



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**Facultad de Ciencias Químicas y
Centro de Química-Instituto de Ciencias
Posgrado en Ciencias Químicas**

**Tesis presentada para obtener el grado de
Doctorado en Ciencias Químicas en el área de Química Orgánica**

**"Síntesis y evaluación biológica de nuevos azaderivados
esteroidales y sacarídicos"**

Presenta:

M.Q.B. Ana Isabel Ahuja Casarín

Directora de tesis

Dra. Sara Montiel Smith

Co-Directora de tesis

Dra. Penélope Merino Montiel

Enero 2021



El presente trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la dirección de las doctoras Sara Montiel Smith y Penélope Merino Montiel. El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) me otorgó la beca doctoral No. 442936, así como una beca mixta para realizar una estancia en la Universidad de Sevilla, España. Gracias a esta estancia se desarrolló una parte del segundo capítulo que se presenta en esta tesis, bajo la tutela del Dr. Oscar López López.

Además, se agradece a CONACyT-México por el apoyo financiero a los proyectos de Ciencia Básica 240329 a SMS y 257465 a PMM. Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021.

Oficio de aprobación de la comisión revisora de tesis



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Socorro Meza Reyes, Dr. José Luis Vega Báez, Dr. Oscar López y López, Dr. Jesús Sandoval Ramírez y la Dra. Anabel Romero López, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Síntesis y evaluación biológica de nuevos azaderivados esteroideos y sacarídicos”**, que presenta la alumna **M.C. Ana Isabel Ahuja Casarín** para obtener el grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los doce días del mes de enero del año dos mil veintiuno.

ATENTAMENTE

Dra. Socorro Meza Reyes

Dr. José Luis Vega Báez

Dr. Oscar López López

Dr. Jesús Sandoval Ramírez

Dra. Anabel Romero López

Posgrado en Ciencias Químicas
FCQ - ICUAP

Edif. 105 I, Ciudad Universitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue.
C.P. 72570
01 (222) 2 29-55-00 Ext. 7307

Tuning the activity of iminosugars: novel *N*-alkylated deoxynojirimycin derivatives as strong BuChE inhibitors

Ana I. Ahuja-Casarin^a, Penélope Merino-Montiel^a, José Luis Vega-Baez^a, Sara Montiel-Smith^a, Miguel X. Fernandes^b, Irene Lagunes^c, Inés Maya^c, José M. Padrón^b, Óscar López^c and José G. Fernández-Bolaños^c

^aFacultad de Ciencias Químicas, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México; ^bBioLab, Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González" (IUBO-AG), Universidad de La Laguna, La Laguna, Spain; ^cDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

ABSTRACT

We have designed unprecedented cholinesterase inhibitors based on 1-deoxynojirimycin as potential anti-Alzheimer's agents. Compounds are comprised of three key structural motifs: the iminosugar, for interaction with cholinesterase catalytic anionic site (CAS); a hydrocarbon tether with variable lengths, and a fragment derived from 2-phenylethanol for promoting interactions with peripheral anionic site (PAS). Title compounds exhibited good selectivity towards BuChE, strongly depending on the substitution pattern and the length of the tether. The lead compounds were found to be strong mixed inhibitors of BuChE ($K_{S1} = 1.8$ and $1.9 \mu\text{M}$). The presumptive binding mode of the lead compound was analysed using molecular docking simulations, revealing H-bond interactions with the catalytic subsite (His438) and CAS (Trp82 and Glu197) and van der Waals interactions with PAS (Thr284, Pro285, Asn289). They also lacked significant antiproliferative activity against tumour and non-tumour cells at $100 \mu\text{M}$, making them promising new agents for tackling Alzheimer's disease through the cholinergic approach.

GRAPHICAL ABSTRACT

ARTICLE HISTORY

Received 21 September 2020
Revised 18 October 2020
Accepted 23 October 2020

KEYWORDS

iminosugars; 1-DNJ; cholinesterase inhibitors; anti-Alzheimer's agents; docking simulations

Introduction

Imino- and azasugars, that is, carbohydrate mimetics where the endocyclic oxygen or a carbon atom, respectively, has been replaced by a nitrogen atom that has attracted great attention within Medicinal Chemistry since several decades ago¹. The key structural motif of such glycomimetics is a protonable nitrogen atom, which might allow them to mimic transition states (in terms of charge and geometry)² of the glycosidase-mediated hydrolysis of glycosidic bonds. Because of this, many imino- and azasugars behave as potent inhibitors of ubiquitous glycosidases and glycosyltransferases³, key enzymes in a plethora of biological processes where carbohydrates are involved, including metabolic pathways, cell wall formation, and recognition events. Numerous imino- and azasugars have shown relevant pharmacological activities⁴, such as antidiabetic⁴, anticancer⁵, antifungal⁶, antiprotazoal⁷ or antiviral agents⁸, among others. In this sense, Sirona Biochem Corp. has just announced⁹ the launching of an intense programme searching for new antivirals for combating the pandemic caused by COVID-19, in which iminosugars are one of the three categories in the study. This choice is strongly supported by the World Laureates Association Shanghai Centre. Some iminosugars have also been found to act as chaperones¹⁰ against lysosomal storage disorders, like Gaucher's¹¹ and Fabry's¹² diseases. Iminosugars have also been found to be effective against cystic fibrosis¹³, an autosomal recessive disease-causing severe multi-system organ

damage, particularly to the respiratory system. Iminosugars can act as correctors of defective cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)^{14,15}, an ABC transporter-class protein that controls the content of ion and water in epithelial cells, or alternatively they can reduce the inflammatory response of pathogens, like *P. aeruginosa*¹⁶. More recently, conjugation of iminosugars with sulphonamides resulted in the inhibition of relevant human carbonic anhydrases¹⁷. Among the vast number of iminosugars and related structures reported so far, 1-deoxynojirimycin (1-DNJ), a natural iminosugar isolated from mulberry leaves¹⁸, is the basis for the so far two marketed drugs derived from iminosugars: Miglitol[®] (*N*-hydroxyethyl-1-deoxynojirimycin)¹⁹ and Zavesca[®] (*N*-butyl-1-deoxynojirimycin)²⁰, used for tackling non-insulin-dependent diabetes, and Gaucher's disease, respectively.

Nevertheless, a field that still remains relatively unexplored concerning iminosugars is Alzheimer's disease. Alzheimer's is a devastating neurodegenerative disease, considered nowadays the most prevalent form of dementia, counting for roughly 70% of total cases²¹. It causes severe impairment of cognitive functionality, neurodegeneration, and even Parkinsonian symptoms, leading the patient to a complete dependence even for accomplishing daily tasks²². According to the World Alzheimer Report 2019, roughly 50 million people have been diagnosed worldwide, and this number is expected to increase almost exponentially to 152 million people by 2050²³. Another worrying aspect is that, although Alzheimer's

CONTACT Penélope Merino-Montiel penelope.merino@correo.buap.mx  Facultad de Ciencias Químicas, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, México; José M. Padrón jmpadron@ull.es  BioLab, Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González" (IUBO-AG), Universidad de La Laguna, c/Astrofísico Francisco Sánchez 2, La Laguna E-38206, Spain; Óscar López osc-lopez@us.es  Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Apartado 1203, Sevilla E-41071, Spain

 Supplemental data for this article can be accessed [here](https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1867191).

© 2020 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Aspectos relevantes de esta tesis fueron presentados en los congresos, simposios o foros académicos abajo descritos.

Ana Isabel Ahuja Casarín, Óscar López López, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith. **Diseño y síntesis de nuevos derivados de iminoazúcares como inhibidores de acetilcolinesterasa.** XXIV Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas. Puebla, México. 11-15 de noviembre de 2019

Ana Isabel Ahuja Casarín, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith. **Compuestos esteroideos conteniendo heterociclos nitrogenados: Síntesis y evaluación de su actividad antiproliferativa y antioxidante.** XXI Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas. Puebla, México. 24-28 de octubre de 2016.

Ana Isabel Ahuja Casarín, Penélope Merino Montiel, Socorro Meza Reyes, Sara Montiel Smith. **Formación de compuestos espiro benzofusionados a partir de dehidroandrosterona.** XV Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica. Cuernavaca, Morelos, México. 11-12 de abril de 2019.

Ana Isabel Ahuja Casarín, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith, Irene Lagunes, José M. Padrón, Inés Maya, José G. Fernández Bolaños, Óscar López López. **Síntesis y evaluación biológica de derivados sacarídicos de tipo iminoazúcar como inhibidores de glucosidasas y acetilcolinesterasa.** VII Encuentro de la Investigación en las Ciencias Químicas. Puebla, México. 23 de noviembre de 2018.

Aidee Viviana Cruz Morelos, Ana Isabel Ahuja Casarín, Penélope Merino Montiel, José Luis Vega Báez, Socorro Meza Reyes, Sara Montiel Smith. **Obtención de benzotiazolinas de androsterona.** VII Encuentro de la Investigación en las Ciencias Químicas. Puebla, México. 23 de noviembre de 2018.

Ana Isabel Ahuja Casarín, Penélope Merino Montiel, Socorro Meza Reyes, Sara Montiel Smith. **Síntesis de derivados benzotiazolina y benzazolina espiroesteroidales.** L Congreso Nacional de Ciencias Farmacéutica, Tequila, Jalisco. 3-7 de septiembre de 2017.

Ana Isabel Ahuja Casarín, Sara Montiel Smith, Penélope Merino Montiel, Socorro Meza Reyes. **Formación de espiroesteroides conteniendo un grupo benzotiazolina.** XIII Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica. Villahermosa, Tabasco. 3-7 de abril de 2017.

Ana Isabel Ahuja Casarín, Penélope Merino Montiel, Socorro Meza Reyes, Sara Montiel Smith. **Síntesis de derivados disustituídos espiro benzofusionados, a partir de androsterona.** 15ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. San Luis Potosí, SLP, México. 22-25 de mayo de 2019.

Óscar López, Paloma Begines, Jesús Roldán-Peña, Inés Maya, Laura L. Romero-Hernández, Ana I. Ahuja, Alma Fuentes-Aguilar, Ailed Arenas-González, Socorro Meza-Reyes, José L. Vega-Báez, Penélope Merino-Montiel, Sara Montiel-Smith, Gabriela B. Plata, Irene Lagunes, José M. Padrón, José G. Fernández-Bolaños. **ROS and antiproliferative agents.** New Diagnostic and Therapeutic Tools against Multidrug-Resistant Tumours. First Working-Group Meeting. Turín, Italia. 30-31 de enero de 2019.

Ana Isabel Ahuja Casarín, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith, Irene Lagunes, José M. Padrón, Inés Maya, José G. Fernández Bolaños, Óscar López López. **Síntesis de nuevos derivados de iminoazúcares híbridos como inhibidores de glicosidasas y acetilcolinesterasa.** Congreso Iberoamericano de Química y XXIX Congreso Peruano de Química. Lima, Perú. 16-19 de octubre de 2018.

Óscar López, Ana I. Ahuja, Gerardo Sánchez, Socorro Meza-Reyes, José L. Vega-Báez, Penélope Merino-Montiel, Sara Montiel-Smith, Irene Lagunes, Alexis Galán, Miguel X. Fernandes, José M. Padrón, Inés Maya, José G. Fernández-Bolaños. **Tuning the activities of iminosugars.** 29th International Carbohydrates Symposium. Lisboa, Portugal. 14-19 de julio de 2018.

Ahuja, A.I., Sánchez, G., López, Ó., Maya, I., Merino-Montiel, P., Meza-Reyes, S., Vega-Báez, J.L., Montiel-Smith, S., Lagunes, I., Galán, A., Fernandes, M.X., Padrón J.J., Fernández-Bolaños, J.G. **Nuevos Derivados de iminoazúcares como inhibidores de glicosidasas y acetilcolinesterasa.** X Reunión de Jóvenes Farmacólogos de Andalucía. Granada, España. 3 de julio de 2018.

Ana Isabel Ahuja Casarín, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith, José M. Padrón, Inés Maya, José G. Fernández Bolaños, Óscar López López. **Diseño, síntesis y docking molecular de nuevos sistemas híbridos iminoazúcares-polifenoles como inhibidores de acetilcolinesterasa, Neuroquímica.** Semana Internacional del Cerebro, Puebla, Pue. 2019.

Ana Isabel Ahuja Casarín, Penélope Merino Montiel, Socorro Meza Reyes, José Luis Vega Báez, Sara Montiel Smith. **Diseño y síntesis del derivado esteroidal: espiro[3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17,5'-imidazolidina]-2'-tiona.** LatinXChem Twitter Conference, Modalidad virtual, 2020.

Ana Isabel Ahuja Casarín, Penélope Merino Montiel, Socorro Meza Reyes, Sara Montiel Smith. **Diseño, síntesis y evaluación biológica de esteroides benzofusionados.** VI Simposio de química farmacéutica. Modalidad virtual, 4 al 6 de noviembre de 2020.

Ana Isabel Ahuja Casarín, Penélope Merino Montiel, Socorro Meza Reyes, Sara Montiel Smith. **Obtención de iminas intermediarias en la formación de benzotiazolinas esteroideas.** 6a reunión de RMN, Modalidad virtual, 12 y 13 de noviembre de 2020.

Ana Isabel Ahuja Casarín, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith, José M. Padrón, Miguel X. Fernandes, Irene Lagunes, Óscar López López. **Diseño de sistemas híbridos iminoazúcares-polifenoles como nuevos inhibidores enzimáticos.** 1er simposio de exalumnos de la maestría en Química Bioorgánica, Modalidad virtual, 9 de diciembre de 2020.

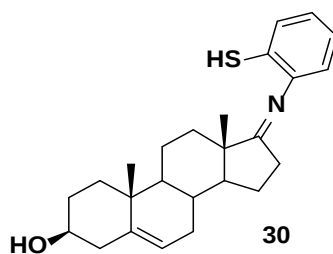
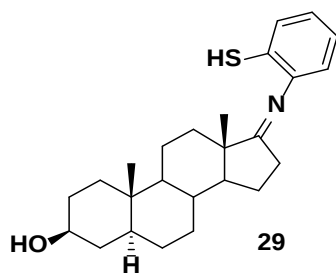
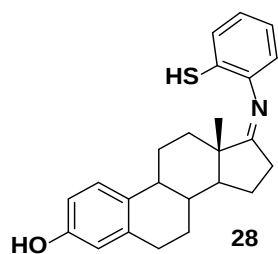
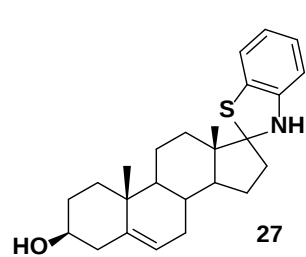
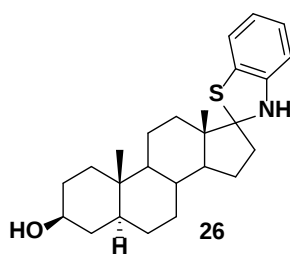
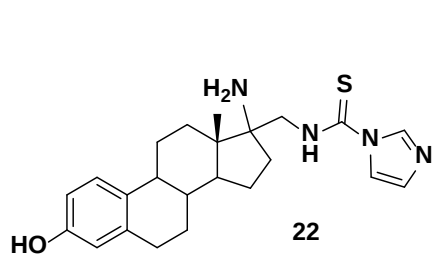
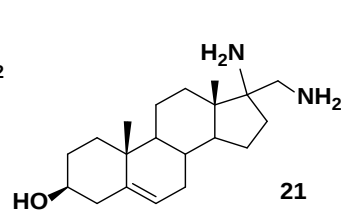
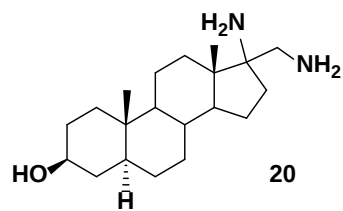
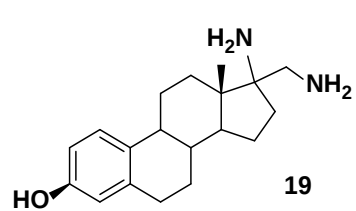
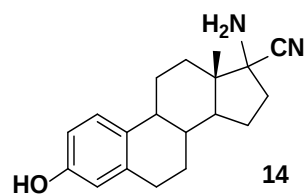
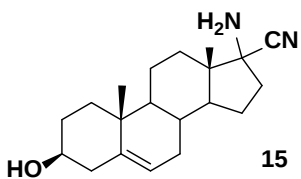
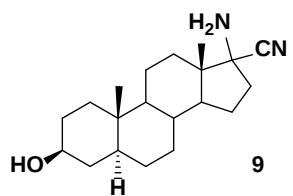
Lista de Siglas y acrónimos

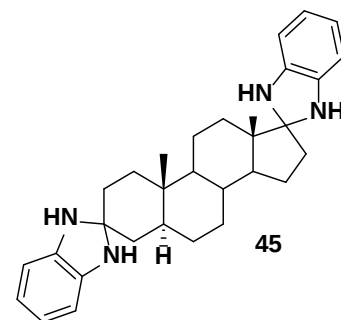
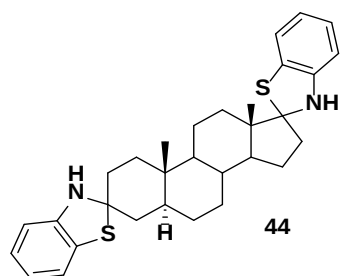
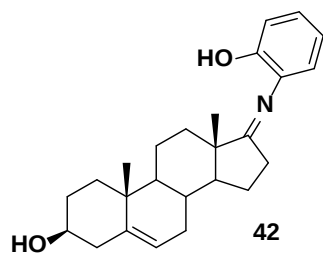
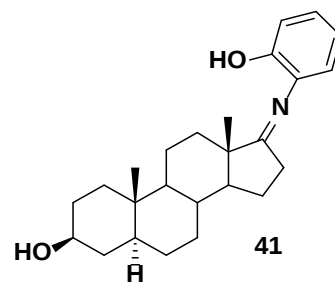
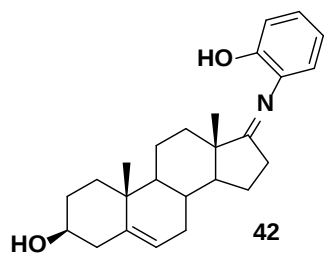
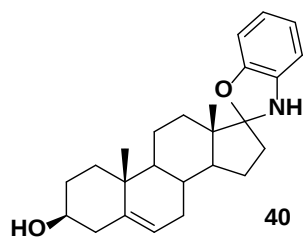
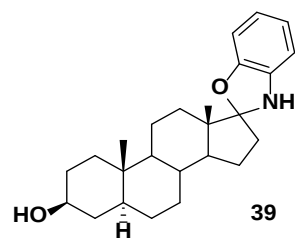
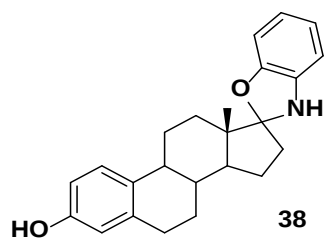
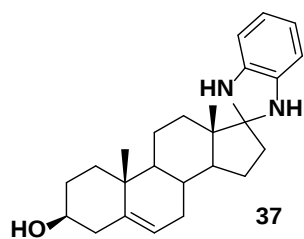
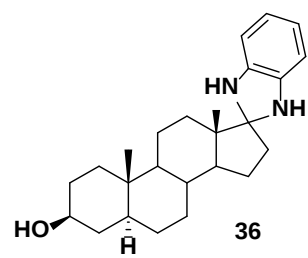
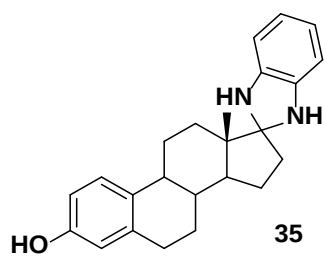
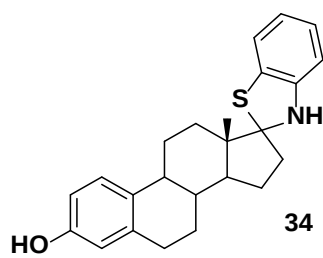
A549	células cancerosas no pequeñas de pulmón
Abs. Vs t	representación gráfica de la variación de la absorbancia contra tiempo
Abs/s	variación de absorbancia contra el tiempo
AChE	acetilcolinesterasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
APTS	ácido <i>para</i> -toluensulfónico
Ax	axial
CAS	sitio aniónico catalítico
CEP	5 α ,8 α -epidioxicolest-6-en-3 β -ol
COSY	COrrrelation SpectroscopY
CYP-17	citocromo P-17
d	doblete
DCM	diclorometano
dd	doble de dobles
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DNJ	1-desoxinojirimicina
DTNB	5,5'-ditiobis(acido 2-nitrobenzoico)
ec	ecuatorial
FEA	2-feniletilamina
GALC	galactosilceramidasa o galactocerebrosidasa
GI₅₀	concentración inhibitoria media
HBL-100	células de cáncer de seno
HeLa	células de cáncer de cérvix
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HT	hidroxitirosol
Hx	hexano
IC₅₀	concentración inhibitoria media

iNOS	sintasa de óxido nítrico inducible
IR	infrarrojo
<i>J</i>	constante de acoplamiento
Ka	constante de disociación acida
Ki	constante de inhibición
Kia	contante de inhibición de enzima libre
Kib	constante de inhibición de Complejo enzima-sustrato unido a otra posición de la enzima
Km	constante de Michaelis-Menten
m/z	relación masa carga
m	multiplete
NB-DNJ	N-butil-desoxinojirimicina
NOESY	NOE SpectroscopY
P53	proteína involucrada en el ciclo celular
PAS	sitio aniónico periférico
PCC	cloro cromato de piridinio
ppm	partes por millón
PPTS	<i>para</i> -toluensulfonato de piridinio
<i>p</i>-TsOH	ácido <i>para</i> -toluensulfónico
Py	piridina
q	cuádruple o cuadruplete
Rf	relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa
RNS	especies reactivas de nitrógeno
ROS	especies reactivas de oxígeno
s	singulete
SW1573	células cancerosas pequeñas de pulmón
ta	temperatura ambiente
t	triplete
T-47D	células cáncer de mama
TBAF	floruro de tetrabutilamonio

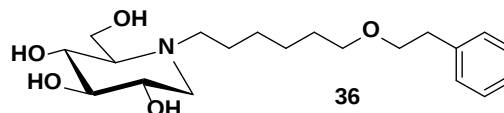
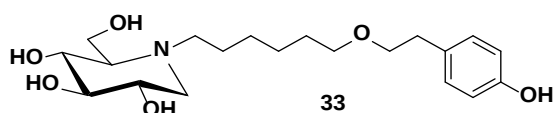
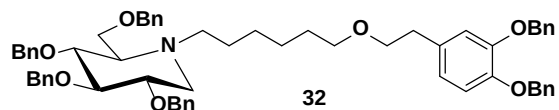
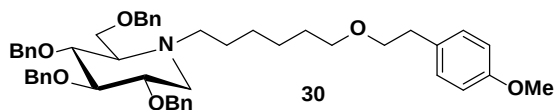
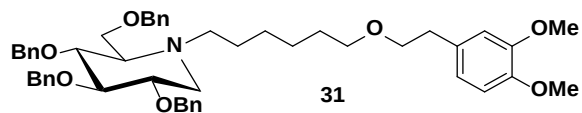
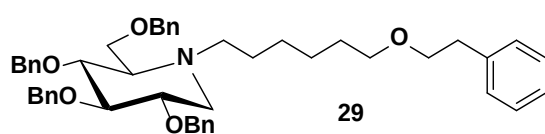
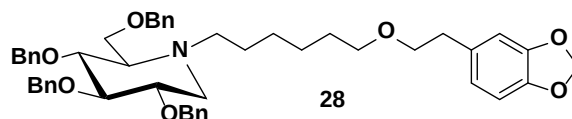
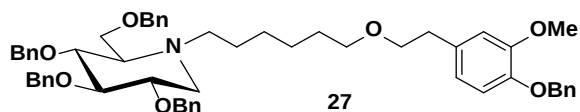
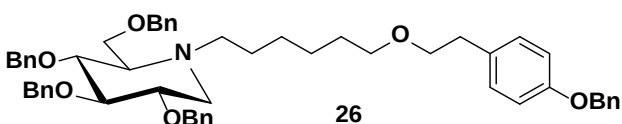
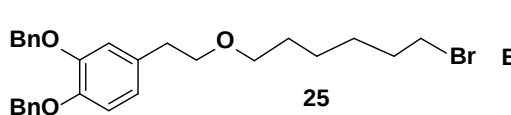
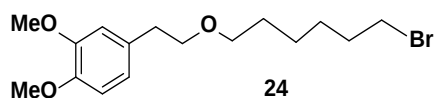
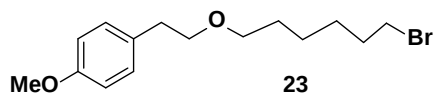
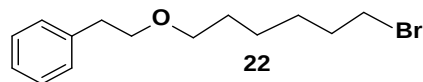
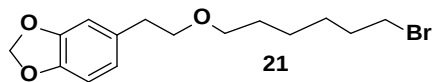
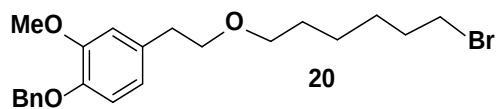
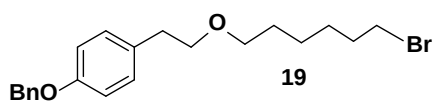
TBAI	yoduro de tetrabutilamonio
TBDPSCI	cloruro de terbutildifenilsilano
TCDI	1,1-tiocarbonil-di-imidazol
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TLC	cromatografía en capa fina
TMSCN	cianuro de trimetilsilano
V	velocidad de la reacción a determinadas condiciones de [S] y en presencia de una determinada concentración de inhibidor
VIH	virus de inmunodeficiencia humana
V_{max app}	velocidad máxima aparente
$\tilde{\nu}_{\text{máx}}$	número de onda en cm^{-1}
V_{max}	velocidad máxima
V_o	velocidad de la reacción a unas determinadas condiciones de [S], y en ausencia de inhibidor
WiDr	células cancerosas de colon
δ	desplazamiento químico en ppm
[I]	concentración del inhibidor
[S]	concentración del sustrato enzimático
®	símbolo de marca registrada
^{13}C RMN	resonancia magnética nuclear de carbono
^1H RMN	resonancia magnética nuclear de protón

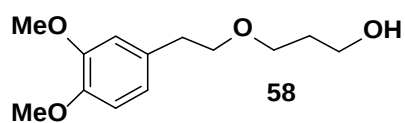
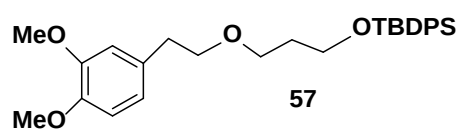
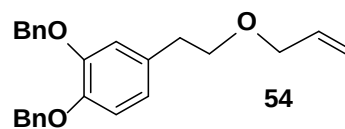
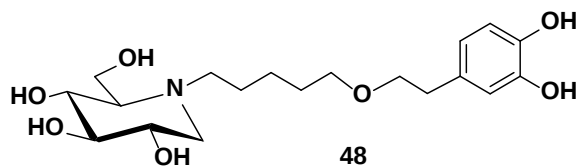
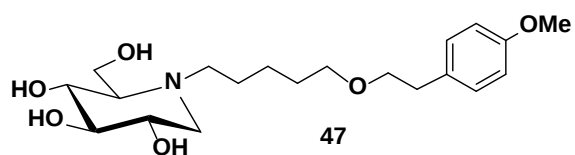
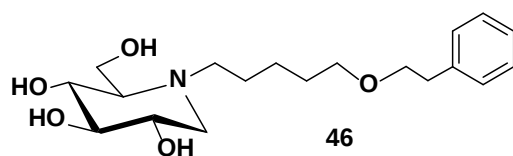
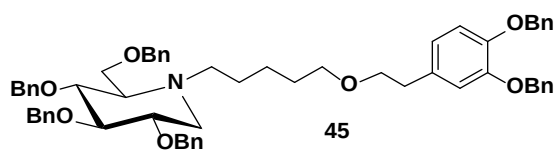
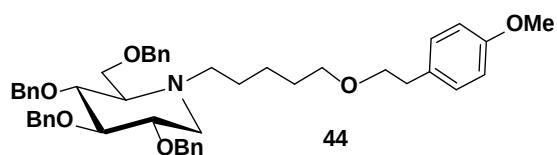
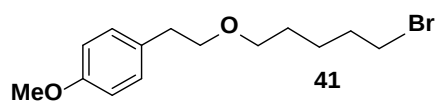
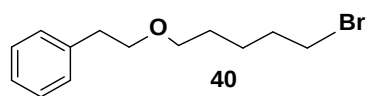
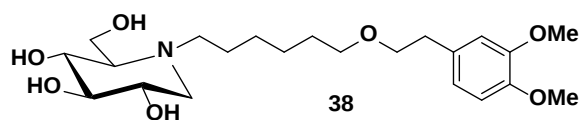
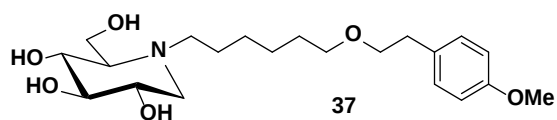
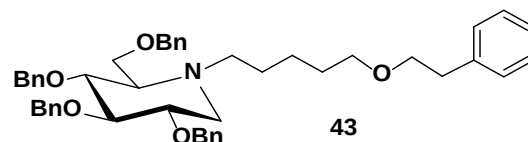
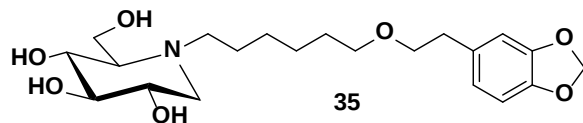
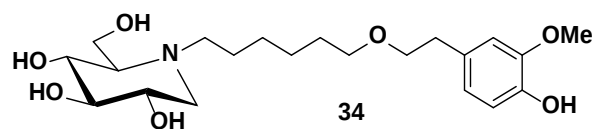
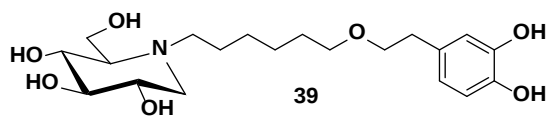
Nuevos compuestos del primer capítulo

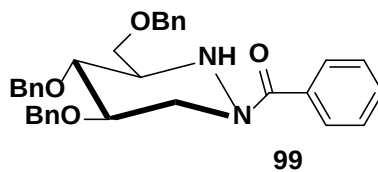
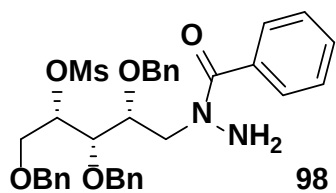
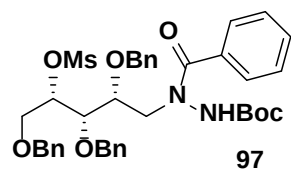
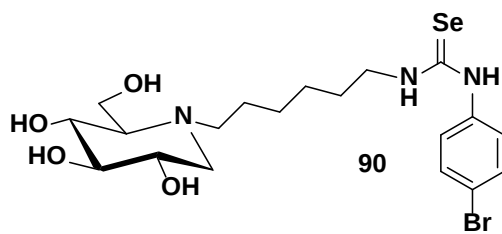
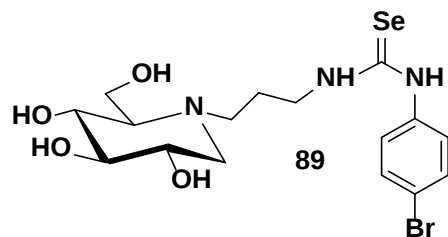
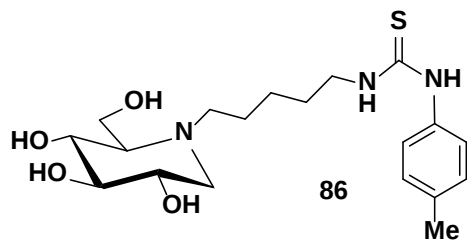
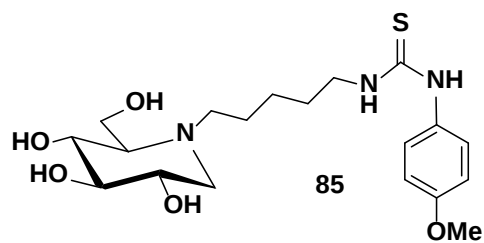
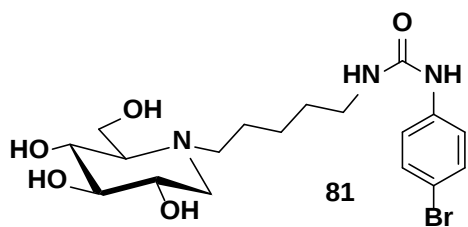
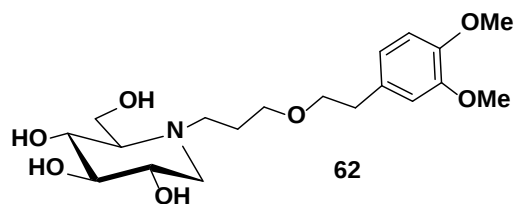
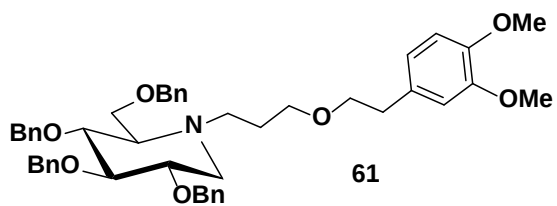
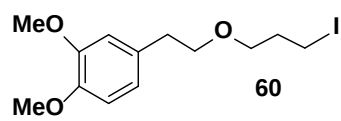
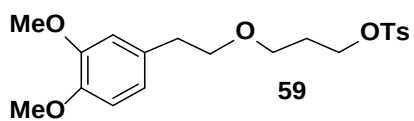


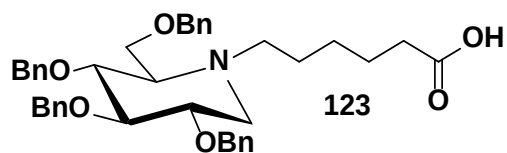
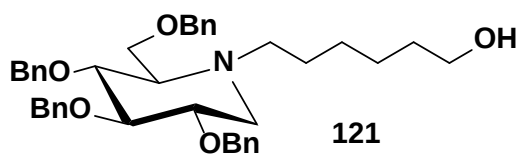
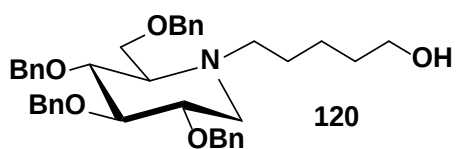
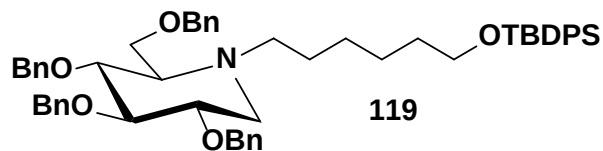
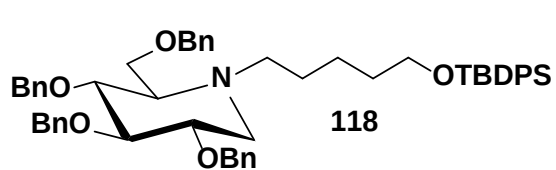
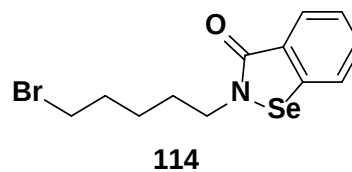
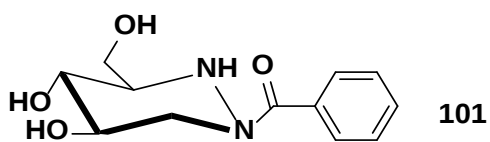


Nuevos compuestos del segundo capítulo









INDICE CAPITULO I

I. Resumen	II
I. Abstract	IV
I.1. Introducción	1
I.2. Antecedentes	3
I.2.1. Cáncer	3
I.2.2. Fármacos anticancerígenos	4
I.2.3. Productos naturales	4
I.2.4. Esteroides	5
I.3. Objetivos	11
I.4. Resultados y discusión	12
I.4.1. Reacción de protección del grupo hidroxilo sobre C-3	12
I.4.2. Síntesis del α -aminonitrilo sobre C-17	16
I.4.3. Obtención del derivado diamino esteroideal	24
I.4.4. Funcionalización de los diaminos esteroidales	27
I.4.5. Síntesis de espiroesteroides con un fragmento de tipo benzotiazolina sobre la posición 17 de estrona (1), <i>trans</i> -androsterona (2) y <i>trans</i> -dehidroandrosterona (3)	33
I.4.6. Síntesis de espiroesteroides con un fragmento de tipo benzimidazolina sobre la posición 17 de estrona, <i>trans</i> -androsterona y <i>trans</i> -dehidroandrosterona.....	47
I.4.7. Síntesis de espiroesteroides con un fragmento de tipo benzoxazolina sobre la posición 17 de estrona, <i>trans</i> -androsterona y <i>trans</i> -dehidroandrosterona.....	52
I.4.8. Síntesis de espiroesteroides disustituídos en la posición 3 y 17 de <i>trans</i> -androsterona (2) con grupos benzotiazolina y benzimidazolina	60
I.5. Ensayos de antiproliferación	66
I.6. Estudios computacionales	68
I.6.1. Estabilidad energética y análisis de población	69
I.6.2. Cálculos de ^{13}C RMN	75
I.6.3. Docking molecular sobre Bcl2 (2O2F)	76
I.7. Conclusiones	81
I.8. Sección experimental	83

INDICE CAPITULO II

II. Resumen	115
II. Abstract	119
II.1. Introducción	124
II.2. Antecedentes.....	127
II.2.1. Iminoazúcares y aza-azúcares	127
II.2.2. Glicosidasas	129
II.2.3. Enfermedades de almacenamiento lisosomal	130
II.2.4. Inhibidores de glicosidasas.....	131
II.2.5. Piperidinas polihidroxiladas	133
II.2.6. Azafagomina.....	134
II.2.7. Actividad biológica de iminoazúcares.....	136
II.2.8. Fármacos derivados de iminoazúcares	137
II.2.9. Alzheimer.....	139
II.2.10. Selenio y derivados.....	140
II.3. Objetivos.....	141
II.4. Discusión de Resultados y análisis espectroscópico	143
II.4.1. Obtención de 1-desoxinojirimicina.....	143
II.4.1.1. Reacción de protección del α -D-glucopiranosido.....	144
II.4.1.2. Reacción de hidrolisis del metilglicósido	144
II.4.1.3. Reacción de reducción del hemiacetal	146
II.4.1.4. Oxidación de Swern y doble aminación reductiva	148
II.4.2. Preparación de fragmentos para alquilación del iminoazúcar.....	149
II.4.3. Alquilación del iminoazúcar	157
II.4.4. Desprotección de grupos hidroxilo	161
II.4.5. Obtención de derivados con espaciador de 5 átomos de carbono	163
II.4.6. Obtención de derivados con espaciador de 3 átomos de carbono	172
II.4.7. Formación de ureas tioureas y selenoureas derivadas de iminoazúcares.....	177
II.4.7.1. Formación de urea de <i>p</i> -bromoanilina	184
II.4.7.2. Síntesis de tioureas	186
II.4.7.3. Formación de selenoureas.....	190
II.4.8. Síntesis de derivados de azafagomina	195
II.4.9. Derivados de ebselen y donepezilo.....	203

II.4.9.1. Síntesis de derivados de ebselen	203
II.4.9.2. Síntesis de derivados de donepezilo	214
II.5. Actividad biológica	222
II.5.1. Evaluación de inhibición enzimática.....	222
II.5.2. Estudios de Docking.....	257
II.5.3. Datos de antiproliferación.....	262
II.6. Conclusiones.....	263
II.7. Sección experimental	265
I.8. Referencias bibliográficas capítulo I.....	336

Lista de figuras capítulo I

Figura I.1. Estructuras de heterocíclicos de interés farmacológico

Figura I.2. Compuestos esteroidales utilizados como fármacos anticancerígenos

Figura I.3. Estructura y numeración del ciclopenta[*a*]fenantreno descrita por la IUPAC

Figura I.4. Colesterol, esterol ampliamente distribuido en el reino animal

Figura I.5. Espiroxindoles en estudio clínico y moléculas relacionadas

Figura I.6. Derivados esteroidales con una porción tipo hidrazona con potente actividad antiproliferativa

Figura I.7. 5 α ,8 α -epidioxicolest-6-en-3 β -ol

Figura I.8. Heterociclos nitrogenados a partir de estrona (**1**), *trans*-androsterona (**2**) y *trans*-dehidroandrosterona (**3**)

Figura I.9. Derivados esteroidales de tipo benzotiazolina, benzoxazolina y benzimidazolina

Figura I.10. Materias primas utilizadas en este trabajo. Estrona (**1**), *trans*-androsterona (**2**) y *trans*-dehidroandrosterona (**3**)

Figura I.11. Gráfica de valores de antiproliferación de los derivados esteroidales

Lista de esquemas capítulo I

Esquema I.1. Ensayo para la reacción de protección de **2** con bromuro de bencilo

Esquema I.2. Reacciones de protección de los grupos hidroxilos de **1** y **2** mediante la formación de un éster metílico

Esquema I.3. Reacciones sobre el C-17 de la estrona (**1**)

Esquema I.4. Reacciones sobre el C-17 de la *trans*-androsterona (**2**)

Esquema I.5. Adición del grupo nitrilo sobre el C-17 de la imina sustituida **10**

Esquema I.6. Adición del grupo nitrilo a las oximas **4** y **7** de estrona y *trans*-androsterona, respectivamente

Esquema I.7. Formación de la mezcla de amida y aminonitrilo a partir de estrona (**1**), *trans*-androsterona (**2**) y *trans*-dehidroandrosterona (**3**) con cianuro de potasio y cloruro de amonio

Esquema I.8. Formación de aminonitrilo de *trans*-dehidroandrosterona **15**

Esquema I.9. Formación del derivado diamino **19**, a partir de la mezcla aminonitrilo y amida de estrona **14** y **16** con LiAlH₄

Esquema I.10. Formación de los derivados diamino **20** y **21**, a partir de la mezcla de aminonitrilo y amida de *trans*-androsterona **9** y **17** y de la *trans*-dehidroandrosterona **15** y **18** respectivamente, con LiAlH_4

Esquema I.11. Formación de intermediario **22** a partir del derivado diamino de estrona **19**

Esquema I.12. Reacción para la formación de espiro derivados de tipo urea **24**

Esquema I.13. Reacción para la formación del espiro derivado tipo urea **25**

Esquema I.14. Condiciones de reacción para la formación de espiro derivados utilizando aminotiofenol

Esquema I.15. Formación de benzotiazolinas y subproductos de *trans*-androsterona **26** y **29** y de *trans*-dehidroandrosterona **27** y **30**

Esquema I.16. Formación del líquido iónico **33**

Esquema I.17. Formación de benzotiazolina de estrona y *trans*-androsterona

Esquema I.18. Formación de epímeros según el ataque nucleofílico de las caras diastereotópicas del C-17

Esquema I.19. Influencia del átomo de **S** con respecto al de **N** en el impedimento estérico

Esquema I.20. Probable mecanismo de reacción para la formación de benzotiazolinas a partir de *trans*-dehidroandrosterona, con APTS

Esquema I.21. Probable mecanismo de reacción para la formación de espiroesteroides tipo benzotiazolinas a partir de *trans*-androsterona empleando líquido iónico como catalizador

Esquema I.22. Formación de espiro derivados con fenilendiamino en tolueno

Esquema I.23. Condiciones de reacción para la formación de espiro derivados con aminofenol

Esquema I.24. Formación de la benzoxazolina **40** a partir de la *trans*-dehidroandrosterona (**3**)

Esquema I.25. Formación de benzoxazolina **39** de *trans*-androsterona

Esquema I.26. Reacción de oxidación de la *trans*-androsterona (**2**)

Esquema I.27. Condiciones de reacción para la formación del derivado disustituido **44**

Esquema I.28. Condiciones de reacción para formación del derivado disustituido **45**

Esquema I.29. Condiciones de reacción para la formación de benzofusionados disustituidos
Ver si mejor se pueden poner estas condiciones en los esquemas anteriores

Lista de espectros capítulo I

- Espectro I.1.** Espectro de ^1H RMN de acetato de androsterona (2b)
- Espectro I.2.** Espectro de ^1H RMN de acetato de estrona (1a)
- Espectro I.3.** Espectro de ^{13}C RMN de acetato de estrona (1a)
- Espectro I.4.** Espectro de ^{13}C RMN de acetato de androsterona (2b)
- Espectro I.5.** Espectro de ^1H RMN de aminonitrilo de dehidroandrosterona (15)
- Espectro I.6.** Espectro de ^{13}C RMN de aminonitrilo de dehidroandrosterona (15)
- Espectro I.7.** Espectro de ^1H RMN de aminonitrilo de androsterona (9)
- Espectro I.8.** Espectro de ^{13}C RMN de aminonitrilo de androsterona (9)
- Espectro I.9.** Espectro de ^1H RMN de aminonitrilo de estrona (14)
- Espectro I.10.** Espectro de ^{13}C RMN de aminonitrilo de estrona (14)
- Espectro I.11.** Espectro ^1H RMN de diamino de estrona (19)
- Espectro I.12.** Espectro ^{13}C RMN de diamino de estrona (19)
- Espectro I.13.** Espectro ^1H RMN de diamino de androsterona (20)
- Espectro I.14.** Espectro ^{13}C RMN de diamino de androsterona (20)
- Espectro I.15.** Espectro ^1H RMN de intermediario 22
- Espectro I.16.** Espectro ^{13}C RMN de intermediario 22
- Espectro I.17.** Espectro de ^1H RMN benzotiazolina de androsterona (26)
- Espectro I.18.** Espectro de ^{13}C RMN benzotiazolina de androsterona (26)
- Espectro I.19.** Espectro de ^1H RMN imina intermediaria benzotiazolina de androsterona (29)
- Espectro I.20.** Espectro de ^{13}C RMN imina intermediaria benzotiazolina de androsterona (29)
- Espectro I.21.** Espectro de ^1H RMN benzotiazolina de dehidroandrosterona (27)
- Espectro I.22.** Espectro de ^{13}C RMN benzotiazolina de dehidroandrosterona (27)
- Espectro I.23.** Espectro de ^1H RMN de imina intermediaria de dehidroandrosterona (30)
- Espectro I.24.** Espectro de ^{13}C RMN de imina intermediaria de dehidroandrosterona (30)
- Espectro I.25.** Espectro de ^1H RMN de líquido iónico (33)
- Espectro I.26.** Espectro de ^{13}C RMN de líquido iónico (33)
- Espectro I.27.** Espectro de ^1H RMN de imina intermediaria de estrona (28)
- Espectro I.28.** Espectro de ^{13}C RMN de imina intermediaria de estrona (28)
- Espectro I.29.** Espectro de ^1H RMN de benzotiazolina de estrona (34)
- Espectro I.30.** Espectro de ^{13}C RMN de benzotiazolina de estrona (34)

- Espectro I.31.** Espectro de ^1H RMN de benzimidazolina de androsterona (36)
- Espectro I.32.** Espectro de ^{13}C RMN de benzimidazolina de androsterona (36)
- Espectro I.33.** Espectro de ^1H RMN de benzimidazolina de estrona (35)
- Espectro I.34.** Espectro de ^{13}C RMN de benzimidazolina de estrona (35)
- Espectro I.35.** Espectro de ^1H RMN de benzimidazolina de dehidroandrosterona (37)
- Espectro I.36.** Espectro de ^{13}C RMN de benzimidazolina de dehidroandrosterona (37)
- Espectro I.37.** Espectro de ^1H RMN de imina intermediaria 41
- Espectro I.38.** Espectro de ^{13}C RMN de imina intermediaria 41
- Espectro I.39.** Espectro de ^1H RMN de benzoxazolina de androsterona (39)
- Espectro I.40.** Espectro de ^{13}C RMN de benzoxazolina de androsterona (39)
- Espectro I.41.** Espectro de ^1H RMN de benzoxazolina de dehidroandrosterona (40)
- Espectro I.42.** Espectro de ^{13}C RMN de benzoxazolina de dehidroandrosterona (40)
- Espectro I.43.** Espectro de ^1H RMN de imina intermediaria 42
- Espectro I.44.** Espectro de ^{13}C RMN de imina intermediaria 42
- Espectro I.45.** Espectro de ^1H RMN de benzoxazolina de estrona (38)
- Espectro I.46.** Espectro de ^{13}C RMN de benzoxazolina de estrona (38)
- Espectro I.47.** Espectro de ^1H RMN de dicetónico androsterona (43)
- Espectro I.48.** Espectro de ^{13}C RMN de dicetónico androsterona (43)
- Espectro I.49.** Espectro de IR de dicetónico androsterona (43)
- Espectro I.50.** Espectro de IR de disustituido benzotiazolina (44)
- Espectro I.51.** Espectro de IR de disustituido benzimidazolina (45)
- Espectro I.52.** Espectro ^1H RMN de disustituido benzotiazolina (44)
- Espectro I.53.** Espectro ^1H RMN de disustituido benzimidazolina (45)
- Espectro I.54.** Espectro ^{13}C RMN de disustituido benzotiazolina (44)

Lista de tablas capítulo I

Tabla I.1. Disolventes empleados en la reacción de reducción de los grupos aminonitrilo y aminoamida

Tabla I.2. Condiciones ensayadas para la obtención de la espirotiourea a partir del derivado diamino de la *trans*-androsterona 21 y el 1,1-tiocarbonil-di-imidazol

Tabla I.3. Desplazamientos químicos de ^{13}C de RMN de la tiourea cíclica 23

Tabla I.4. Condiciones de reacción ensayadas para la formación de espiroureas sin obtener los resultados esperados

Tabla I.5. Condiciones de reacción ensayadas para la síntesis de benzoxazolinas, a partir de 1, 2 o 3 de manera indistinta, sin obtener el resultado deseado

Tabla I.6. Valores GI₅₀ de la actividad antiproliferativa de derivados esteroidales contra diferentes líneas celulares de cáncer humano

Lista de figuras capítulo II

Figura II.1. Diagrama general de iminoazúcares con porción fenólica

Figura II.2. Diagrama general de ureas, tioureas y selenoureas derivadas de DNJ

Figura II.3. Diagrama general de derivados de azafagomina

Figura II.4. Nuevos derivados de tipo iminoazúcar

Figura II.5. Iminoazúcares

Figura II.6. Fármacos inhibidores de glucosidasas

Figura II.7. Fármacos contra el Alzheimer

Figura II.8. Ebselen

Figura II.9. Nojirimicina

Figura II.10. Algunos ejemplos de polihidroxipiperidinas

Figura II.11. Inhibidores de glicosidasas

Figura II.12. Derivados propil fenil-azafagomina

Figura II.13. Imino y aza-azúcares muy potentes

Figura II.14. Iminoazúcares naturales

Figura II.15. Rearreglo de Amadori

Figura II.16. Reacción de derivados de azafagomina alquilados en N-2

Figura II.17. Derivado de azafagomina con mejor actividad inhibitoria

Figura II.18. Castanospermina

Figura II.19. Compuestos *N*-arilados de tipo lactamas

Figura II.20. Desoxinojirimicina numerada

Figura II.21. Diagrama general de iminoazúcares con porción fenólica

Figura II.22. Modelo de compuestos de tipo selenourea, urea y tiourea

Figura II.23. Materias primas empleadas para la síntesis de nuevos iminoazúcares

Figura II.24a. Espectro de masas de derivado metoxilado desprotegidos con espaciador de 5 carbonos

Figura II.24b. Espectro de masas de derivado fenólico desprotegidos con espaciador de 5 carbonos

Figura II.24c. Espectro de masas de derivado HT desprotegido con espaciador de 5 carbonos

Figura II.25. Diagrama general de ureas, tioureas y selenoureas derivadas de desoxinojirimicina

Figura II.26. Derivados de ebselen, planteados para síntesis

Figura II.27. Análogos de donepezilo diseñados para síntesis

Figura II.28. Datos de inhibición enzimática para β -glucosidasas

Figura II.29. Evaluación biológica de derivados fenólicos sobre acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

Figura II.30. Estructura del donepezilo y derivados fenolicos sintetizados

Figura II.31. Derivado dimetoxilado de la desoxinojirimicina, con sus valores de inhibición sobre acetilcolinesterasa y donepezilo

Figura II.32. Docking de compuesto dimetoxilado de cadena de 3, 5 y 6

Figura II.33. Aminoácidos presentes en los sitios activos de la acetilcolinesterasa

Figura II.34. Simulación de Docking de la interacción entre derivado dimetoxilado y AChE

Figura II.35. Simulación de Docking de la interacción del derivado dimetoxilado con BuChE

Figura II.36. Simulación de Docking de la interacción del derivado dimetoxilado con BuChE

Lista de esquemas capítulo II

Esquema II.1. Síntesis de 1-Desoxinojirimicina (6)

Esquema II.2. Reacción para obtención de hidroxitirosol (8)

Esquema II.3. Protección quimioselectiva del tirosol (9), alcohol homovanílico (10) e hidroxitirosol (8)

Esquema II.4. Reacción de reducción del ácido 2-(3,4-dimetoxifenil) etanoico (14)

Esquema II.5. Reacción de alquilación de materias primas

Esquema II.6. Reacción de alquilación de la desoxinojirimicina per-O-bencilada

Esquema II.7. Desprotección de los compuestos **26-32**

Esquema II.8. Alquilación de la desoxinojirimicina con espaciador de 5 átomos de carbono

Esquema II.9. Reacción de alquilación de alcoholes con 1,3-dibromopropano (método 1)

Esquema II.9-A. Compuestos formados en la reacción de alquilación en medio básico

Esquema II.10. Reacción de alquilación de alcoholes con 1,3-dibromopropano (método 2)

Esquema II.11. Reacción para formación de derivado de desoxinojirimicina con 3 átomos de carbono

Esquema II.12. Síntesis de yodo azidas

Esquema II.13. Reacción para alquilación de desoxinojirimicina con azidas yodadas

Esquema II.14. Reacción para desprotección de hidroxilos y reducción de azida terminal

Esquema II.15. Reacción de formación de urea de *p*-bromoanilina

Esquema II.16. Síntesis de isotiocianato de *p*-anisidina

Esquema II.17. Reacción para la formación de tioureas

Esquema II.18. Formación del isoselenocianato **88**

Esquema II.19. Formación de selenoureas

Esquema II.20. Formación de selenocarbamato

Esquema II.21. Reacción de transformación de L-xilosa a su forma metil furanósido

Esquema II.22. Reacción de protección de forma furano de L-xilosa (**93**)

Esquema II.23. Reacción de hidrólisis del metoxilo de **94**

Esquema II.24. Reacción de apertura del anillo y aminación reductiva

Esquema II.25. Reacción de benzoilación y mesilación para formación de azafagomina

Esquema II.26. Reacción de eliminación del grupo Boc.

Esquema II.27. Reacción de ciclación de azafagomina bencilada

Esquema II.28. Reacción de alquilación de azafagomina protegida

Esquema II.29. Reacción de desprotección y alquilación de azafagomina benzoilada

Esquema II.30. Reacción para acoplar azafagomina al dimetoxifeniletanal mediante animación reductiva

Esquema II.31. Reacción de formación de diselenuros

Esquema II.32. Reacción de formación de derivados de ebselén

Esquema II.33. Alquilación de iminoazúcar con yodo-azida

Esquema II.34. Reacción secundaria dentro de la reacción de alquilación

Esquema II.35. Formación de diazido-pentano

Esquema II.36. Obtención de la bromo-amina-pentano.

Esquema II.37. Formación de derivado del ebselen **114**

Esquema II.38. Mecanismo de reacción de formación de derivado de ebselen (**114**)

Esquema II.39. Formación de derivado del ebselen con iminoazúcar en cadena de 5

Esquema II.40. Protección de bromo-pentanol y bromo-hexanol con TBDPSCI

Esquema II.41. Reacción para obtención de iminoazúcar alquilado con alcohol terminal

Esquema II.42. Reacción para formación de reactivo de Dess-Martin

Esquema II.43. Reacción de oxidación con Dess-Martin sobre iminoazúcar con alcohol terminal

Esquema II.44. Reacción de oxidación de Swern sobre iminoazúcar con alcohol terminal

Lista de espectros capítulo II

Espectro II.1. Espectro de ^1H RMN de metil- α -D-glucopiranosido bencilado (**2**)

Espectro II.2. Espectro de ^1H RMN de α,β -D-glucopiranosido bencilado (**3**)

Espectro II.3. Espectro de ^{13}C RMN de α,β -D-glucopiranosido bencilado (**3**)

Espectro II.4. Espectro de ^1H RMN del diol (**4**)

Espectro II.5. Espectro de ^{13}C RMN del diol (**4**)

Espectro II.6. Espectro de ^1H RMN de 1-Desoxinojirimicina (**6**)

Espectro II.7. Espectro de ^{13}C RMN de 1-Desoxinojirimicina (**6**)

Espectro II.8. Espectro de ^1H RMN de HT bencilado (**13**)

Espectro II.9. Espectro de ^1H RMN de alcohol homovanílico bencilado (**12**)

Espectro II.10. Espectro ^1H RMN de tirosol bencilado, alquilado con 1,6-bromohexanol (**19**)

Espectro II.11. Espectro ^1H RMN derivados metoxilado **23**, dimetoxilado **24** y acetal **21**

Espectro II.12. Espectro ^1H RMN de derivados alcohol homovanílico (**20**), fenólico (**22**) y HT (**25**)

Espectro II.13. Espectro ^{13}C RMN de tirosol bencilado alquilado con 1,6-dibromohexano (**19**)

Espectro II.14. Espectro ^{13}C RMN de derivados metoxilado (**23**), dimetoxilado (**24**), acetal (**21**), alcohol homovanílico (**20**), fenólico (**22**) y HT (**25**)

Espectro II.15. Espectro ^1H RMN de derivado de tirosol (**26**)

Espectro II.16. Espectro ^1H RMN de derivados: dimetoxilado **31**, metoxilado **30** y acetal **28**

Espectro II.17. Espectro ^1H RMN de derivados de alcohol homovanílico **27**, fenólico **29** y HT **32**

Espectro II.18. Espectro ^{13}C RMN de derivado de tirosol (**26**)

Espectro II.19. Espectros ^{13}C RMN de derivados: dimetoxilado (**31**), metoxilado (**30**), acetal (**28**), alcohol homovanílico (**27**), fenólico (**29**) y HT (**32**)

Espectro II.20. Espectro ^1H RMN de derivado de tirosol (**33**)

Espectro II.21. Espectros ^1H RMN de derivados de 1-desoxinojirimicina: dimetoxilado (**38**), metoxilado (**37**), acetal (**35**), alcohol homovanílico (**34**), fenólico (**36**), HT (**39**)

Espectro II.22. Espectro ^{13}C RMN de derivado de 1-desoxinojirimicina: a) tirosol (**33**), b) dimetoxilado (**38**), c) metoxilado (**37**), d) acetal (**35**), e) alcohol homovanílico (**34**), f) fenólico (**36**), g) HT (**39**)

Espectro II.23. Espectro de ^1H RMN de compuestos fenólicos alquilados con 1,5-dibromopentano

Espectro II.24. Espectro de ^{13}C RMN de compuestos fenólicos alquilados con 1,5-dibromopentano

Espectro II.25. Espectro del ^1H RMN de derivado metoxilado alquilado con 1,5-dibromopentano (**44**)

Espectro II.26. Espectros de ^1H RMN de compuestos fenólicos alquilados con 1,5-dibromopentano derivados de desoxinojirimicina

Espectro II.27. Espectros de ^{13}C RMN de compuestos fenólicos alquilados con 1,5-dibromopentano derivados de desoxinojirimicina

Espectro II.28. Espectros de ^1H RMN de compuestos fenólicos alquilados con 1,5-dibromopentano desprotegidos derivados de desoxinojirimicina

Espectro II.29. Espectro de ^{13}C RMN de compuestos fenólicos alquilados con 1,5-dibromopentano desprotegidos

Espectro II.30. Espectros de ^1H RMN de compuestos fenólicos alquilados con 1,3-dibromopropano (reacción de eliminación)

Espectro II.32. Espectro de ^1H RMN de bromo propanol protegido con TBDPSCl, alquilado con dimetoxifeniletanol (**57**)

Espectro II.33. Espectro de ^1H RMN de derivado dimetoxilado con espaciador de 3 (**61**)

Espectro II.34. Espectro de ^{13}C RMN de derivado dimetoxilado con espaciador de 3 (61)

Espectro II.35. Espectro de masas de derivado dimetoxilado con cadena de 3 (61)

Espectro II.36. Espectro de ^1H RMN comparativo de 6-azida-hexanol y la azida yodada

Espectro II.37. Espectro de ^1H RMN de desoxinojirimicina bencilada alquilada con cadena de 5 con azida terminal (75)

Espectro II.38. Espectro de ^1H RMN de desoxinojirimicina bencilada alquilada con cadena de 6 con azida terminal (76)

Espectro II.39. Espectro de ^1H RMN de desoxinojirimicina bencilada alquilada con cadena de 3 con azida terminal (74)

Espectro II.40. Espectro ^1H RMN desoxinojirimicina alquilada con cadenas de 3, 5 y 6 átomos de carbono con amina terminal

Espectro II.41. Espectro ^{13}C RMN desoxinojirimicina alquilada con cadena 6 con amina terminal (79)

Espectro II.42. Espectro de RMN ^1H de urea de desoxinojirimicina (81)

Espectro II.43. Espectro de RMN ^{13}C de urea de desoxinojirimicina (81)

Espectro II.44. Espectro de masas de alta resolución de urea de *p*-bromoanilina (81)

Espectro II.45. Espectro de ^1H RMN de tiourea de *p*-anisidina (85)

Espectro II.46. Espectro de ^1H RMN de tiourea de *p*-tolilo (86)

Espectro II.47. Espectro de ^{13}C RMN de tiourea de *p*-anisidina (85)

Espectro II.48. Espectro de ^{13}C RMN de tiourea de *p*-tolilo (86)

Espectro II.49. Espectro de masas de alta resolución de urea de *p*-anisidina (85)

Espectro II.50. Espectro de masas de alta resolución de urea de *p*-tolilo (86)

Espectro II.51. Espectro de RMN ^1H de selenourea de 6 (90)

Espectro II.52. Espectro de RMN ^1H de selenourea de 3 (89)

Espectro II.53. Espectro de masas de alta resolución de selenourea de cadena de 6 (90)

Espectro II.54. Espectro de masas de alta resolución de selenourea de cadena de 3 (89)

Espectro II.55. Espectro de ^{13}C RMN de metil-L-xilopiranososa (93)

Espectro II.56. Espectro de ^1H RMN, de L-xilofuranosa bencilada (95)

Espectro II.57. Espectro de ^1H RMN, de *tert*-butil 2-((2R,3R,4S)-2,3,5-tris(benziloxi)-4-hidroxipentil)hidrazina-1-carboxilato (96)

- Espectro II.58.** Espectro de ^1H RMN de *tert*-butil 2-benzoil-2-((2R,3S,4S)-2,3,5-tris(benziloxi)-4-((metilsulfonil)oxi)pentil)hidrazina-1-carboxilato (97)
- Espectro II.59.** Espectro de ^1H RMN de (2S,3S,4R)-5-(1-benzoilhidrazinil)-1,3,4-tris(benziloxi)pentan-2-il metanesulfonato (98)
- Espectro II.60.** Espectro de ^1H RMN de azafagomina benzoilada bencilada (99)
- Espectro II.61.** Espectro de ^{13}C RMN de azafagomina benzoilada bencilada (99)
- Espectro II.62.** Espectro de ^1H RMN de azafagomina benzoilada (101)
- Espectro II.63.** Espectro de ^1H RMN de diselenuro de ácido antranílico (107)
- Espectro II.64.** Espectro de ^{13}C RMN de diselenuro de ácido antranílico (107)
- Espectro II.65.** Espectro de ^1H RMN de diselenuro de ácido antranílico dimetoxilado (108)
- Espectro II.66.** Espectro de ^{13}C RMN de diselenuro de ácido antranílico dimetoxilado (108)
- Espectro II.67.** Espectro de ^1H RMN de derivado de ebselen (110)
- Espectro II.67-A.** Espectro de ^1H RMN de sales de trietilamonio formadas durante la reacción de derivados de ebselen
- Espectro II.68.** Espectro ^1H y ^{13}C RMN de diazido pentano (112-A)
- Espectro II.69.** Espectro de ^1H RMN de 1-azido-2-bromopentano (112-B)
- Espectro II.70.** Espectro de ^{13}C RMN de 1-azido-2-bromopentano (112-B)
- Espectro II.71.** Espectro ^1H RMN molécula de ebselen alquilada con bromo-pentano (114)
- Espectro II.72.** Espectro ^{13}C RMN molécula de ebselen alquilada con bromo-pentano (114)
- Espectro II.73.** Espectro ^1H RMN de 5-bromo-1-pentanol protegido con TBDPSCl (116)
- Espectro II.74.** Espectro ^{13}C RMN de 5-bromo-1-pentanol protegido con TBDPSCl (116)
- Espectro II.75.** Espectro ^1H RMN de iminoazúcar alquilado con 5-bromo-1-pentanol protegido con TBDPS (118)
- Espectro II.76.** Espectro ^{13}C RMN de iminoazúcar alquilado con 5-bromo-1-pentanol protegido con TBDPS (118)
- Espectro II.77.** Espectro de ^1H RMN de iminoazúcar con hidroxilo terminal en cadena de 6 (121)
- Espectro II.78.** Espectro de ^{13}C RMN de iminoazúcar con hidroxilo terminal en cadena de 6 (121)
- Espectro II.79.** Espectro ^1H RMN de iminoazúcar con ácido carboxílico terminal (123)
- Espectro II.80.** Espectro ^{13}C RMN de iminoazúcar con ácido carboxílico terminal (123)

CAPITULO I

I. Resumen

En este capítulo de la tesis se presenta la síntesis de nuevos derivados esteroidales conformacionalmente restringidos, a partir de estrona, *trans*-androsterona y *trans*-dehidroandrosterona y su estudio como potenciales agentes antiproliferativos. Dichos derivados con un fragmento de tipo espiroheterociclo en la posición C-17, fueron obtenidos mediante reacciones de ciclocondensación con rendimientos moderados.

Se planteó la obtención de imidazolidina-2-tionas e imidazolidin-2-onas (tioureas y ureas cíclicas, respectivamente), a través del derivado diamino como intermediario clave, mediante tres pasos de síntesis donde el paso crucial fue la realización de la reacción de Strecker sobre el grupo carbonilo para obtener un aminonitrilo, seguido de su reducción, originando el correspondiente diamino (**figura 1**).

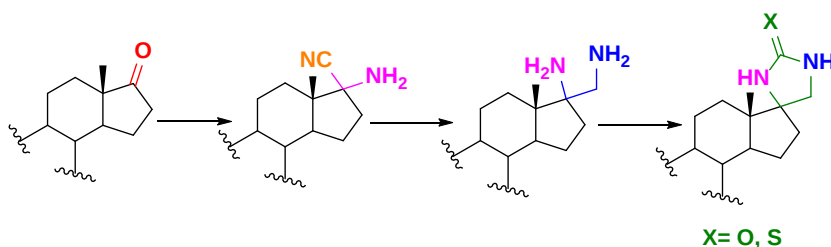


Figura 1. Diagrama de formación de espiroureas y espirotioureas cíclicas

Se ensayaron las condiciones de reacción para la obtención de la correspondiente tiourea cíclica, empleando 1,1'-tiocarbonildiimidazol o tiofosgeno como agentes tionantes, y por otra parte para la obtención de la urea se trató con trifosgeno; no obstante, a pesar de las numerosas modificaciones experimentales ensayadas, incluyendo cambio de disolvente, temperatura y catalizador, solo fue posible obtener la espirotiourea derivada de estrona en 4 pasos de reacción.

Alternativamente, se ensayó la condensación del carbonilo en C-17 con *o*-aminotiofenol, *o*-fenilendiamina y *o*-aminofenol, originando compuestos espiránicos de tipo benzotiazolina, benzimidazolina y benzoxazolina, respectivamente (**figura 2**). Esta ruta sintética, por tanto, mantiene intacta la posición C-3 del esqueleto estereoidal, posición fundamental en muchas interacciones biológicas.

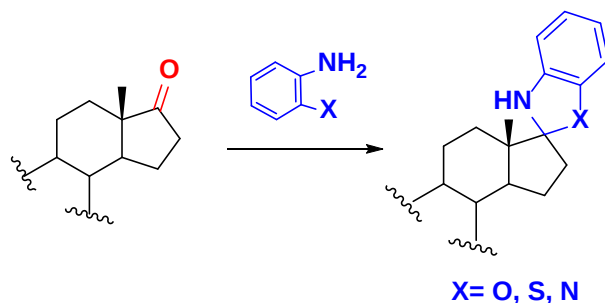


Figura 2. Diagrama de formación de derivados benzofusionados

Los compuestos sintetizados fueron evaluados *in vitro* sobre un panel de 6 líneas celulares de tumores sólidos humanos: A549 (células no pequeñas de pulmón), HBL-100 (mama), HeLa (cérvix), SW1573 (células pequeñas de pulmón), T-47D, (mama) y WiDr (colon), con el fin de comprobar nuestra hipótesis, de que el diseño y síntesis de nuevos compuestos conteniendo los farmacóforos mencionados podrían presentar actividad como agentes antiproliferativos. Los resultados obtenidos fueron comparados con dos agentes quimioterapéuticos esteroidales, la abiraterona y la galaterona. Los derivados más potentes fueron los espiroheterociclos de benzoxazolina tanto de estrona como de *trans*-dehidroandrosterona, con valores de GI_{50} en el rango submicromolar, frente a la línea celular SW1573, con un incremento de actividad de 4-160 veces con respecto a los fármacos empleados como referencia. Finalmente, se completó este capítulo con el estudio de docking molecular de los derivados obtenidos de mayor interés, además del estudio computacional para determinar la configuración del nuevo centro quiral en C-17 generado en la formación de los espiroheterociclos, y el docking molecular de la benzoxazolina de estrona sobre la proteína Bcl-2, mostrando una buena interacción con los aminoácidos del sitio activo de esta.

I. Abstract

In this chapter it is described the synthesis of novel conformationally constrained steroidal derivatives, from estrone, trans-androsterone and trans-dehydroandrosterone and their study as potential antiproliferative agents. These compounds bearing a spiroheterocycle fragment on C-17, were obtained through cyclocondensation reactions with moderate yields.

The preparation of imidazoline-2-thiones and imidazolidine-2-ones (cyclic thioureas and cyclic ureas, respectively) was designed through a diamine derivative as key intermediate, in a three step synthesis route where the crucial step was a Strecker reaction performed over the carbonyl group to obtain the aminonitrile, followed by a reduction of the nitrile giving the desired diamine derivative (**figure 1**).

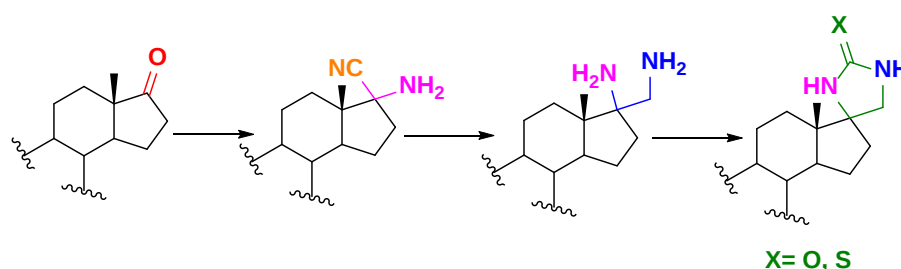


Figure 1. Cyclic spirothioureas and spirothioureas formation diagram

It was essayed the reaction conditions to obtain the proposed cyclic thioureas, using 1,1'-thiocarbonyldiimidazole or thiophosgene as tightening agents and triphosgene for the cyclic ureas. Nevertheless, despite the numerous experimental modifications tested, including change of the solvent, temperature and catalysts, it was only possible to obtain the estrone-derived spirothiourea in 4 reaction steps.

Alternatively, the carbonyl group on C-17 was condensed with o-aminothiophenol, o-phenylenediamine and o-aminophenol to afford the corresponding spiranic benzothiazoline, benzimidazoline and benzoxazoline, respectively. This synthetic pathway maintains untouched the C-3 position of the steroidal skeleton, which is fundamental in many biological interactions.

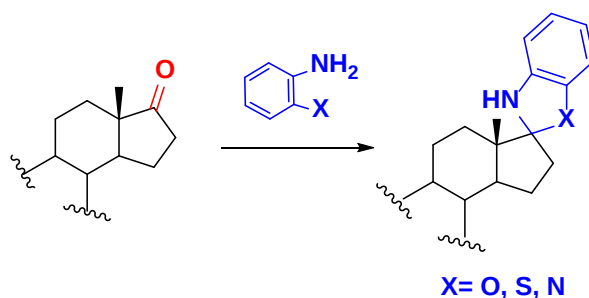


Figure 2. Formation diagram of benzofused derivatives

The synthesized compounds were evaluated *in vitro* on a panel of 6 human solid tumor cell lines: A549 (non-small lung cells), HBL-100 (breast), HeLa (cervix), SW1573 (small lung cells), T- 47D, (breast) and WiDr (colon), in order to test our hypothesis, that the design and synthesis of new compounds containing the aforementioned pharmacophores, could present activity as antiproliferative agents. The results obtained were compared with two steroidal chemotherapeutic agents, abiraterone and galaterone. The most potent derivatives were the benzoxazoline spiroheterocycles, both from estrone and from *trans*-dehydroandrosterone, with GI_{50} values in the submicromolar range, compared to the SW1573 cell line, with an increase of the activity of 4-160 times with respect to the drugs used for reference. Finally, this chapter was completed with the molecular docking study of the most interesting derivatives obtained, in addition to the computational study to determine the configuration of the new chiral center at C-17 generated in the formation of spiroheterocycles, and the molecular docking of estrone benzoxazoline on the Bcl-2 protein, showing a good interaction with the amino acids of its active site.

I.1. Introducción

Actualmente el cáncer es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial; se estima que en el año 2015 murieron alrededor de 8.8 millones de personas en todo el mundo a causa de este padecimiento. A nivel mundial el cáncer es la principal causa de enfermedad ya que representa 12.7 millones de nuevos casos por año y se espera que esta cifra aumente a 26 millones para el año 2030.¹

La identificación de nuevos agentes quimioterapéuticos con menos efectos adversos y mayor efectividad terapéutica es esencial para un mejor pronóstico de pacientes con cáncer.² Desde 1940, el 48.6% de todas las nuevas moléculas descubiertas en el área del tratamiento del cáncer son productos naturales o derivados de estos.³ La gran diversidad estructural, así como la amplia gama de actividades biológicas exhibida por los productos naturales, hace que sean estructuras idóneas para el diseño racional de fármacos.^{4,5,6}

En la primera parte de esta Tesis Doctoral nos centraremos en los esteroides, los cuales han resultado ser útiles en el tratamiento de muchos tipos de cáncer y de otras enfermedades.⁷

Por otro lado, algunos heterociclos nitrogenados son reconocidos por una amplia variedad de biomoléculas,⁸ proporcionando a las moléculas diversas propiedades biológicas, algunos ejemplos de estos son las oxazolinas,^{9,10} oxazolidinonas,¹¹ y las imidazolinas^{12,13} (figura I.3).



Figura I.3. Estructuras de heterocíclicos de interés farmacológico

La incorporación de heterociclos a un esqueleto esteroideal ha conducido al descubrimiento de nuevas moléculas que presentan un amplio espectro de propiedades biológicas; estructuras esteroidales con heterociclos sobre el anillo D poseen propiedades biológicas únicas que confieren a este tipo de compuestos no solo las típicas actividades hormonales, sino que también actúan como potentes antibióticos, anticancerígenos, o antioxidantes, entre otros.¹⁴

Con respecto a su actividad antiproliferativa, se ha observado que derivados esteroidales con heterociclos nitrogenados en C-17 presentan propiedades antagonistas de receptores androgénicos,¹⁵ como la galeterona y la abiraterona (**figura I.4**), los cuales se usan en el tratamiento del cáncer de próstata avanzado.¹⁶

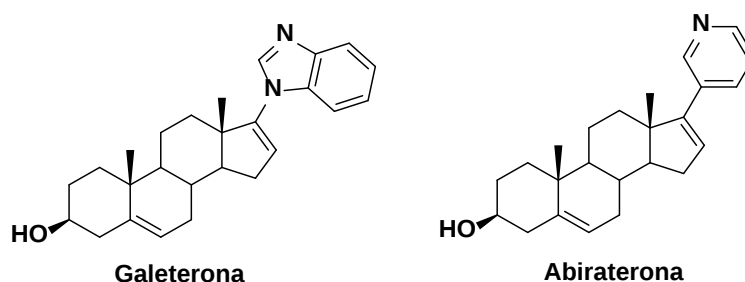


Figura I.4. Compuestos esteroidales utilizados como fármacos anticancerígenos

Algunos estudios sugieren que la interacción con los receptores androgénicos se debe a la coordinación de un par de electrones libres del N del heterociclo con el grupo hemo del centro activo de la enzima.¹⁷

Debido a las interesantes propiedades de los compuestos conformacionalmente restringidos,¹⁸ así como a la peculiar distribución espacial implícita en una estructura espiránica, la síntesis de espiroheterociclos esteroidales se ha convertido en objeto de gran interés en el área de Química Orgánica, sin considerar su amplia gama de actividades biológicas.

El presente trabajo implica el diseño, la síntesis y caracterización espectroscópica de nuevos derivados esteroidales heterocíclicos con conformación restringida, así como la evaluación de su actividad antiproliferativa, su estudio de docking molecular y los cálculos teóricos para establecer la configuración de C-17.

I.2. Antecedentes

I.2.1. Cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial; en 2015 los tumores malignos fueron responsables de 8.7 millones de muertes, además 17.5 millones de nuevos casos fueron registrados, y se espera que el número de casos aumente en un 70% para las próximas dos décadas,¹⁹ llegando a 26 millones para el año 2030. Considerando el impacto sobre la salud y la economía, el cáncer representa un gran reto a nivel mundial, por lo que el descubrimiento de nuevos agentes quimioterapéuticos se ha convertido en una auténtica necesidad actual.²⁰

Tan solo en México el cáncer es la tercera causa de muerte y se estima que cada año mueren 14 de cada 100 mexicanos a causa de esta enfermedad²¹ aunque las cifras son alarmantes, muchos de los casos pueden presentar un buen pronóstico si son detectados a tiempo.²²

La célula eucariótica posee estrictos mecanismos de control que la inducen a replicarse bajo condiciones muy específicas.²³ Por diferentes causas, estos controles pueden anularse y como resultado la célula se reproduce descontroladamente originando un tumor que puede ser el origen de un cáncer.²⁴ La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos:

- Carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioletas e ionizante.
- Carcinógenos químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua de bebida).
- Carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.²⁵

Estas alteraciones llevan a diversas mutaciones, las cuales son causa importante de la iniciación y el progreso de muchas enfermedades, incluyendo la aterosclerosis, las

enfermedades del corazón, y el cáncer. Se ha observado que los fitoquímicos que reducen la mutagénesis pueden ofrecer potencial preventivo contra el cáncer.²⁶

Estudios epidemiológicos y en animales han indicado que los productos naturales quimiopreventivos se asocian con un menor riesgo de desarrollo del cáncer.²⁷ La identificación de nuevos agentes con menos efectos adversos y mayor efectividad terapéutica es muy significativa para un mejor pronóstico de pacientes con cáncer.²⁸

I.2.2. Fármacos anticancerígenos

Algunos fármacos anticancerígenos presentan actividad antiproliferativa, la cual es la capacidad de inhibir el desarrollo descontrolado de células eucarióticas.²⁹

Los utilizados en el tratamiento del cáncer pueden clasificarse en varios grupos de acuerdo con factores como, su mecanismo de acción, su estructura química y su relación con otros compuestos; de hecho, algunas moléculas pueden actuar de más de una forma y pertenecer a más de un grupo.

Los corticoesteroides, o simplemente esteroides, son hormonas naturales, útiles en el tratamiento de muchos tipos de cáncer y de otras enfermedades, aunque poseen una función más como coadyuvantes en el tratamiento del cáncer que propiamente como compuestos anticancerígenos. Algunos ejemplos de estos son la prednisona, la metilprednisolona y la dexametasona.³⁰

I.2.3. Productos naturales

Con la finalidad de combatir las diversas enfermedades, la medicina ha estado vinculada desde siempre al uso de compuestos provenientes de plantas, animales o microorganismos. En las últimas décadas, los avances en los métodos de aislamiento y purificación, así como los análisis espectroscópicos y espectrométricos, han permitido la caracterización de los principios activos para su uso farmacéutico, ya sea como productos naturales o como moléculas derivadas de ellos.⁴

Los productos naturales constituyen, sin lugar a duda, un buen punto de partida para el descubrimiento de nuevas entidades químicas con potencial terapéutico,³¹ ya que pueden considerarse estructuras privilegiadas³² que han sido seleccionadas por la evolución por su capacidad de interaccionar con múltiples receptores, por lo tanto, exhiben múltiples

actividades biológicas.³³ Los productos naturales, análogos o derivados de sus farmacóforos, representan el 50% de los fármacos que existen actualmente en uso clínico, especialmente en el área del cáncer.³⁴ Por ejemplo en los últimos años, muchos componentes procedentes de plantas se han purificado e identificado como agentes anticancerígenos eficaces.³⁴

Algunos estudios se han enfocado en los compuestos químicos que normalmente se encuentran en frutas y verduras, varios de estos agentes son conocidos por destruir células cancerosas con independencia del estado de los receptores. Estos compuestos son capaces de actuar en gran medida debido a su actividad pleiotrópica, lo que significa que estos agentes son capaces de presentar efectos en receptores no relacionados.³⁵ Un requisito previo importante en la identificación de tales agentes es que deben ser fisiológicamente poco tóxicos y lo menos dañinos frente a las células normales.³⁶

En los últimos años, se han descrito algunos compuestos naturales que tienen propiedades contra el cáncer, tales como el nucleósido cordicepina, que induce la apoptosis y la autofagia en las células de cáncer de mama, y la isoflavona genisteína, que inhibe la metástasis ósea osteolítica de cáncer de mama.³⁶ El resveratrol (un polifenol de la uva) y la sanguinarina (un alcaloide) también inhiben la proliferación y promueven la apoptosis de las células de osteosarcoma.³⁷

I.2.4. Esteroides

Los esteroides constituyen un amplio grupo de productos naturales ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son compuestos orgánicos que poseen un esqueleto derivado del ciclopenta[*a*]fenantreno (**figura I.5**).

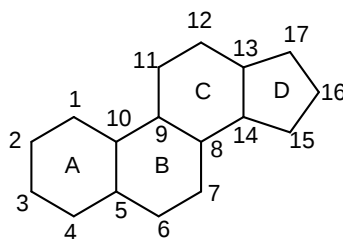


Figura I.5. Estructura y numeración del ciclopenta[*a*]fenantreno descrita por la IUPAC³⁸

Su esqueleto consta de 4 anillos nombrados como A, B, C y D, por lo general contiene grupos metilo sobre las posiciones C-10 y C-13, mientras que en C-17 frecuentemente poseen

una cadena lateral hidrocarbonada.³⁹ La gran mayoría de los compuestos esteroidales poseen un grupo oxigenado en C-3. Los dobles enlaces son también grupos funcionales usualmente observados en moléculas esteroidales naturales; un ejemplo de ello es el colesterol, con una insaturación entre las posiciones C-5 y C-6 (**figura I.6**).

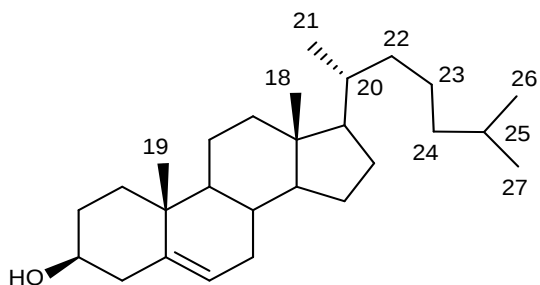


Figura I.6. Colesterol, esteroide ampliamente distribuido en el reino animal

Se ha llegado a considerar que los compuestos esteroidales fueron de las primeras estructuras moleculares construidas por los organismos vivos y que posteriormente a la par de la diversificación de las especies fueron tomando las funciones características que hoy conocemos.⁴⁰

En cuanto a los esteroides como familia, son un grupo de compuestos estructuralmente relacionados, que poseen un amplio espectro de actividades biológicas,⁴¹ podemos encontrar una gran diversificación estructural, tanto en compuestos que presentan el núcleo esteroide como en derivados de estos, lo que hace a este tipo de metabolitos una familia inmensa con múltiples y diversas actividades biológicas, lo que incrementa su importancia a nivel farmacológico.⁴² Los compuestos naturales y los derivados de estos son las moléculas más usadas como medicamentos alrededor del mundo.⁴³ El primer agente anticancerígeno con estructura esteroide fue de origen herbal. Además de los esteroides naturales de plantas, algunos metabolitos esteroidales endógenos son también reportados como potentes agentes antiproliferativos.⁴⁴

Los esteroides juegan un rol primordial en la regulación de procesos fisiológicos y en la interacción con numerosas dianas terapéuticas.⁴⁵

Presentan múltiples aplicaciones⁴⁷ como antiinflamatorios, diuréticos, anabólicos, anticonceptivos, antiandrogénicos y anticancerígenos.⁴²

La obtención de derivados esteroidales mediante semisíntesis es un área de especial interés en la Química Medicinal, con el fin de acceder a nuevas moléculas bioactivas, para el tratamiento de diversas enfermedades. En particular, la incorporación de heterociclos a los esteroides ha conducido a derivados menos tóxicos y con una menor quimiorresistencia.⁴²

Los esteroides naturales y sus congéneres sintéticos fueron extensivamente estudiados en las últimas décadas. Las hormonas sexuales, diuréticos y antibióticos son algunos ejemplos representativos. En particular la actividad antiflogística de los esteroides llamada también característica antiinflamatoria, es vista como un área activa en la química bioorgánica medicinal.⁴⁶ Otro grupo de esteroides que ha sido ampliamente estudiada son los de origen marino y especialmente los derivados polihidroxilados, presentan múltiples actividades biológicas, como citotóxicas, antibacterianas, antifúngicas y antiinflamatorias.⁴⁷

Dos ejemplos representativos de esteroides con actividad biológica son la galaterona y la abiraterona, utilizados para el tratamiento de cáncer de próstata avanzado. La galaterona posee un único mecanismo de acción dual, caracterizado por la inhibición selectiva de la actividad de la enzima CYP-17, a su vez actúa como un antagonista del receptor de andrógenos, por otro lado, la abiraterona es un inhibidor de la síntesis de andrógenos por bloqueo de la acción de la enzima CYP-17 que está involucrada en la biosíntesis de andrógenos.⁴⁸

Recientemente, Zhang y colaboradores han descrito la preparación de nuevos dihidropiridinil espirooxindoles esteroideos; la evaluación biológica parece indicar que estos compuestos inhiben potentemente el crecimiento de las células cancerosas humanas e inducen el paro del ciclo celular y la apoptosis de una manera dependiente del tiempo y la concentración (**figura I.7**).⁴⁸

Los agentes esteroidales utilizados en las practicas oncológicas son típicamente administrados por sus propiedades de disrupción endocrina (como los antagonistas de estrógenos o inhibidores de la aromatasa); los análogos sintéticos de los esteroides naturales son ampliamente utilizados en el tratamiento de canceres del sistema reproductivo.⁴⁹

Además de los bien conocidos disruptores endocrinos, se ha descrito que otros esteroides ejercen efectos anticancerígenos pronunciados de una manera independiente de la hormona.⁵⁰

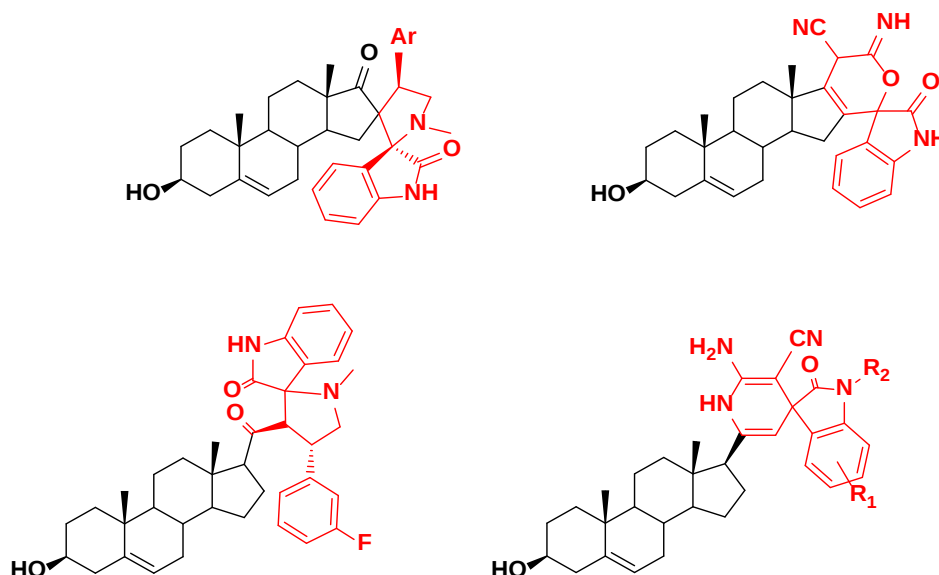


Figura I.7. Espiroindoles en estudio clínico y moléculas relacionadas⁴⁸

Los alcaloides esteroidales, metabolitos secundarios que contienen nitrógeno, se encuentran en muchas familias de plantas como las *liliaceae*, las *solanaceae*, y muchos de ellos se comportan como potentes agentes anticancerígenos; en este contexto, la solasodina glicosilada se ha investigado contra el carcinoma humano.⁵⁰ Por otro lado, los androstanos y sus análogos estructurales son considerados como un prometedor esqueleto para el desarrollo de agentes anticancerígenos basados en esteroides.⁵⁰

Se ha descrito una acción antiproliferativa considerable de varios conjuntos de análogos de androstano innovadores contra una amplia variedad de líneas celulares, que incluyen cáncer de próstata, mama, cuello uterino, ovario, leucemia, melanoma, colon y cáncer gástrico.⁵⁰

Los derivados de la 19-nortestosterona, por ejemplo, levonorgestrel, desogestrel y dienogestrel, se utilizan ampliamente en la terapia de reemplazo hormonal, la anticoncepción y el tratamiento de la endometriosis.⁵⁰ Más allá de estas aplicaciones clínicas bien establecidas, varios derivados de 19-nortestosterona han sido reportados recientemente como potenciales agentes anticancerígenos, por ejemplo, se ha demostrado que la mibolerona (7 α , 17 α -Dimetil-19-nortestosterona), un miembro sintético metabólicamente estable de esta clase inhibe eficazmente la proliferación de célula cancerígenas estimuladas por estrógenos en ensayos in vitro.⁵¹

Los derivados esteroidales que contiene nitrógeno son fármacos clínicos comúnmente usados en la quimioterapia del cáncer; casi todos los fármacos anticancerígenos, de uso clínico se limitan debido a su toxicidad hacia los tejidos normales. Un logro importante de la quimioterapia del cáncer es amplificar la inhibición selectiva de las células tumorales, mientras se disminuye la toxicidad a los tejidos normales. Un enfoque para mejorar esta selectividad es fusionar diferentes heterociclos que contiene nitrógeno unidos a un núcleo esteroidal. Los aductos citotóxicos formados pueden atacar a tumores específicos, observado en muchos estudios previos de la interacción entre los esteroides y sus receptores en el control del crecimiento de las células cancerígenas.⁵²

Los esteroides pueden ser utilizados en cánceres dependientes de hormonas, por otro lado, también se ha comprobado su efecto positivo en el carcinoma hepatocelular uno de los tipos de cáncer más peligrosos. Es el causante de la tercera causa de muerte por cáncer, se ha visto que algunos heterociclos disminuyen la toxicidad e incrementan la selectividad.

En la **figura I.8** se muestran dos derivados esteroidales con hidrazona, una función inusual; estos derivados presentaron una alta actividad antiproliferativa en carcinoma de hígado humano.⁵³

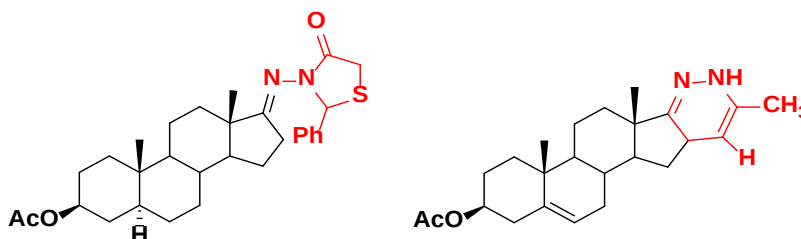


Figura I.8. Derivados esteroidales con una porción tipo hidrazona con potente actividad antiproliferativa⁵³

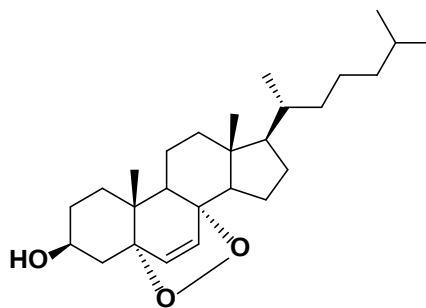


Figura I.9. 5α,8α-epidioxicolest-6-en-3β-ol

Otro heterociclo esteroidal relevante es el $5\alpha,8\alpha$ -epidioxicolest-6-en- 3β -ol (CEP) (**figura I.9**), capaz de inhibir el crecimiento de células cancerosas, inducir apoptosis o detener el ciclo celular por rutas tanto dependientes como independientes de p53.⁵³

Al-Mohizea y colaboradores reportaron que la presencia de heterocícl^{os} en estructuras esteroidales generan derivados que actúan como analgésicos, anticonvulsivantes, antiandrogénicos, y antimicrobianos. Recientemente algunos heterociclos con un residuo esteroidal han sido reportados como antiandrogénicos y con actividad antitumoral frente al cáncer de próstata.⁴⁷

I.3. Objetivos

- Diseñar, sintetizar y caracterizar espectroscópicamente nuevos derivados esteroidales con residuos heterocíclicos de tipo urea y tiourea, de conformación restringida, con una unión espiránica sobre la posición 17, a partir de estrona (1), *trans*-androsterona (2) y *trans*-dehidroandrosterona (3).

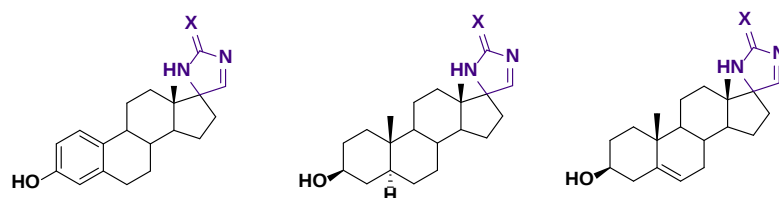


Figura I.10. Heterociclos nitrogenados a partir de estrona (1), *trans*-androsterona (2) y *trans*-dehidroandrosterona (3)

- Sintetizar, benzotiazolinas, benzimidazolinas y benzoxazolinas por reacciones de tipo *one-pot*, sobre el grupo carbonilo de C-17 a partir de estrona (1), *trans*-androsterona (2) y *trans*-dehidroandrosterona (3).

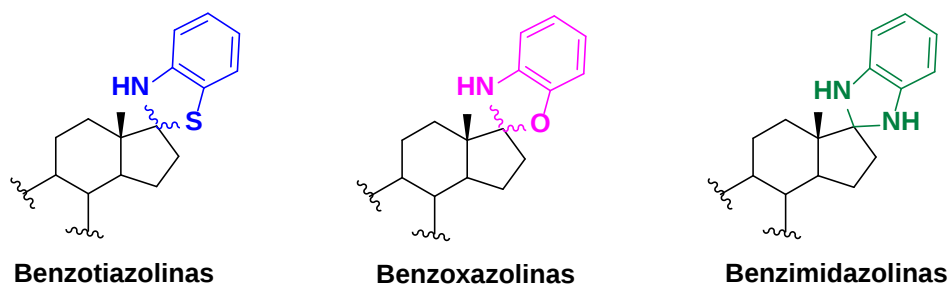


Figura I.11. Derivados esteroidales de tipo benzotiazolina, benzoxazolina y benzimidazolina

- Evaluar la actividad antiproliferativa, de todos los derivados sintetizados sobre una serie de líneas celulares de tumores sólidos humanos.
- Realizar un estudio de relación estructura-actividad.

I.4. Resultados y discusión

Todas las rutas sintéticas descritas en este primer bloque parten de los siguientes esteroides comerciales: estrona (1), *trans*-androsterona (2) o *trans*-dehidroandrosterona (3) (figura I.12).

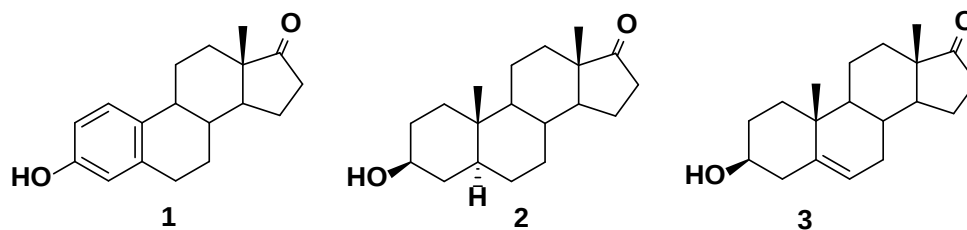
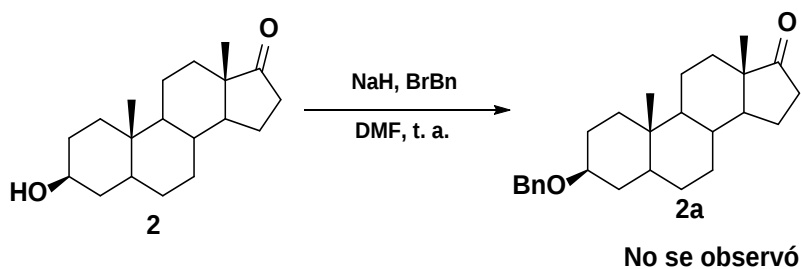


Figura I.12. Materias primas utilizadas en este trabajo. Estrona (1), *trans*-androsterona (2) y *trans*-dehidroandrosterona (3)

Inicialmente se planteó la síntesis de imidazolidina-2-tionas e imidazolidin-2-onas espiránicas sobre C-17 (tioureas y ureas cíclicas, respectivamente), a partir de estrona, *trans*-androsterona y *trans*-dehidroandrosterona. Para ello se requiere generar en C-17 un aminonitrilo, y posteriormente reducirlo para obtener un diamino como intermedio clave, para funcionalizarlo y así obtener diversos heterociclos. A continuación, se describe la secuencia de síntesis requerida para tal fin:

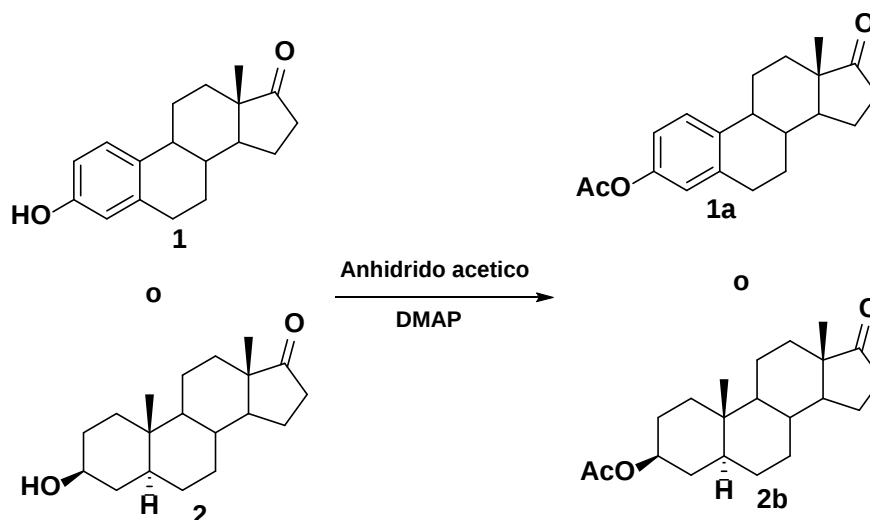
I.4.1. Reacción de protección del grupo hidroxilo sobre C-3

La primera etapa de la síntesis implica la protección del grupo hidroxilo de la posición C-3, con objeto de evitar posteriores reacciones secundarias, seleccionando inicialmente el grupo bencilo. Se realizó la reacción de protección sobre la *trans*-androsterona (2), usando bromuro de bencilo, hidruro de sodio como base y DMF como disolvente, (esquema I.1), sin embargo; se observó una descomposición de la materia prima, por lo que fue necesario cambiar de grupo protector, intentando como segunda opción el grupo acetato.



Esquema I.1. Ensayo para la reacción de protección de **2** con bromuro de bencilo

Se realizó la protección del hidroxilo de la posición 3 con un grupo acetato, sobre estrona (**1**) y *trans*-androsterona (**2**), utilizando anhídrido acético y DMAP como catalizador (**esquema I.2**). Se llevó a cabo la protección del hidroxilo en C-3 de manera satisfactoria, (98% de rendimiento para estrona y 89% para *trans*-androsterona, tras purificación en columna).

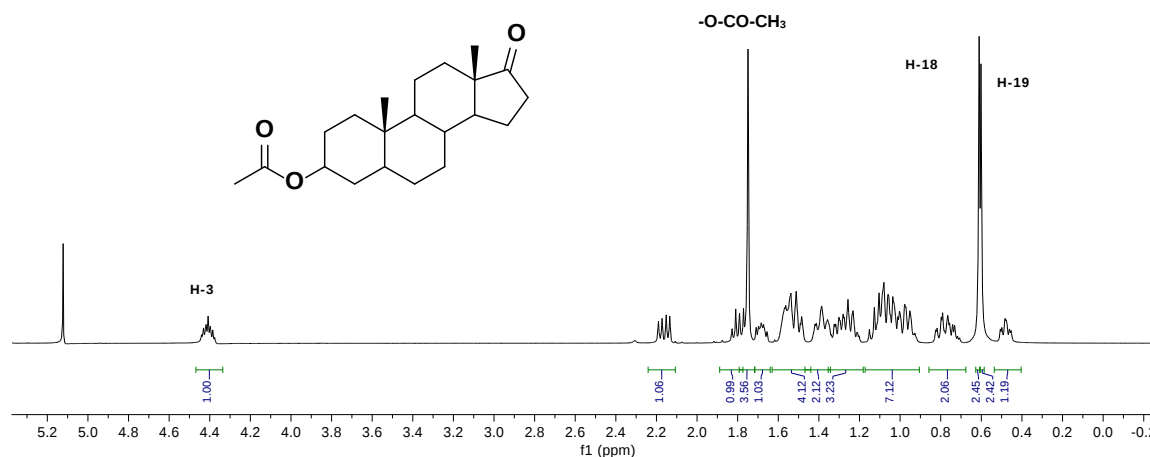


Esquema I.2. Reacciones de protección de los grupos hidroxilos de **1** y **2** mediante la formación de un éster metílico

Se pudo confirmar la presencia de ambas estructuras mediante el análisis de la espectroscopía de RMN de ^1H , observando entre 1.70 y 2.20 ppm la señal característica del metilo del grupo acetato en ambos espectros.

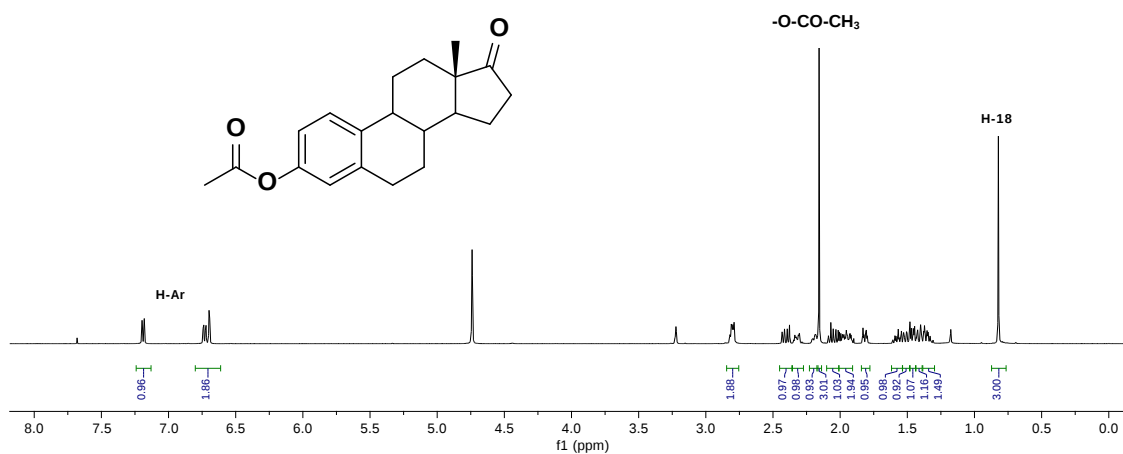
En el espectro del derivado de androsterona **2b** (**espectro I.1**), en alrededor de 0.60 ppm se encuentran los dos singuletes asignados a los metilos 18 y 19 y entre 0.40 y 2.20 ppm, la mayoría de los protones del esqueleto esteroideal. Por otro lado, la presencia del grupo

acetato se confirma por la presencia del singulete a 1.8 ppm y por el fuerte desapantallamiento experimentado por H-3, que resuena a aproximadamente 4.40 ppm.



Espectro 1.1. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del acetato de *trans*-androsterona (**2b**)

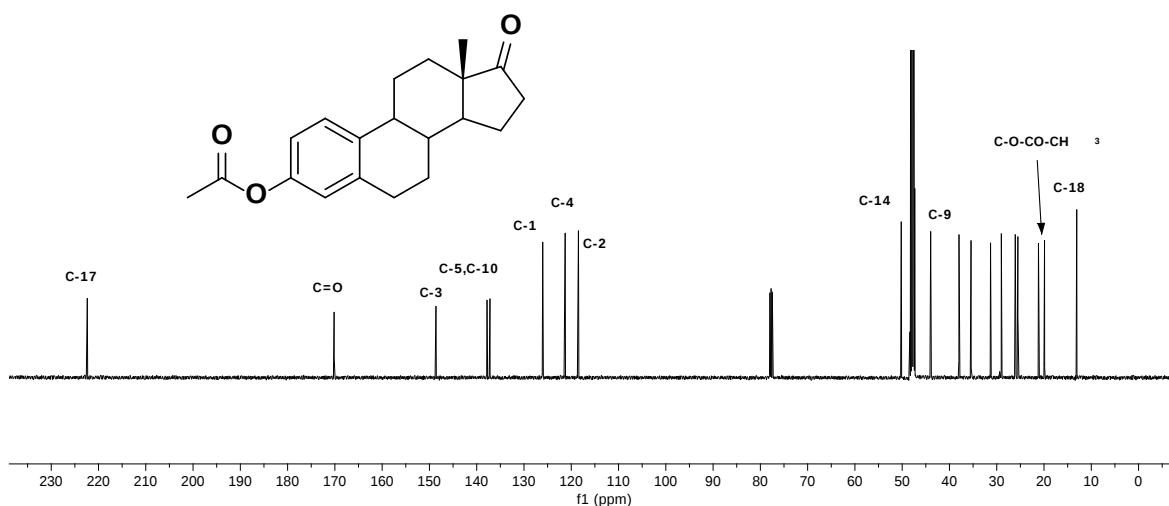
En el caso del derivado de estrona **1a** (**espectro I.2**) se observa un singulete por 0.70 ppm el cual corresponde al metilo 18. En 2.20 ppm se encuentra una señal simple perteneciente al metilo del grupo acetato, entre 6.50 y 7.20 ppm se muestra claramente la presencia de los hidrógenos del anillo aromático trisustituido de la estrona.



Espectro I.2. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del acetato de estrona (**1a**)

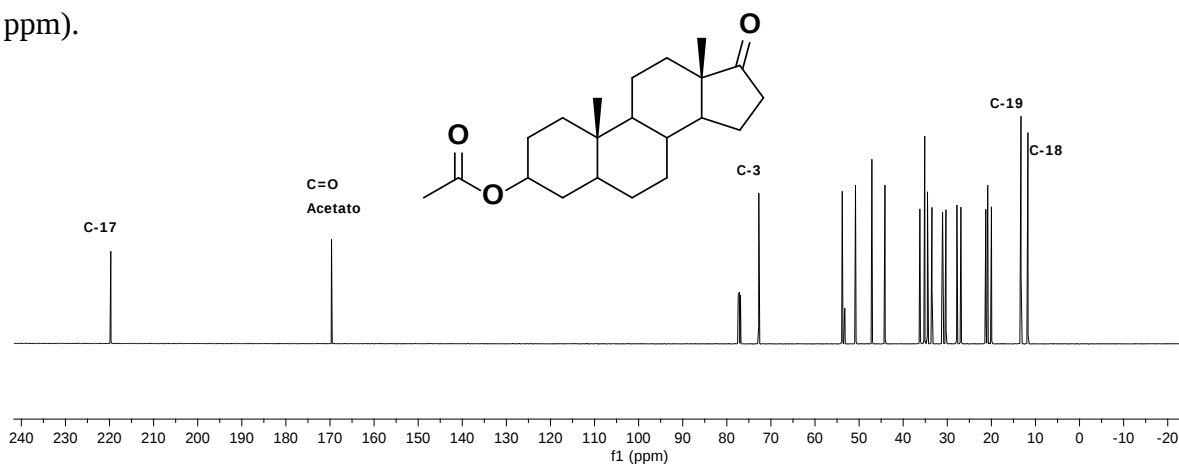
En el espectro de RMN de ^{13}C , del derivado de estrona **1a** (**espectro I.3**), se localiza la señal del metilo 18 en 10.0 ppm, mientras en 20.0 ppm la señal del metilo del grupo acetato; entre 115.0 y 150.0 ppm, se observan las señales de los 6 carbonos del anillo aromático de la

estrona, además de una señal en 170.0 ppm, la cual pertenece al carbonilo del acetato y en 222.0 ppm el carbono carbonílico C-17.



Espectro I.3. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de acetato de estrona (**1a**)

En el espectro de RMN de ^{13}C del derivado de *trans*-androsterona **2b** (**espectro I.4**), observamos todos los carbonos de esqueleto esteroideal entre 10.0 ppm y 55.0 ppm. La incorporación del grupo acetato origina también en el espectro un fuerte desapantallamiento de C-3, siendo la única señal del núcleo esteroideal con una resonancia superior a 70 ppm, exceptuando, obviamente, los grupos carbonilo de acetato (170.0 ppm) y de C-17 (220.0 ppm).

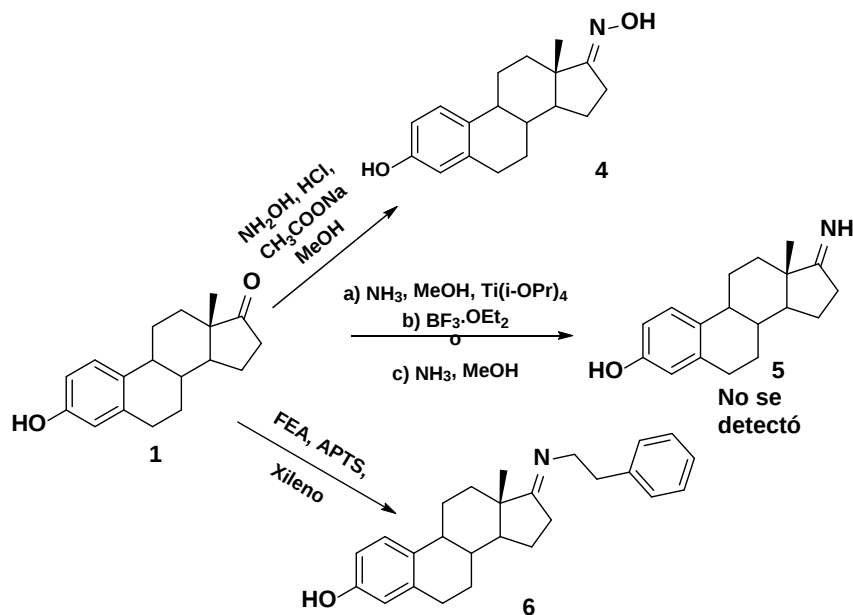


Espectro I.4. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de acetato de androsterona (**2b**)

I.4.2. Síntesis del α -aminonitrilo sobre C-17

Se planteó la formación del α -aminonitrilo como intermediario sintético clave, a partir de estrona (**1**) y *trans*-androsterona (**2**). Al realizar la primera reacción para la obtención del aminonitrilo, se eliminó el grupo protector de C-3, por lo que las reacciones posteriores se llevaron a cabo sin protección del grupo hidroxilo de C-3. El acceso a dicho intermedio implica una reacción de Strecker a partir del grupo carbonilo de los esteroides empleados como materia prima. A tal efecto se requiere la formación de una imina, y este paso supuso un mayor número de problemas sintéticos de los previstos inicialmente. Las estrategias seguidas se muestran en los **esquemas I.3** (estrona) y **I.4** (*trans*-androsterona). Sobre ambos esteroides se ensayó la formación de tres tipos de electrófilos sobre los cuales poder adicionar el anión cianuro: oxima (**4**, **7**), empleando hidrócloruro de hidroxilamina comercial; imina (**5**, **8**), a partir de NH_3 y diversos ácidos de Lewis como catalizadores; o *N*-feniletilimina (**6**, **10**) usando FEA y catálisis ácida (APTS).

La reacción sobre estrona (**1**) se realizó con una solución de amoníaco en metanol anhidro e isopropóxido de titanio como catalizador, se mantuvo a temperatura ambiente durante 8 días, pero la reacción no procedió.

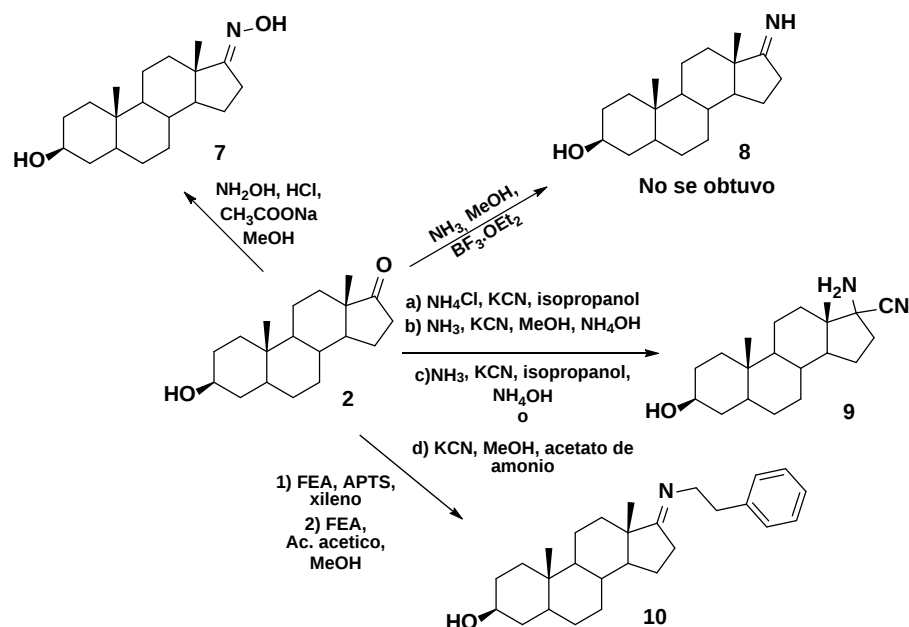


Esquema I.3. Reacciones sobre el C-17 de la estrona (**1**)

Para la formación de las iminas a partir de estrona (1) y *trans*-androsterona (2), se ensayó el uso de amoníaco metanólico en presencia de un ácido de Lewis como catalizador ($\text{Ti}(\text{i-OPr})_4$ o BF_3); a pesar de emplear largos tiempos de reacción (hasta 8 días), o temperaturas de reflujo, no se observó reacción alguna.

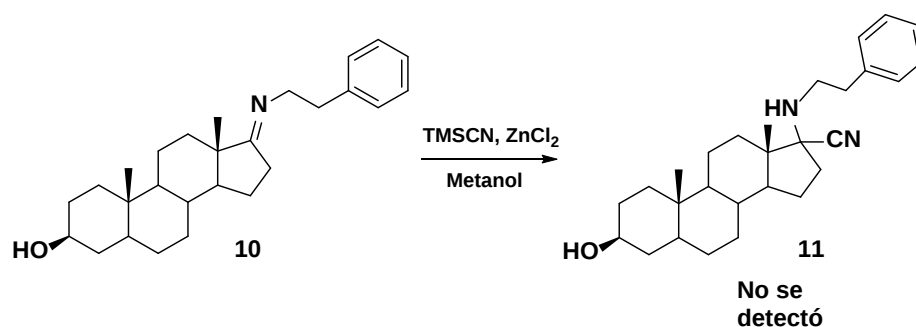
En el caso de la reacción con la *trans*-androsterona (2, **esquema I.4**), para la formación de la imina, se observó mediante CCF la formación del complejo del esteroide con BF_3 ; no obstante, tras la adición de agua en el procesado de la reacción, revirtió hasta el compuesto original, sin obtenerse nada de la imina buscada. Se obtuvo el mismo resultado empleando malla molecular durante el transcurso de la reacción. La reacción con estrona (1) tampoco presentó ningún cambio.

Alternativamente, se ensayaron otras dos reacciones utilizando estrona (1) y *trans*-androsterona (2), para intentar el acceso a la imina *N*-sustituida 11 (**esquema I.5**). Dicho proceso implica una reacción en dos etapas: la primera parte consistió en la formación de la imina 6 y 10 utilizando 2-feniletilamina (FEA) en xileno, y ácido *p*-toluensulfónico como catalizador. La reacción transcurrió a reflujo durante 72 horas; tras la eliminación del disolvente se observó la formación de varios subproductos, además de los productos esperados y materia prima.



Esquema I.4. Reacciones sobre el C-17 de la *trans*-androsterona (2)

Una vez eliminado el disolvente se procedió a la segunda etapa de reacción sin purificación (**esquema I.5**). Para formar el amino nitrilo a partir de la imina sustituida, se utilizó TMSCN y cloruro de zinc anhidro, la reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 7 días, sin observar ningún cambio.



Esquema I.5. Adición del grupo nitrilo sobre el C-17 de la imina sustituida **10**

Posteriormente se modificaron las condiciones de reacción para la *trans*-androsterona (**2**), para intentar acceder al α -amino nitrilo **9** (**esquema I.4**):

Primero se utilizó cianuro de potasio, cloruro de amonio e isopropanol, en agitación constante a temperatura ambiente durante 8 días. Posteriormente, se modificó y se cambió el cloruro de amonio por solución de amoniaco en metanol y el isopropanol por metanol, dejando la reacción en agitación constante a temperatura ambiente por 8 días. En la tercera se adicionó acetato de sodio y cianuro de potasio en metanol, la reacción se dejó a reflujo durante 3 días, sin embargo, ninguna procedió. La última reacción se realizó en dos etapas, la primera consistió en formar la imina **10** utilizando FEA y ácido acético como catalizador, la reacción se mantuvo a reflujo durante 64 horas, pero tampoco se llevó a cabo.

Las oximas **4** y **7** obtenidas de estrona (**1**) y *trans*-androsterona (**2**) sobre el carbono 17, se generaron con clorhidrato de hidroxilamina y acetato de sodio a reflujo durante una hora, ambas reacciones procedieron en su totalidad y fueron purificadas, observando la formación de ambas oximas, *E* y *Z* en el espectro de RMN. Una vez generadas las oximas **4** y **7**, se ensayó la adición nucleofílica de cianuro empleando diversas condiciones experimentales (**esquema I.6**); en todas ellas se empleó metanol como disolvente, con un rango de temperatura comprendido entre la temperatura ambiente y la temperatura de reflujo:

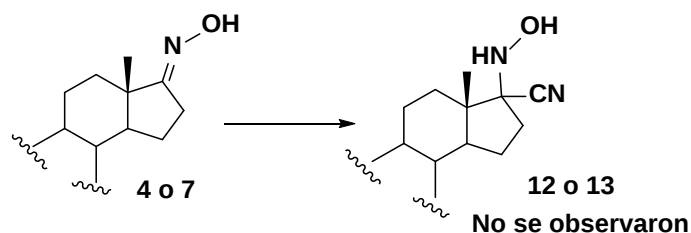
1-. Cianuro de potasio, en ausencia de catalizador.

2-. Cianuro de potasio en presencia de ZnCl_2 anhidro.

3-. TMSCN y ZnCl_2 anhidro.

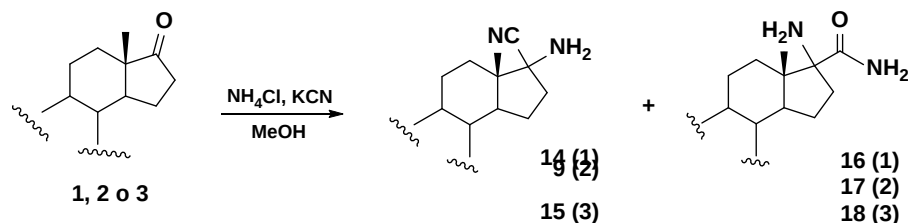
4-. TMSCN y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$.

Desafortunadamente, en ninguna de las condiciones anteriormente mencionada se observó evolución de la reacción; con el $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ se detectó la formación del correspondiente complejo mediante CCF pero tampoco evolucionó.



Esquema I.6. Adición del grupo nitrilo a las oximas **4** y **7** de estrona y *trans*-androsterona respectivamente

Alternativamente y partiendo de *trans*-androsterona (**2**), con 2 equivalentes de cianuro de potasio y de cloruro de amonio en metanol, la reacción se mantuvo a 80 °C durante 64 horas, obteniéndose inesperadamente la amida **17** y el aminonitrilo **9** (esperado), en un rendimiento bajo. Con objeto de optimizar las condiciones de esta reacción *one pot* hacia la formación del aminonitrilo deseado, se modificó tanto el número de equivalentes de ambos reactivos (KCN y NH_4Cl), como la temperatura de reacción. Así pues, partiendo de estrona, *trans*-androsterona y *trans*-dehidroandrosterona (**esquema I.7**), se observó que un incremento gradual en el número de equivalentes de los reactivos (hasta 7.0) conducía a un incremento sustancial en el rendimiento de la reacción, así como a una disminución en el tiempo de esta; también se comprobó que no era necesario emplear condiciones de reflujo, sino que bastaba agitación a temperatura ambiente durante un período de 2 días. En estas condiciones se observó la formación de una mezcla de los aminonitrilos buscados (**14**, **9**, **15**), junto con las correspondientes amidas (**16-18**), que no pudieron ser separados mediante purificación cromatográfica.

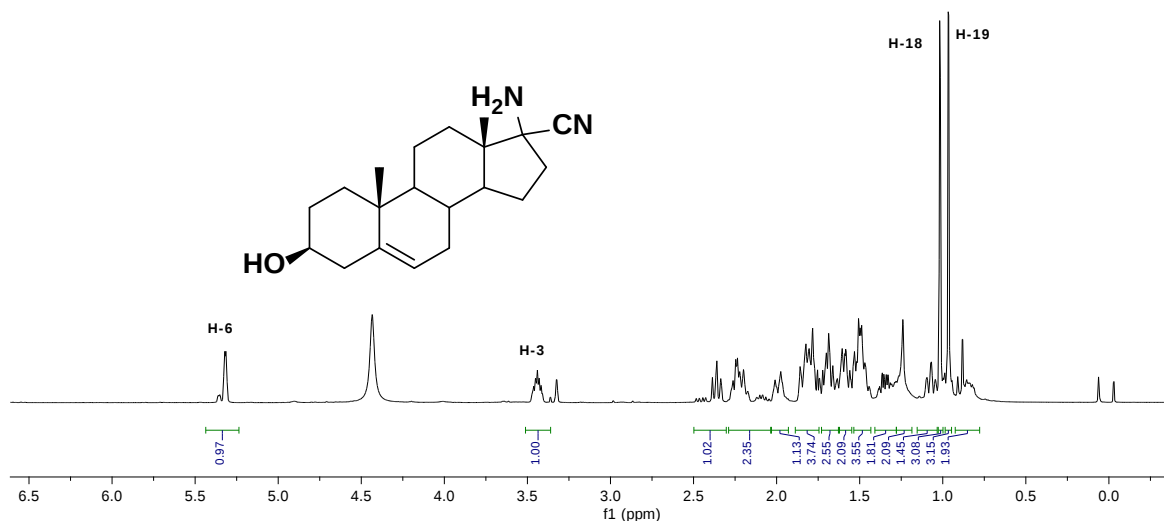


Esquema I.7. Formación de la mezcla de amida y aminonitrilo a partir de estrona (1), *trans*-androsterona (2) y *trans*-dehidroandrosterona (3) con cianuro de potasio y cloruro de amonio

Una vez finalizada la reacción de formación del aminonitrilo y la amida, se realizó un percolado sobre gel de sílice con hexano: acetato de etilo, para quitar las sales formadas en la reacción, para su posterior purificación en columna cromatográfica. No fue posible separar los productos de formación de la reacción ya que se encuentran en equilibrio, por lo que se analizó la mezcla de ambos, observando señales características de los dos en RMN.

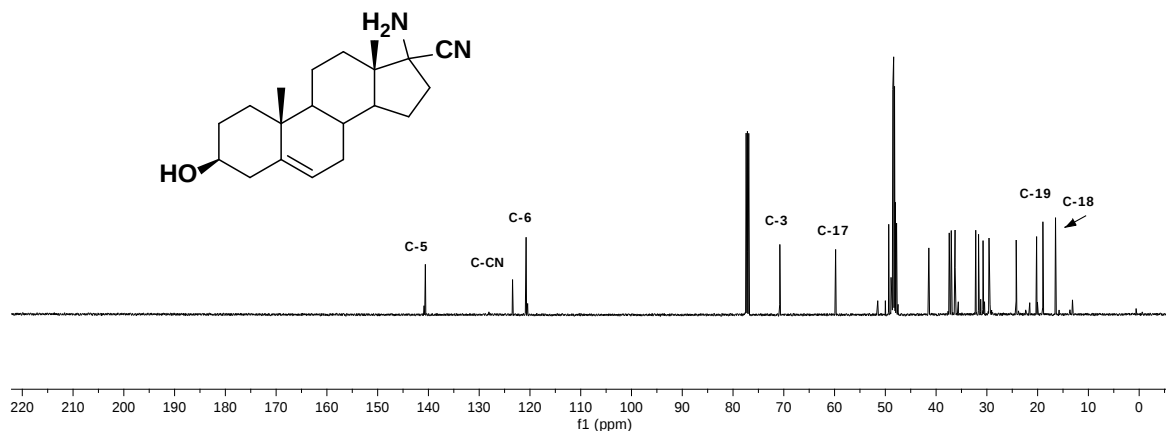
Dado que la formación de la amida debe ocurrir mediante la hidrólisis parcial del grupo nitrilo, se decidió añadir hidróxido de amonio, al inicio de la reacción con la finalidad de neutralizar el medio ácido, y así evitar la transformación a la amida, lo que llevó a obtener de forma pura los aminonitrilos buscados.

En el espectro de protón del aminonitrilo de *trans*-dehidroandrosterona (15) (**espectro I.5**), se observan dos señales simples alrededor de 1.00 ppm, correspondientes a los metilos 18 y 19; las dos señales a frecuencias más altas del compuesto 15, ambas como señales múltiples, resuenan a aproximadamente 3.50 y 5.40 ppm, y que corresponden al protón de C-3 y el protón vinílico de C-6, respectivamente.



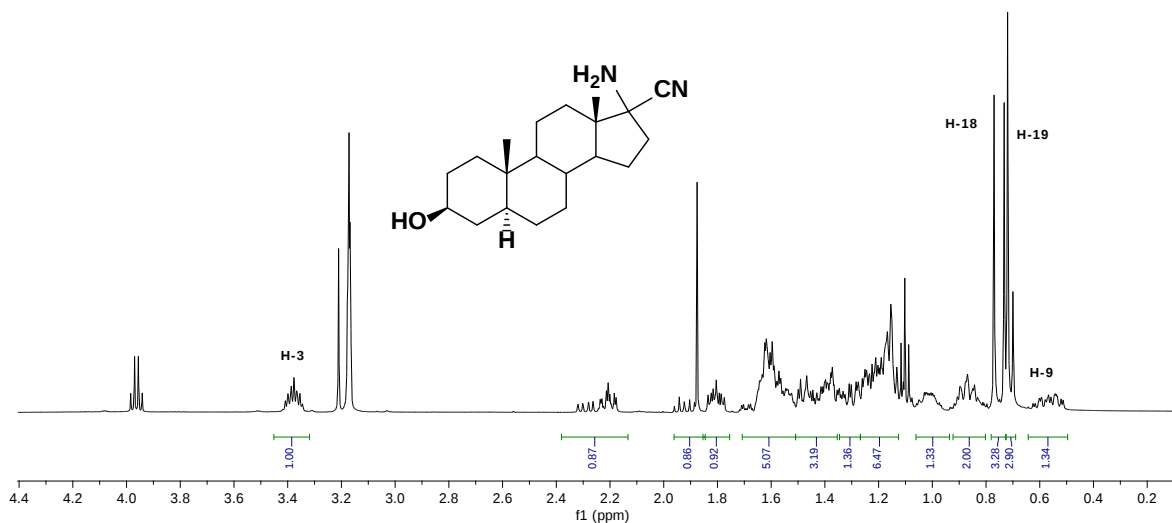
Espectro I.5. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de aminonitrilo de *trans*-dehidroandrosterona (15)

El espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **15** (**espectro I.6**) muestra claramente la incorporación del grupo nitrilo, observándose la señal correspondiente a aproximadamente 125.0 ppm, junto con la desaparición del grupo carbonilo en C-17 (en torno a 220.0 ppm), que se apantalla fuertemente hasta 60 ppm, lo cual es compatible con la formación del α -aminonitrilo. Otras señales relevantes son los carbonos vinílicos (C-5 y C-6), a 140.0 y 120.0 ppm, respectivamente, así como C-3, que resuena a 70.0 ppm.



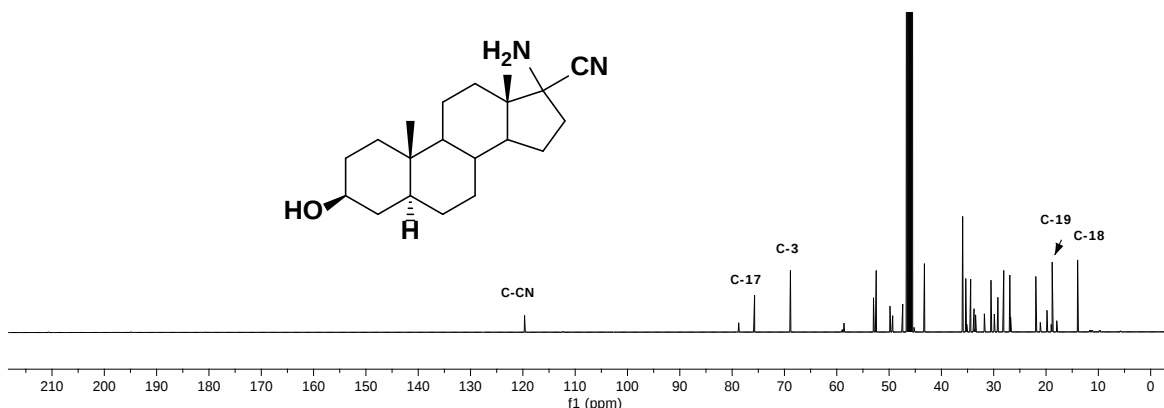
Espectro I.6. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de aminonitrilo de *trans*-dehidroandrosterona (**15**)

En el caso del aminonitrilo de *trans*-androsterona (**9**), en su espectro de RMN de protón (**espectro I.7**), igual que en el caso anterior se encuentran todas las señales del esqueleto esteroidal, pero ninguna señal que nos confirme la formación del derivado esperado.



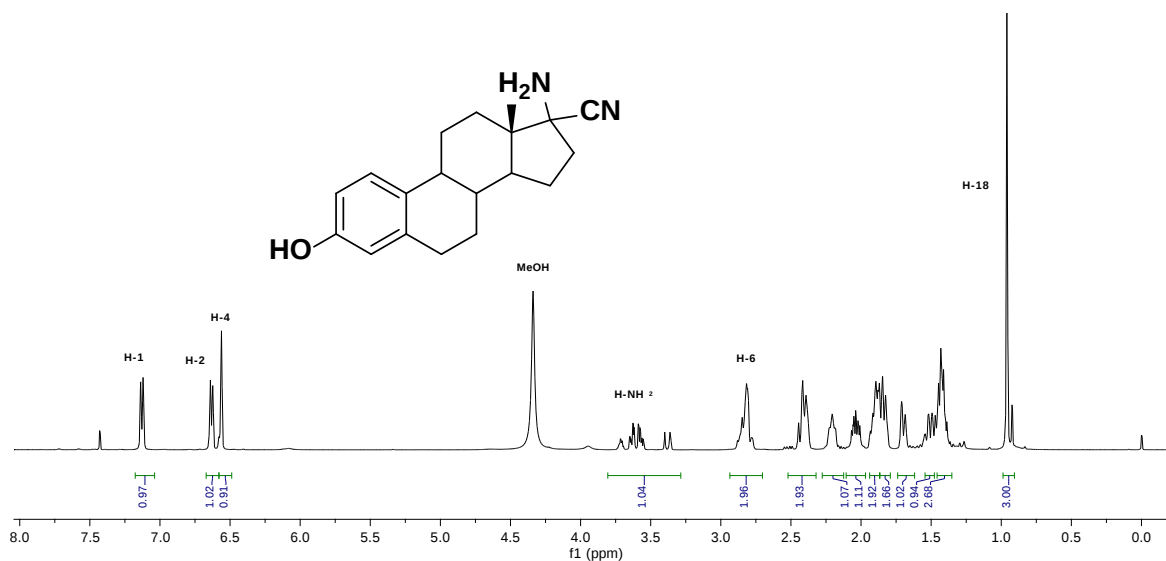
Espectro I.7. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de aminonitrilo de *trans*-androsterona **9**

En el caso del espectro de carbono (**espectro I.8**), entre 20.0 y 55.0 ppm se presentan todos los carbonos del esqueleto esteroidal no funcionalizado, en alrededor de 70.0 ppm se encuentra la señal de C-3, mientras en 75.0 ppm la señal de C-17, el cual se desplazó desde 220.0 ppm, finalmente como señal que confirma la transformación de la materia prima está el carbono del nitrilo en 122.6 ppm.



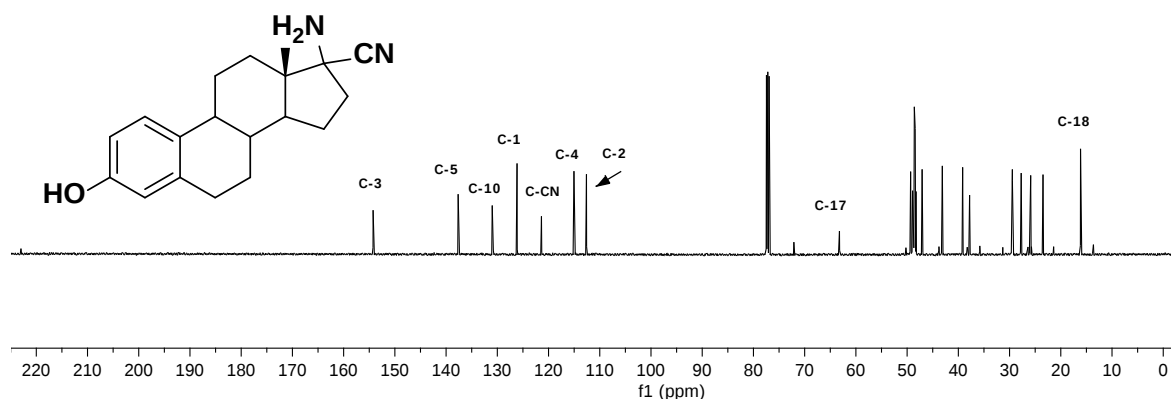
Espectro I.8. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de aminonitrilo de *trans*-androsterona (**9**)

Finalmente, en el caso del espectro de RMN de protón del aminonitrilo de estrona **14** (**espectro I.9**), se observa un singulete alrededor de 0.96 ppm, señal que pertenece al metilo 18, en 3.50 ppm, dos multipletes que corresponden con los protones de la amina y en la zona de aromáticos entre 6.50 y 7.20 ppm los protones del anillo A de la estrona.



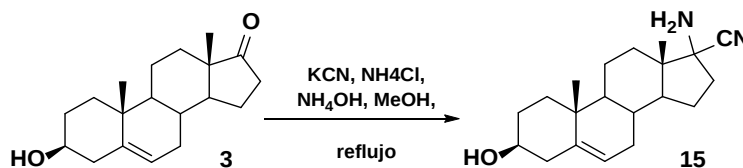
Espectro I.9. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de aminonitrilo de estrona **14**

De igual forma que en los casos anteriores para confirmar la formación del aminonitrilo **14** es necesario analizar el espectro de carbono (**espectro I.10**), en el cual a frecuencias bajas se ven las señales de los carbonos de los anillos B, C y D del esqueleto de la estrona, por 60.0 ppm se observa C-17, el cual al ser funcionalizado sufre un gran desplazamiento a frecuencias bajas, entre 110.0 ppm y 155.0 ppm los carbonos del anillo A, la señal del nitrilo en 121.3 ppm, confirma la formación del compuesto **14**.



Espectro I.10. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de aminonitrilo de estrona **14**

Una vez obtenidos los aminonitrilos de los tres esteroides, mediante una reacción de Strecker, en rendimientos moderados, para su posterior reducción con LiAlH_4 , obteniendo el diamino correspondiente, se decidió optimizar dichas reacciones, como el tiempo de reacción, se consideró que el tiempo óptimo para la reacción es de 2 días obteniendo menos del 50% de rendimiento, por lo que se probaron las mismas condiciones, pero a reflujo con la finalidad de reducir el tiempo de reacción y aumentar el rendimiento, sin embargo dicho proceso solo dio un buen resultado en el caso de la *trans*-dehidroandrosterona (**3**), ocurriendo la reacción en un tiempo de 6 horas a reflujo del metanol, con un rendimiento que va entre el 70 y el 80%, por el contrario en el caso de la estrona (**1**) y la *trans*-androsterona (**2**) el rendimiento disminuye, por lo que la obtención de dichos compuestos se mantuvo a temperatura ambiente (**esquema I.8**).



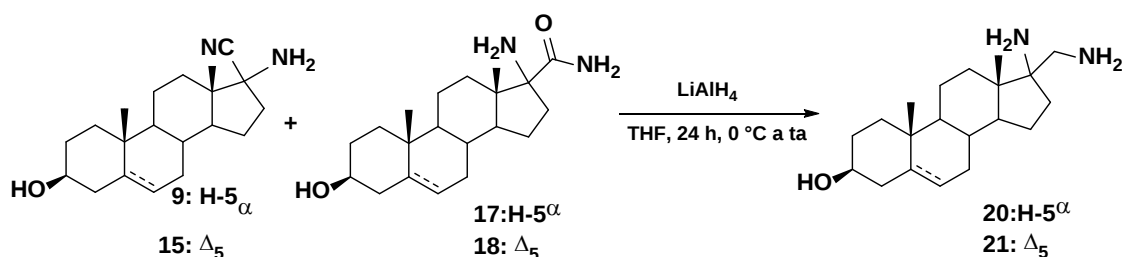
Esquema I.8. Formación del aminonitrilo de *trans*-dehidroandrosterona **15**

I.4.3. Obtención del derivado diamino esteroidal

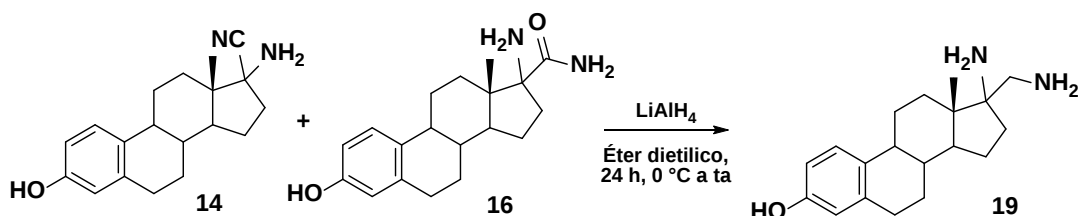
El siguiente paso en la estrategia sintética para la preparación de heterociclos espiránicos derivados de esteroides fue la reducción del grupo nitrilo para originar un diamino. Dado que es posible obtener el diamino por medio de reducción tanto del aminonitrilo como de la amida, la mezcla de ambos se sometió a una reducción; para llevar a cabo esta reacción se utilizó hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4). Cuando se empleó como disolvente THF, la reducción de los derivados de *trans*-androsterona **9** y **17** y de *trans*-dehidroandrosterona **15** y **18** (**esquema I.9**) procedió sin problema, sin embargo, la reducción de los derivados de estrona **14** y **16** no se llevó a cabo, por lo que se decidió utilizar otro disolvente como éter etílico (**esquema I.10**). Cabe destacar que la sustitución de THF por éter dietílico permitió la reducción de los derivados de estrona (**esquema I.8**), pero no los de *trans*-androsterona ni de *trans*-dehidroandrosterona.

Tabla I.1. Disolventes empleados en la reacción de reducción de los grupos aminonitrilo y aminoamida

Compuesto Disolvente	14 y 16 (Derivados de estrona)	9 y 17 (Derivados de <i>trans</i> -androsterona)	15 y 18 (Derivados de <i>trans</i> -dehidroandrosterona)
THF	No hubo reacción	Se obtuvo el producto esperado	No hubo reacción
Éter dietílico	Se obtuvo el producto esperado	No hubo reacción	No hubo reacción

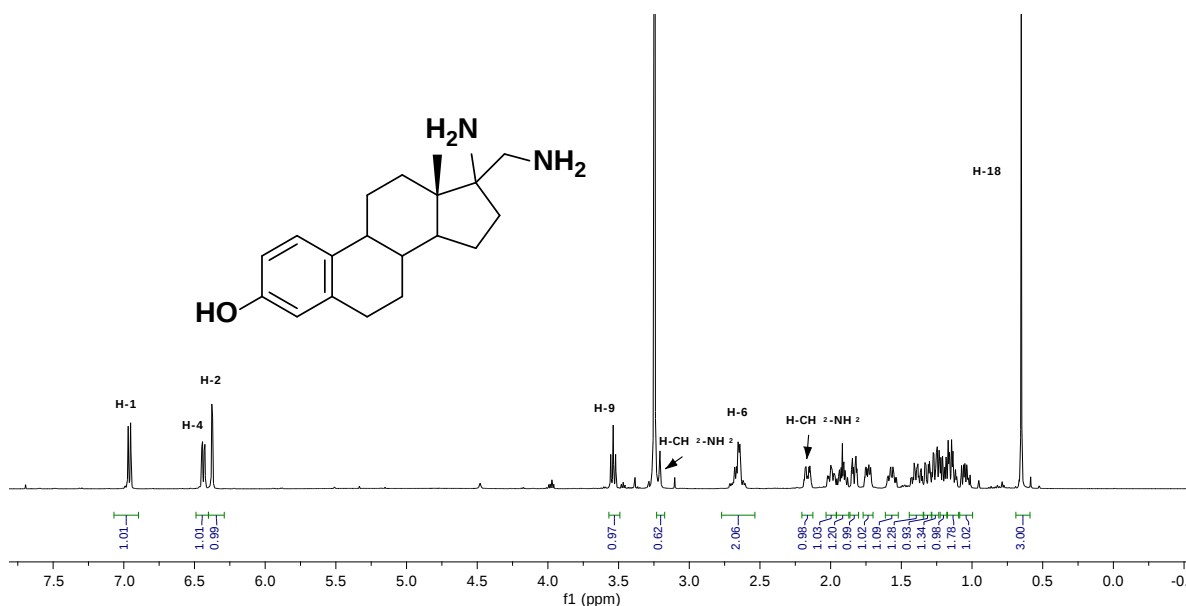


Esquema I.9. Formación de los derivados diamino **20** y **21**, a partir de la mezcla de aminonitrilo y amida de *trans*-androsterona **9** y **17** y de la *trans*-dehidroandrosterona **15** y **18** respectivamente, con LiAlH_4



Esquema I.10. Formación del derivado diamino **19**, a partir de la mezcla aminonitrilo y amida de estrona **14** y **16** con LiAlH_4

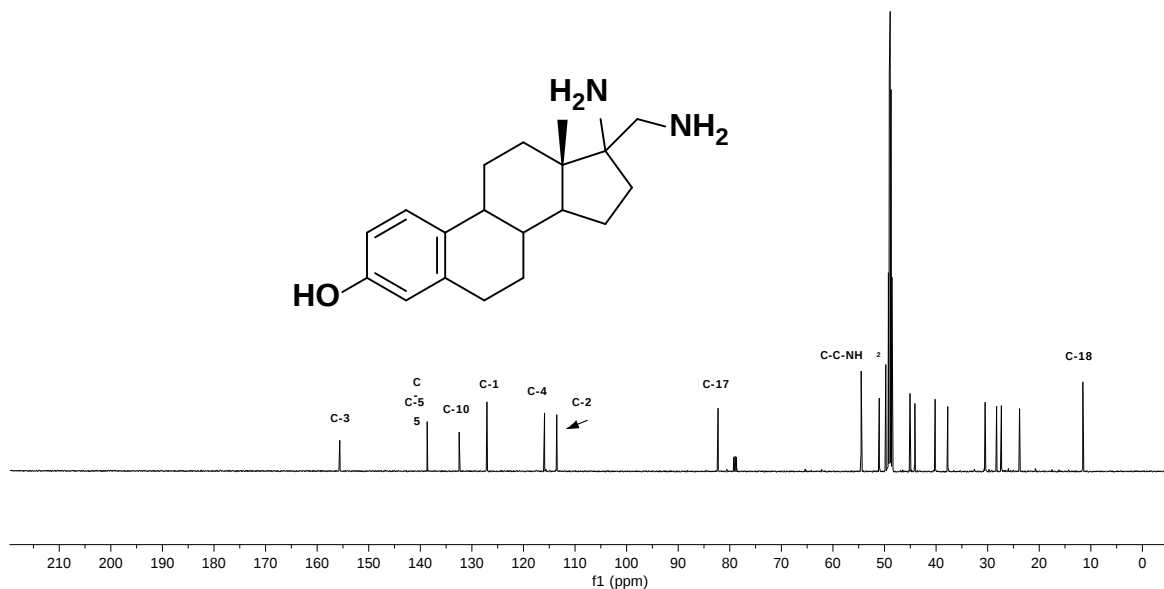
En ambos casos las reacciones fueron detenidas mediante la adición de agua, se eliminaron las sales filtrando sobre gel de sílice, y finalmente fueron purificados en columna cromatográfica, para su posterior caracterización mediante RMN de ^1H y de ^{13}C



Espectro I.11. Espectro ^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) de diamino de estrona (**19**)

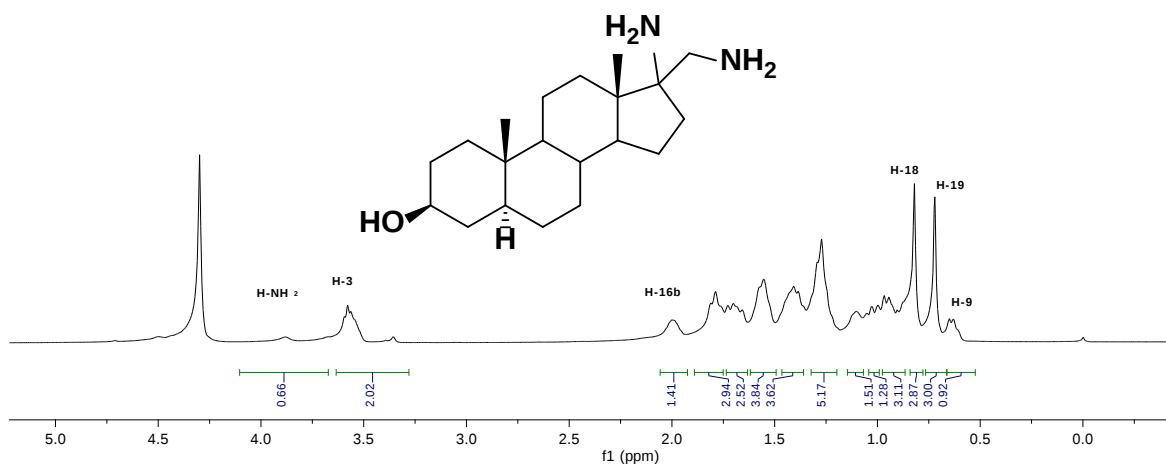
En el espectro de RMN de protón del diamino de estrona (**19**) (**espectro I.11**), se observa una señal simple a frecuencias bajas la cual corresponde al metilo 18, por 2.20 ppm y 3.20 ppm como señales dobles, se observan los protones del carbono unido a la amina primaria, esta señal sirve para inferir la reducción del nitrilo. Para confirmar la formación del diamino **19** se analizó el espectro de carbono (**espectro I.12**), en el que se observa en 53.0 ppm el CH_2 en el que se transforma el nitrilo, carbono que nos da la pauta de la reducción, por 80.5 ppm se encuentra el carbono 17, el cual se desplaza aproximadamente 20 ppm hacia frecuencias altas con respecto al aminonitrilo esteroideal **14**, en la zona de aromáticos, se

aprecian todos los carbonos del anillo A de la estrona, por otro lado, ya no se observa el carbono del nitrilo en 120 ppm.



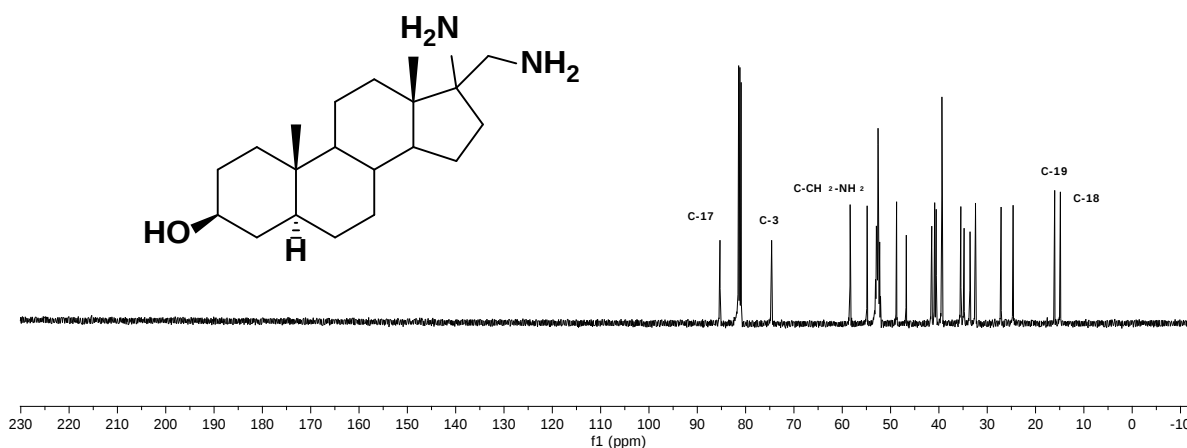
Espectro I.12. Espectro ¹³C RMN (125.5 MHz, CD₃OD) de diamino de estrona (**19**)

En el caso del diamino de *trans*-androsterona (**20**), en el espectro de RMN de protón (**espectro I.13**), en 3.35 ppm se encuentra una señal múltiple que corresponde a uno de los protones del CH₂ de la amina primaria, el otro protón se encuentra cerca de 4.00 ppm, por 3.50 ppm se presenta el multiplete del protón de C-3.



Espectro I.13. Espectro ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) de diamino de *trans*-androsterona (**20**)

En el espectro de RMN de carbono del diamino **20** (**espectro I.13**) se encuentran todas las señales del esqueleto esteroideal, comparando este con el del aminonitrilo **9** se puede observar, la señal del CH₂ de la amina primaria formada por la reducción del nitrilo en 59.0 ppm, el cual reemplaza a la señal del nitrilo en 120.0 ppm, a frecuencias altas por 75.0 ppm se haya C-3 y por 85.0 ppm el C-17, el cual de igual forma que en el diamino de estrona (**19**) se encuentra a 10 ppm más desplazado hacia frecuencias altas que en el aminonitrilo **9**.



Espectro I.14. Espectro ¹³C RMN (125.5 MHz, CDCl₃) de diamino de *trans*-androsterona (**20**)

I.4.4. Funcionalización de los diaminos esteroideos

Una vez obtenidos los diaminos de los tres esteroides, se realizaron las pruebas de formación de los espiroheterociclos.

Los primeros intentos se realizaron con el diamino de *trans*-androsterona (**20**), con objeto de optimizar esta reacción, se ha llevado a cabo la modificación de una amplia gama de condiciones experimentales (**tabla I.2**), que incluye el agente tioacilante (1,1'-tiocarbonildiimidazol (TCDI) o tiofosgeno), disolvente, en cuanto a polaridad y punto de ebullición (DCM, THF, MeOH, DMF, temperatura (ambiente → 125 °C), catalizador (ninguno, Et₃N, K₂CO₃, piperidina, NaHCO₃, Cs₂CO₃), o tiempo de reacción (3 a 6 días).

Los resultados ponen de manifiesto la importancia del empleo de altas temperaturas (por encima de 80 °C), el disolvente (DMF), así como la naturaleza del catalizador básico (K₂CO₃, Cs₂CO₃) para observar alguna evolución (**Tabla I.2**, entradas 6, 9-11).

Tabla I.2. Condiciones ensayadas para la obtención de la espirotiourea a partir del derivado diamino de la *trans*-androsterona **21** y el 1,1-tiocarbonil-di-imidazol

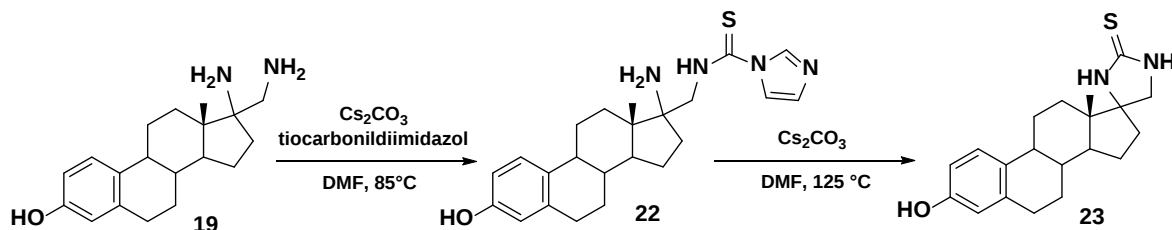
Ensayo	Disolvente	Temperatura	Catalizador	Resultado
1	DCM	ambiente	Ninguno	No hubo reacción
2	DCM	ambiente	(CH ₃ CH ₂) ₃ N	No hubo reacción
3	DCM	40 °C	(CH ₃ CH ₂) ₃ N	No hubo reacción
4	MeOH	Reflujo	(CH ₃ CH ₂) ₃ N	No hubo reacción
5	DMF	ambiente	K ₂ CO ₃	No hubo reacción
6	DMF	85 °C	K ₂ CO ₃	Forma un intermediario en muy bajo rendimiento
7	THF	70 °C	Piperidina	No hubo reacción
8*	DCM/MeOH	0 °C	Na ₂ HCO ₃	No hubo reacción
9**	DMF	85 °C	K ₂ CO ₃	Formación de intermediario (50%)
10**	DMF	85 °C	Cs ₂ CO ₃	Formación de intermediario (cuantitativo)
11**	DMF	125 °C	Cs ₂ CO ₃	Compuesto espiránico

* Se utilizó tiofosgeno como reactivo

Se utilizó la diamina de estrona **19 como materia prima

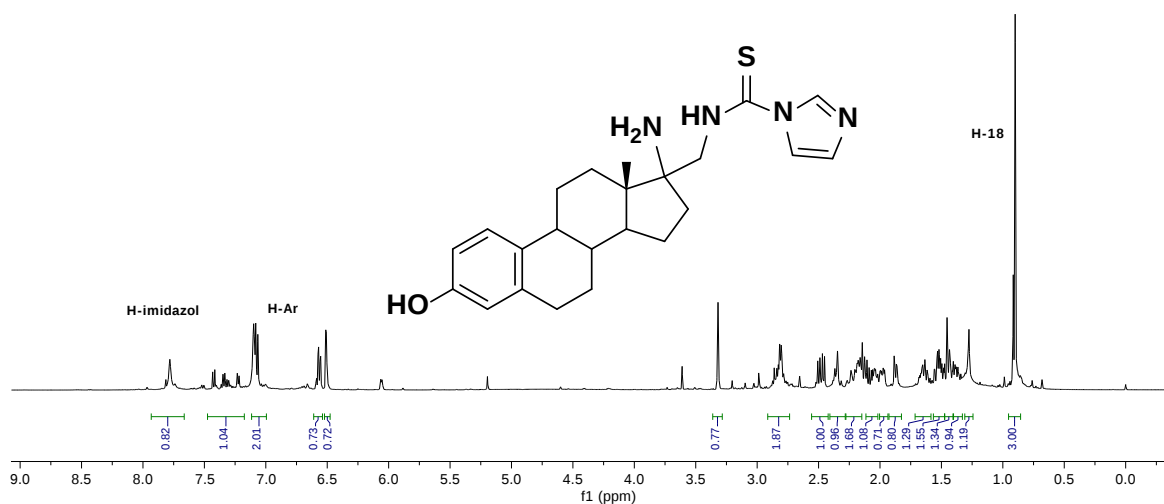
Partiendo del diamino derivado de estrona **19**, y usando DMF como disolvente, y K₂CO₃ como base a una temperatura de 85 °C (**Tabla I.2**, entrada 9) se aisló la tiourea **22** (50% de rendimiento tras purificación cromatográfica), producto intermedio en la formación de **23**. Su formación demuestra que la reacción comienza con el ataque nucleófilo del grupo amino primario de **19** sobre el TCDI, desplazando a uno de los dos fragmentos de imidazol en un mecanismo análogo a una sustitución nucleofílica acíclica sobre derivados de ácido; de forma análoga, debería producirse el ataque nucleófilo intramolecular del grupo amino libre en **22**, eliminando el segundo fragmento de imidazol, y conduciendo al fragmento espiránico de tipo imidazolidina-2-tiona de **23**. No obstante, la baja reactividad del sistema se pone de manifiesto con el hecho de que no se detectara el compuesto final deseado bajo estas condiciones experimentales. La sustitución del catalizador básico por Cs₂CO₃ (entrada 10) permitió acceder al compuesto **22**, esta vez con rendimiento cuantitativo. Sólo cuando se incrementó la temperatura hasta 125 °C, en presencia de Cs₂CO₃, se pudo aislar el espiroderivado deseado **23** con bajo rendimiento (20%). Estos resultados también muestran la diferencia de reactividad entre los distintos esteroides; así pues, comparando las entradas 6 y 9, que emplean las mismas condiciones (DMF, K₂CO₃, 85 °C), para el caso de la estrona,

el intermedio **22** se obtiene con un 50% de rendimiento, mientras que, para la *trans*-androsterona, el rendimiento del mismo producto es muy reducido.



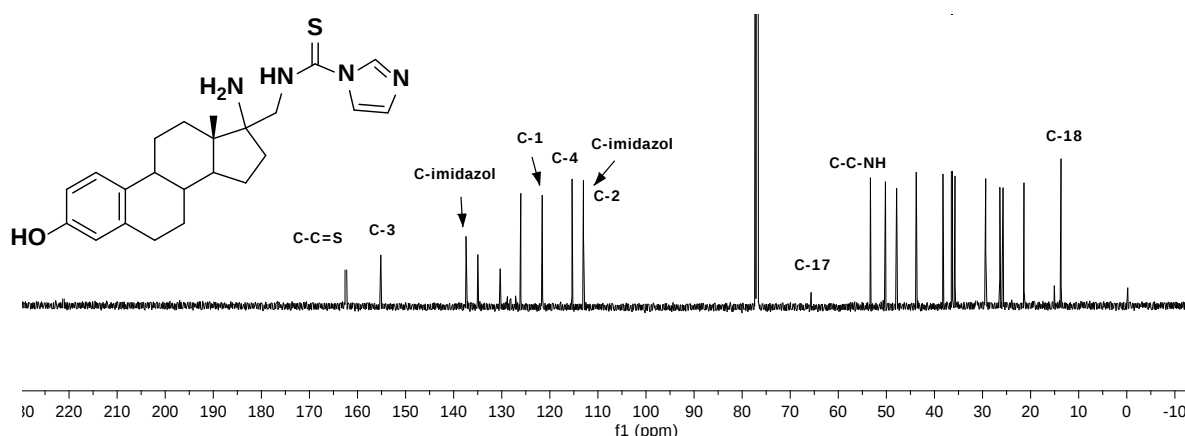
Esquema I.11. Formación de compuesto **23** a partir del derivado diamino de estrona **19**

En el espectro de RMN de protón de **22** (**espectro I.15**) se observa a frecuencias bajas una señal simple que integra para 3 protones y corresponde al metilo 18, en la región de aromáticos entre 6.50 y 7.20 ppm se encuentran los protones del anillo A de la estrona y entre 7.20 y 8.00 ppm los 3 protones del anillo de imidazol.



Espectro I.15. Espectro ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de compuesto **22**

En el espectro de carbono del compuesto **22** (**espectro I.16**), se observa por 50.0 ppm la señal del carbono que soporta a la amina de la tiourea, por 65.0 ppm la señal del carbono 17, entre 110.0 y 140.0 ppm los carbonos del anillo A de la estrona y los 3 carbonos del anillo del imidazol, por 155.0 ppm la señal del carbono 3 y sobre 160.0 ppm la señal del carbono del grupo tiona (CS).



Espectro I.16. Espectro ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de intermediario **22**

Con estos resultados se decidió probar la reacción con carbonato de cesio a mayor temperatura por lo que se realizó un nuevo ensayo con el intermediario **22** a 125°C , observando la formación de un nuevo compuesto de menor polaridad. En este caso al analizar el espectro de carbono del compuesto nuevo, se observó en 56.7 ppm la señal de C-1' del heterociclo recién formado. Por otra parte, en 68.4 ppm el carbono espiránico. En 167.9 ppm el carbono del tiocarbonil. Además, en este espectro ya no se observan los 3 carbonos del anillo de imidazol, de la materia prima. No obstante, en el espectro de protón no se pudo observar alguna señal que confirmara la formación del heterociclo.

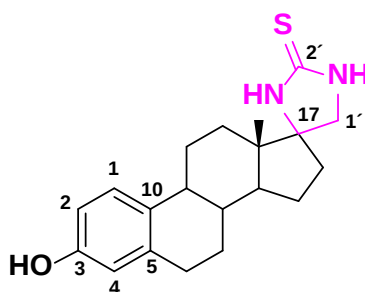
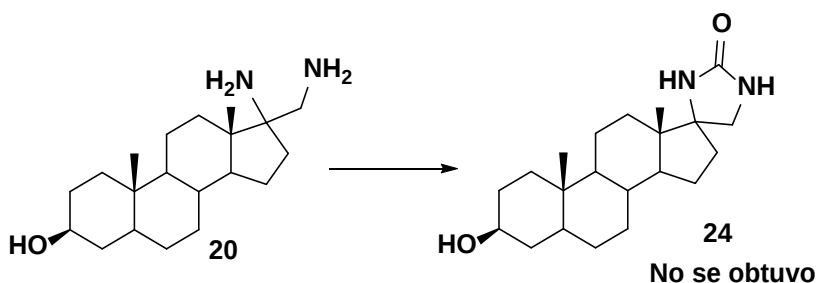


Tabla I.3. Desplazamientos químicos de ^{13}C de RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de la tiourea cíclica **23**

Carbono	Desplazamiento químico (ppm)
2'	167.9
3	160.7
5	139.6
10	132.6
1	130.8
4	129.3
2	126.2
17	68.4
1'	56.7

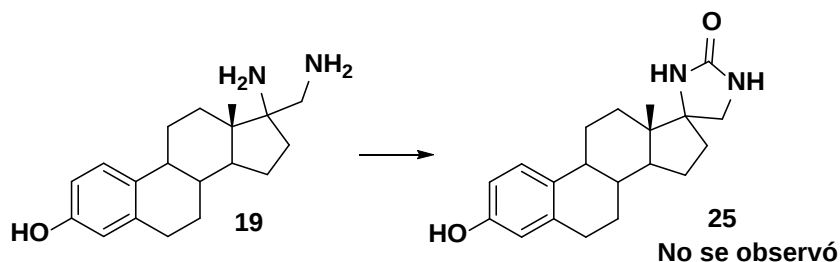
Con la intención de formar un espiro heterociclo isótero, pero con oxígeno se decidió llevar a cabo una reacción con trifosgeno (**esquema I.12**), en un medio bifásico, en una solución acuosa de bicarbonato y una mezcla DCM/MeOH, El trifosgeno (carbonato de

bis(triclorometilo)) es un equivalente sintético del fosgeno de más fácil manejo que este (es sólido y fácilmente manejable).⁵⁴ No obstante, no se observó la formación del producto esperado.



Esquema I.12. Formación de espiro derivados de tipo urea 24

Posteriormente se probó la reacción con trifosgeno, utilizando ahora el diamino de estrona (**19**) (**esquema I.13**), en esta ocasión se utilizó THF como disolvente y carbonato de calcio como catalizador, la reacción se siguió durante 3 días a temperatura ambiente, pero no se observó ningún cambio, por lo que se calentó a reflujo, observando un ligero progreso en la reacción. Se mantuvo por más tiempo sin presentar avance, por lo que se decidió hacer otros ensayos, cambiar el disolvente por DCM y adicionar un catalizador como piperidina, sin embargo, tampoco se notó algún cambio en la materia prima.



Esquema I.13. Formación del espiro derivado tipo urea 25

Posteriormente se probó el diamino de la *trans*-dehidroandrosterona (**21**), dicha reacción también se probó con trifosgeno, se utilizó catálisis ácida en lugar de básica, como APTS en DCM. Al observar que la reacción no procedió se realizó otro ensayo, en medio ácido, pero sustituyendo el disolvente por THF, manteniendo la reacción a reflujo, sin embargo, este ensayo tampoco tuvo éxito. Continuando con los ensayos del diamino de *trans*-dehidroandrosterona (**21**), se utilizó trifosgeno y acetato de sodio como catalizador en THF, se observó la formación de nuevos compuestos, pero en cantidades ínfimas, por lo que el ensayo fue considerado como negativo. A partir del mismo compuesto de partida se llevó a

cabo un nuevo ensayo en THF, con 1,1-carbonildiimidazol, se calentó a reflujo durante 6 días, pero no hubo reacción. Sin obtener resultados hasta el momento se decidió evaluar las mismas condiciones con el tiocarbonildiimidazol, sin embargo, tampoco funciono, al no presentar cambios a 125 °C se decidió probar a 150 °C, sin observar cambio alguno. Por lo que se decidió continuar con trifosgeno, se preparó una reacción utilizando piridina como catalizador, en tolueno a 0 °C, observando en placa la formación de dos nuevos compuestos, los cuales no pudieron ser caracterizados.

Tabla I.4. Condiciones de reacción ensayadas para la formación de espiroureas sin obtener los resultados esperados

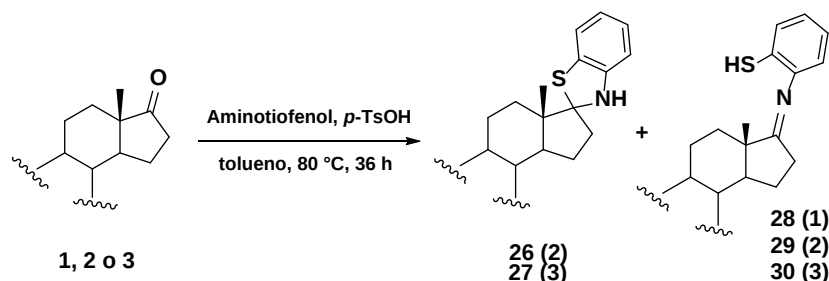
Materia prima	Reactivo	Disolvente	Temperatura	Catalizador	Resultado
21	Trifosgeno	DCM/MeOH	0 °C	Na ₂ HCO ₃	No hubo reacción
19	Trifosgeno	THF	ambiente	CaCO ₃	No hubo reacción
19	Trifosgeno	THF	Reflujo	CaCO ₃	No hubo reacción
19	Trifosgeno	DCM	Reflujo	Piperidina	No hubo reacción
20	Trifosgeno	DCM	ambiente	APTS	No hubo reacción
20	Trifosgeno	THF	reflujo	APTS	No hubo reacción
20	Trifosgeno	THF	reflujo	Acetato de sodio	No hubo reacción
20	1,1-carbonildiimidazol	THF	Reflujo	Piperidina	No hubo reacción
19	1,1-carbonildiimidazol	DMF	125 °C	Cs ₂ CO ₃	No hubo reacción
19	1,1-carbonildiimidazol	DMF	150 °C	Cs ₂ CO ₃	No hubo reacción
20	Trifosgeno	Tolueno	0 °C	Piridina	Mezcla compleja

Dado que no se consiguió acceder a la función de tipo imidazolidin-2-ona (urea cíclica) en ninguno de los esteroides, bajo ninguna de las condiciones experimentales ensayadas, se decidió incorporar otro tipo de estructuras heterocíclicas espiránicas.

I.4.5. Síntesis de espiroesteroides con un fragmento de tipo benzotiazolina sobre la posición 17 de estrona (1), *trans*-androsterona (2) y *trans*-dehidroandrosterona (3)

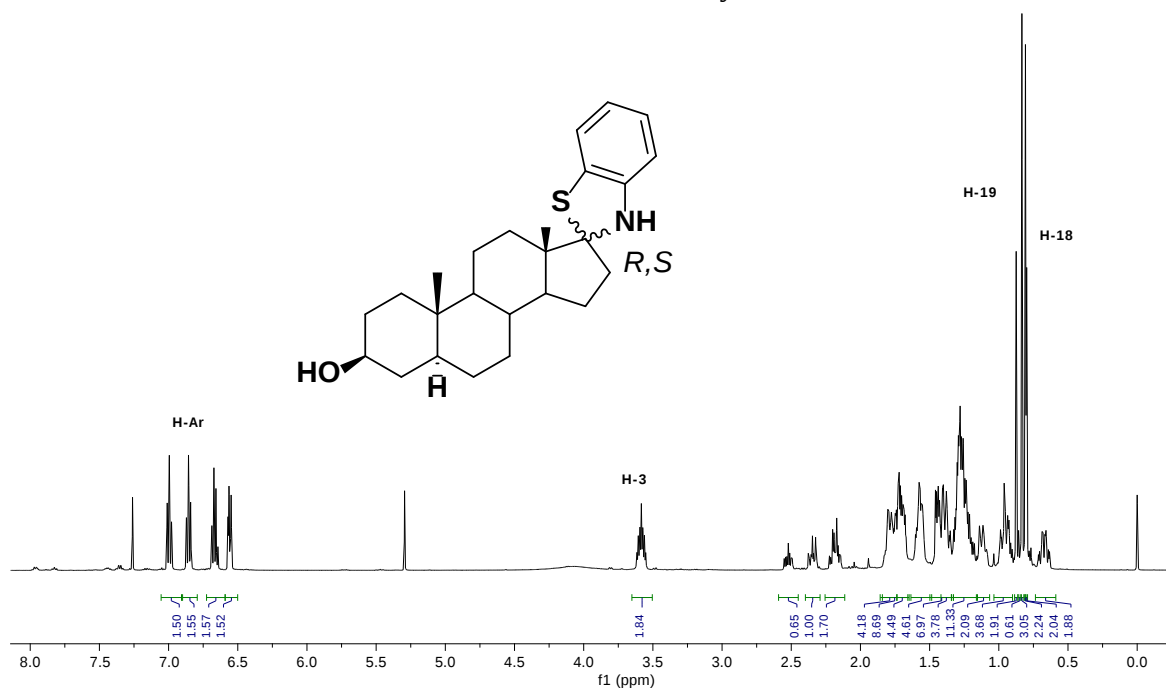
Para la formación de los derivados de benzotiazolina a partir de los 3 esteroides, se realizaron múltiples experimentos, probando diferentes condiciones de reacción. En primera instancia se realizó la reacción en un proceso libre de disolvente, usando como soporte inorgánico alúmina neutra, dejando la reacción en agitación constante a temperatura ambiente durante varios días sin obtener ningún resultado. Posteriormente, se subió la temperatura llevando la reacción a 80 °C, sin observar ningún cambio. Tras varios intentos, aumentando equivalentes y triturando en mortero se decidió cambiar la metodología. Se pensó en un disolvente apolar o uno polar aprótico con la finalidad de favorecer la reacción; por lo que fue utilizado tolueno, en un inicio se realizó a temperatura ambiente y sin catalizador, aumentando paulatinamente la temperatura sin observar cambio alguno, después se probó con un catalizador ácido, para activar al grupo carbonilo. Por reportes encontrados en la literatura, se realizó con ácido *p*-toluensulfónico a temperatura ambiente, sin observar resultado, con la finalidad de aumentar la interacción molecular y favorecer la reacción, se subió la temperatura, llevando la reacción a 80 °C (**esquema I.14**), de esta manera y con ayuda del catalizador se obtuvo el producto esperado. En la síntesis de los derivados con una porción benzotiazolina en la posición 17 de estrona (1), *trans*-androsterona (2), y *trans*-dehidroandrosterona (3), se utilizó aminotiofenol como binucleófilo para la formación del grupo benzotiazolina, las reacciones procedieron en un alto rendimiento, en el caso de *trans*-androsterona y *trans*-dehidroandrosterona se generó la mezcla de epímeros del espiroheterociclo, sin embargo en su mayoría se observa la presencia de la imina intermediaria **28**, **29** o **30**, observando la mezcla *E* y *Z*, la reacción se presenta de manera diastereoselectiva, en una proporción 60:40 aproximadamente, en el caso de la reacción de estrona (1), solo se presentó la mezcla de iminas intermediarias **28**, sin observar la presencia del derivado benzofusionado **34**. Las reacciones fueron purificadas en columna cromatográfica con gel de sílice. Observando únicamente la formación de dos nuevos

productos (la imina y el benzofusionado), y materia prima de cada uno de los esqueletos esteroidales.



Esquema I.14. Condiciones de reacción para la formación de espiro derivados utilizando aminotiofenol

Los derivados fueron caracterizados mediante RMN ^1H y ^{13}C .

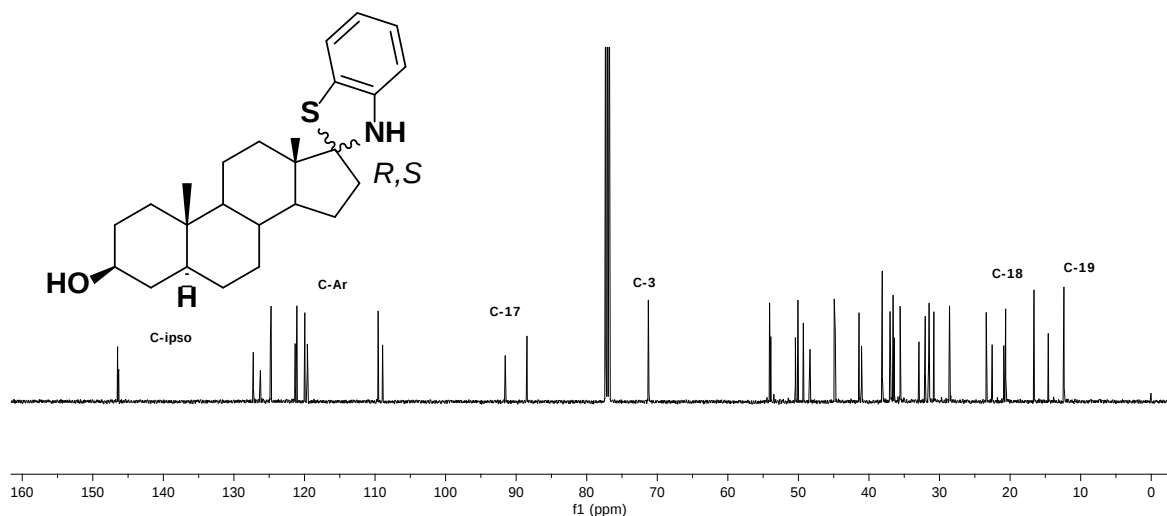


Espectro I.17. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) benzotiazolina de *trans*-androsterona (**26**)

En el espectro de ^1H RMN (**espectro I.17**) del derivado de *trans*-androsterona **26**, se observa la presencia del núcleo esteroidal entre 0.58 ppm y 2.60 ppm, en este rango se encuentran 4 señales simples, que corresponden a los metilos 18 y 19 de ambos epímeros, en 3.59 ppm se ve una señal múltiple perteneciente al protón de C-3, el cual se encuentra desapantallado debido a su cercanía con el grupo hidroxilo. A su vez se intuye una señal ancha en torno a 4.00 ppm la cual corresponde al OH de C-3. Entre 6.54 ppm y 6.93 ppm los

protones aromáticos del grupo benzotiazolina, a su vez se puede ver claramente la presencia de dos juegos de señales debido a la presencia de ambos epímeros.

En el espectro de carbono del derivado **26 (espectro I.18)**, se observan a frecuencias bajas cuatro señales, que corresponden a los carbonos 18 y 19, a frecuencias altas por 70.0 ppm, se encuentra el carbono 3. Alrededor de 90.0 ppm las señales correspondientes a los carbonos espiro de ambos epímeros; entre 108.0 ppm y 125.0 ppm los CH del anillo aromático de la benzotiazolina, a frecuencias altas entre 126.0 ppm y 147.0 ppm, los carbonos *ipso*, los cuales también se presentan como dos juegos de señales, uno por cada epímero, los carbonos cercanos al átomo de nitrógeno se presentan más desplazados a frecuencias altas, que los carbonos próximos al átomo de azufre.

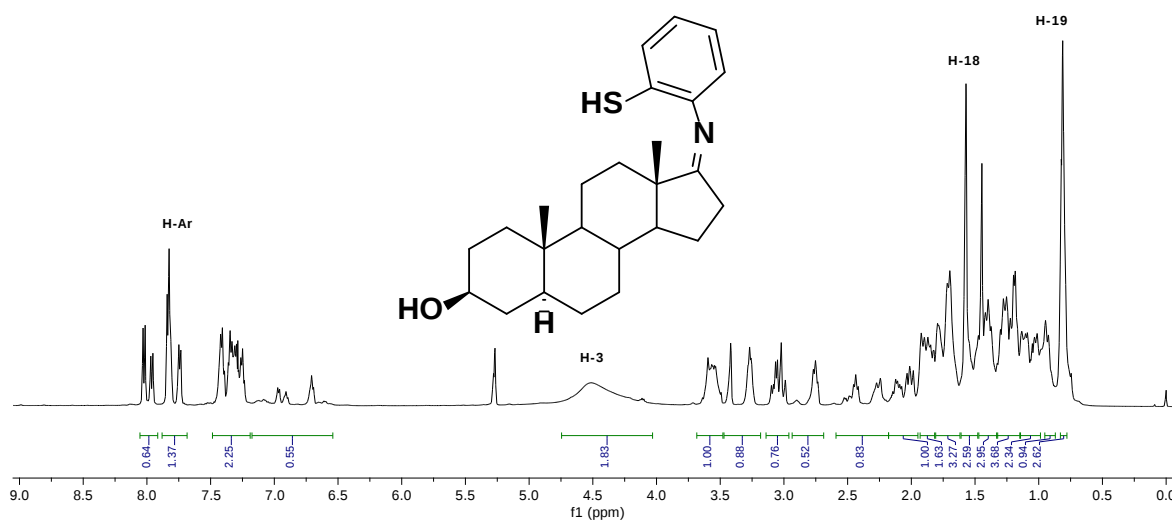


Espectro I.18. Espectro de ¹³C RMN (125.5 MHz, CDCl₃) benzotiazolina de *trans*-androsterona (**26**)

Para dilucidar la configuración absoluta del nuevo estereocentro se realizó un experimento NOESY; sin embargo, no fue posible observar las interacciones entre los protones del metilo 18 y la amina, por lo que no se logró obtener la configuración de ninguno de los derivados. Por ello, se recurrió al empleo de cálculos teóricos para la obtención de las configuraciones, los cuales se describen más adelante.

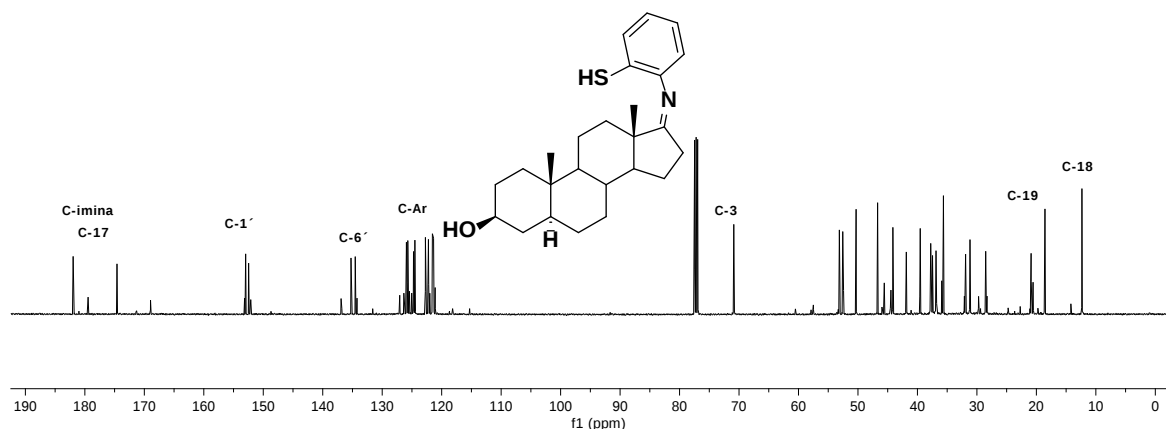
Por otro lado, en los espectros de las iminas de *trans*-androsterona (**29**), se observan en el espectro de protón (**espectro I.19**), 2 señales simples, las cuales pertenecen a los metilos 18 y 19 de la mezcla de iminas **29**, por 4.50 ppm una señal múltiple que corresponde al protón de C-3, entre 6.50 ppm y 8.00 ppm se encuentran dos juegos de señales los cuales pertenecen

a los anillos aromáticos de la mezcla de iminas *E* y *Z*, las cuales se encuentra en una proporción aproximada 50:50.



Espectro I.19. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) imina intermediaria benzotiazolina de *trans*-androsterona (29)

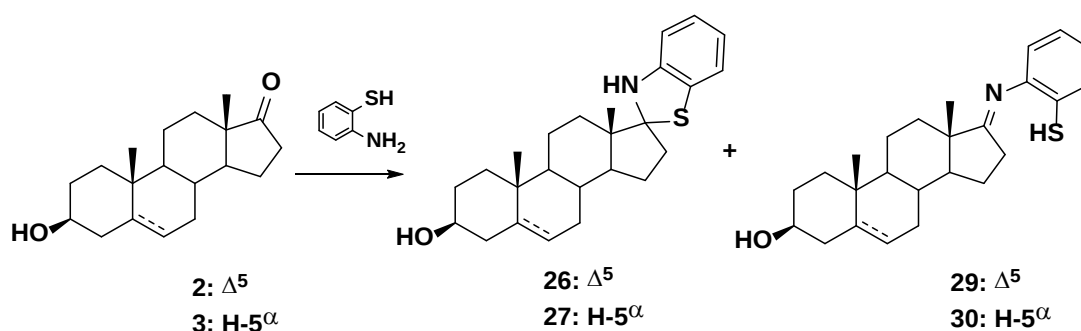
Por otro lado, en el espectro de carbono (**espectro I.20**) se observan a frecuencias bajas las señales de carbono de los metilos 18 y 19, alrededor de 70.0 ppm se encuentra C-3, a frecuencias altas entre 120.0 ppm y 130.0 ppm los CH del anillo aromático. Por 135.0 ppm los dos carbonos de C-6', y en 155.0 ppm los carbonos de C-1'. Entre 175.0 ppm y 185.0 ppm los carbonos de la mezcla de iminas (C-17).



Espectro I.20. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de imina intermediaria benzotiazolina de *trans*-androsterona (29)

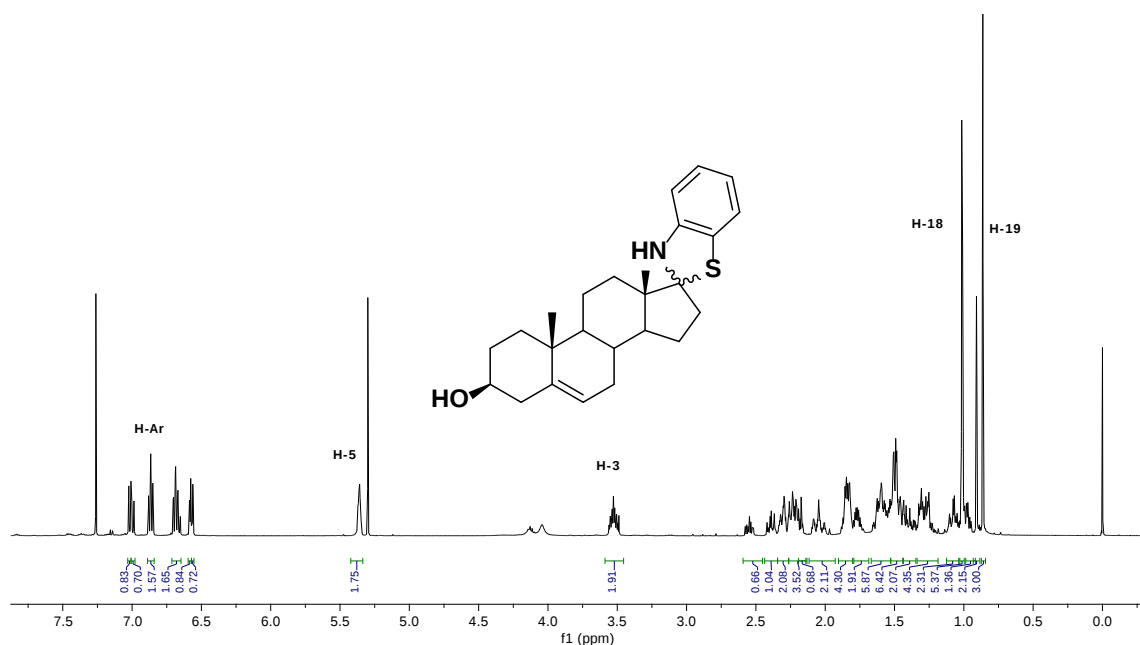
Considerando que el rendimiento de la reacción era bastante bajo y el tiempo de reacción, bastante prolongado; se intentó optimizar la formación de la benzotiazolina

derivada de androsterona. Utilizando PPTS como catalizador, se observó que, a 85 °C en tolueno, la reacción procede en 6 horas, la cantidad de disolvente se varió en dos ensayos, observando que cuando se realiza una menor disolución, hay una mayor presencia de la imina intermediaria con relación al derivado espiránico, por lo que en este ensayo la disolución es importante. Por otro lado, se probó la reacción en DMC a 40 °C. En este caso la reacción procede de manera más limpia, observando casi exclusivamente la formación del derivado benzofusionado. Sin embargo, el tiempo de reacción es de tres días debido a la menor temperatura de ebullición del disolvente, a su vez no se logra el consumo total de la materia prima. De igual forma que en la *trans*-androsterona se realizaron los mismos ensayos para *trans*-dehidroandrosterona (**esquema I.15**), observando la formación del mismo subproducto. El mejor rendimiento en ambos casos fue observado en tolueno, utilizando PPTS como catalizador a 85 °C.



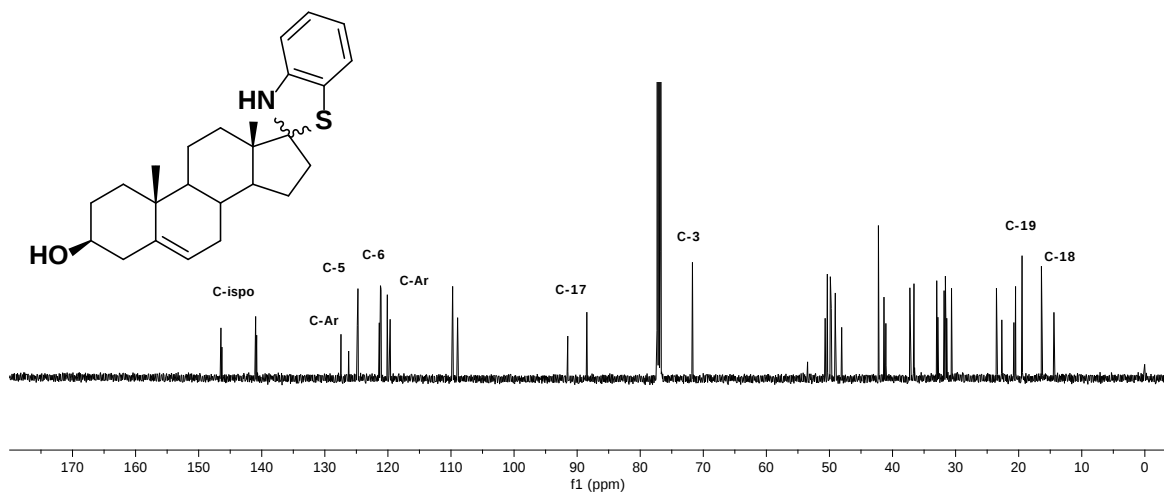
Esquema I.15. Formación de benzotiazolinas y subproductos de *trans*-androsterona **26** y **29** y de *trans*-dehidroandrosterona **27** y **30**

Los compuestos **27** y **30** formados con *trans*-dehidroandrosterona, fueron caracterizados mediante resonancia magnética nuclear de ^1H y de ^{13}C , en el espectro de protón (**espectro I.21**) del derivado benzofusionado **27**, se observan 4 señales simples pertenecientes a los protones de los metilos 18 y 19. Hacia frecuencias altas por 3.50 ppm se encuentra una señal múltiple que corresponde al protón de C-3, sobre 5.50 ppm otra señal múltiple perteneciente al protón vinílico de C-6. En la región de aromáticos se presentan 4 grupos de señales, pertenecientes a los protones de la región bencénica de la mezcla epimérica de benzotiazolinas, observando claramente la presencia de ambos epímeros.



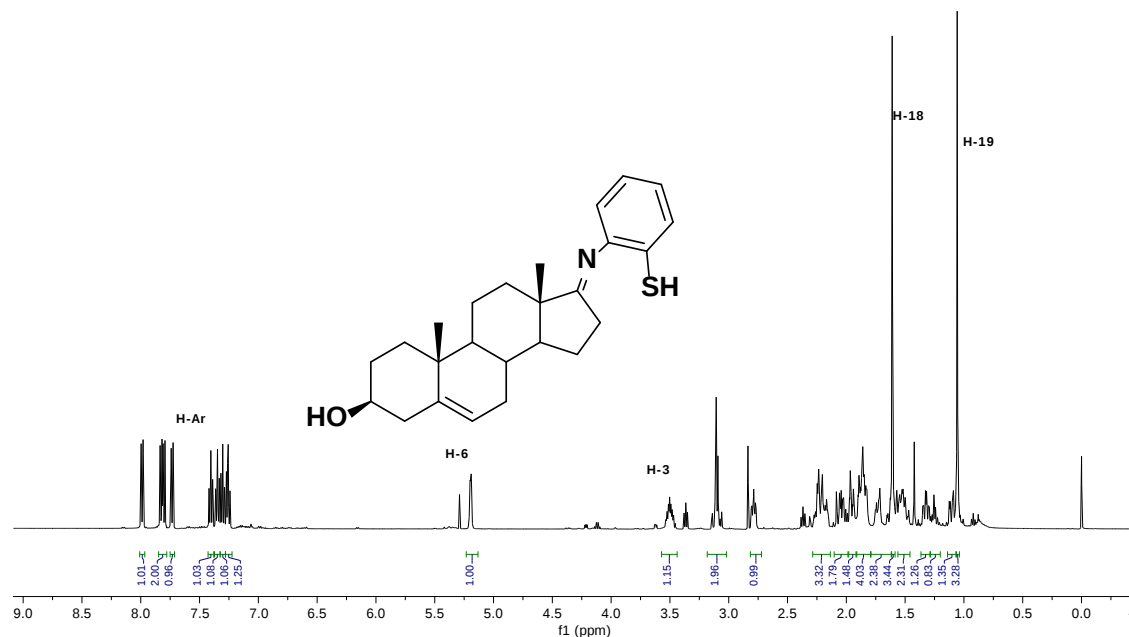
Espectro I.21. Espectro de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) benzotiazolina de *trans*-dehidroandrosterona (27)

En el espectro de carbono (**espectro I.22**) se observan a frecuencias bajas las señales correspondientes a los metilos angulares, alrededor de 70.0 ppm se presenta C-3, hacia frecuencias altas por 90.0 ppm, la presencia de los dos carbonos espiránicos de la mezcla epimérica. Más adelante en la región de aromáticos entre 110.0 ppm y 120.0 ppm se encuentran los H del anillo aromático, entre 125.0 ppm y 130.0 ppm los carbonos vinílicos, a frecuencias altas por 125.0 ppm los carbonos ipso.



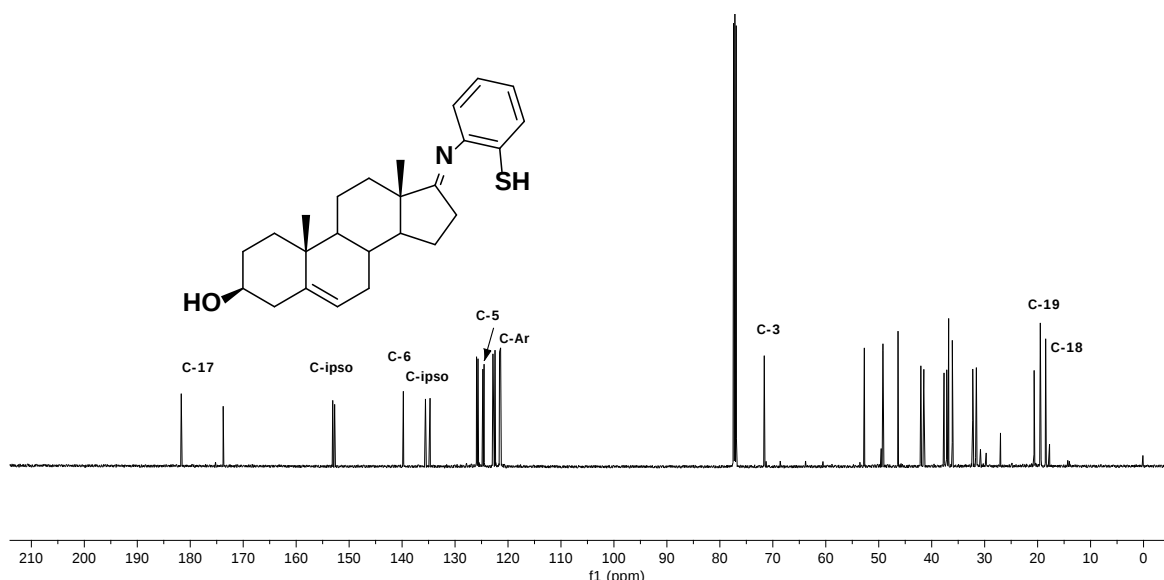
Espectro I.22. Espectro de ¹³C RMN (125.5 MHz, CDCl₃) benzotiazolina de *trans*-dehidroandrosterona (27)

También fue caracterizada la imina intermediaria **30**, observando en el espectro de ^1H RMN (**espectro I.23**), alrededor de 1.00 ppm y 1.50 ppm 2 señales simples, las cuales corresponden a los metilos angulares 18 y 19. En 3.50 ppm una señal múltiple que corresponde al protón de C-3, hacia frecuencias altas alrededor de 5.20 ppm otra señal múltiple, correspondiente al protón vinílico del doble enlace entre C-5 y C-6, hacia frecuencias altas en la región de aromáticos, se encuentran 8 grupos de señales que pertenecen a los protones aromáticos de las iminas *E* y *Z*.



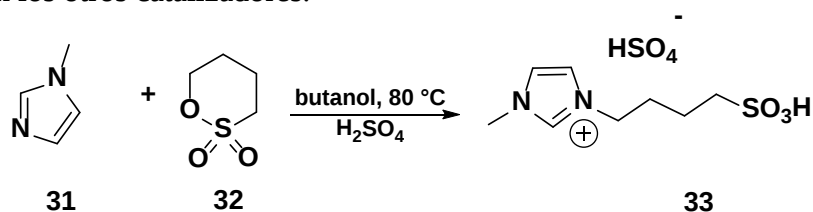
Espectro I.23. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de imina intermediaria de *trans*-dehidroandrosterona (**30**)

En el espectro de carbono (**espectro I.24**) a frecuencias bajas se observan las señales de los metilos angulares, C-3 aparece alrededor de 70.0 ppm. El carbono 17 debido a la influencia del doble enlace nitrógeno de la imina se encuentra entre 170.0 ppm y 185.0 ppm. Se observan dos señales una perteneciente al isómero *E* y otro al isómero *Z*. A frecuencias altas entre 120.0 y 155.0 ppm, se encuentran los carbonos vinílicos C-5 y C-6 y los carbonos aromáticos, los CH se observan un poco menos desplazados a frecuencias altas que los carbonos ipso.



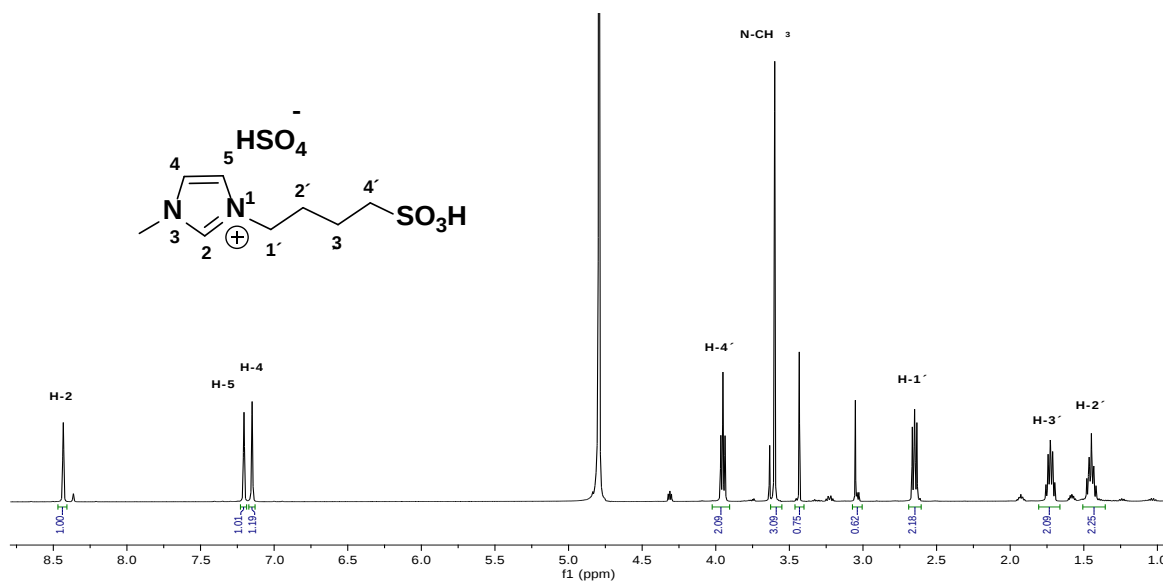
Espectro I.24. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de imina intermedia de *trans*-dehidroandrosterona (**30**)

Por otro lado, se decidió probar otro catalizador, un líquido iónico, el 1-metil-3-(4'-sulfobutil)-imidazolio (**33**), esto se decidió con base a reportes de la literatura, donde ha dado buenos resultados como catalizador en la síntesis de 2,3-dihidroquinazolin-4(1*H*)-onas 2,2-disustituidas.⁵⁵ El líquido iónico imidazolio fue sintetizado a partir del 1-metilimidazol (**31**) y 1,4-butanodisulfato (**32**), en butanol a 80 °C. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se lavó con éter etílico para eliminar el disolvente; al compuesto se adicionó ácido sulfúrico y se colocó nuevamente a 80 °C, hasta la disolución total, lo que indica la formación del líquido iónico (**esquema I.16**). Este se implementó en la formación de las benzotiazolinas de estrona (**31**) y *trans*-androsterona (**26**) (**esquema I.17**), observando la formación del derivado espiránico correspondiente, en rendimientos mayores a los casos anteriores. En ambos casos, se observa la formación del derivado espiránico y de la imina correspondiente. La reacción se llevó a cabo en acetonitrilo a 85 °C, mostrando un comportamiento similar en el caso de la androsterona, de hecho, presenta un rendimiento mucho mayor del compuesto espiránico, en relación con los otros catalizadores.



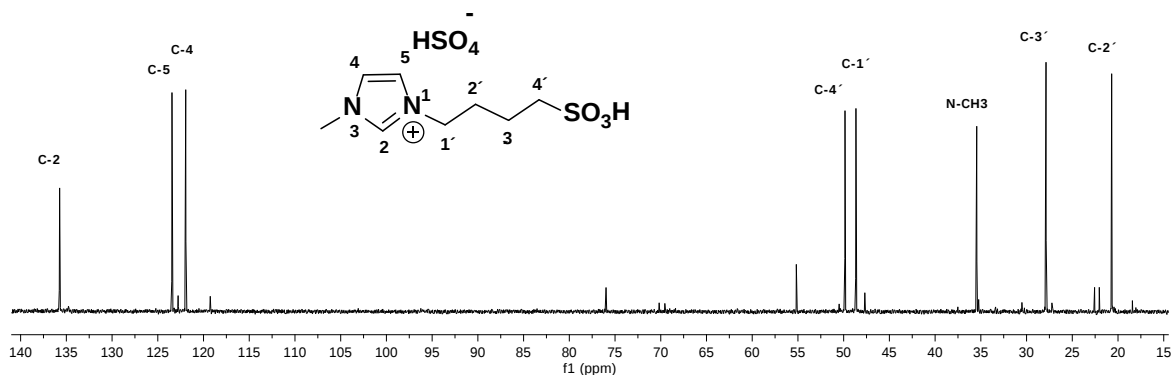
Esquema I.16. Formación del líquido iónico **33**

La formación del líquido iónico fue confirmada mediante RMN de protón y carbono, observando en el espectro de protón (**espectro I.25**) dos señales múltiples entre 1.20 y 1.80 ppm, los cuales pertenecen a los protones de los carbonos 2' y 3' de la cadena alifática, por 2.70 ppm se encuentra una señal triple que corresponde al protón del carbono 1', el cual percibe más el efecto del imidazol, por 3.60 ppm se puede apreciar una señal simple que integra para 3 protones y corresponde al metilo del imidazol, alrededor de 4.00 ppm, se observa otra señal triple, que pertenece a los protones del carbono 4', hacia frecuencias altas en la región de aromáticos se presentan dos señales pertenecientes a los protones de C-4 y C-5 del imidazol, por 8.50 ppm el protón de C-2 el cual se encuentra más desplazado a frecuencias altas debido a la influencia de los dos nitrógenos.



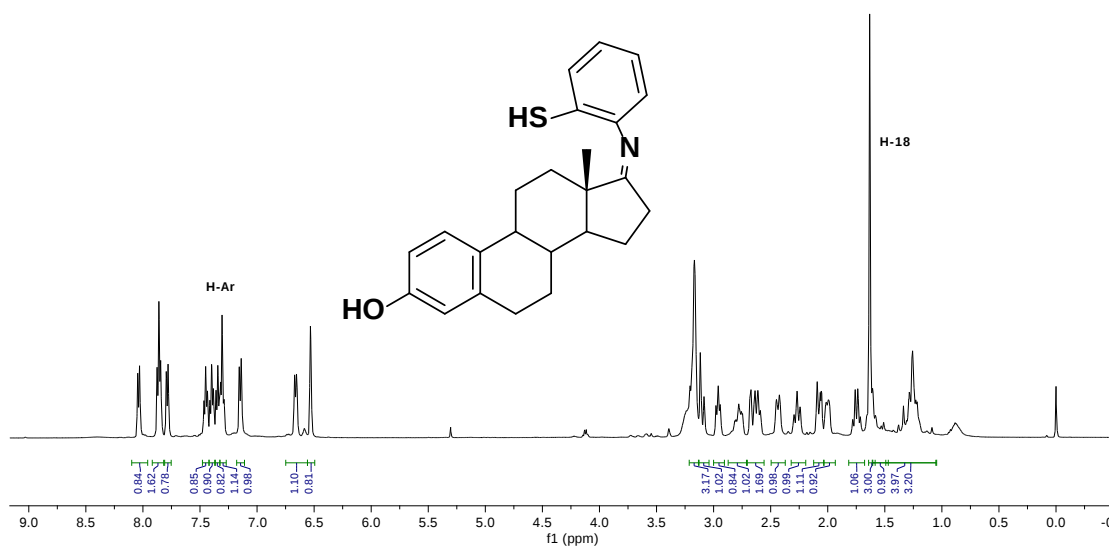
Espectro I.25. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, D_2O) del líquido iónico **33**

Por otro lado, en el espectro de carbono (**espectro I.26**) se observan entre 20.0 y 30.0 ppm dos señales que corresponden a los carbonos 2' y 3'. Posteriormente por 35.0 ppm la señal del grupo metilo del imidazol. Entre 120.0 y 125.0 ppm se encuentran los carbonos 1' y 4', en la zona de aromáticos entre 120.0 y 125.0 ppm los carbonos 4 y 5 y por 135.0 ppm, el carbono 2 del imidazol.



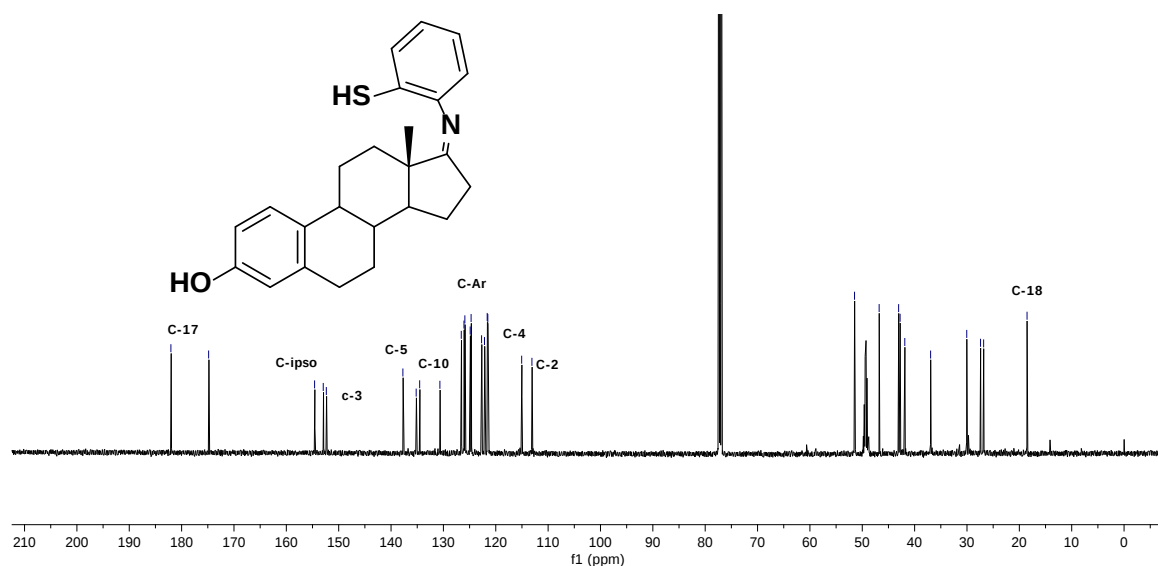
Espectro I.26. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, D_2O) del líquido iónico **33**

Sin embargo, en el caso de la estrona, ninguno de los catalizadores anteriores había logrado formar el derivado espiránico. Observando solo la presencia de la imina **28**, la cual fue caracterizada mediante RMN. En el espectro de protón (**espectro I.27**) alrededor de 1.50 ppm se encuentra un singulete perteneciente al metilo 18. A frecuencias altas en la región de aromáticos hay múltiples juegos de señales, que corresponden tanto a los protones del anillo A de la estrona, como a los protones aromáticos de la mezcla de iminas.



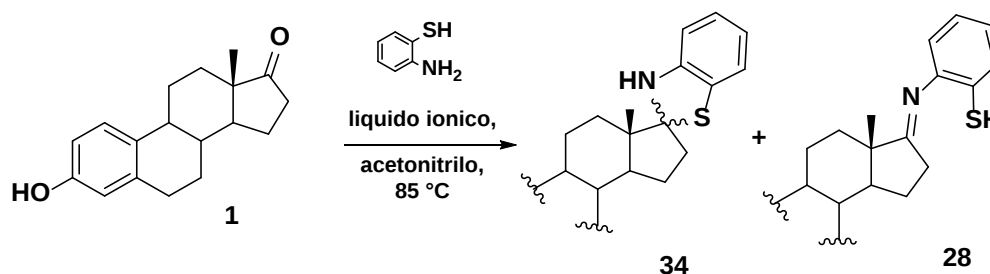
Espectro I.27. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de imina intermediaria de estrona (**28**)

Por otro lado, en el espectro de carbono (**espectro I.28**), por 20.0 ppm se encuentra la señal del metilo 18, sobre 110.0 ppm los carbonos del anillo A de manera sencilla. Sin embargo, las señales de carbono del anillo aromático de la imina se encuentran dobleteadas, entre 170.0 y 185.0 ppm se presenta el carbono 17 de ambas iminas *E* y *Z*, estas señales confirman la presencia de la imina, ya que no se observa una señal de carbono espiránico.



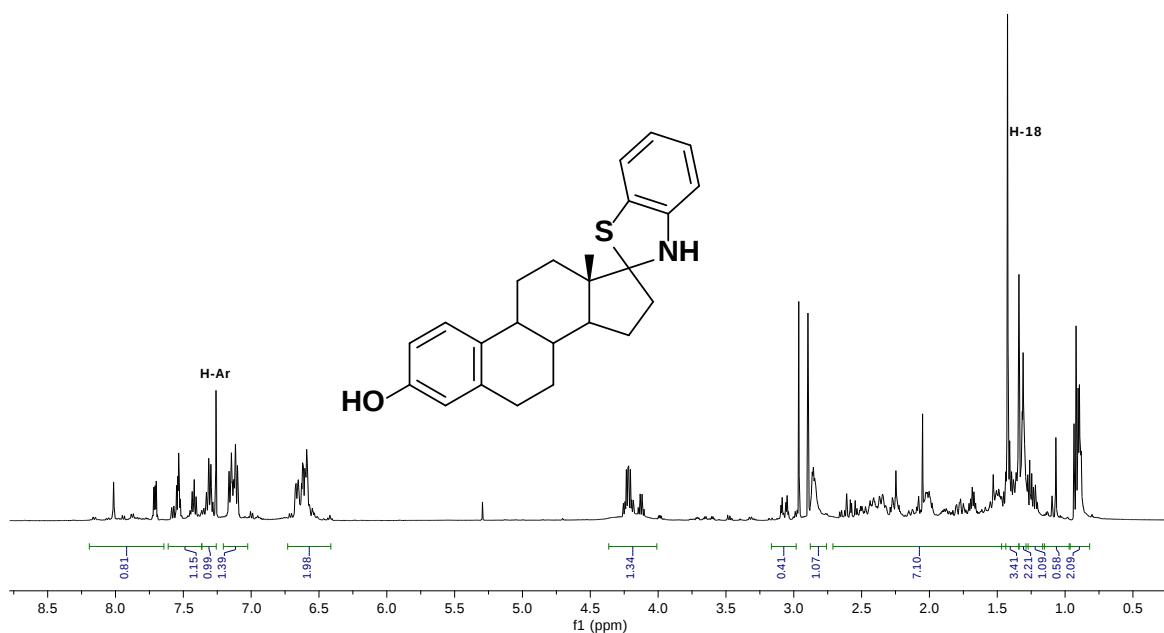
Espectro I.28. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de imina intermediaria de estrona (**28**)

Sin embargo, al emplear el líquido iónico como catalizador, si fue posible obtener el derivado espiránico de estrona **34**, con las condiciones indicadas en el **esquema I.17**.



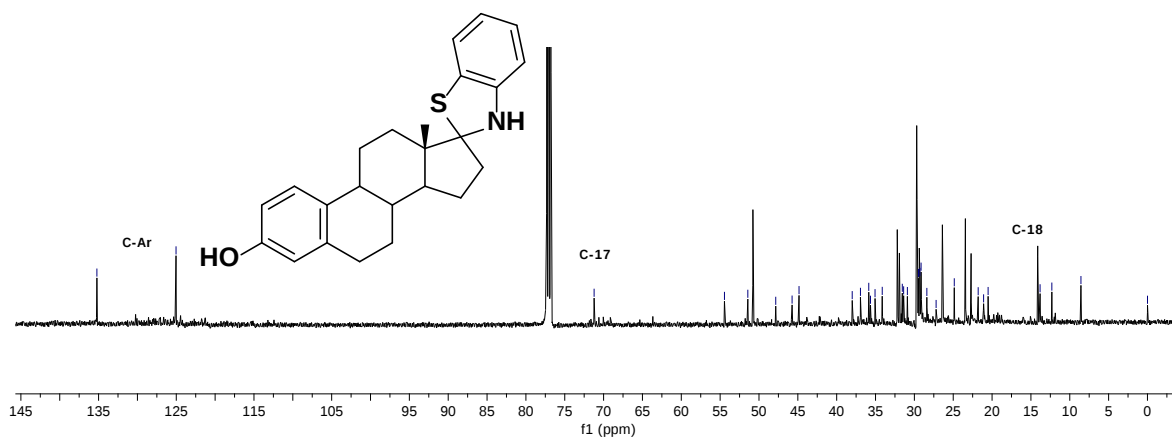
Esquema I.17. Formación de benzotiazolina de estrona y *trans*-androsterona

Esto se pudo comprobar mediante RMN, especialmente en el espectro de RMN de ^{13}C . En el espectro de protón (**espectro I.29**), se observa a frecuencias bajas, un grupo de señales pertenecientes al esqueleto esteroidal, en la región de aromáticos entre 6.50 ppm y 8.00 ppm, tenemos múltiples grupos de señales las cuales corresponden a los protones aromáticos del anillo A de la estrona y al anillo de la benzotiazolina



Espectro I.29. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de benzotiazolina de estrona (**34**)

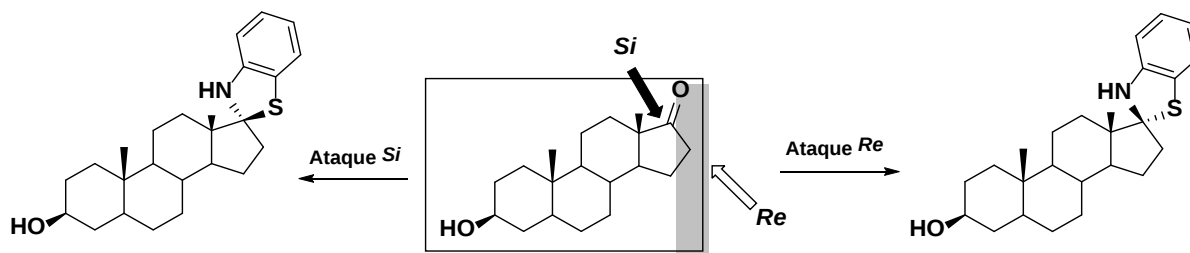
Por otro lado, en el espectro de carbono (**espectro I.30**), la señal en 70.0 ppm, asignada a C-17 junto con la ausencia de la señal de imina a aproximadamente 170.0 ppm, demuestran la formación del espiro fusionado al esqueleto esteroideal, en este caso solo se observa la formación de un compuesto.



Espectro I.30. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de benzotiazolina de estrona (**34**)

Con objeto de explicar la diastereoselectividad facial, debe considerarse que el ataque nucleofílico del nitrógeno del *o*-aminotiofenol sobre el grupo carbonilo puede producirse, en principio, tanto por la cara *Si* como por la cara *Re*, produciendo la formación de ambos

epímeros (**esquema I.18**). El aislamiento de las iminas confirma que la reacción comienza con el ataque nucleófilo del grupo amino.



Esquema I.18. Formación de epímeros según el ataque nucleofílico de las caras diastereotópicas del C-17

Sin embargo, debido al efecto estérico, es más probable el ataque por la cara *Re* debido a que el átomo de azufre (radio covalente = 1.02 Å) tiene un mayor tamaño que el átomo de nitrógeno (radio covalente = 0.7 Å), provocando que exista una mayor repulsión estérica cuando el azufre se encuentra hacia adelante, lo que provoca un mayor efecto estérico del azufre con el metilo 18, haciendo más estable el epímero donde el nitrógeno se encuentra hacia atrás (**Figura I.13**).

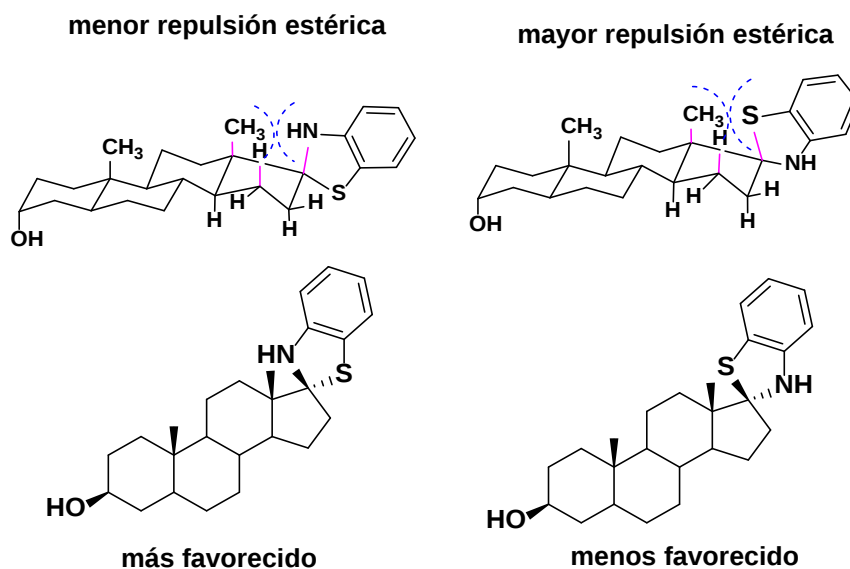
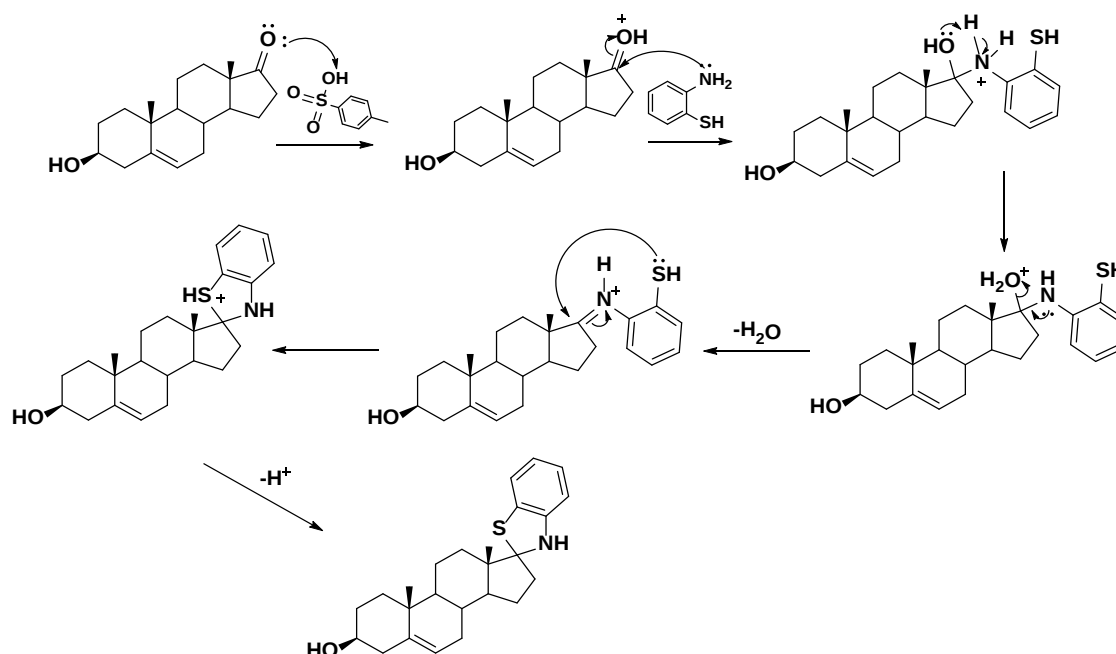


Figura I.13. Influencia del átomo de S con respecto al de N en el impedimento estérico

En el caso de estos compuestos, se obtuvo la mezcla de epímeros, la cual no fue posible separar por columna cromatográfica, debido a la similitud en el *R_f* de los compuestos.

En el caso de la reacción realizada en tolueno, que condujo a una mayor proporción de iminas, con relación *E/Z* de aproximadamente 50:50, pudo aislarse en los 3 esqueletos esteroideos. Confirmando de esta manera que el mecanismo de dicha reacción procede por la formación de la imina. En el caso de las iminas, todas las señales duplicadas pueden ser apreciadas claramente, observando la ausencia de carbono espiro, sin embargo, el carbono 17 se observa desplazado a altas frecuencias, por la presencia de la imina. En el caso de los derivados benzofusionados, los carbonos espiránicos se observan entre 70.0 ppm y 110.0 ppm, los cuales también se observan duplicados debido a la presencia de ambos epímeros. Aunque estos compuestos no pudieron separarse, en el espectro de RMN, se puede ver claramente que la reacción tiene diastereoselectividad, en una proporción promedio de 60:40.

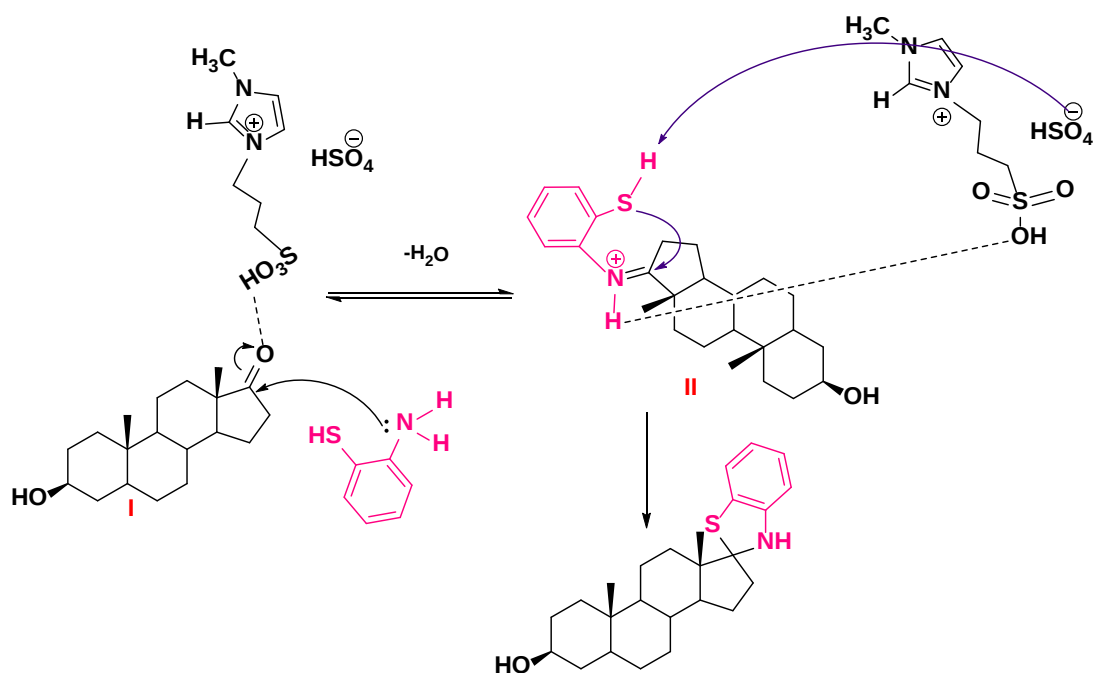
Dentro de los catalizadores empleados el APTS y el PPTS son ácidos de Brönsted, los cuales actúan donando un protón al oxígeno del grupo carbonilo, haciendo que el carbonilo sea más electrófilo, y favoreciendo de esta manera el ataque nucleófilo de la amina (esquema I.19).



Esquema I.19. Probable mecanismo de reacción para la formación de benzotiazolinas a partir de *trans*- dehidroandrosterona, con APTS como catalizador

Por otro lado, se tiene al liquido iónico **33** el cual actúa formando un aducto con el grupo carbonilo, posteriormente entra el par electrónico, dejando deficiente de carga al

carbono, lo que lo hace más reactivo para el ataque nucleofílico del átomo de nitrógeno, dando lugar a la imina intermediaria, en la mezcla *E* y *Z*, para el posterior ataque del segundo nucleófilo, formando el derivado benzofusionado (**esquema I.20**).



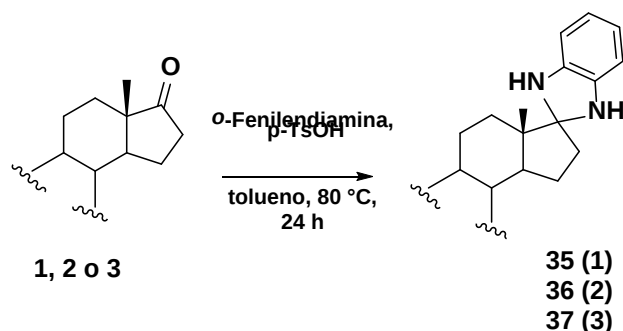
Esquema I.20. Probable mecanismo de reacción para la formación de espiroesteroides tipo benzotiazolinas a partir de *trans*-androsterona empleando liquido iónico como catalizador

I.4.6. Síntesis de espiroesteroides con un fragmento de tipo benzimidazolina sobre la posición 17 de estrona, *trans*-androsterona y *trans*-dehidroandrosterona

Una vez optimizada la formación de benzotiazolinas esteroidales, se decidió extenderla a la síntesis de benzimidazolinas; para ello se evaluó el tratamiento de la cetona en C-17 del esteroide con *o*-fenilendiamina (**esquema I.21**). La sustitución isostérica del azufre por nitrógeno en el anillo heterocíclico puede proporcionar interesantes relaciones estructura-actividad.

Inicialmente se empleó tolueno como disolvente a 80 °C; sin embargo, tras un tiempo de reacción de 24 h, se observó la formación de una gran cantidad de subproductos,

provocado quizás por la mayor reactividad de la *o*-fenilendiamina con respecto al *o*-aminotiofenol.

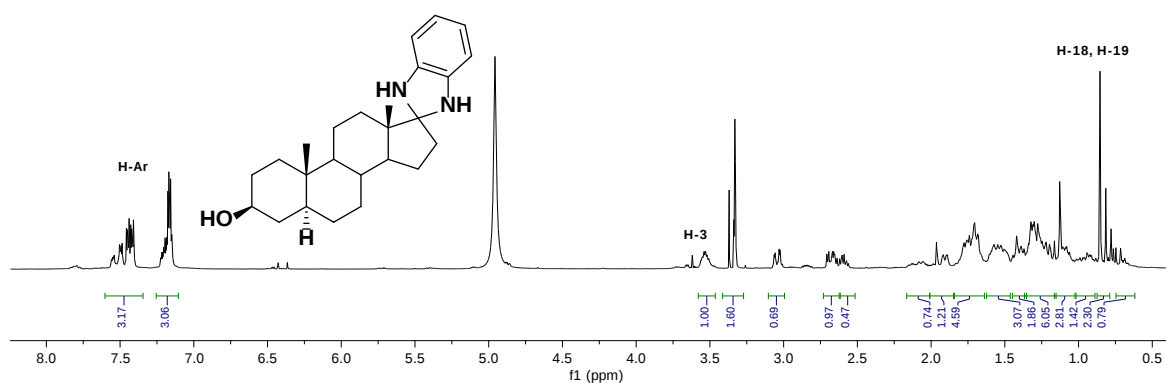


Esquema I.21. Formación de espiro derivados con fenilendiamino en tolueno

Debido a la formación de múltiples subproductos, se decidió cambiar el disolvente por metanol; de esta forma, puede disminuirse la reactividad de la *o*-fenilendiamina, por un lado, por la formación de enlaces de hidrógeno con el disolvente, y por otro, por la reducción del punto de ebullición. Como catalizadores, se evaluaron el APTS y el PPTS. En el caso de este tipo de compuestos, no se genera un centro quiral en C-17, por lo que solo se observa la formación de un compuesto, y a diferencia de los tioisósteros no fue posible aislar las iminas intermediarias.

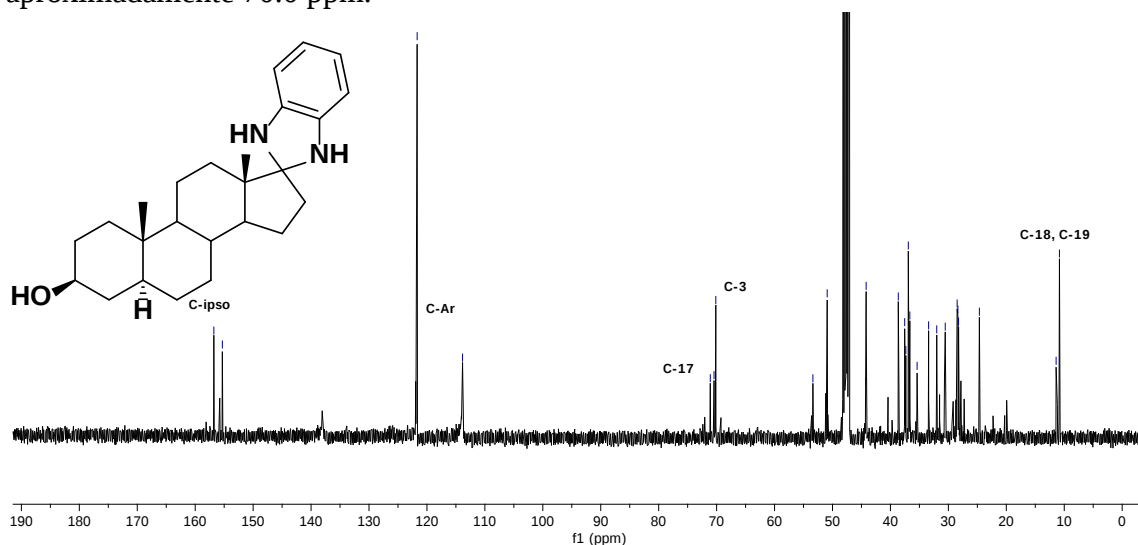
Igual que en el caso de las benzotiazolinas, la reacción se realizó empleando *trans*-androsterona (2), estrona (1) y *trans*-dehidroandrosterona (3) como materias primas; durante la optimización de la reacción con *trans*-androsterona se observó que se presentaba un mejor rendimiento con el APTS como catalizador, por lo que se decidió llevar a cabo la reacción con estrona y *trans*-dehidroandrosterona en similitud de condiciones. Se obtuvo mejor rendimiento para *trans*-androsterona, y una reducción significativa en el caso de estrona y *trans*-dehidroandrosterona, atribuible a una menor reactividad de estos sistemas, así como a la formación de múltiples subproductos, detectados en CCF.

La formación de los derivados benzofusionados de tipo imidazolina, fue confirmada mediante RMN de ^1H y de ^{13}C . En los espectros de protón del derivado de *trans*-androsterona **36** (**espectro I.31**), se observan dos señales simples que integran para tres protones cada una, y pertenecen a los protones de los metilos angulares 18 y 19, alrededor de 3.50 ppm una señal múltiple, la cual corresponde al protón de C-3, finalmente en la región de aromáticos se presentan dos señales múltiples, que corresponden a los protones del anillo aromático de la benzimidazolina.



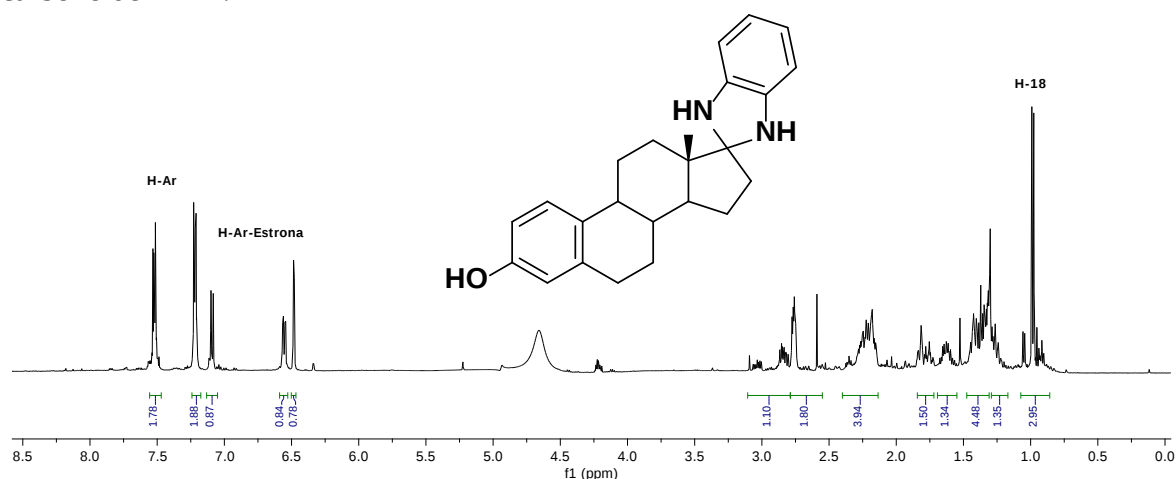
Espectro I.31. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) de benzimidazolina de *trans*-androsterona (**36**)

La formación de la benzimidazolina espiránica **36** se confirma realmente con el espectro de RMN de ^{13}C (**espectro I.32**), donde se observa la desaparición de la señal de la cetona en C-17 por 220.0 ppm, y un fuerte apantallamiento de dicho carbono hasta aproximadamente 70.0 ppm.



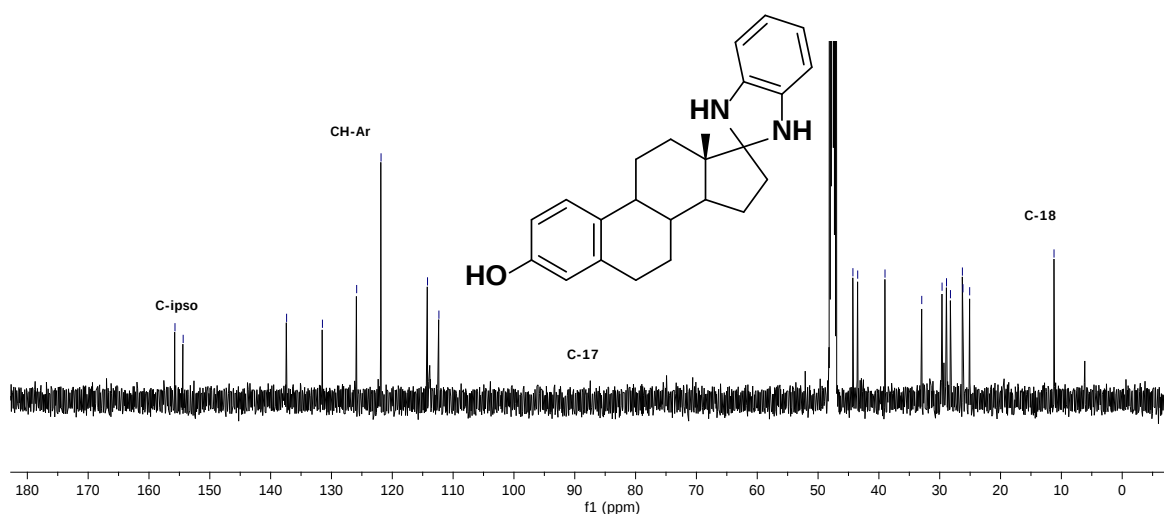
Espectro I.32. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CD_3OD) de benzimidazolina de *trans*-androsterona (**36**)

Para el derivado de estrona **35** en el espectro de protón (**espectro I.33**), se observa en la zona de aromáticos, entre 6.50 y 7.50 ppm dos grupos de señales, las primeros corresponden al anillo A del esqueleto esteroidal, y el segundo que se encuentra a frecuencias más altas, pertenece al anillo aromático de la benzimidazolina. De igual forma que en el caso anterior la pauta de confirmación de formación del espiroheterociclo la da el espectro de carbono de RMN.



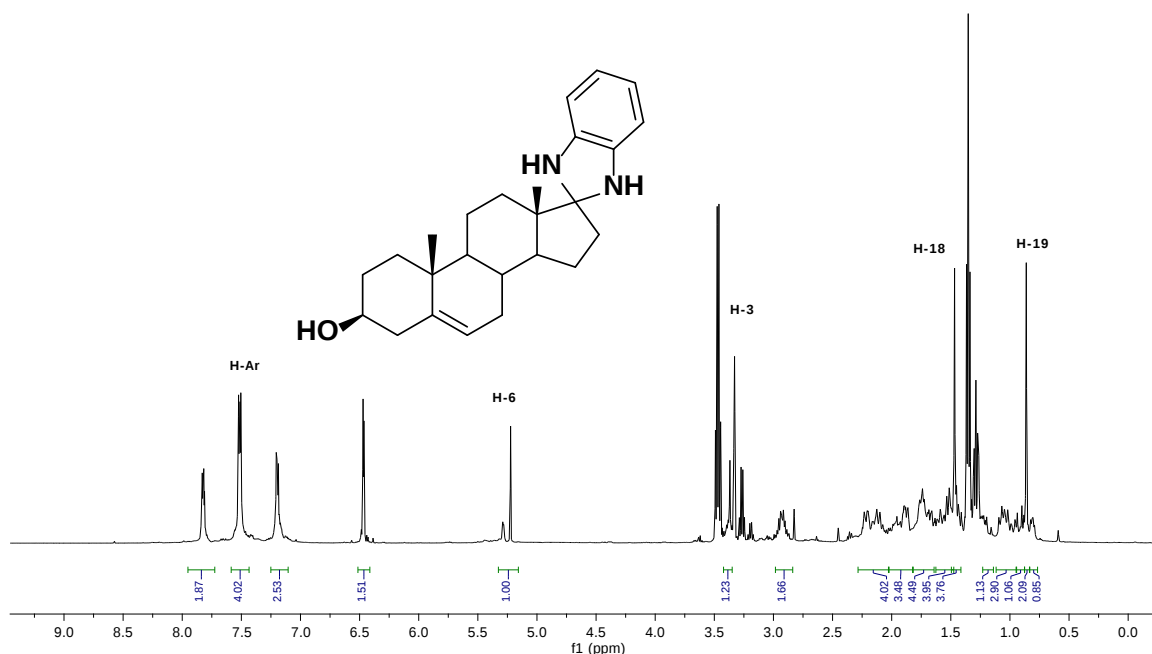
Espectro I.33. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) de benzimidazolina de estrona (**35**)

En el espectro de carbono (**espectro I.34**), se observa la resonancia del carbono 17 alrededor de 85.0 ppm, el cual confirma la formación del benzofusionado; en la región de aromáticos entre 110.0 y 160.0 ppm, se encuentran las señales tanto del anillo A de la estrona, como el de la benzimidazolina.



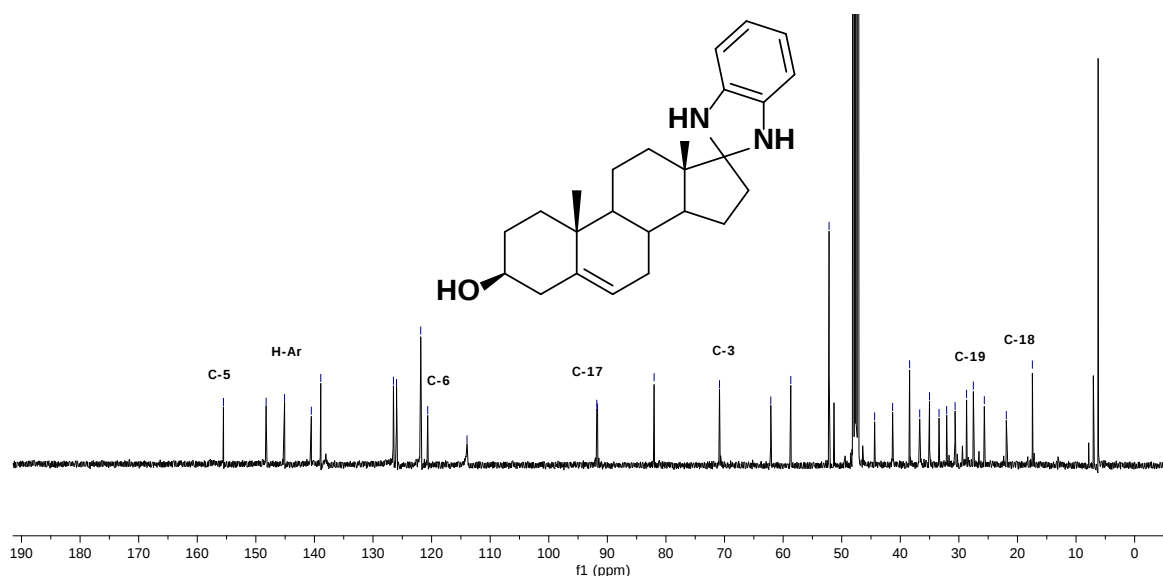
Espectro I.34. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CD_3OD) de benzimidazolina de estrona (**35**)

En los espectros del derivado de *trans*-dehidroandrosterona **37** (**espectro I.35**) se pueden observar dos señales simples, correspondientes a los protones de los metilos 18 y 19, a frecuencia más altas, por 3.30 ppm se encuentra el protón de C-3. En la región de los protones vinílicos, una señal múltiple que integra para 1 protón y corresponde al protón de C-6. En la zona de aromáticos hay 4 grupos de señales que integran para un protón cada uno y corresponden a los protones del anillo aromático de la benzimidazolina, de igual forma que en los casos anteriores, la confirmación de la formación del derivado benzofusionado se observa en el espectro de carbono.



Espectro I.35. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) de benzimidazolina de *trans*-dehidroandrosterona (**37**)

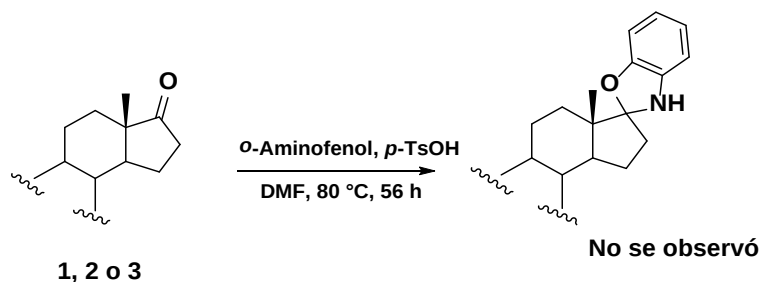
En el espectro de carbono (**espectro I.36**) se observa por 90.0 ppm la señal del carbono 17, la cual corresponde al carbono espiránico. Como es característico de los espectros de carbono de *trans*-androsterona y *trans*-dehidroandrosterona se presenta la señal de C-3 alrededor de 70.0 ppm, y en 120.0 ppm y 155.0 ppm los carbonos vinílicos. Entre 120.0 ppm y 150.0 ppm se encuentran las señales de los carbonos aromáticos de la benzimidazolina.



Espectro I.36. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CD_3OD) de benzimidazolina de *trans*-dehidroandrosterona (37)

I.4.7. Síntesis de espiroesteroides con un fragmento de tipo benzoxazolina sobre la posición 17 de estrona, *trans*-androsterona y *trans*-dehidroandrosterona

El otro binucleófilo utilizado para la síntesis de estos compuestos fue el *o*-aminofenol, con objeto de conseguir una nueva sustitución isótera en el fragmento heterocíclico espiránico. Inicialmente se intentó acceder a los espiros con un fragmento de benzoxazolina, empleando condiciones análogas a las descritas en el apartado anterior; de esta forma, el tratamiento de los esteroides **1-3** con *o*-aminofenol se efectuó empleando tolueno como disolvente, *p*-TsOH como catalizador, a una temperatura de 80 °C. No obstante, no se observó ningún avance, a pesar de incrementar el número de equivalentes de *o*-aminofenol al doble. El mismo resultado se obtuvo al sustituir tolueno por DMF como disolvente, y emplear largos tiempos de reacción de hasta 56 h (**esquema I.22**).



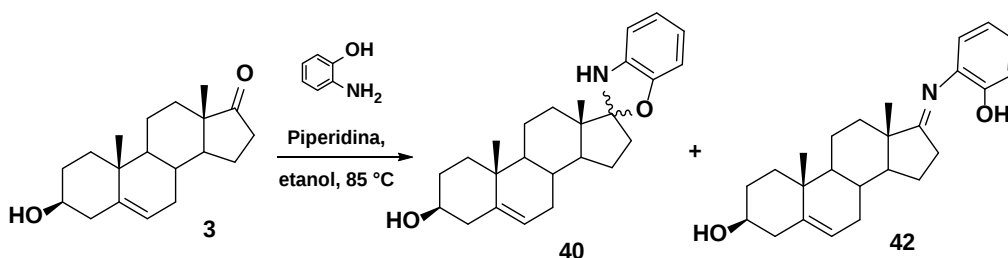
Esquema I.22. Condiciones de reacción para formación de espiro derivados con *o*-aminofenol

Posteriormente se intentaron una serie de condiciones presentadas en la **tabla I.5**, modificando el disolvente (tolueno, DMF, DCM), catalizador, tanto ácido como básico (APTS, AcOH, NaH, CaCO₃), como temperatura (ambiente → 80 °C); no obstante, en ninguno de estos casos se obtuvo resultado alguno.

Tabla I.5. Condiciones de reacción ensayadas para la síntesis de benzoxazolinas, a partir de **1**, **2** o **3** de manera indistinta, sin obtener el resultado deseado

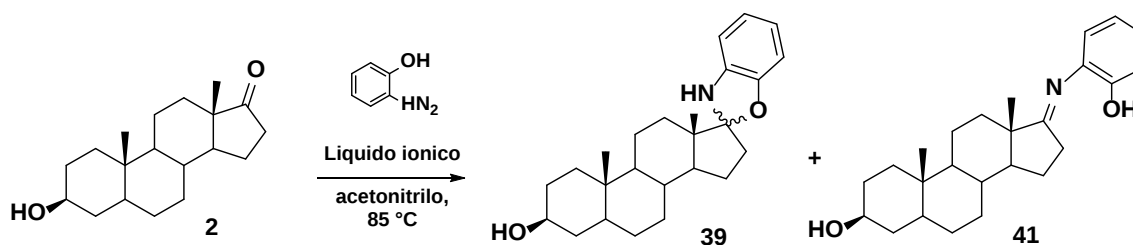
Ensayo	Disolvente	Catalizador	Temperatura
1	Tolueno	APTS	Ambiente
2	DMF	APTS	Ambiente
3	Tolueno	CH ₃ COOH	Ambiente
4	DCM	CH ₃ COOH	Ambiente
5	DMF	CH ₃ COOH	Ambiente
6	Tolueno	NaH	Ambiente
7	Tolueno	CaCO ₃	Ambiente
8	Tolueno	APTS	80°C
9	DMF	APTS	80°C
10	Tolueno	CH ₃ COOH	80°C
11	DCM	CH ₃ COOH	50°C
12	DMF	CH ₃ COOH	80°C
13	Tolueno	NaH	80°C
14	Tolueno	CaCO ₃	80°C

Al no observar reacción con este tipo de catalizadores, se decidió probar otro tipo de catálisis básica, utilizando piperidina en etanol (**esquema I.23**). Dicha reacción se llevó a cabo inicialmente para la estrona a temperatura ambiente pero no se observaron resultados, por lo que se decidió incrementar hasta la temperatura de reflujo; en este caso se observó un ligero avance en la reacción, conduciendo al espiro derivado buscado con un rendimiento bastante bajo. En el caso de *trans*-androsterona (**2**) y *trans*-dehidroandrosterona (**3**), se observó la formación de la imina intermediaria, de hecho, en la *trans*-androsterona no se detectó la formación del producto benzofusionado. Debido al bajo rendimiento se decidió trabajar en la optimización de las reacciones; así pues, se aumentó el número de equivalentes del *o*-aminofenol, y a su vez se aumentó la cantidad de piperidina al doble, obteniendo un rendimiento 10% más alto.



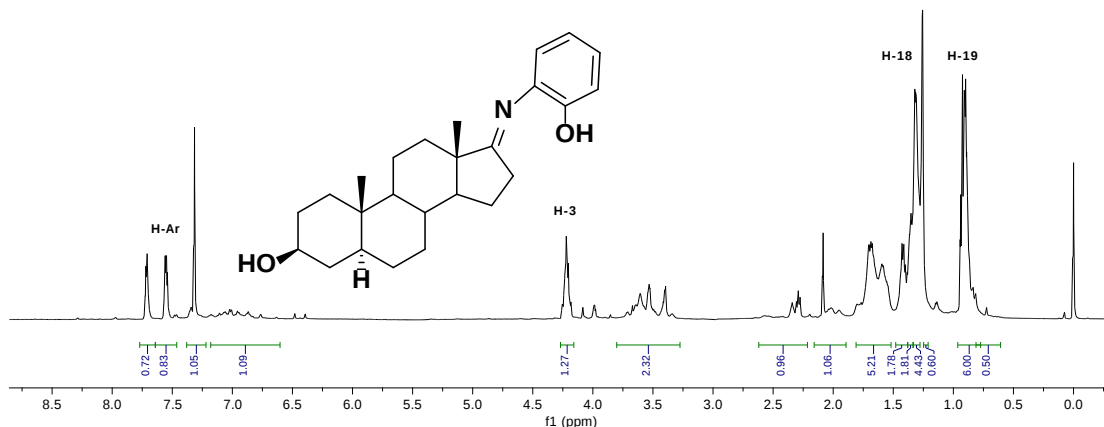
Esquema I.23. Formación de la benzoxazolina **40** a partir de la *trans*-dehidroandrosterona (**3**)

Dicha reacción se llevó a cabo en etanol anhidro, a reflujo con piperidina, lo que ayudó a obtener la mezcla de benzoxazolinas, las cuales no fue posible separar en columna cromatográfica. La mezcla solo se obtuvo para estrona y *trans*-dehidroandrosterona, en el caso de *trans*-androsterona, se obtuvo la imina correspondiente, por lo que se decidió probar la reacción con el líquido iónico **33** (**esquema I.24**). Se utilizaron las mismas condiciones descritas en el apartado anterior, con lo que se obtuvo el derivado espiránico **39**, además de la imina **41**. Este grupo de compuestos, al igual que las benzotiazolininas, se obtuvieron como una mezcla no resuelta de epímeros, muy notable en los espectros de RMN.



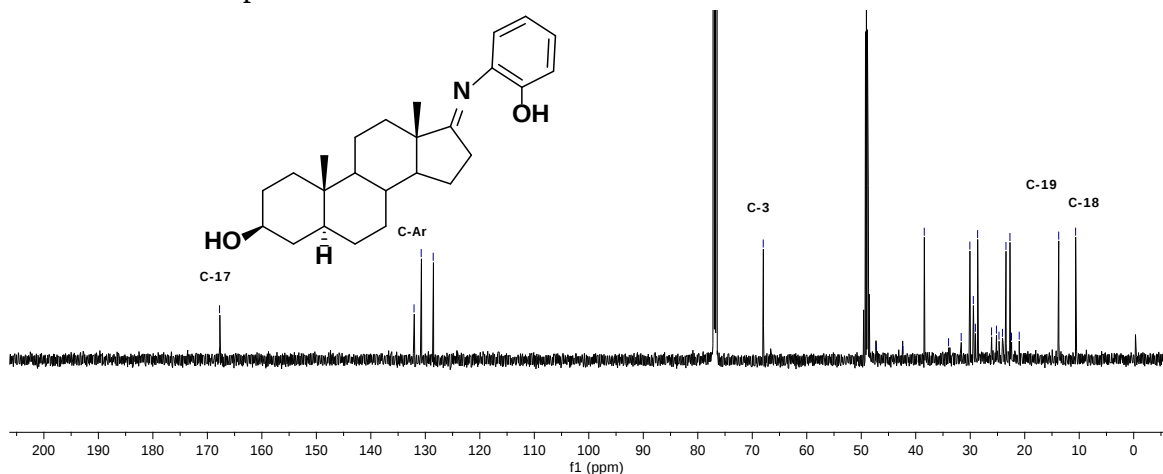
Esquema I.24. Formación de la benzoxazolina **39** de *trans*-androsterona

La formación de los compuestos fue confirmada mediante RMN de protón y de carbono. En el espectro de protón del derivado de *trans*-androsterona **41**, realizado con piperidina (**espectro I.37**). Se observa en 4.30 ppm una señal múltiple que pertenece al protón de C-3. Hacia frecuencias altas en la zona de los aromáticos entre 6.50 y 7.75 ppm un conjunto de señales que integran para 4 protones, lo que corresponde al número de protones del anillo aromático del *o*-aminofenol, el cual se unió al esteroide mediante la cetona de la posición 17 dando lugar a la formación de una imina.



Espectro I.37. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de imina intermediaria **41**

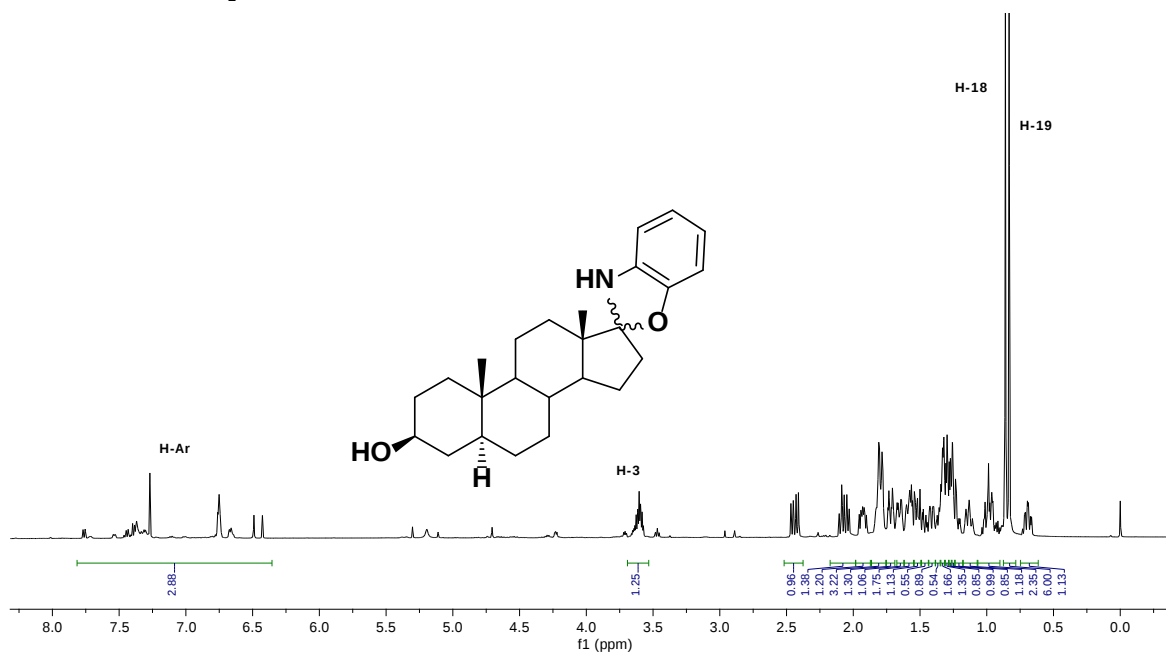
En el espectro de ^{13}C de **41** (**espectro I.38**) se observa la ausencia de un carbono espiránico ya que estos se presentan entre 70.0 ppm y 110.0 ppm; por el contrario, se observa un carbono altamente desplazado hacia frecuencias altas por 170.0 ppm, lo que es indicativo de un carbono de tipo imina.



Espectro I.38. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de imina intermediaria **41**

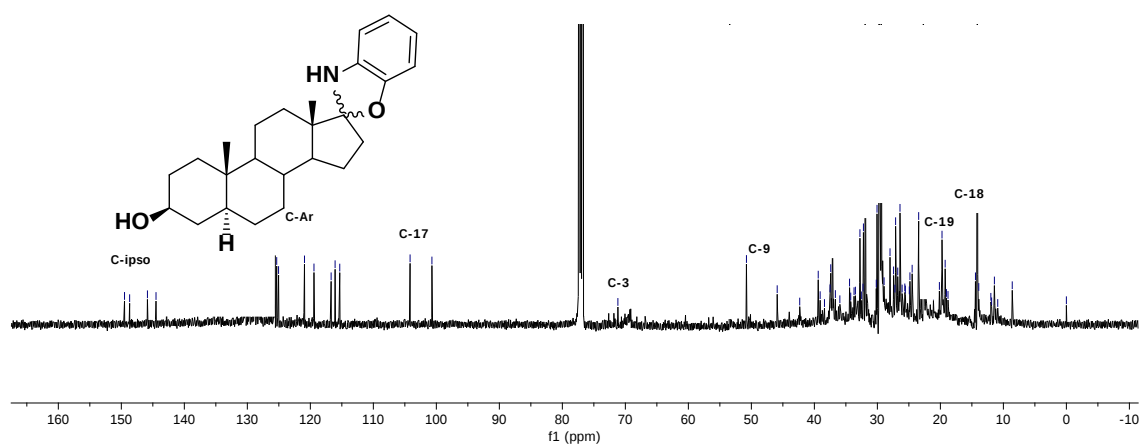
En el caso del espectro de la reacción realizado con liquido iónico (**espectro I.39**), se aprecia la formación del derivado benzofusionado **39**. En el espectro de RMN de protón, se observan dos señales simples a frecuencias bajas, las cuales corresponden a los metilos 18 y

19. En torno a 3.50 ppm resuena el protón de 3 como una señal múltiple y a frecuencias altas, se observan los 4 protones del anillo aromático de la benzoxazolina.



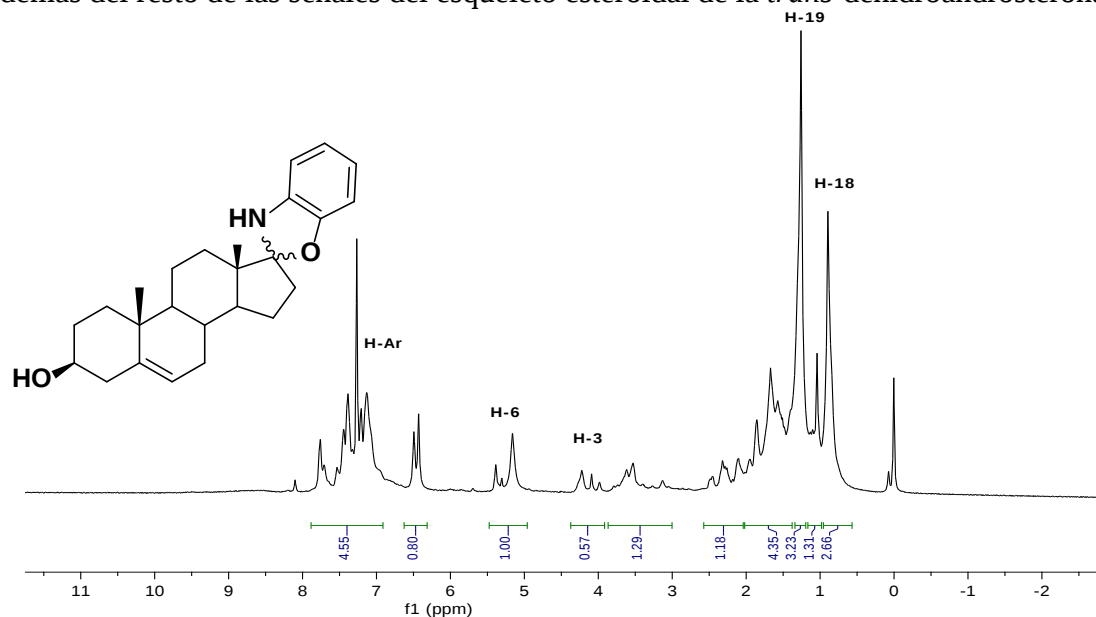
Espectro I.39. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de benzoxazolina de *trans*-androsterona (39)

En el espectro de carbono (**espectro I.40**), se observa un doble juego de señales, indicando la presencia de ambos epímeros de 39. La formación de la benzoxazolina se justifica por la ausencia de los grupos carbonilo e imino en C-17, y la aparición de señales asignadas a C-17 en torno a 100.0 ppm, que es compatible con el carbono espiránico.



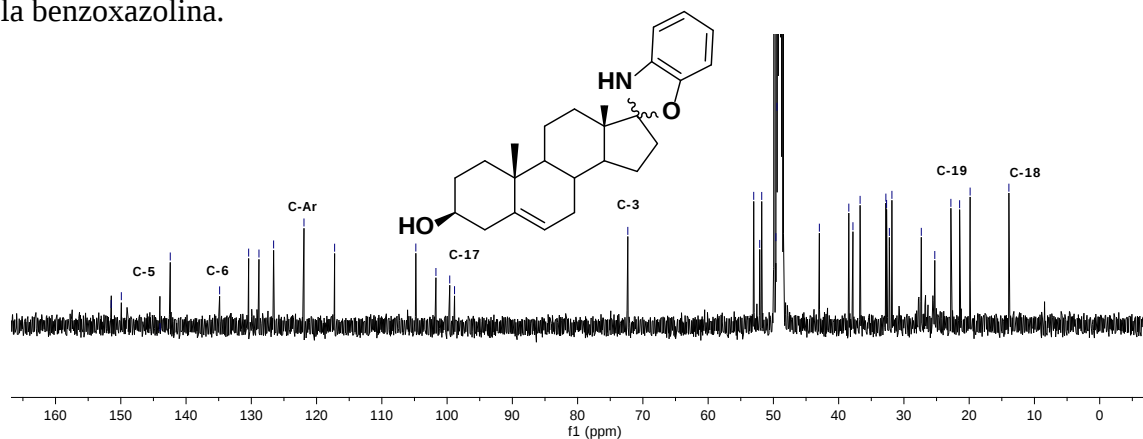
Espectro I.40. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de benzoxazolina de *trans*-androsterona (39)

De forma análoga en el espectro de RMN de protón de la benzoxazolina de *trans*-dehidroandrosterona (**40**) (**espectro I.41**) se puede observar en la región de aromáticos una serie de señales múltiples que pertenecen a los protones aromáticos de la benzoxazolina, además del resto de las señales del esqueleto esteroidal de la *trans*-dehidroandrosterona.



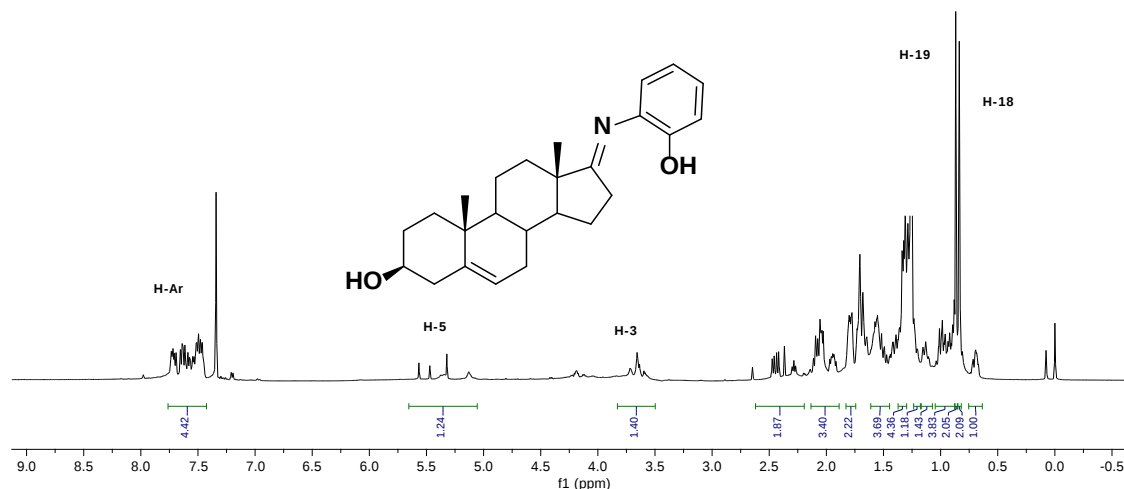
Espectro I.41. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) de benzoxazolina de *trans*-dehidroandrosterona (**40**)

Como en los casos anteriores, la formación del espiroheterociclo se confirma con el espectro de RMN de ^{13}C (**espectro I.42**). En él se pueden observar, los carbonos vinílicos entre 135.0 ppm y 145.0 ppm, alrededor de 70.0 ppm al carbono 3. Como señal confirmatoria se encuentra por 100.0 ppm al carbono espiránico C-17 de ambos epímeros, carbono que se desplaza de 220.0 ppm. En la región de aromáticos se pueden ver los carbonos aromáticos de la benzoxazolina.



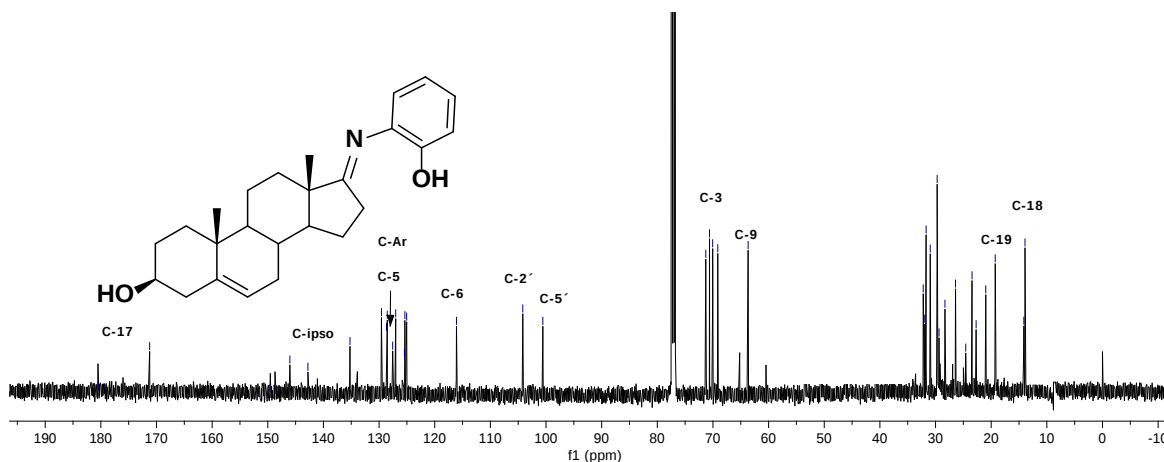
Espectro I.42. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CD_3OD) de benzoxazolina de *trans*-dehidroandrosterona (**40**)

En el espectro de RMN de protón (**espectro I.43**) de la imina **42**, se observan dos señales simples a frecuencias bajas que corresponden a los metilos 18 y 19; el protón vinílico de 6 se encuentra alrededor de 5.50 ppm. Finalmente, a frecuencias altas en la zona de aromáticos entre 7.20 y 8.00 ppm se hayan los 4 protones aromáticos del anillo bencénico del *o*-aminofenol.



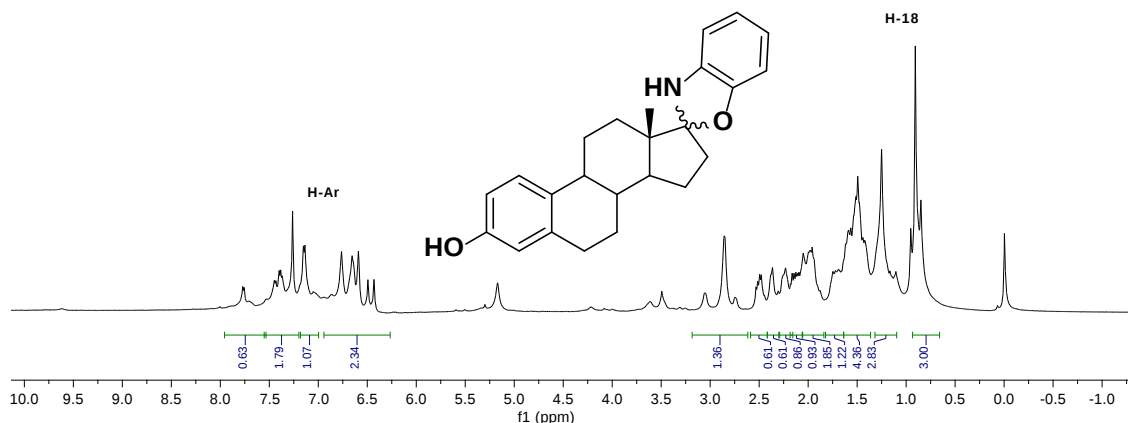
Espectro I.43. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de imina intermediaria **42**

En el espectro de carbono (**espectro I.44**), se observan todas las señales del esqueleto esteroidal. Por otro lado, entre 100.0 y 150.0 ppm se encuentran los carbonos del anillo bencénico de la mezcla de iminas. La señal que da la pauta de formación de la imina son los dos carbonos entre 170.0 ppm y 180.0 ppm, que corresponden al carbono 17 de ambos epímeros, los cuales se desplazan de 220.0 ppm al transformarse la cetona en imina.



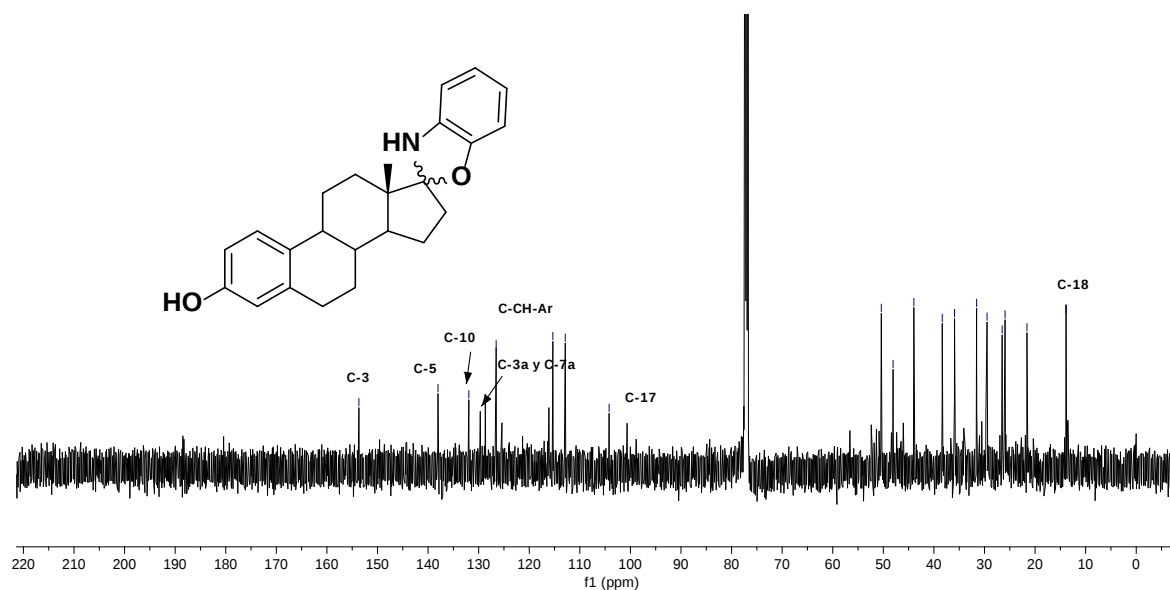
Espectro I.44. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de imina intermediaria de benzoxazolina de *trans*-dehidroandrosterona (**42**)

Finalmente, en el espectro de RMN de protón de la benzoxazolina de estrona (**38**) (**espectro I.45**), se observa a frecuencias bajas un singlete perteneciente al metilo 18. A frecuencias bajas en la región de aromáticos se encuentran los protones del anillo A de la estrona y los protones de la benzoxazolina.



Espectro I.45. Espectro de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) de benzoxazolina de estrona (**38**)

Sin embargo, para confirmar la formación del derivado benzofusionado se necesita del espectro de carbono (**espectro I.46**). En el cual se pueden ver entre 100.0 ppm y 105.0 ppm las señales de los carbonos espiránicos (C-17) de ambos epímeros, confirmado la formación del derivado benzofusionado. Finalmente, entre 110.0 ppm y 155.0 ppm se observan los carbonos del anillo A y los carbonos de la porción bencénica de la benzoxazolina.



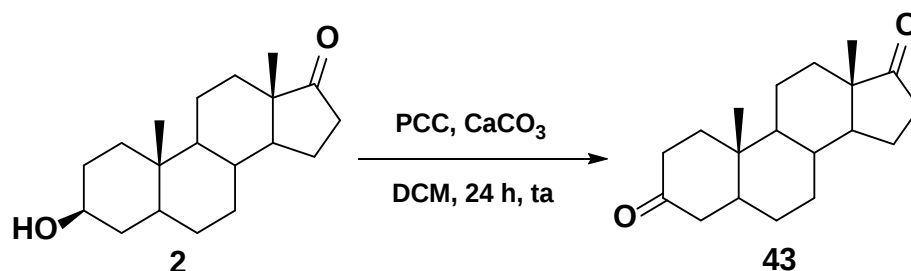
Espectro I.46. Espectro de ¹³C RMN (125.5 MHz, CDCl₃) de benzoxazolina de estrona (**38**)

I.4.8. Síntesis de espiroesteroides disustituídos en la posición 3 y 17 de *trans*-androsterona (2) con grupos benzotiazolina y benzimidazolina

Con todo lo anterior y con base a los reportes de la literatura se decidió sintetizar una variación de este tipo de compuestos, los disustituídos de *trans*-androsterona, con porciones benzotiazolina y benzimidazolina. Para esto fue necesario llevar a cabo dos pasos de reacción.

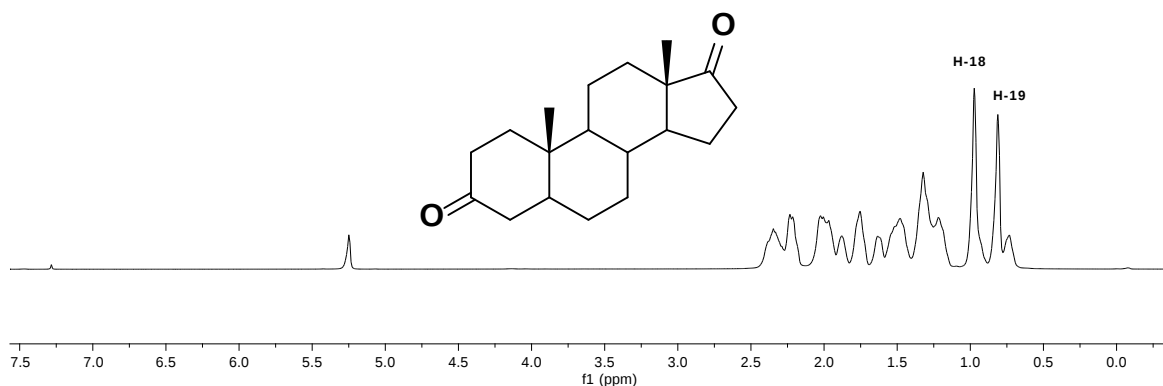
Paso 1: Oxidación de *trans*-androsterona para obtención del dicetónico en C-3 y C-17.

Para ello lo primero fue formar al dicetónico de *trans*-androsterona (43) (esquema I.25), utilizando PCC como agente oxidante y CaCO₃, en cloruro de metileno; tras 24 h de reacción a temperatura ambiente, el compuesto 43 fue aislado con rendimiento cuantitativo.



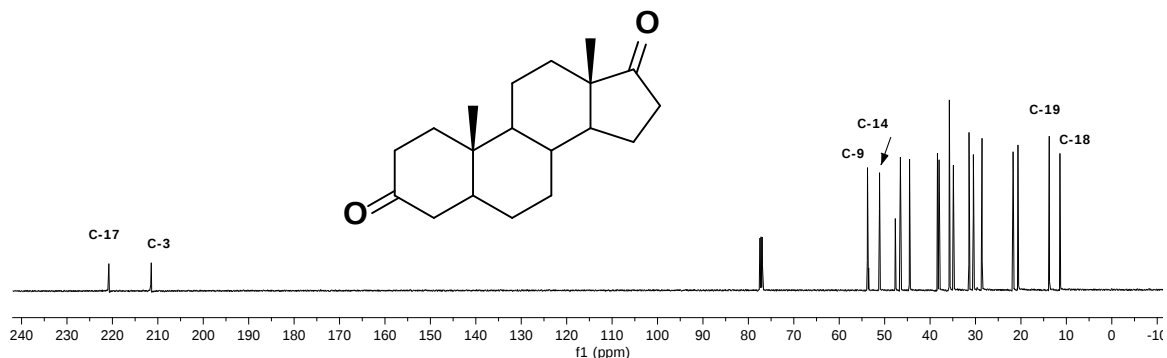
Esquema I.25. Reacción de oxidación de *trans*-androsterona (2)

Para confirmar la formación de este compuesto, se registraron los espectros de RMN. En el espectro de ¹H RMN (espectro I.47) se pueden observar las señales del esqueleto esteroide, sin embargo, ya no se observa la señal del protón de 3, lo que indica la conversión del alcohol en una cetona.



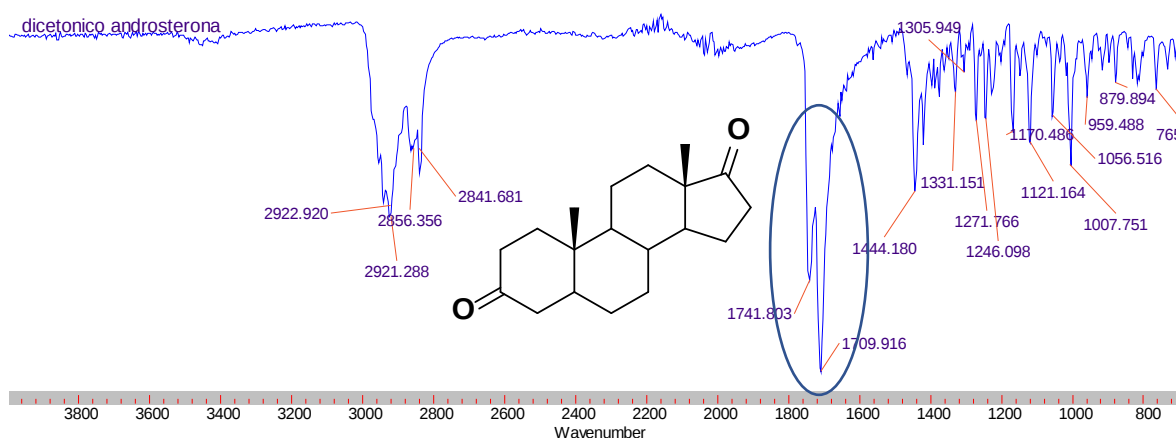
Espectro I.47. Espectro de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) de dicetónico de *trans*-androsterona (43)

En el espectro de carbono (**espectro I.48**), se observan dos señales entre 210.0 ppm y 220.0 ppm que corresponden a los carbonos carbonílicos de cetona de 3 y 17, con lo que se confirma la formación del dicetónico.



Espectro I.48. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de dicetonico de *trans*-androsterona (**43**)

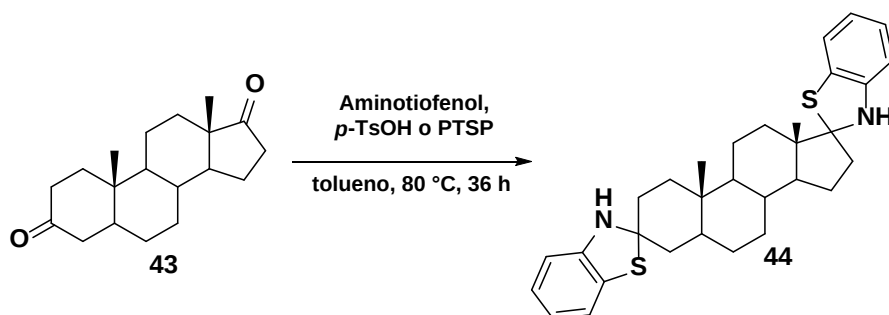
Además de los espectros de RMN también se obtuvo el espectro de IR en el que (**espectro I.49**) se pudo observar la presencia de dos grupos carbonilos como dos señales intensas en 1741 cm^{-1} y en 1709 cm^{-1} , además ya no se observa la señal del grupo hidroxilo.



Espectro I.49. Espectro de IR de dicetonico de *trans*-androsterona (**43**)

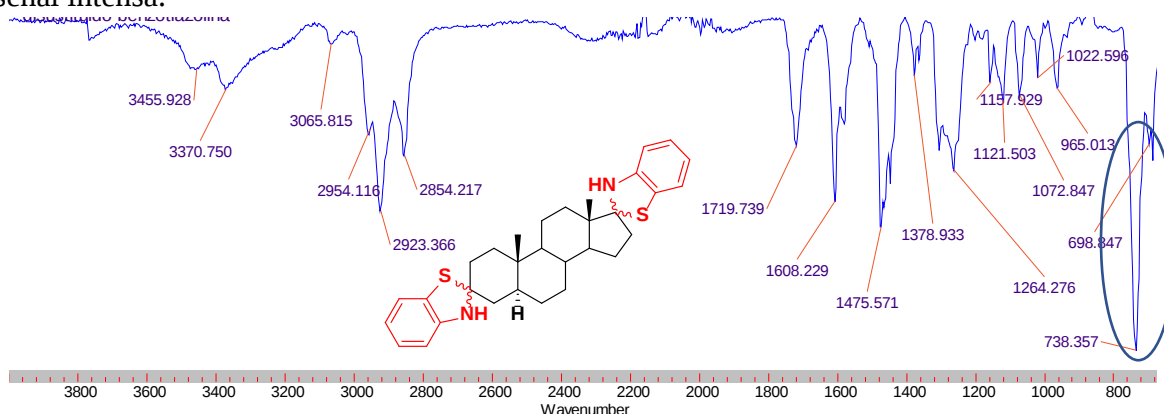
Paso 2: Formación del derivado disustituido con benzotiazolina y benzimidazolina

Para formar los dos espiros sobre las posiciones 3 y 17 fueron utilizadas las mismas condiciones empleadas para las síntesis de los espiros de la posición 17, anteriormente mencionados; en concreto, para la benzotiazolina **44** (**esquema I.26**) se empleó *p*-TsOH como catalizador, tolueno como disolvente, a una temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los rendimientos observados en estos casos fueron de bajos a moderados.



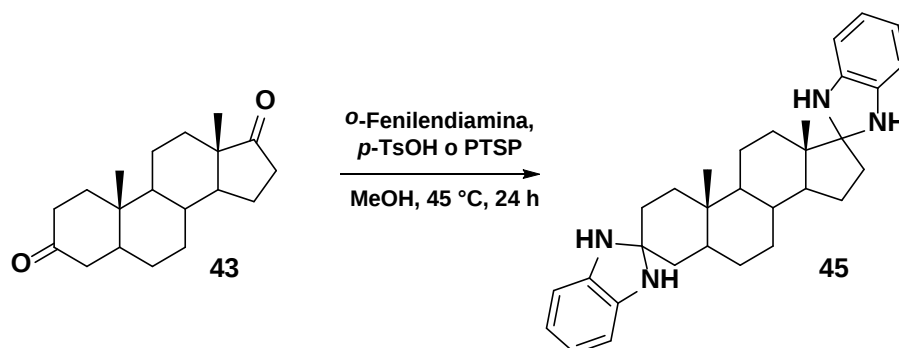
Esquema I.26. Condiciones de reacción para la formación del derivado disustituido **44**

En el espectro de IR del derivado disustituido por benzotiazolinas (**44**) (**espectro I.50**), se observan dos señales por encima de 3300 cm^{-1} la cual corresponde a los grupos NH; otro dato importante en este espectro es la ausencia de las señales intensas en torno a 1700 cm^{-1} de los carbonilos, y finalmente por 738 cm^{-1} , se observa el estiramiento C-S como una señal intensa.



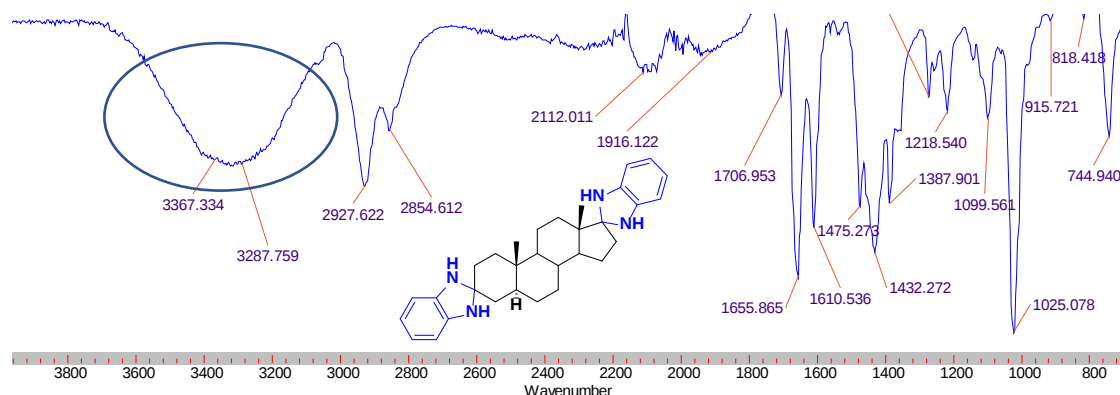
Espectro I.50. Espectro de IR de disustituido benzotiazolina (**44**)

Para el caso de la benzimidazolina **45**, las condiciones se muestran en el **esquema I.27**.



Esquema I.27. Condiciones de reacción para formación del derivado disustituido **45**

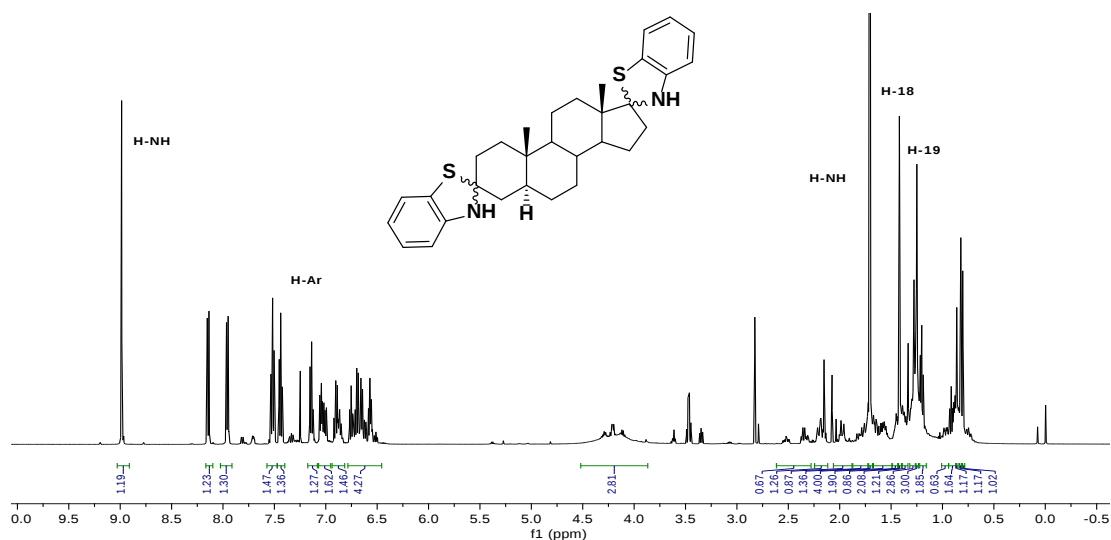
En el espectro de IR de la benzimidazolina **45** (**espectro I.51**) se observa una señal ancha en torno a 3300 cm^{-1} , la cual se debe al estiramiento N-H de las aminas de las benzimidazolininas; de igual forma que en el espectro anterior tampoco se observan las señales de los carbonilos.



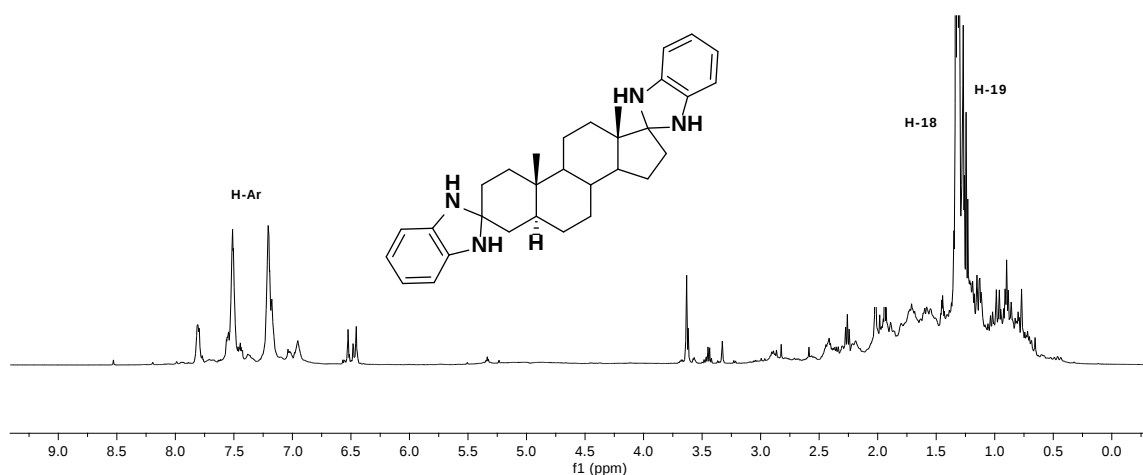
Espectro I.51. Espectro de IR de disustituido benzimidazolina (**45**)

Los productos obtenidos fueron purificados en columna cromatográfica y caracterizados por RMN de ^1H y de ^{13}C . Los compuestos formados con APTS comenzaron a degradarse rápidamente, antes de la purificación, sin contar que no había consumo total de la materia prima, por lo que se decidió, probar las reacciones con PTSP. Observando consumo total de la materia prima en 6 horas de reacción a $85\text{ }^\circ\text{C}$. Sin embargo, al momento de la purificación el derivado disustituido de benzotiazolininas se degradaba rápidamente en la columna, por lo que no fue posible separar los 4 epímeros que se observaban en placa. Estos se forman debido a la generación de dos nuevos centros estereogénicos, los cuales son claramente visibles en el espectro de carbono de RMN.

En el espectro de RMN de protón (**espectro I.52 y I.53**) de ambos derivados, se observa los protones aromáticos de las dos porciones benzotiazolina o benzimidazolina.

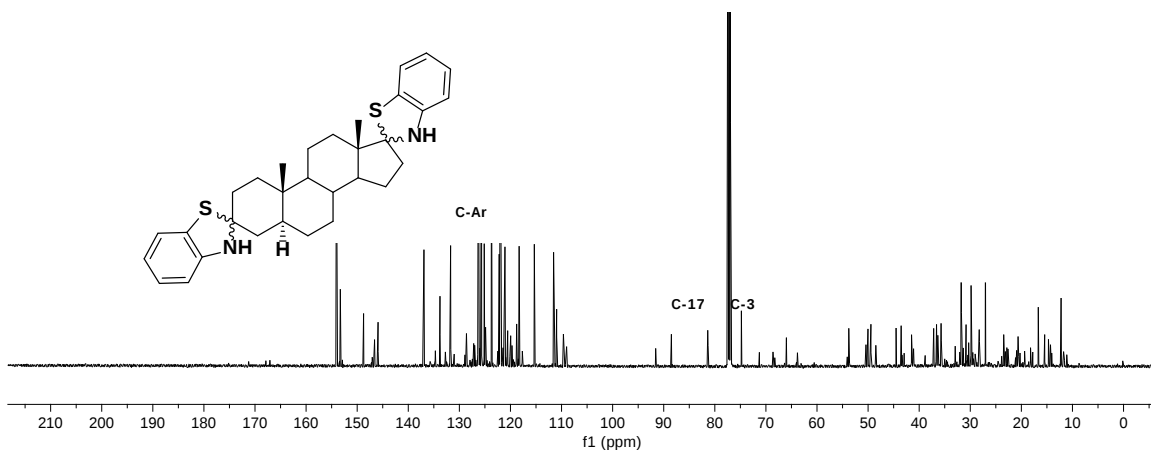


Espectro I.52. Espectro ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de disustituido benzotiazolina (44)



Espectro I.53. Espectro ^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) de disustituido benzimidazolina (45)

Por otro lado, en el espectro de carbono del disustituido de benzotiazolina (44) (**espectro I.54**), se observa la formación de los 4 epímeros, por lo que se ven una gran cantidad de señales de carbono. Dificultando en gran medida su caracterización, sin embargo, el desplazamiento hacia frecuencias bajas en torno a 75.0 ppm y 90.0 ppm de los carbonos C-3 y C-17, respectivamente, nos indica la formación de ambas benzotiazolinas.



Espectro I.54. Espectro ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de disustituido de benzotiazolina (**44**)

En el caso del espectro de carbono del disustituido de benzimidazolina (**45**) se observa únicamente la formación de un derivado ya que, debido a la simetría del heterociclo, no se generan centros estereogénicos ni en C-3, ni en C-17. Observamos solo dos carbonos espiránicos entre 80.0 ppm y 90.0 ppm, se observan las señales de los carbonos aromáticos de ambos anillos y las señales del esqueleto esteroidal.

I.5. Ensayos de antiproliferación

En colaboración con el Dr. José Manuel Padrón (Universidad de la Laguna, España) se ha llevado a cabo la evaluación de la actividad antiproliferativa de los compuestos preparados en este apartado de la Tesis Doctoral.

Para ello se empleó un panel de 6 líneas celulares de tumores sólidos humanos: A549 (células de pulmón no pequeñas), HBL-100 (mama), HeLa (cervix) y SW1573 (células de pulmón no pequeñas), como líneas sensibles a fármacos, así como T-47D (mama) y WiDr (colon), como líneas resistentes a multifármacos. La evaluación se efectuó usando una implementación del protocolo del Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. (NCI60)¹³. Los resultados, expresados como GI₅₀ (μM), (concentración del compuesto requerida para inhibir el 50% de la proliferación celular tras 48 h de exposición), se presentan en la **tabla I.6**.

Dichos compuestos fueron comparados con los valores de inhibición de los fármacos esteroideos galaterona y abiraterona, los cuales fueron usados como control positivo de agentes antiproliferativos esteroideos, empleados de manera convencional en quimioterapia. De esta forma, se ha analizado la influencia del tipo de compuesto (imina o heterociclo), la naturaleza del heteroátomo (S, N, O), así como el tipo de esteroide de partida (*trans*-androsterona, *trans*-dehidroandrosterona o estrona). De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa que la mayoría de los compuestos inhiben el crecimiento celular en el rango micromolar, y pueden extraerse una serie de interesantes relaciones estructura-actividad. En general, las iminas intermedias evaluadas, exhiben una actividad antiproliferativa moderada, con valores de GI₅₀ comprendidos entre 11-78 μM. La excepción es el compuesto **30**, con una actividad potente frente a las líneas HBL-100 (11 μM, mama) y HeLa (4.4 μM, cáncer cérvico-uterino).

Con respecto al residuo esteroideal, los derivados de estrona resultaron ser más potentes que sus análogos de *trans*-androsterona y *trans*-dehidroandrosterona, siendo especialmente notable la diferencia en el caso de las benzimidazolininas. Así pues, mientras el compuesto **37** careció de actividad destacable a la máxima concentración ensayada (100 μM), y el derivado **36** mostró actividad moderada, la benzimidazolina **35**, exhibió valores de GI₅₀ en el rango micromolar para todas las líneas celulares evaluadas (GI₅₀ = 1.6-4.5 μM). Dichos valores son análogos a los del fármaco galaterona y suponen un incremento de actividad de hasta 50 veces con respecto a la abiraterona.

Por otro lado, en cuanto al tipo de heterociclo, de forma general, los más activos fueron los derivados de tipo benzoxazolina. Son especialmente potentes los compuestos **38** y **40**, con actividades en el rango submicromolar-micromolar. Dichos derivados resultaron ser especialmente potentes frente a la línea SW1573, en un incremento de actividad de hasta 160 veces con respecto a la abiraterona.

Con esto podemos concluir que modificaciones en el anillo D del esqueleto esteroide, afectan su actividad, al igual que el heteroátomo presente en el heterociclo, observando actividad moderada en los heterociclos de azufre, y de nitrógeno, salvo en el caso de estrona, y una potente actividad en los derivados con oxígeno. Para inferir las relaciones de actividad de la estructura, los datos se ven mejor utilizando el gráfico de rango GI₅₀ (Figura I.14).

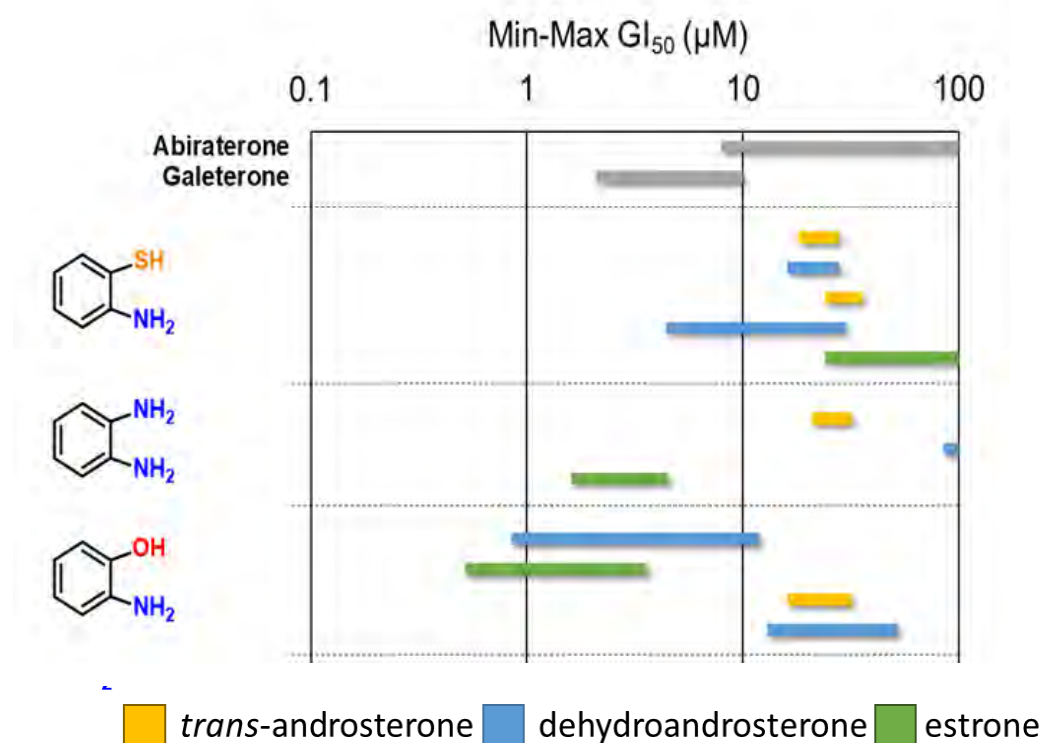


Figura I.14. Grafica de valores de antiproliferación de los derivados esteroidales

Tabla I.6. Valores GI₅₀ de la actividad antiproliferativa de derivados esteroideos contra diferentes líneas celulares de cáncer humano

Compuestos	Valor de GI ₅₀ (μM) frente a cada línea celular					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
29	27±4.7	33±5.1	24±3.4	25±1.7	36±3.0	30±2.4
26	22±0.4	24±3.2	19±4.5	18±3.8	19±1.8	28±7.1
28	44±6.6	>100	25±4.9	24±8.8	36±6.6	78±17
27	27±4.9	16±7.8	21±4.4	23±3.8	28±1.9	27±4.7
30	29±8.9	11±2.0	4.4±0.7	16±4.7	21±0.7	30±10
36	21±3.1	24±1.4	22±5	22±4.1	32±5.6	24±4.7
35	3.3±0.5	4.5±0.7	3.6±0.6	1.6±0.6	3.7±0.4	4.3±0.9
37	>100	>100	98±.7	>100	>100	>100
41	21±3.0	27±2.7	16±3.1	16±4.0	32±5.2	23±3.4
38	2.1±0.4	3.6±1.0	1.7±0.2	0.52±0.1	2.9±.02	2.8±0.5
42	24±3.1	52±4.5	23±3.7	13±2.7	47±2.6	42±1.9
40	2.3±0.5	12±2	1.8±0.2	0.85±0.2	2.3±0.3	2.7±0.1
15	53±7.5	82±9.1	18±2.4	73±8.6	52±7.5	57±6.2
19	>100	>100	7.5±1.3	>100	>100	>100
21	93±9.5	96±5.5	21±3.8	42±7.7	46±7.2	53±3
20	37±2.1	58±14	29±9.3	68±22	>100	44±7.9
Abiraterona	95±8.0	>100	7.9±0.5	85±4.5	24±4.5	42±7.7
Galaterona	3.9±1.3	10±0.9	5.3±0.4	3.9±0.5	2.1±0.1	2.7±0.2

Los valores de GI₅₀ se dan en μM. La desviación estándar se calculó de dos a cuatro experimentos independientes. La abiraterona y la galaterona se utilizaron como fármacos citotóxicos de referencia. Los valores en negrita representan los mejores datos antiproliferativos contra líneas celulares tumorales con valores de GI₅₀ <10 μM.

I.6. Estudios computacionales

Los métodos basados en la química computacional son ampliamente utilizados en la caracterización espectroscópica y asignación estereoquímica de centros estereogénicos, de una gran cantidad de moléculas bioactivas, las cuales han sido útiles para predecir tanto las estructuras moleculares como sus propiedades de RMN, como las constantes de acoplamiento y los desplazamientos químicos de ¹H y ¹³C.^{56, 57} Actualmente, se han desarrollado metodologías fiables para comparar los

desplazamientos químicos de RMN obtenidos experimentalmente con los calculados teóricamente obtenidos.^{58,59} El aporte teórico para este trabajo es aclarar la asignación correspondiente de cada espectro, calculando la configuración relativa de siete derivados esteroidales con posible actividad antiproliferativa. Se realizaron análisis de energía Gap, energía libre, población, densidad electrónica y ¹³C RMN, utilizando la metodología DFT, poniendo énfasis en el carbono espiránico C-17.

I.6.1. Estabilidad energética y análisis de población

La **figura I.15** muestra las estructuras optimizadas calculadas al nivel teórico B3LYP / 6-31+G (d,p), de los siete derivados esteroidales con mayor actividad antiproliferativa (GI50) en las seis líneas celulares cancerosas de acuerdo con la **Tabla I.6**. Las propiedades estructurales y la diastereoselectividad fueron analizadas mediante la presencia de un carbono espiránico, que se origina por el ataque nucleofílico sobre C-17 del anillo D del sistema de anillos del esqueleto esteroide. Los compuestos **30** se obtuvieron a partir de *trans*-dehidroandrosterona (**3**), al igual que los compuestos **40** los cuales son diastereoisómeros entre sí, por otro lado, **38** son diastereoisómeros sintetizados a partir de estrona (**1**). El compuesto **35** se obtuvo como estructura única a partir del precursor (**1**). Los diferentes reactivos dieron lugar a diferentes grupos como benzotiazolinas (**30**), benzoxazolinas (**38** y **40**) y benzimidazolinas (**35**). Los diferentes grupos y sustituyentes aportan diferentes características electrónicas, que confieren diversas propiedades como estabilidad y reactividad. Experimentalmente, existen dos formas de determinar la estabilidad cinética, una de ellas es mediante medidas calorimétricas y otra mediante la constante de equilibrio. Computacionalmente, la estabilidad relativa de un par de diastereoisómeros se puede determinar de forma directa utilizando la energía libre, ΔG , en condiciones normales. Otra medida de estabilidad es la energía de la brecha ($E_g = E_{LUMO} - E_{HOMO}$) en el marco de los orbitales moleculares de frontera. Un gran valor de E_g implica una gran estabilidad cinética y una baja reactividad química, debido a que es desfavorable eliminar electrones del orbital molecular ocupado más alto (HOMO) para transferirlos al orbital molecular desocupado más bajo (LUMO), y de esta forma transportar fuera la reactivación de la reacción química.

En la **Tabla 7** se muestra la energía libre, G (en a.u.), energías libres relativas con respecto al compuesto o diastereoisómero más estable (ΔG , en kJ mol^{-1}), energías gap (E_g , en eV), población (en %) y los ángulos diedros representativos de los siete compuestos optimizados. Los resultados muestran la siguiente tendencia en la estabilidad energética: **30a** > **30b** > **40a** > **40b** > **38a** > **38b** > **35**. Los compuestos **30**, con los valores G más pequeños, tienen un enlace de hidrógeno entre el grupo S–H y el átomo de N del grupo imina, que estabiliza a las estructuras moleculares. El compuesto **30a** es más estable que el compuesto **30b** en 3.84 kJ mol^{-1} . Los compuestos **38a** y **40a** con configuración *R* son más estables que sus respectivos diastereoisómeros *S*, **38b** y **40b**, en 5.92 y 5.45 kJ mol^{-1} , respectivamente. Por otro lado, los diastereoisómeros **40** y **38** tienen el mismo sustituyente E, sin embargo, la mayor estabilidad observada de **40** con respecto a **38** se debe a la diferencia en el anillo A y la presencia del doble enlace en el anillo B de los precursores (**3**) y (**1**), respectivamente. La **figura 16** muestra el potencial electrostático molecular (MEP) de los siete derivados esteroideos usando un mismo valor de 4×10^{-4} a.u. Las regiones rojas indican carga negativa o alta densidad electrónica, las regiones azules indican carga positiva o densidad electrónica deficiente y las regiones amarillas corresponden a valores intermedios. Se observa que los compuestos **30** y **40** del precursor **3**, muestran una región con alta densidad electrónica en el doble enlace del anillo B, mientras que en los compuestos **38** y **35**, la densidad electrónica se encuentra en el anillo A. Otras regiones con alta densidad electrónica se encuentran en el sustituyente E y en el O–H unido al anillo A de todos los compuestos, por otro lado, las regiones con densidad electrónica deficiente se encuentran en los átomos de H de los enlaces O–H, N–H y S–H.

E_g (4.87 y 4.82 eV , respectivamente). Los compuestos **30** presentan un enlace imina entre el carbono C-17 del anillo D y el átomo de N del sustituyente E (ver **Figura 16**), proporcionando densidad electrónica en esta región. Los valores de E_g disminuyen cuando el sustituyente E contiene más átomos donantes de electrones, lo que añade densidad electrónica hacia C-17, como se observa en el compuesto **35** el cual presenta dos átomos de N en el sustituyente E. Esta indica cuando existe una contribución importante de donación de electrones, una reactividad química importante y una estabilidad cinética menor. Además, en la **Tabla 7** se muestra el análisis de población

utilizando ΔG en las tres series de compuestos (**30**, **40** y **38**), los compuestos mayoritariamente poblados tienen valores entre 83-92%. Para la serie **30**, el compuesto **30a** es el más poblado, en esta configuración el ángulo diedro entre los dos carbonos del grupo –Ph de E y el enlace imina –C = N– es 108 °, mientras que en el compuesto **30b** el ángulo diedro es de -114 °, se encuentra hacia el lado contrario. Por otro lado, el compuesto (17R) –**40a** de la serie **40**, está mayormente poblado con 91.6% mientras que (17S) –**40b** solo tiene 8.4% poblado. El ángulo diedro entre los dos carbonos de los anillos C y D, entre el carbono espiro C-17 y el grupo –NH es -167.9 ° en (17R) –**40a** mientras que en (17S) –**40b** es 81.6 °, verificando la posición contraria del sustituyente E para la serie **38**, se observa que (17R) –**38a** es el diastereoisómero más poblado con 90.02% mientras que (17S) –**38b** tiene 9.98% de población, de manera similar a la serie **40**, sus ángulos diedros calculados (-168.2 ° y 80.9 °) indican configuraciones contrarias del sustituyente E, por lo tanto, el análisis teórico de G y Eg sugiere que el compuesto **35**, con el mayor G (menor estabilidad) y el menor espacio (4.32 eV) es una de las más propensas a presentar mayor actividad antiproliferativa en las seis líneas celulares estudiadas en este trabajo.

Tabla I.7. Energía libre (G in a.u.), energía libre relativa (ΔG , in kJ mol⁻¹), energía gap (E_g , en eV), población (en %), y el ángulo diedro representativo (en grados) de los derivados esteroidales con mayor actividad antiproliferativa (GI₅₀), calculados por el nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d,p).

Compuestos	G (a.u.)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	E_g (eV)	Población (%)	Angulo diedro (grados)
30a	-1500.2901	0.00	4.873	82.53	107.63°(–C ₁₇ =N–C _{Ph} –C _{SH} –)
30b	-1500.2886	3.84	4.817	17.47	-114.27°(–C ₁₇ =N–C _{Ph} –C _{SH} –)
(17R)– 40a	-1177.3215	0.00	4.711	91.60	-167.89°(–C _C –C _D –C ₁₇ –NH–)
(17S)– 40b	-1177.3192	5.92	4.709	8.40	81.64°(–C _C –C _D –C ₁₇ –NH–)
(17R)– 38a	-1135.6838	0.00	4.778	90.02	-168.22°(–C _C –C _D –C ₁₇ –NH–)
(17S)– 38b	-1135.6817	5.45	4.715	9.98	80.96°(–C _C –C _D –C ₁₇ –NH–)
35	-1116.2284	—	4.317	100.0	77.20°(–C _C –C _D –C ₁₇ –NH–)

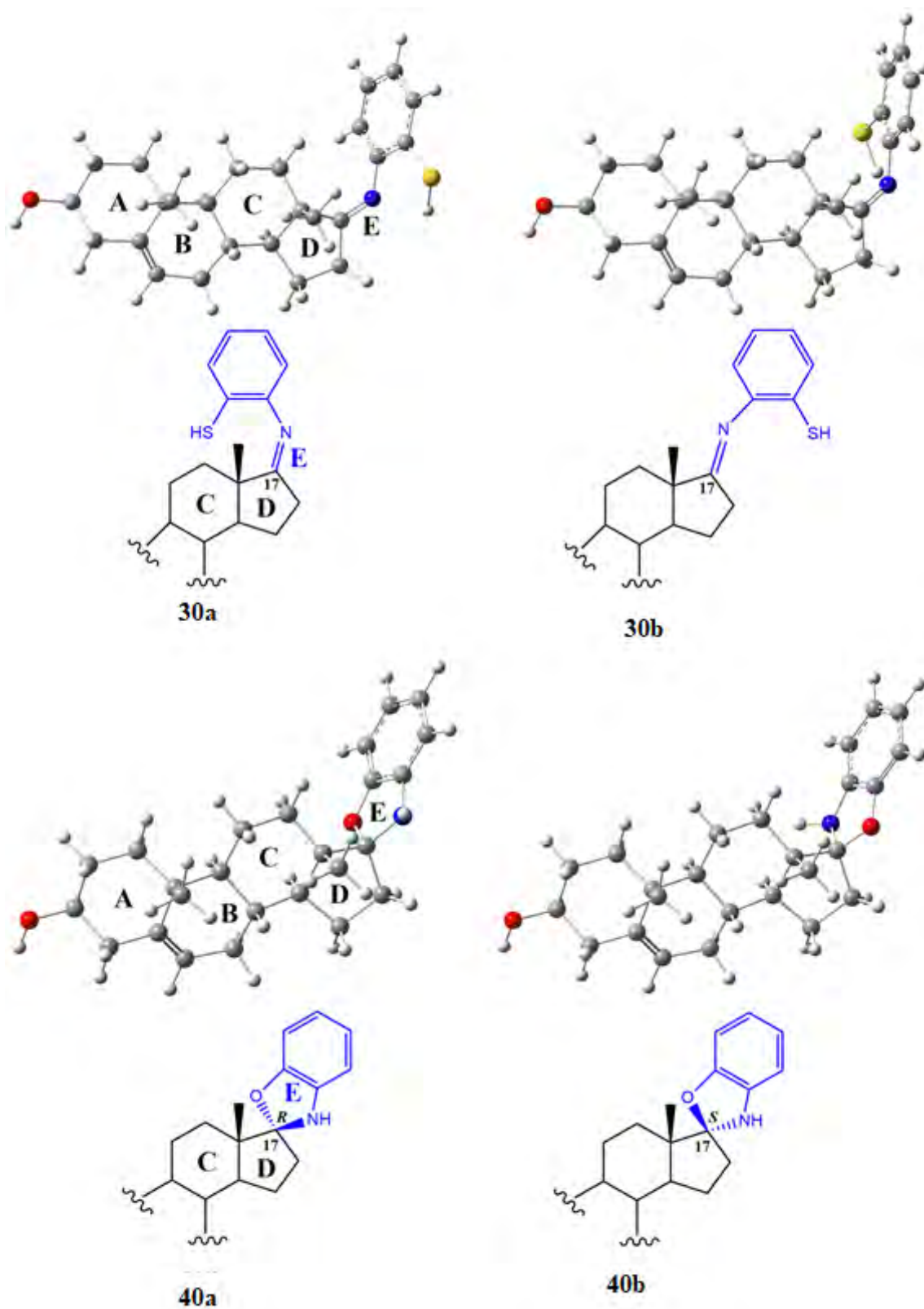
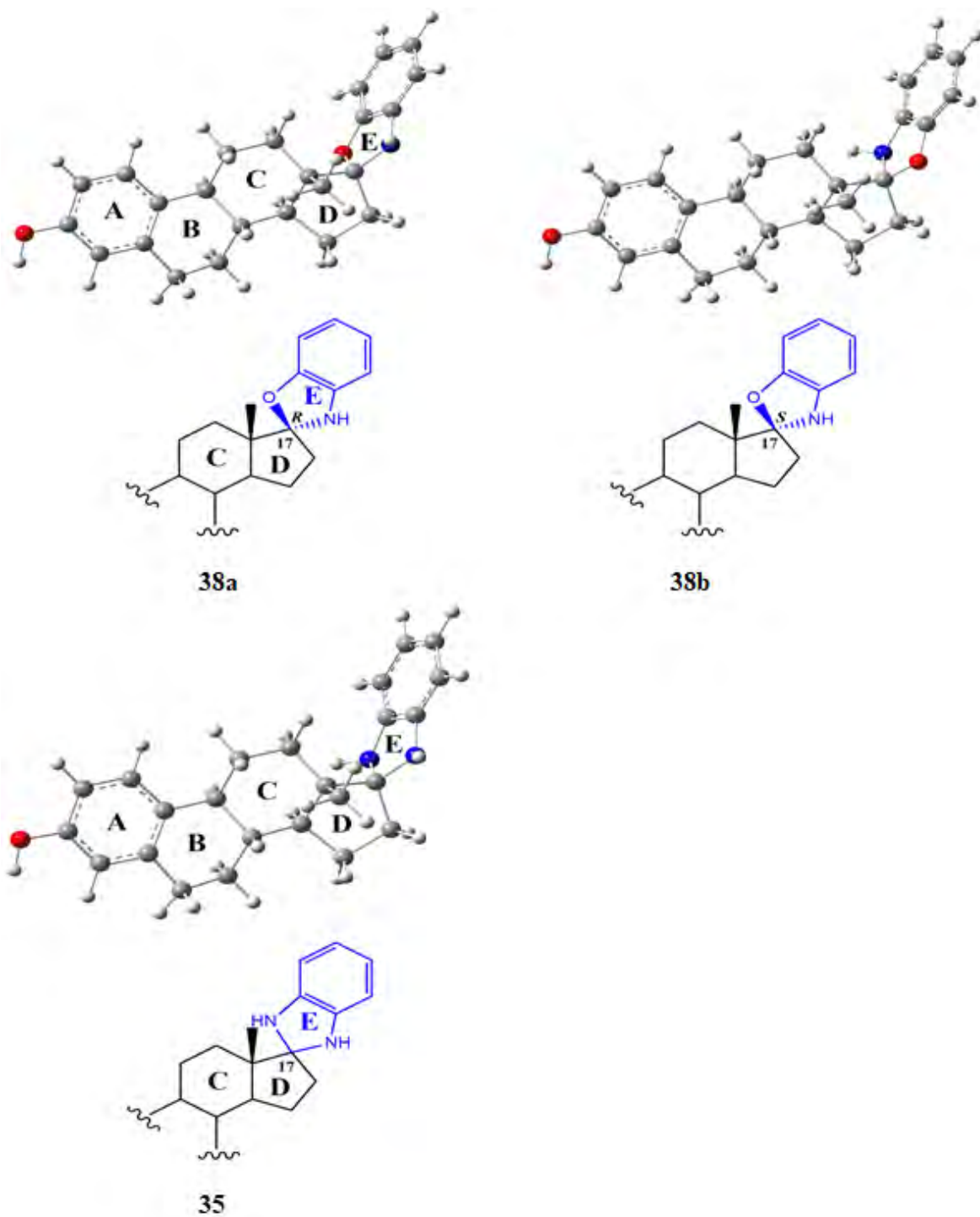


Figura I.15. Estructuras optimizadas de los derivados esteroideos con mayor actividad antiproliferativa (GI50), calculados por el nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d,p).



Cont. Figura I.15. Estructuras optimizadas de los derivados esteroidales con mayor actividad antiproliferativa (GI_{50}), calculado por el nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d,p).

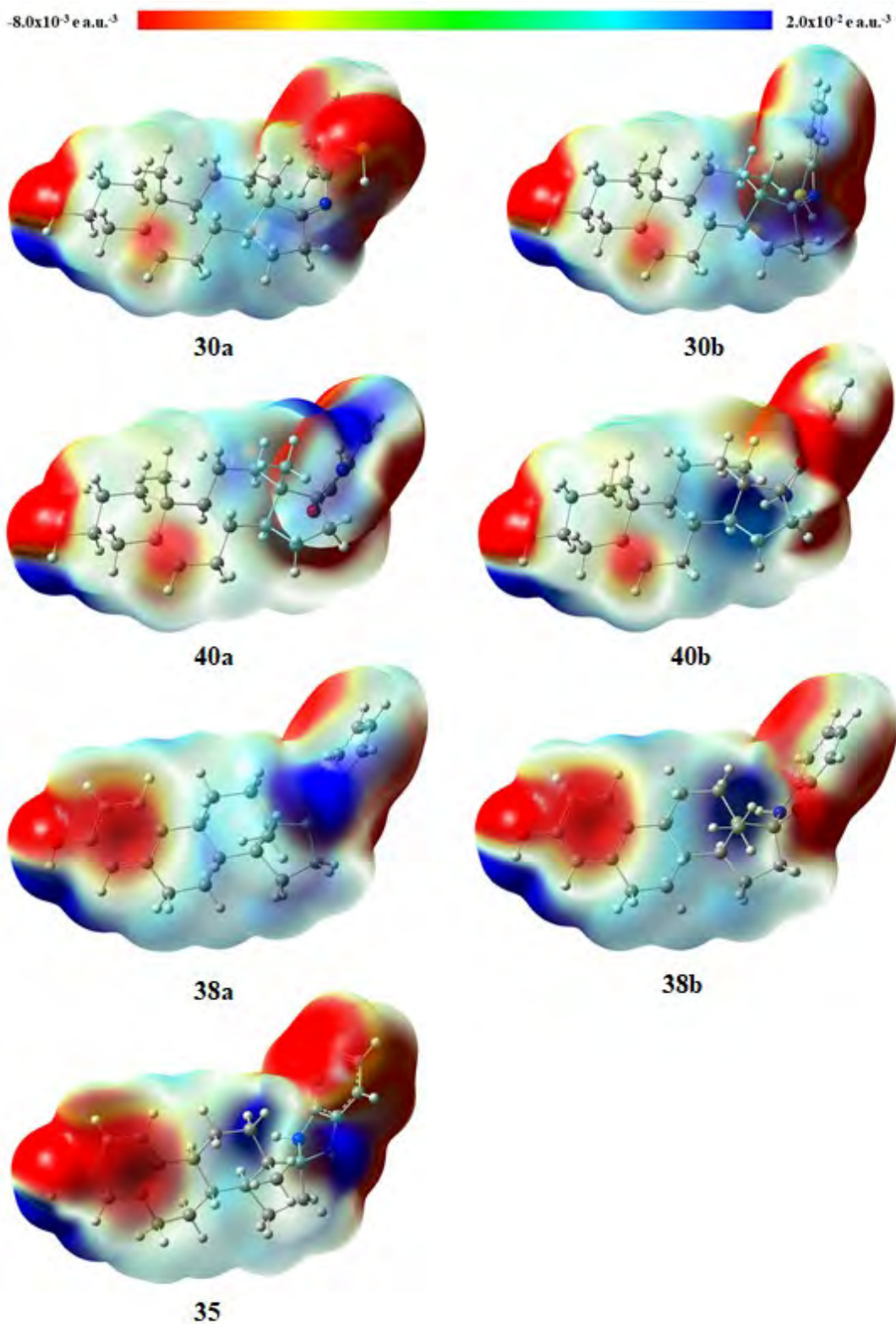


Figura I.16. Potencial molecular electrostatico (PEM) de los derivados esteroidales con mayor actividad antiproliferativa (GI_{50}), calculado por el nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d,p).

I.6.2. Cálculos de ^{13}C RMN

Los cálculos de los cambios químicos de ^{13}C RMN de los compuestos se llevaron a cabo usando la ecuación $\delta = \sigma_{\text{ref}} - \sigma$, donde σ_{ref} es la protección magnética isotrópica de tetrametilsilano (TMS) con un valor de $\sigma_{\text{ref}} = 192.599$ ppm. Los resultados experimentales y teóricos para el carbono espiránico C-17 se muestran en la **tabla I.8**. Los valores calculados concuerdan con los obtenidos experimentalmente. Por tanto, se predijo el valor para el compuesto **38b**. En general, el método RMN-DFT utilizado en este trabajo proporciona valores ligeramente sobreestimados a 3 ppm en promedio, lo que sugiere que las estructuras teóricamente propuestas son correctas.

Tabla I.8. Desplazamientos químicos experimentales y calculados de ^{13}C RMN (δ , en ppm) para el C-17 de los derivados esteroidales con mayor actividad antiproliferativa (GI_{50}). Los valores teóricos son calculados usando el método GIAO del nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d,p).

Compuesto	$\delta^{13}\text{C}_{\text{teo}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{exp}}$
30a	182.08	181.70
30b	175.93	173.78
(17R)– 40a	102.61	99.60
(17S)– 40b	101.68	98.86
(17R)– 38a	103.76	100.60
(17S)– 38b	102.73	—
35	89.77	87.47

I.6.3. Docking molecular sobre Bcl2 (2O2F)

Como se ha visto con anterioridad los esteroides son productos naturales ampliamente distribuidos en la naturaleza, los cuales se pueden encontrar como hormonas, lípidos de soporte entre otros dentro de los organismos vivos. Debido a esto, utilizarlos como fármacos suena prometedor, ya que son fáciles de reconocer por el cuerpo humano. Por ello fueron sintetizados una serie de derivados esteroideos, los cuales se diseñaron como agentes antiproliferativos. Esta actividad podría ser llevada a cabo mediante el anclaje a receptores nucleares, a la inhibición de alguna enzima durante el proceso de replicación o de alguna proteína durante la apoptosis.⁶⁰

Se decidió realizar un estudio de docking molecular sobre una proteína involucrada en el proceso de apoptosis, la cual también se ha observado interactúa con moléculas estructuralmente semejantes a los compuestos sintetizados. Esta proteína es la Bcl-2, una proteína antiapoptótica que provee a las células cancerosas un mecanismo común para sobrevivir y crear resistencia a los fármacos quimioterapéuticos actuales, en este caso debido a la similitud del ligando co-cristalizado con nuestras moléculas se decidió utilizar la proteína co-cristalizada con una acil sulfonamida (4-(4-bencil-4-metoxipiperidin-1-il)-n-[(4-{[1,1-dimetil-2(feniltio)etil]amino}-3-nitrofenil)sulfonyl]benzamida) denominada 2O2F, esta se expresa en *Escherichia coli* BL21(DE3), pero procede del humano (*homo sapiens*), es una proteína de una sola cadena, con una longitud de 138 aminoácidos. Tiene un peso molecular de 17.06 kDa y presenta un total de 1204 átomos.⁶¹ Bcl-2 es un protooncogén extraído de las células B de linfoma 2, se encuentra en la traslocación recíproca entre los cromosomas 14 y 18 que se presenta en los linfomas foliculares.⁶² A diferencia de otros oncogenes este se encuentra involucrado en el bloqueo de la muerte celular y no en el control de la proliferación, tiene una localización mitocondrial lo que indica la importancia de este orgánulo en los procesos de apoptosis, esta proteína lleva a cabo una interacción con su homólogo Bax, la cual es una proteína pro-apoptótica.⁶² Para que exista una regulación en los procesos apoptóticos debe existir una relación Bcl-2/Bax, (anti-apoptótica/pro-apoptótica), la cual en los procesos cancerosos se encuentra alterada. Las proteínas Bcl-2 y sus homólogos están implicados en un gran número de procesos cancerosos como el melanoma y los carcinomas de mama, próstata y pulmón, a su vez se relaciona con la resistencia a los tratamientos antitumorales más utilizados.⁶³

El acoplamiento molecular se llevó a cabo con la benzoxazolina de estrona, compuesto que resulto más activo en las pruebas de inhibición de la proliferación celular, sobre Bcl-2. La estructura cristalizada de esta proteína fue obtenida de la base de datos Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/structure/2O2F>), bajo el código de identificación 2O2F, estudiada por RMN en solución, 1 conformero analizado. La proteína fue preparada en el programa computacional Chimera,⁶⁴ en el que se minimizo su energía. Los cálculos de acoplamiento fueron realizados con AutoDock Vina (autodock_vina_1_1_2_win32.msi).⁶⁵ En el cual se realizó un acoplamiento automatizado del ligando semiflexible con el sitio de unión rígido de la proteína, en el programa se realizaron 10 corridas del experimento, cada una de estas da una predicción de modo de unión del ligando con el sitio activo de la proteína.

Todas las moléculas de agua fueron removidas de la proteína, a su vez todos los átomos de hidrogeno fueron añadidos. Para el ligando y la proteína fueron asignadas las cargas de Gasteiger y los átomos no polares fueron escondidos. El grid fue generado dentro del programa de Chimera, y centrado sobre las coordenadas cristalográficas del ligando cristalográfico, las dimensiones del grid fueron 25 x 25 x 25 Å, para la visualización de los compuestos fueron utilizados Pymol 1.3,⁶⁶ Discovery Studio, versión 4.1 (Accelrys, Inc. San Diego),⁶⁷ y Proteins.plus.⁶⁸ El ligando fue preparado en Chem Bio Draw, minimizando su energía y fue utilizado en el programa Chimera y procesado en Autodock Vina.

Fue utilizado un equipo Toshiba de 4.0 GB con procesador Intel(R) Celeron(R) CPU N2820 @ 2.13 GHz, con un sistema operativo de 64 bits, procesador basado en x64.

El primer paso fue la validación del Docking, para esto se llevó a cabo el reacoplamiento del ligando co-cristalizado (**L10**) sobre la proteína, observando que se mantienen las interacciones originales y presenta un RMSD: 0.532 Å, arrojó un puntaje de -10.3 kcal/mol. Los aminoácidos con los que interactúa el ligando co-cristalizado con la proteína son Leu134, Val130, Val145, Phe150, Phe147, Phe101, Phe109. Se realizó la visualización de la pose 1 del ligando co-cristalizado en proteins.plus y se pudo observar la mayoría de las interacciones mencionadas, las cuales se encuentran reportadas en la literatura.⁶² Se muestran las interacciones de la validación en la **figura I.17**.

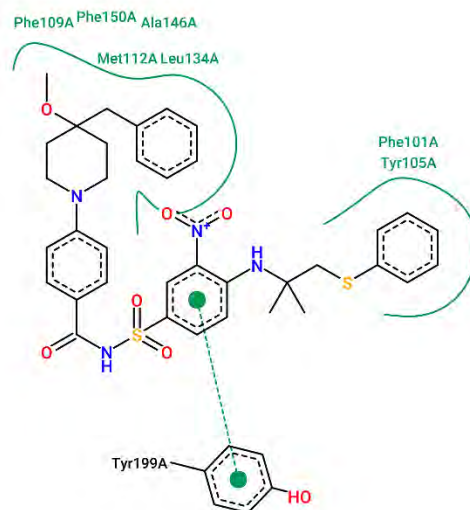
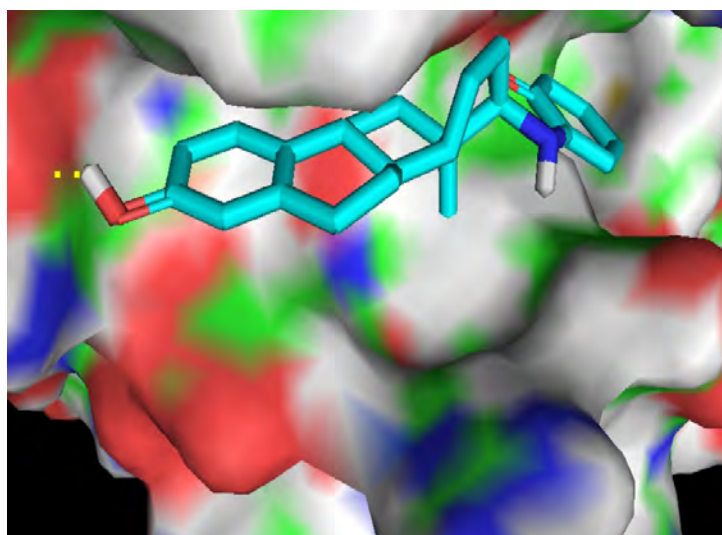


Figura I.17. Interacciones del ligando co-cristalizado LI0 con la proteína Bcl-2 observadas en proteins.plus

Una vez realizada la validación se realizó el acoplamiento molecular de la benzoxazolina de estrona, el compuesto más activo en la evaluación antiproliferativa sobre las 6 líneas celulares cancerosas, con la proteína escogida Bcl-2, lo cual dio un puntaje de -9.2 kcal/mol, el compuesto muestra interacciones por puente de hidrogeno con Gln96 por el hidroxilo de C-3 de la estrona, unión que no forma parte de las interacciones del ligando cristalográfico con la proteína, lo que puede resultar favorable ya que podría reforzar el complejo ligando-proteína, esto se observa mediante una estructura tridimensional en el programa PYMOL, y se presenta en la **figura I.18**.



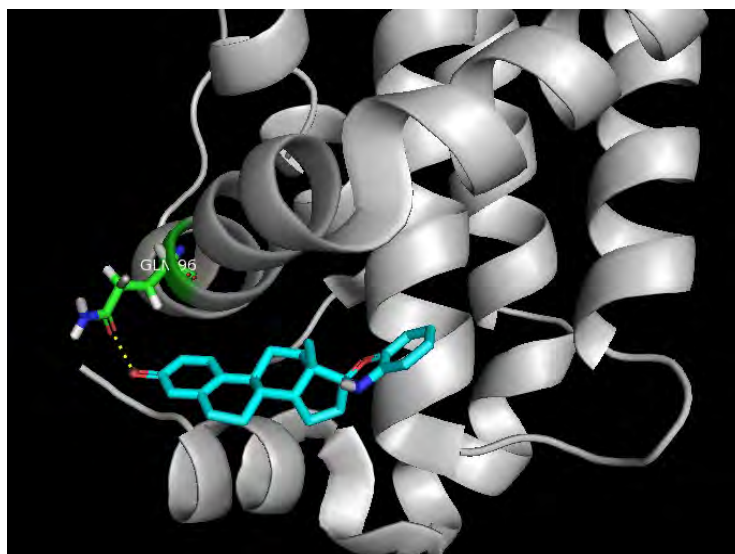


Figura I.18. Presentación en tres dimensiones de la benzoxazolina de estrona (presentada en azul), dentro del sitio activo de Bcl-2, podemos observar la interacción por puente de hidrogeno.

En cuanto al resto de las interacciones se pueden observar con claridad en las visualizaciones bidimensionales, como son Discovery (**figura I.19**) y Proteins.plus (**figura I.20**). En Discovery studio se observan las dos poses que más se asemejan al ligando cristalográfico, presenta interacciones con Leu134, Val130, Val145, Phe150, Phe101 y Phe109, las cuales también presenta el ligando cristalográfico, también se observan buenas interacciones con la Tyr199, interacción que no presenta el ligando LI0.

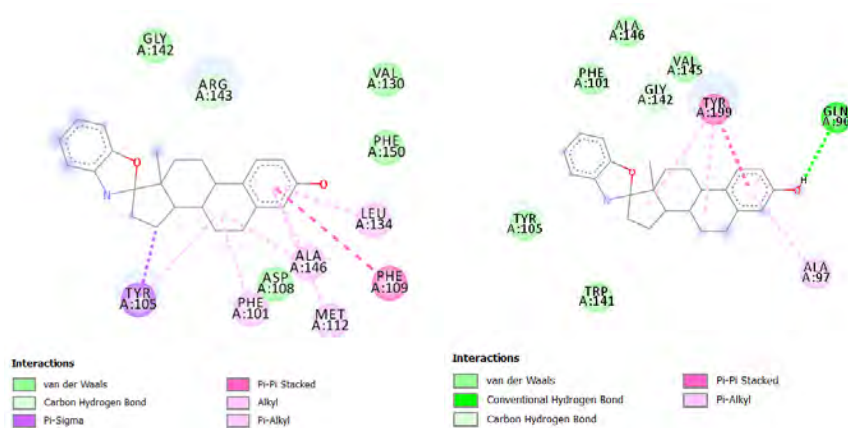


Figura I.19. Visualización en 2D, de las interacciones de benzoxazolina de estrona con los aminoácidos del sitio activo de Bcl-2, en Discovery.

Para observar con más claridad las interacciones del docking, fue procesado en protein.plus, en el que se pudo ver que los dos anillos aromáticos generan interacciones de tipo pi-pi con la Tyr105, y con la Tyr199, a su vez con el anillo de la benzoxazolina presenta interacciones de tipo Van der Waals con Phe101 y forma un puente de hidrogeno con Gln96. El resto del esqueleto esteroide presenta interacciones hidrofóbicas con Ala97 y con Tyr199, interacciones que presenta en una de las 2 conformaciones con mayor similitud, con todo esto se puede concluir que la benzoxazolina de estrona podría actuar mediante la inhibición de la proteína Bcl-2 ya que presenta múltiples interacciones con el sitio activo, esto concuerda con lo observado en los resultados in vitro con buenos valores de inhibición de la proliferación celular.

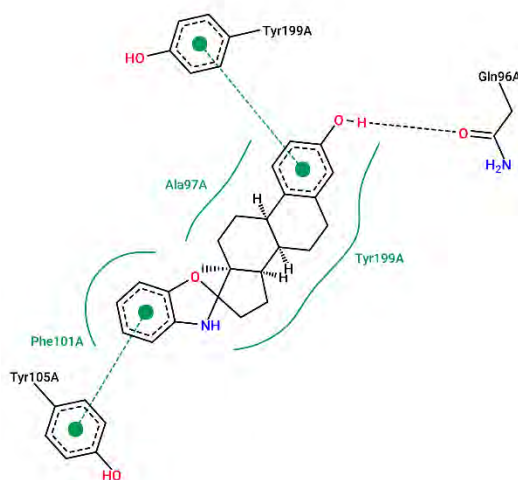


Figura I.20. Visualización en 2D, de las interacciones de benzoxazolina de estrona con los aminoácidos del sitio activo de Bcl-2, en protein.plus.

1.7. Conclusiones

Con la finalidad de llevar a cabo la preparación de ureas y tioureas espiránicas, fueron sintetizados dos intermediarios, de tipo aminonitrilo y diamino a partir del carbonilo de la posición 17 de estrona, *trans*-androsterona y *trans*-dehidroandrosterona, sin embargo, a pesar de modificar las condiciones experimentales solo fue posible obtener la espirotiourea a partir de la estrona.

Por otro lado, fue desarrollada una metodología para sintetizar espiro heterociclos benzofusionados sobre la posición 17; mediante reacciones de ciclocondensación de tipo *one-pot*, formando benzotiazolinas, benzimidazolinas y benzoxalinas a partir de estrona, *trans*-androsterona y *trans*-dehidroandrosterona, en rendimientos moderados. A su vez fueron aisladas las iminas intermediarias de algunos de los compuestos, los cuales fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas. Dichas reacciones fueron llevadas a cabo con la ayuda de diversos catalizadores; todos los compuestos sintetizados fueron evaluados como agentes antiproliferativos.

Se observó que la imina **30**, presenta una actividad potente frente a las líneas HBL-100 (11 μ M, mama) y HeLa (4.4 μ M, cáncer cérvico-uterino). Se vio que los derivados de estrona resultaron ser más potentes que sus análogos de *trans*-androsterona y *trans*-dehidroandrosterona, siendo especialmente notable la diferencia en el caso de las bezimidazolinas. Presentando valores de GI₅₀ en el rango micromolar bajo para todas las líneas celulares evaluadas (GI₅₀ = 1.6-4.5 μ M). Dichos valores son análogos a los del fármaco galaterona y suponen un incremento de actividad de hasta 50 veces con respecto a la abiraterona. Por otro lado, en cuanto al tipo de heterociclo, de forma general, los más activos fueron los derivados de tipo benzoxazolina. Los compuestos **38** y **40** son especialmente potentes, con actividades en el rango submicromolar-micromolar. Dichos derivados resultaron ser especialmente potentes frente a la línea SW1573, en un incremento de actividad de hasta 160 veces con respecto a la abiraterona.

De los resultados teóricos se obtuvo que los compuestos **30a** y **30b** tienen la mayor estabilidad energética. Los diastereoisómeros **40a** y **38a**, con configuración *R*, son más estables que sus respectivos diastereoisómeros *S*, mientras que **40b** y **38b**, son los más poblados. Los desplazamientos químicos de ¹³C RMN se calcularon con precisión confiable con respecto a los encontrados experimentalmente, lo que fue útil para la predicción de los

espectros de ^{13}C RMN del compuesto **38b**. Finalmente en el estudio de docking se puede concluir que la benzoxazolina de estrona podría actuar mediante la inhibición de la proteína Bcl-2 ya que presenta múltiples interacciones con su sitio activo.

I.8. Sección experimental

Esteroides

Métodos generales

Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Perkin Elmer FT-IR One, los datos se expresan en números de onda (cm^{-1}).

Los espectros de RMN fueron determinados en un equipo Bruker Ascend 500 MHz. Los desplazamientos químicos están reportados en ppm (δ) y el espectro fue referenciado con el disolvente protonado residual (^1H) y con el disolvente deuterado (^{13}C): CDCl_3 (7.26 y 77.16 ppm), CD_3OD (3.31 y 49.0 ppm) para ^1H , y ^{13}C RMN respectivamente. Las constantes de acoplamiento (J) están expresadas en Hertz (Hz). Las señales de ^1H y ^{13}C , están asignadas usando experimentos de RMN de 1D y 2D (DEPT, COSY, HSQC, y HMBC). La multiplicidad de las señales de los espectros de ^1H se describe como: *s* para una simple, *d* para una señal doble, *dd* para una señal doble de doble, *ddd* para una señal doble de doble de doble, *dc* para una señal doble de cuádruple, *t* para una señal triple y *m* para una señal múltiple.

Las columnas cromatográficas fueron empacadas utilizando gel de sílice Merc 60 (malla 230-400).

Para la CCF se utilizaron placas comerciales de gel de sílice de 60 platos F₂₅₄; dichas placas fueron observadas por luz UV y reveladas con vainillina al 10% en etanol con 1% de H_2SO_4 .

Todos los disolventes utilizados fueron de grado reactivo, o destilados antes de ser utilizados. Los reactivos utilizados se adquirieron de Aldrich o Merck y se utilizaron sin ninguna purificación.

Ensayos antiproliferativos

La actividad antiproliferativa in vitro se evaluó utilizando el método de sulforodamina B (SRB), con algunas modificaciones.⁴² Los compuestos puros se disolvieron en DMSO para obtener la concentración deseada. Las células se inocularon en una placa de 96 pocillos en una concentración de 100 μ M cada placa a una densidad de 2500 (A549, HBL-100, HeLa y SW1573), o 5000 (T-47D y WiDr) células por pocillo, en base en su momento de crecimiento. Aunado a estas células también fueron evaluadas, la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y y la línea celular de fibroblastos humanos BJ-hTERT. Las densidades de siembra celular fueron de 5,000 células / pozo para SH-SY5Y y 7,000 células / pozo para BJ-hTERT. Las células de control se expusieron a una concentración equivalente de DMSO (0,25% v / v, control negativo). Cada compuesto se evaluó por triplicado a diferentes concentraciones en un rango de 0.01 a 100 μ M. Los tiempos de incubación del fármaco fueron de 48 h. La densidad óptica de cada pocillo se midió a 530 nm (primario) y 620 nm (secundario). La actividad antiproliferativa, expresada como 50% de inhibición del crecimiento (GI_{50}), se calculó de acuerdo con las fórmulas de NCI.⁴³

Métodos computacionales

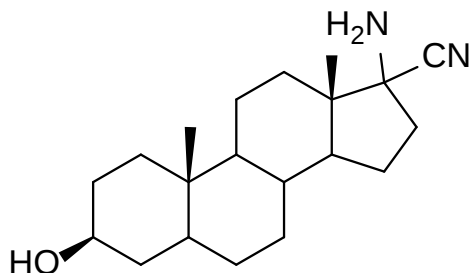
Para determinar qué compuesto es termodinámicamente más estable en la mezcla como se muestra en el **esquema 1** y en la **tabla I.6** [**30a (3)**, **30b (3)**, **35 (1)**, **40a (3)**, **40b (3)**, **38a (1)**, **38b (1)**], la estabilidad energética basada en la energía libre y las preferencias conformacionales se calcularon utilizando la Teoría Funcional de la Densidad, DFT, con el híbrido funcional B3LYP⁶⁹ y el conjunto de bases 6-31+G (d,p)⁷⁰ en fase gaseosa. Así, la energía libre, G, para los siete compuestos con mayor actividad antiproliferativa (GI_{50}) (**ver Tabla I.6**) se obtuvo a partir de estructuras totalmente optimizadas sin restricciones de simetría. Se realizaron cálculos de frecuencias vibratorias (con $\nu_i > 0$) para asegurar estructuras mínimas en la superficie de energía potencial. A partir de los cálculos de frecuencias vibracionales se obtuvieron las poblaciones a partir de valores de energía libre de la serie [**30a (3)** – **30b (3)**, **40a (3)** – **40b (3)**, **38a (1)** – **38b (1)**], para conocer cuál es el compuesto energéticamente más estable y poblado. Los desplazamientos químicos de ¹³C RMN se calcularon utilizando

la comparación de medida del orbital atómico (GIAO) ⁷¹ como la diferencia entre la protección magnética isotrópica del carbono C-17 de cada compuesto con respecto al TMS (tetrametilsilano) utilizado como valor de referencia. Todos los cálculos se realizaron con el programa Gaussian16 ⁷² y los resultados se visualizaron con el software GaussianView 6.0.16. ⁷³

Parte experimental

Formación de espiroheterociclos a partir de diaminos

17-Amino-3 β -hidroxi-5 α -androsta-17-carbonitrilo (**9**)



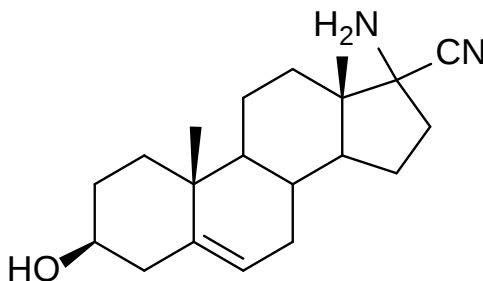
A una solución de *trans*-androsterona (300 mg, 1.03 mmol) en MeOH (10 mL), se adiciono NH₄Cl (386 mg, 7.23 mmol, 7.0 eq.), KCN (470 mg, 7.23 mmol, 7.0 eq.) e NH₄OH (40 gotas); la mezcla se mantuvo en agitación durante 2 días a temperatura ambiente. La reacción fue filtrada y llevada a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica (Hx: AcOEt 9:1→7:3). Obteniendo **9** como un sólido blanco (254 mg, 78%).

IR (cm⁻¹) 3447-3255 (OH, NH), 2924-2858 (C-H alifático), 2233 (C-N nitrilo), 1273 (C-N), 1022 (C-N).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 3.38 (m, 1H, H-3), 2.23 (m, 1H, H-16b), 1.92 (m, 1H, H-NH₂), 1.81 (m, 1H, H-16a), 1.61 (m, 5H, H-2, H-11b, H-12b, H-15b), 1.42 (m, 3H, H-4, H-15a), 1.31 (m, 1H, H-8), 1.21 (m, 7H, H-11a, H-12a, H-9, H-1, H-6), 1.01 (m, 1H, H-5), 0.86 (m, 2H, H-7), 0.75 (d, J = 18.8 Hz, 3H, H-18), 0.71 (d, J = 10.0 Hz, 3H, H-19), 0.57 (m, 1H, H-14) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CDCl₃) δ 122.6 (C-CN), 80.2 (C-17), 70.4 (C-3), 54.2 (C-14), 53.5 (C-14), 51.2 (C-9), 50.5 (C-9), 46.8 (C-13), 44.6 (C-5), 44.5 (C-5), 37.6 (C-4), 37.3 (C-15), 36.7 (C-7), 36.6 (C-6), 35.7 (C-8), 35.6 (C-10), 35.4 (C-10), 35.2 (C-2), 34.8 (C-16), 33.1 (C-16), 31.9 (C-4), 31.2 (C-12), 31.2 (C-12), 30.6 (C-2), 29.4 (C-6), 24.1 (C-11), 22.8 (C-11), 21.5 (C-1), 20.5 (C-1), 16.0 (C-19), 13.4 (C-18) ppm.

17-Amino-3 β -hidroxi-5 α -androst-5-en-17-carbonitrilo (15)



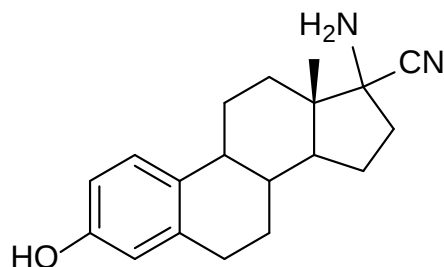
A una solución de *trans*-dehidroandrosterona (300 mg, 1.04 mmol) en MeOH (10 mL), fue adicionado NH₄Cl (389 mg, 7.28 mmol, 7 eq.), KCN (474 mg, 7.28 mmol, 7 eq.), e NH₄OH (40 gotas), la mezcla fue puesta a reflujo durante 6 horas. La reacción fue filtrada y llevada a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica (Hx: AcOEt 95:5→7:3). Obteniendo **15** como un sólido blanco (290 mg, 89%).

IR (cm⁻¹) 3420-3242 (OH, NH), 2933-2890 (C-H alifático), 2225 (C-N nitrilo), 1722 (C-H doble enlace), 1458 (C=C), 1458 (C-N), 1053 (C-N).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 5.34 (m, 1H, H-6), 3.42 (m, 1H, H-3), 2.41 (m, 1H, H-4b), 2.15 (m, 2H, H-8, H-16b), 1.98 (m, 1H, H-9), 1.80 (m, 3H, H-7b, H-16a, H-15b), 1.68 (m, 3H, H-4a, H-11b, H-7a), 1.58 (m, 2H, H-2b, H-15a), 1.48 (m, 2H, H-11a, H-12b), 1.34 (m, 1H, H-1b), 1.24 (m, 2H, H-12a, H-2a), 1.09 (m, 1H, H-1a), 1.02 (s, 3H, H-18), 0.96 (s, 3H, H-19), 0.86 (m, 1H, H-14) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CDCl₃) δ 140.6 (C-5), 123.4 (C-CN), 120.8 (C-6), 70.8 (C-3), 59.8 (C-17), 49.3 (C-9), 47.8 (C-14), 47.7 (C-13), 41.4 (C-4), 37.4 (C-10), 37.0 (C-1), 36.3 (C-8), 32.2 (C-16), 31.6 (C-12), 30.7 (C-7), 29.6 (C-2), 24.2 (C-15), 20.2 (C-11), 19.0 (C-19), 16.5 (C-18) ppm.

17-Amino-3β-hidroxi-[estra-1,3,5(10)-trien-17-carbonitrilo (14)



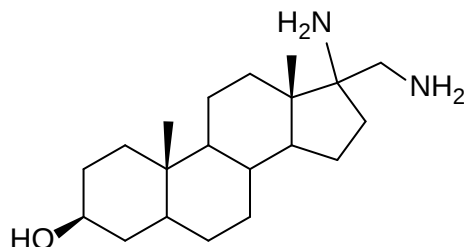
A una solución de estrona (300 mg, 1.10 mmol) en MeOH (10 mL), fue adicionado NH_4Cl (415 mg, 7.76 mmol, 7 eq.), KCN (505 mg, 7.76 mmol, 7 eq.) e NH_4OH (40 gotas) la mezcla fue puesta en agitación a temperatura ambiente durante 2 días. La reacción fue filtrada y llevada a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica (Hx: AcOEt 95:5→7:3). Obteniendo **14** como un sólido blanco (98 mg, 30%).

IR (cm^{-1}) 3747-3299 (OH, NH), 2933-2860 (C-H alifático), 2360-2329 (C-H aromático), 2196 (C-N nitrilo), 1580 (C=C), 1055 (C-N), 784 (=C-H).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.13 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-1), 6.63 (m, 1H, H-2), 6.56 (s, 1H, H-4), 3.61 (m, 1H, H- NH_2), 2.82 (m, 2H, H-6), 2.44 (m, 2H, H-11b, H-16b), 2.17 (m, 1H, H-9), 2.03 (m, 1H, H-16a), 1.89 (m, 2H, H-15b, H-12b), 1.84 (d, $J = 10.4$ Hz, 2H, H-7b, H-14), 1.67 (m, 1H, H-7a), 1.52 (m, 1H, H-11), 1.42 (m, 3H, H-15a, H-12a, H-8), 0.96 (s, 3H, H-18) ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 154.2 (C-3), 137.6 (C-5), 131.0 (C-10), 126.1 (C-1), 121.3 (C-CN), 115.0 (C-4), 112.6 (C-2), 63.2 (C-17), 49.3 (C-13), 47.0 (C-14), 43.1 (C-9), 39.1 (C-8), 37.8 (C-16), 29.5 (C-7), 29.4 (C-6), 27.7 (C-12), 25.7 (C-11), 23.4 (C-15), 16.1 (C-18) ppm.

17-Amino-17-aminometil-5 α -androstan-3 β -ol (20)



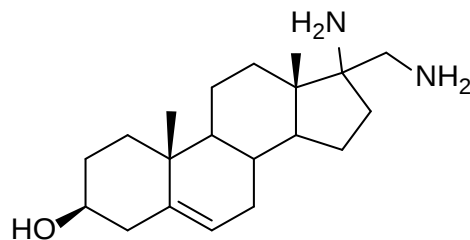
A una solución de aminonitrilo de *trans*-androsterona (254 mg, 0.76 mmol), en THF anhidro (10 mL), fue adicionado LiAlH₄ (72 mg, 1.89 mmol, 2.5 eq.), la mezcla fue puesta en agitación a temperatura ambiente, bajo atmosfera de argón, durante 24 horas, fue filtrada sobre sílica y llevada a sequedad. La purificación se realizó mediante columna cromatográfica (Hx: AcOEt 9:1→7:3) Obteniendo **20** como un sólido blanco (121 mg, 50%).

IR (cm⁻¹) 3947-3442 (OH, NH), 3051-2887 (C-H alifático), 1266 (C-N), 1037 (C-N).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 3.88 (m, 1H, H-NH₂), 3.58 (m, 1H, H-3), 3.35 (m, 1H, H-NH₂), 1.97 (m, 1H, H-16b), 1.80 (m, 3H, H-11b, H-7b, H-5b), 1.69 (m, 3H, H-2b, H-15b, H-4b), 1.53 (m, 3H, H-12, H-16a), 1.40 (m, 2H, H-8, H-11a), 1.28 (m, 6H, H-1, H-4a, H-6, H-15a), 1.09 (m, 1H, H-7a), 1.02 (m, 1H, H-14), 0.91 (m, 2H, H-2a, H-5a), 0.82 (s, 3H, H-18), 0.72 (s, 3H, H-19), 0.64 (m, 1H, H-9) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CDCl₃) δ 81.3 (C-17), 70.6 (C-3), 54.3 (C-9), 50.8 (C-14), 44.7 (C-CH₂-NH₂), 42.7 (C-13), 37.5 (X-2, C-12, C-1), 36.9 (C-5), 36.5 (C-7), 35.4 (X2, C-8, C-10), 31.5 (C-2), 30.8 (C-11), 29.5 (C-16), 28.4 (C-6), 23.1 (C-4), 20.6 (C-15), 12.0 (C-19), 10.9 (C-18) ppm.

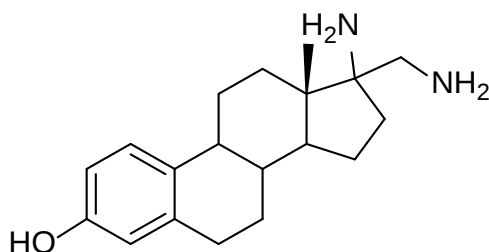
17-Amino-17-aminometilandro-5-en-3 β -ol (21)



A una solución de aminonitrilo de *trans*-dehidroandrosterona (**15**) (0.300 g, 0.9 mmol), en THF anhidro (10 mL), fue adicionado LiAlH₄ (85 mg, 2.25 mmol, 2.5 eq.), la mezcla fue puesta en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, fue filtrada sobre sílica y llevada a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica (Hx: AcOEt 9:1→7:3) Obteniendo **21** como un sólido blanco (115 mg, 40%).

IR (cm⁻¹) 3375-3219 (OH, NH), 2929-2866 (C-H alifático), 1741 (C-H doble enlace), 1449 (C=C), 1375 (C-N), 1056 (C-N) 1025 (C-N).

17-Amino-17-aminometilestra-1,3,5(10)-trien-3-ol (19)



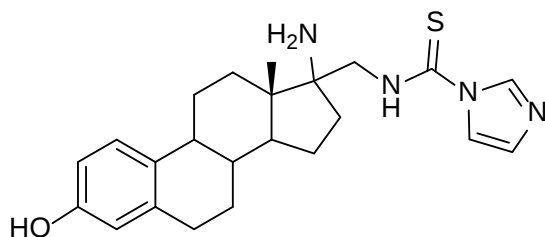
A una solución de aminonitrilo de estrona (0.393 g, 1.25 mmol), en éter etílico (20 mL), fue adicionado LiAlH₄ (0.118 g, 3.12 mmol, 2.5 eq.), la mezcla fue puesta en agitación bajo atmosfera de argón, a temperatura ambiente durante 24 horas, fue filtrada sobre sílica y llevada a sequedad. La purificación se realizó mediante columna cromatográfica (Hx: AcOEt 9:1→7:3) Obteniendo **19** como un sólido blanco (375 mg, 60%).

IR (cm⁻¹) 3250(OH, NH), 2925-2861 (C-H alifático), 2086-2046 (C-H aromático), 1717 (C=C), 1579 (C=C), 1055 (C-N), 816 (=C-H).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 6.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-1), 6.44 (dd, *J* = 8.4, 2.7 Hz, 1H, H-4), 6.37 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-2), 3.54 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-9), 3.20 (m, 1H, H-CH-NH₂), 2.66 (m, 2H, H-6), 2.16 (m, 1H, H-CH-NH₂), 2.00 (m, 1H, H-14), 1.92 (m, 1H, H-8), 1.83 (m, 1H, H-7b), 1.74 (m, 1H, H-7a), 1.57 (m, 1H, H-11b), 1.39 (m, 1H, H-15b), 1.31 (m, 1H, H-16b), 1.26 (dt, *J* = 8.4, 4.6 Hz, 1H, H-11a), 1.20 (m, 1H, H-12b), 1.14 (m, 2H, H-15a, H-16a), 1.04 (m, 1H, H-12a), 0.65 (s, 3H, H-CH₃) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CD₃OD) δ 153.8 (C-3), 136.8 (C-5), 130.6 (C-10), 125.2 (C-1), 114.1 (C-4), 111.7 (C-2), 80.5 (C-17), 52.7 (C-C-NH₂), 49.2 (C-14), 48.0 (C-13), 43.3 (C-9), 42.3 (C-8), 38.4 (C-12), 36.0 (C-16), 28.7 (C-6), 26.5 (C-7), 25.6 (C-11), 22.0 (C-15), 9.8 (C-18) ppm.

17-[(3'-Imidazoltioureido)metil]-17-aminoestra-1,3,5(10)-trien-3-ol (22)



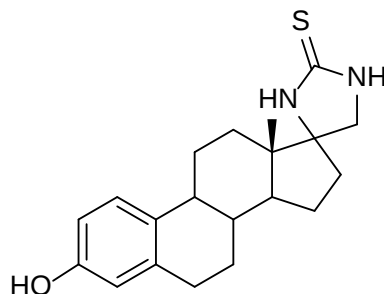
A una solución de diamino de estrona (100 mg, 0.327 mmol), en DMF (7.5 mL), se le adiciono tiocarbonildiimidazol (87 mg, 0.47 mmol, 1.5 eq.) y carbonato de cesio (213 mg, 0.6557 mmol, 2 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a 85 °C durante 66 horas, transcurrido este tiempo la reacción fue detenida y lavada con salmuera y extraída con acetato de etilo (3 x 50 mL), la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica (Hx: AcOEt 9:1→7:3), reacción cuantitativa (134 mg).

IR (cm⁻¹) 3466-3199 (OH, NH), 2918-2733 (C-H alifático), 2104-1890 (C-H aromático), 1592 (C=C), 1462-1438 (N-C=), 1025 (C-N).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (s, 1H, H-2'), 7.35 (m, 1H, H-5'), 7.14 (s, 1H, H-4'), 6.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-1), 6.65 (s, 2H, H-4, H-2), 2.83 (m, 2H, H-CH₂-NH₂), 2.50 (m, 1H, H-9), 2.38 (m, 1H, H-6b), 2.23 (m, 1H, H-6a), 2.12 (m, 1H, H-14), 2.04 (m, 1H, H-8), 1.96 (m, 2H, H-11b, H-NH), 1.61 (m, 2H, H-15b, H-7b), 1.50 (m, 4H, H-15a, H-12b, H-16b, H-11a), 1.40 (m, 1H, H-16a), 1.21 (m, 2H, H-12a, H-7a), 0.91 (s, 3H, H-18) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CDCl₃) δ 162.6 (C-C=S), 155.3 (C-3), 137.6 (C-2'), 135.1 (C-5), 130.5 (C-10), 126.2 (C-4'), 121.7 (C-1), 115.5 (C-4), 113.2 (C-2, C-5'), 65.6 (C-17), 53.5 (C-CH₂-NH₂), 50.4 (C-14), 48.0 (C-13), 43.9 (C-9), 38.4 (C-8), 35.9 (C-12), 31.6 (C-16), 29.5 (C-6), 26.6 (C-7), 25.9 (C-11), 21.5 (C-15), 13.8 (C-18) ppm.

Espiro[3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17,5'-imidazolidina]-2'-tionea (23)



A una solución del imidazoltioureido **22** (134 mg, 0.32 mmol), en DMF (8 mL), se le adiciono carbonato de cesio (213 mg, 0.6557 mmol, 2 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a 125 °C durante 25 horas, transcurrido este tiempo la reacción fue detenida y lavada con salmuera y extraída con acetato de etilo (3 x 50 mL), la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad. El compuesto fue purificado mediante columna cromatográfica (Hx: AcOEt 98:2→7:3), obteniendo **23**, como un aceite amarillento (20%, 22 mg).

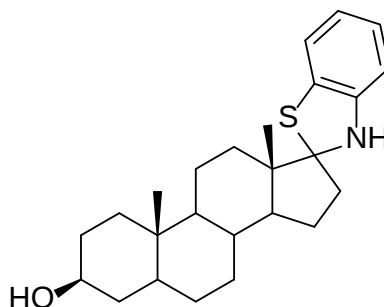
IR (cm⁻¹) 3459-3207 (OH, NH), 2978-2853 (C-H alifático), 2491-2376 (C=S), 2082 (C-H aromático), 1671 (C=C), 1443 (C=C), 1024 (C-N), 837 (=C-H).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (m, 2H, H-1, H-4), 6.90 (m, 1H, H-2), 4.21 (m, 1H, H-CH₂-NH), 3.66 (m, 1H, H-9), 3.52 (m, 1H, H-CH₂-NH), 3.34(m, 1H, H-6a), 3.05 (m, 1H, H-6b), 2.86 (m, 1H, H-14), 2.40 (m, 2H, H-8, H-11b), 2.12 (m, 1H, H-7a), 1.90 (m, 2H, H-15b, H-11a), 1.68 (m, 6H, H-16, H-12, H-15a, H-7b), 1.56 (s, 3H, H-18) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CDCl₃) δ 167.8 (C=S), 139.6 (C-3), 132.5 (C-5), 130.9 (C-10), 130.2 (C-1), 129.1 (C-4), 128.3 (C-2), 68.12 (C-17), 56.6 (CH₂-NH), 38.8 (C-14), 36.4 (C-13), 34.5 (C-9), 32.8 (C-8), 30.4 (C-12), 29.0 (C-16), 28.0 (C-6), 27.5 (C-7), 23.1 (C-11), 19.8 (C-15), 14.1 (C-18) ppm.

Formación de derivados benzofusionados

(17*R/S*)- 3β-Hidroxi-espiro[5α-androstan-17, 2'-benzotiazolina] (26)



Método 1:

A una solución de *trans*-androsterona (250 mg, 0.86 mmol) en DCM anhidro (20 mL) fue adicionada una cantidad catalítica de APTS (35 mg, 0.18 mmol, 0.21 eq.). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente fue adicionado el aminotiofenol (323 mg, 2.58 mmol, 3 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a reflujo por 36 h. Después la mezcla fue diluida en DCM, y lavada con NaHCO₃, (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrado y concentrado a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica (hexano: AcOEt: trietilamina 95:5:0.5)

obteniendo **34** como un aceite azul, como mezcla de epímeros no resuelta en proporción 62:48 (229 mg, 67%).

Método 2:

A una solución de *trans*-androsterona (300 mg, 1.03 mmol) en acetonitrilo (25 mL), se le agregó líquido iónico **33** (135 mg, 0.43 mmol, 0.41 eq.), y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregó aminotiofenol (360 mg, 0.300 mmol, 2.88 mmol, 2.8 eq.) y reflujo durante 9 horas, la reacción se detuvo agregando hielo y se mantuvo en agitación 30 minutos, luego se neutralizó con K₂CO₃ y se extrajo con AcOEt, (3x50 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se secó. El compuesto fue purificado mediante cromatografía en columna (hexano: AcOEt 9:1→85:15). Para dar el compuesto **28** como un aceite verde (33 mg, 8%) y los compuestos **34** como un aceite azul (372 mg, 91%). Mezcla epimérica (38:62).

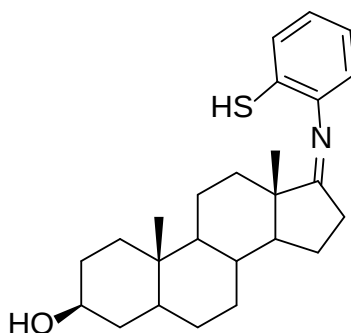
IR (cm⁻¹) 3316 (OH, NH), 2922-2855 (C-H alifático), 2123 (C-H aromático), 1582 (C=C), 1471 (C-N), 1035 (C-N), 732 (C-S).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 6.99 (dd, 2H, $J_{3'-4'} = J_{3'-2'} = 7.8$ Hz, H-5'), 6.86 (d, 2H, $J_{2'-3'} = 7.3$ Hz, H-4'), 6.67 (dd, 2H, $J_{3'-4'} = J_{4'-5'} = 7.3$ Hz, H-6'), 6.57 (d, 1H, $J_{5'-4'} = 3.3$ Hz, H-7'), 6.55 (d, 1H, $J_{5'-4'} = 3.4$ Hz, H-7'), 3.58 (m, 2H, H-3), 2.52 (m, 1H, H-16a), 2.34 (m, 1H, H-16a), 2.18 (m, 2H, H-16b), 1.79 (m, 4H, H-12a, H-4b), 1.70 (m, 4H, H-1a, H-2a), 1.58 (m, 4H, H-2b, H-11a), 1.45 (m, 2H, H-12b), 1.38 (m, 4H, H-4a, H-8), 1.33-1.20 (m, 6H, H-2a, H-2b, H-6a, H-6b, H-11b, H-14, H-15b), 1.12 (m, 2H, H-5), 0.97 (m, 4H, H-1a, H-7a), 0.87 (s, 2H, H-18), 0.85 (m, 1H, H-7b), 0.83 (s, 3H, H-18), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.80 (s, 2H, H-19), 0.67 (m, 2H, H-9) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CDCl₃) δ 146.5 (C-3a'), 146.3 (C-3a'), 127.2 (C-7a'), 126.2 (C-7a'), 124.8 (C-4'), 124.7 (C-4'), 121.3 (C-5'), 121.1 (C-5'), 119.9 (C-6'), 119.6 (C-6'), 109.6 (C-7'), 108.9 (C-7'), 91.5 (C-17), 88.5 (C-17), 71.3 (C-3), 71.2 (C-3), 54.1 (C-9), 53.9 (C-9), 50.4 (C-14), 50.1 (C-14), 49.3 (C-13), 48.4 (C-13), 44.9 (C-5), 44.8 (C-5), 41.4 (C-12), 41.1 (C-12), 38.1 (C-2), 37.0 (C-2), 37.0 (C-1), 36.6 (C-1), 36.4 (C-8), 35.6 (C-8), 35.5 (C-10),

32.9 (C-10), 32.0 (C-7), 31.5 (C-7), 31.5 (C-4), 31.5 (C-4), 30.8 (C-6), 28.6 (C-6), 28.5 (C-15), 23.4 (C-15), 22.5 (C-15), 20.9 (C-11), 20.6 (C-11), 16.6 (C-18), 14.6 (C-18), 12.4 (C-19), 12.4 (C-19) ppm.

17-[2'-Mercaptofenilimino]-5 α -androstan-3 β -ol (29)



Método 1:

A una solución de *trans*-androsterona (300 mg, 1.03 mmol) en tolueno anhidro (7 mL) fue adicionada una cantidad catalítica de PPTS (60 mg, 0.23 mmol, 0.22 eq.). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente fue adicionado el aminotiofenol (387 mg, 3.09 mmol, 3 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a reflujo por 10 h. Después la mezcla fue diluida en DCM, y lavada con NaHCO₃, (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrado y concentrado a sequedad. El crudo de reacción fue purificado mediante columna cromatográfica (hexano: AcOEt: trietilamina 95:5:0.5) obteniendo el benzofusionado **34** como un aceite azul (86 mg, 21%) y la imina **28** como un aceite verde, (226.5 mg, 55%).

Método 2:

A una solución de *trans*-androsterona (250 mg, 0.86 mmol) en tolueno anhidro (6 mL) fue adicionada una cantidad catalítica de APTS (35 mg, 0.18 mmol, 0.21 eq.). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente fue adicionado el aminotiofenol (74 mg, 0.69 mmol, 2 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a reflujo por 7 h. Después la mezcla fue diluida en DCM, y lavada con NaHCO₃, (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrado y concentrado a sequedad. El compuesto fue purificado mediante columna cromatográfica (hexano: AcOEt: trietilamina 95: 5: 0.5)

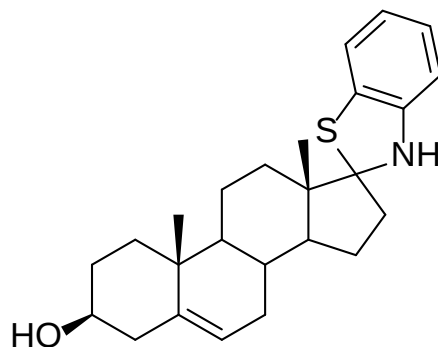
obteniendo **28** como un aceite verde, como una mezcla de isómeros geométricos en proporción 52:48 (79 mg, 23%).

IR (cm⁻¹) 3449 (OH, NH), 2925-2855 (C-H alifático), 2113 (C-H aromático), 1734 (C=C), 1455 (C-N), 1037 (C-N), 758 (=C-H), 729 (C-S).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (m, 1H, H-5'), 7.88-7.68 (m, 2H, H-2', H-5'), 7.49-7.19 (m, 4H, H-2', H-3', H-3', H-4'), 6.66 (m, 1H, H-4'), 4.51 (s, 2H, OH), 3.58 (m, 1H, H-3), 3.37 (m, 1H, H-16a), 3.05 (m, 1H, H-16b), 2.82 (m, 1H, H-14), 2.39 (m, 1H, H-4a), 2.07 (m, 1H, H-4b), 1.88 (m, 2H, H-7), 1.81-1.62 (m, 3H, H-1a, H-6a, H-6b), 1.57 (s, 3H, H-18), 1.47-1.32 (m, 3H, H-1b, H-12a, H-12b), 1.33-1.15 (m, 6H, H-15a, H-15b, H-11a, H-2a, H-5), 1.14-0.99 (m, 2H, H-11b, H-2b), 0.92 (m, 2H, H-8, H-9), 0.81 (s, 3H, H-19) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CDCl₃) δ 181.9 (C-17), 174.5 (C-17), 153.0 (C-1'), 152.5 (C-1'), 135.3 (C-6'), 134.5 (C-6'), 125.9 (C-3'), 125.7 (C-3'), 124.7 (C-4'), 124.5 (C-4'), 122.8 (C-5'), 122.3 (C-5'), 121.5 (C-2'), 121.3 (C-2'), 70.8 (C-3), 58.2 (C-14), 53.1 (C-9), 52.5 (C-13), 46.7 (C-5), 44.3 (C-4), 44.1 (C-1), 41.9 (C-2), 39.5 (C-16), 36.9 (C-10), 35.6 (C-8, C-12 (X2)), 31.9 (C-7), 31.2 (C-6), 28.5 (C-15), 20.9 (C-11), 18.6 (C-19), 12.3 (C-18) ppm.

(17*R/S*)- 3β-Hidroxi-espiro[androst-5-en-17, 2'-benzotiazolina] (27)



A una solución de *trans*-dehidroandrosterona (250 mg, 0.87 mmol) en tolueno anhidro (15 mL) fue adicionada una cantidad catalítica de APTS (35 mg, 0.18 mmol, 0.21 eq.). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente fue adicionado el

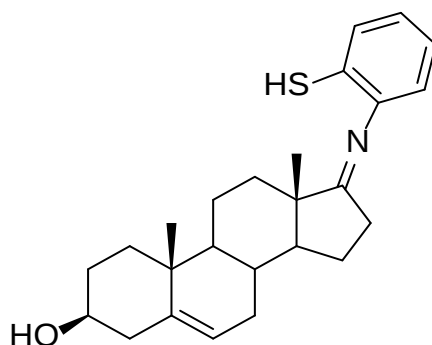
aminotiofenol (325 mg, 2.60 mmol, 3.0 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a reflujo por 10 h. Después la mezcla fue diluida en DCM, y lavada con NaHCO_3 (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada con Na_2SO_4 anhidro, filtrado y concentrado a sequedad. El crudo de reacción se purificó mediante columna cromatográfica (hexano: AcOEt: trietilamina 95:5:0.5) obteniendo **27** como un aceite marrón, (46 mg, 13%). Mezcla epimérica (61:39).

IR (cm^{-1}) 3327 (OH, NH), 3000-2800 (C-H alifático), 2291 (C-H aromático, C-H doble enlace), 1735 (C-H doble enlace), 1579 (C=C), 1457 (C-N), 1048 (C-N), 738 (C-S).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.02 (dd, 1H, $J_{2'-3'} = 7.6$ Hz, $J_{2'-4'} = 1.0$ Hz, H-4'), 6.99 (dd, 1H, $J_{2'-3'} = 7.6$ Hz, $J_{2'-4'} = 1.0$ Hz, H-4'), 6.87 (dd, 2H, $J_{4'-5'} = 4'-3' = 7.7$ Hz, $J_{4'-2'} = 1.9$ Hz, H-6'), 6.68 (dd, 2H, $J_{3'-4'} = 9.4$ Hz, $J_{3'-2'} = 7.5$ Hz, $J_{3'-5'} = 1.1$ Hz, H-5'), 6.58 (dd, 1H, $J_{5'-4'} = 3.5$ Hz, $J_{5'-3'} = 0.8$ Hz, H-7'), 6.57 (dd, 1H, $J_{5'-4'} = 3.6$ Hz, $J_{5'-3'} = 0.8$ Hz, H-7'), 5.36 (dd, 2H, $J_{6-7} = 5.3$ Hz, $J_{\text{Gem}} = 3.5$ Hz, H-6), 3.53 (m, 2H, H-3), 2.48 (m, 2H, H-16a), 2.32 (m, 2H, H-2a), 2.24 (m, 2H, H-2b), 2.19 (m, 2H, H-16b), 2.0 (m, 2H, H-7b), 1.90-1.80 (m, 5H, H-4a, H-1a, H-12a), 1.77 (m, 2H, H-15b), 1.66-1.55 (m, 6H, H-7b, H-11a, H-11b), 1.55-1.45 (m, 7H, H-12a, H-12b, H-14, H-4b), 1.40 (m, 2H, H-11), 1.34-1.24 (m, 4H, H-9, H-15a), 1.08 (m, 2H, H-1b), 1.02 (s, 3H, H-19), 1.01 (s, 2H, H-19), 0.97 (m, 1H, H-8), 0.91 (s, 2H, H-18), 0.86 (s, 3H, H-18) ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 146.5 (C-3a'), 146.3 (C-3a'), 141.0 (C-7a'), 140.8 (C-7a'), 127.4 (C-5), 126.2 (C-5), 124.9 (C-6'), 124.7 (C-6'), 121.4 (C-4'), 121.3 (C-4'), 121.2 (C-6), 121.1 (C-6), 120.1 (C-5'), 119.6 (C-5'), 109.7 (C-7'), 108.9 (C-7'), 91.5 (C-17), 88.5 (C-17), 71.7 (C-3), 71.7 (C-3), 50.7 (C-9), 50.3 (C-9), 49.9 (C-8), 49.7 (C-8), 49.1 (C-13), 48.1 (C-13), 42.2 (C-2), 41.3 (C-16), 41.1 (C-16), 37.2 (C-1), 37.2 (C-1), 36.6 (C-10), 36.5 (C-10), 33.0 (C-14), 32.8 (C-14), 32.8 (C-7), 31.8 (C-7), 31.6 (C-4), 31.6 (C-4), 31.4 (C-12), 30.6 (C-12), 23.5 (C-15), 22.7 (C-15), 20.8 (C-11), 20.5 (C-11), 19.5 (C-19), 19.5 (C-19), 16.4 (C-18), 14.4 (C-18) ppm.

17-[2'-Mercaptofenilimino]-androst-5-en-3 β -ol (30)



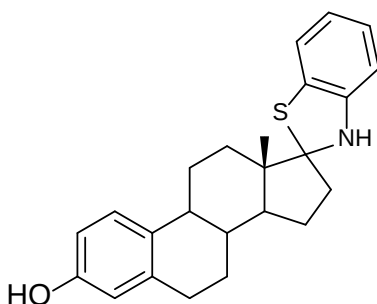
A una solución de *trans*-dehidroandrosterona (300 mg, 1.04 mmol) en tolueno anhidro (7 mL) fue adicionada una cantidad catalítica de PPTS (60 mg, 0.24 mmol, 0.23 eq.). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente fue adicionado el aminotiofenol (390 mg, 3.12 mmol, 3 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a reflujo por 16 h. Después la mezcla fue diluida en DCM, y lavada con NaHCO₃, (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrado y concentrado a sequedad. El crudo de reacción se purificó mediante columna cromatográfica (hexano: AcOEt: trietilamina 95:5:0.5) obteniendo **30** como un aceite marrón, (73 mg, 18 mg), mezcla de iminas (52:48); y **27** como un aceite marrón (324 mg, 79%).

IR (cm⁻¹) 3327 (OH, NH), 3000-2800 (C-H alifático), 2291 (C-H aromático, C-H doble enlace), 1735 (C-H doble enlace), 1579 (C=C), 1457 (C-N), 1048 (C-N), 738 (C-S).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (d, $J_{3'-4'} = 8.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.83 (d, $J_{6'-5'} = 8.0$ Hz, 1H, H-6'), 7.80 (d, $J_{3'-4'} = 8.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.73 (d, $J_{6'-5'} = 7.9$ Hz, 1H, H-6'), 7.40 (dd, $J_{5'-6'} = J_{5'-4'} = 7.6$ Hz, 1H, H-5'), 7.35 (dd, $J_{5'-6'} = J_{5'-4'} = 7.6$ Hz, 1H, H-5'), 7.30 (dd, $J_{4'-5'} = J_{4'-3'} = 7.6$ Hz, 1H, H-4'), 7.26 (dd, $J_{4'-5'} = 9.1$, $J_{4'-3'} = 6.1$ Hz, 1H, H-4'), 5.19 (t, $J_{6-7a} = J_{6-7b} = 4.9$ Hz, 1H, H-6), 3.51 (m, 1H, H-3), 3.10 (m, 2H, H-16), 2.79 (dt, $J_{14-15} = 10.1$ Hz, $J_{14-8} = 6.8$ Hz, 1H, H-14), 2.29-2.14 (m, 3H, H-4, H-7a), 2.10-1.99 (m, 2H, H-7b, H-1a), 1.95 (m, 1H, H-1b), 1.92-1.79 (m, 4H, H-12, H-15), 1.79-1.61 (m, 2H, H-11a, H-2a), 1.61 (s, 3H, H-18), 1.58-1.46 (m, 2H, H-11b, H-2b), 1.32 (td, $J_{9-11} = 11.9$ Hz, $J_{9-8} = 4.3$ Hz, 1H, H-9), 1.11 (dt, $J_{8-14} = 13.9$ Hz, $J_{8-7} = 3.6$ Hz, 1H, H-8), 1.06 (s, 3H, H-19) ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 181.7 (C-17), 173.8 (C-17), 153.1 (C-1'), 152.7 (C-1'), 139.8 (C-5), 135.6 (C-2'), 134.7 (C-2'), 125.9 (C-5'), 125.7 (C-5'), 124.7 (C-4'), 124.5 (C-4'), 122.8 (C-3'), 122.4 (C-3'), 121.6 (C-6'), 121.4 (C-6'), 121.4 (C-6), 71.6 (C-3), 52.7 (C-14), 49.2 (C-9), 46.4 (C-13), 42.0 (C-4), 41.5 (C-1), 37.7 (C-16), 37.2 (C-8, C-12 (X2)), 36.8 (C-10), 36.1 (C-15), 32.2 (C-7), 31.6 (C-2), 20.7 (C-11), 19.5 (C-19), 18.5 (C-18) ppm.

(17R/S)- 3-Hidroxi-espiro[estra-1,3,5(10)-trien-17, 2'-benzotiazolina] (34)



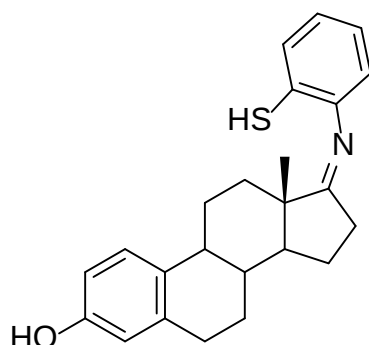
A una solución de estrona (300 mg, 1.1 mmol) en acetonitrilo (10 mL), se añadió líquido iónico, bisulfato de 1-metil-3-(4'-sulfobutil)-imidazolio (135 mg, 0.43 mmol, 0.38 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se añadió aminotiofenol (360 mg, 0.300 mL, 2.87 mmol, 2.6 eq.) y se mantuvo a reflujo durante 10 horas, la reacción se detuvo agregando hielo y se mantuvo en agitación durante 30 minutos, después se neutralizó con K_2CO_3 y se extrajo con AcOEt, (3 x 50 mL), la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. El crudo de reacción fue purificado mediante cromatografía en columna (Hexano: AcOEt 9: 1→85:15); se obtuvo la mezcla de iminas **28** (44:56), como un aceite amarillo (303 mg, 73%), y la mezcla de **34** como un aceite marrón (33 mg, 8%), mezcla epimérica (64:36).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (m, 1H, H-4'), 7.48 (m, 1H, H-1), 7.30 (m, 1H, H-6'), 7.11 (m, 2H, H-4, H-5'), 6.59 (m, 2H, H-7', H-2), 3.07 (m, 1H, H-9), 2.83 (m, 1H, H-6b), 2.57 (m, 1H, H-6a), 2.40 (m, 1H, H-16b), 2.11 (m, 2H, H-8, H-14), 1.82 (m, 1H, H-16a),

1.59 (m, 2H, H-11), 1.40 (s, 3H, H-18), 1.30 (m, 2H, H-15), 1.23 (m, 1H, H-7b), 1.09 (m, 1H, H-7a), 0.89 (m, 2H, H-12) ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 135.2 (C-ipso), 125.0 (CH-Ar), 71.3 (C-17), 71.2 (C-17), 54.4 (C-14), 51.4 (C-14), 47.8 (C-13), 45.8 (C-13), 45.7 (C-9), 44.8 (C-9), 38.0 (C-16), 36.9 (C-16), 35.9 (C-8), 35.6 (C-8), 35.0 (C-12), 34.1 (C-12), 31.6 (C-6), 31.4 (C-6), 30.9 (C-7), 28.4 (C-7), 24.9 (C-11), 21.8 (C-11), 21.1 (C-15), 20.5 (C-15), 13.8 (C-18), 12.3 (C-18) ppm.

17-[2'-Mercaptofenilimino]-estra-1,3,5(10)-triene-3 β -ol (28)



A una solución de estrona (100 mg, 0.37 mmol) en tolueno anhidro (10 mL) fue adicionada una cantidad catalítica de APTS (15 mg, 0.08 mmol, 0.21 eq.). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente fue adicionado el aminotiofenol (138 mg, 1.10 mmol, 3 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a reflujo por 14 h. Después la mezcla fue diluida en DCM, y lavada con NaHCO_3 , (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada con Na_2SO_4 anhidro, filtrado y concentrada a sequedad. El compuesto fue purificado en columna cromatográfica (hexano: AcOEt: trietilamina 95:5:0.5) obteniendo **28** como un aceite marrón, (109 mg, 78%). Mezcla de iminas (49:51).

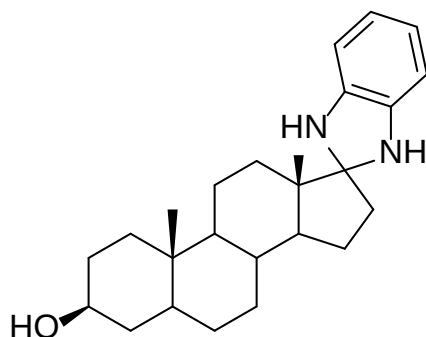
IR (cm^{-1}) 3492 (OH, NH), 3069-2858 (C-H alifático), 2118 (C-H aromático), 1498 (C=C), 992 (C-N), 758 (=C-H), 758 (C-S), 729 (C-S).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.01 (d, $J_{6'-5'} = 8.1$ Hz, 1H, H-6'), 7.86 (m, 2H, H-6', H-3'), 7.79 (d, $J_{3'-4'} = 7.9$ Hz, 1H, H-3'), 7.45 (dd, $J_{5'-6'} = J_{5'-4'} = 7.7$ Hz, 1H, H-5'), 7.40 (dd, $J_{5'-6'} =$

$J_{5'-4'} = 7.7$ Hz, 1H, H-5'), 7.34 (dd, $J_{4'-5'} = J_{4'-3'} = 8.3$ Hz, 1H, H-4'), 7.30 (ddd, $J_{4'-5'} = J_{4'-3'} = 11.5$ Hz, $J_{4'-6'} = 3.7$ Hz, 1H, H-4'), 7.15 (d, $J_{1-2} = 8.3$ Hz, 1H, H-1), 6.66 (m, 1H, H-2), 6.53 (m, 1H, H-4), 3.15 (m, 2H, H-16), 2.96 (t, $J_{14-15} = 9.3$ Hz, 1H, H-14), 2.79 (m, 1H, H-6a), 2.71-2.54 (m, 2H, H-9, H-6b), 2.44 (d, $J_{11a-11b} = 13.0$ Hz, 1H, H-11a), 2.27 (t, $J_{12ax-11ax} = 12.9$ Hz, 1H, H-12a), 2.08 (m, 1H, H-12b), 1.99 (m, 1H, H-7a), 1.75 (q, $J_{8-7} = J_{8-14} = 11.1$ Hz, 1H, H-8), 1.63 (s, 3H, H-18), 1.61-1.05 (m, 3H, H-7b, H-15b, H-11b) ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 182.0 (C-17), 174.8 (C-17), 154.5 (C-1'), 152.9 (C-1'), 152.3 (C-3), 137.7 (C-5), 135.1 (C-2'), 134.5 (C-2'), 130.6 (C-10), 126.5 (C-1), 126.0 (C-5'), 125.8 (C-5'), 124.8 (C-4'), 124.6 (C-4'), 122.6 (C-6'), 122.1 (C-6'), 121.6 (C-3'), 121.4 (C-3'), 115.0 (C-4), 113.0 (C-2), 51.4 (C-14), 46.7 (C-13), 43.0 (C-8), 42.7 (C-9), 41.8 (C-12), 36.9 (C-16), 30.0 (C-6), 27.3 (C-7, C-15 (X2)), 26.7 (C-11), 18.5 (C-18) ppm.

(17*R/S*)- 3 β -Hidroxi-espiro[5 α -androstan-17, 2'-benzimidazolina] (36)



A una solución de *trans*-androsterona (100 mg, 0.34 mmol) en MeOH (2.5 mL) fue adicionada una cantidad catalítica de APTS (15 mg, 0.08 mmol, 0.22 eq.). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 20 minutos, posteriormente se adiciono fenilendiamino (74 mg, 0.69 mmol, 2 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a 50 °C durante 10 h. Después la reacción fue detenida mediante eliminación del disolvente concentrando a sequedad, la mezcla fue diluida en DCM, y lavada con NaHCO_3 , (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 anhidro, filtrada y concentrada a sequedad. El crudo fue purificado

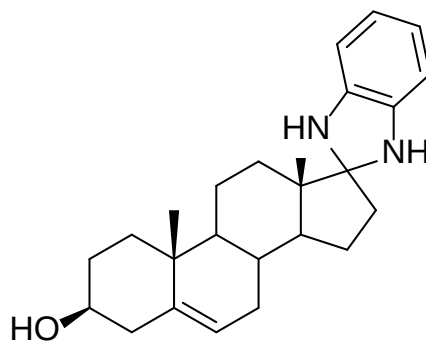
mediante columna cromatográfica (DCM: acetona: trietilamina 95:5:0.5) obteniendo **36** como un aceite amarillo, (103 mg, 79%).

IR (cm⁻¹) 3307 (OH, NH), 2930-2830 (C-H alifático), 2109 (C-H aromático, C-H doble enlace), 1616 (C-H doble enlace), 1447 (C=C), 1273 (C-N), 1022 (C-N), 742 (=C-H).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7.59-7.37 (m, 2H, H-5',H-7'), 7.27-7.08 (m, 2H, H-4'-H-6'), 3.52 (m, 1H, H-3), 3.04 (dd, J_{14-8} = 16.6 Hz, J_{14-15} = 3.4 Hz, 2H, H-14), 2.67 (m, 2H- H-15), 2.10 (m, 2H, H-12), 1.93 (m, 2H, H-4), 1.74 (m, 2H, H-7), 1.61-1.47 (m, 4H, H-1, H-11), 1.40 (m, 2H, H-6), 1.36-1.16 (m, 4H, H-2, H-5), 1.09 (m, 2H, H-16), 0.96 (m, 1H, H-8), 0.85 (s, 3H, H-19), 0.81 (s, 3H, H-18), 0.66 (m, 1H, H-9) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CD₃OD) δ 156.8 (C-7a'), 155.3 (C-3a'), 121.7 (C-4', C-7' (X2)), 113.8 (C-5', C-6' (X2)), 71.1 (C-17), 70.4 (C-17), 70.1 (C-3), 53.4 (C-9), 44.3 (C-13), 38.6 (C-11), 37.5 (C-2), 37.3 (C-1), 36.9 (C-8), 36.6 (C-5), 35.4 (C-10), 32.0 (C-12), 30.5 (C-6), 28.5 (C-15), 28.4 (C-14), 28.2 (C-16), 24.6 (C-4), 11.4 (C-18), 10.8 (C-19) ppm.

(17R/S)-Espiro[3 β -hidroxi-androst-5-ene-17, 2'-benzimidazolina] (37)



A una solución de *trans*-dehidroandrosterona (250 mg, 0.87 mmol) en metanol anhidro (15 mL) fue adicionada una cantidad catalítica de APTS (38 mg, 0.2 mmol, 0.23 eq.). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 20 minutos, posteriormente fue adicionado el fenilendiamino (187 mg, 1.73 mmol, 2 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a 50 °C por 15 h. Después la mezcla fue diluida en DCM, y lavada con NaHCO₃, (3 x 20 mL), la fase

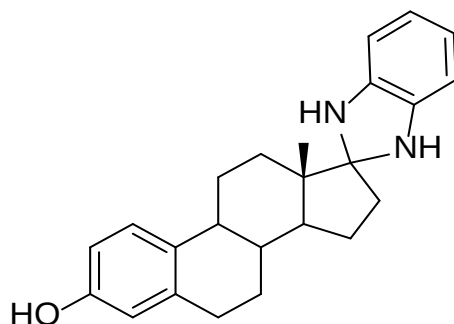
orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrado y concentrado a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por Columna cromatográfica (DCM: metanol: trietilamina 90:10:0.5) obteniendo **37** como un aceite naranja, (65 mg, 20%).

IR (cm⁻¹) 3380 (OH, NH), 2935-2852 (C-H alifático), 2112.59 (C-H aromático, C-H doble enlace), 1609 (C-H doble enlace), 1452 (C=C), 1271 (C-N), 742 (=C-H).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7.81 (m, 2H, H-3', H-4'), 7.61-7.38 (m, 4H, H-4', H-5', H-6', H-7'), 7.20 (m, 2H, H-4', H-7'), 5.25 (m, 1H, H-6), 3.39 (m, 1H, H-3), 2.92 (m, 2H, H-4), 2.28-2.03 (m, 4H, H-7, H-16), 2.02-1.82 (m, 3H, H-11a, H-2a, H-2b), 1.83-1.64 (m, 2H, H-1a, H-15b), 1.63-1.50 (m, 3H, H-12a, H-8, H-15b), 1.47 (s, 3H, H-19), 1.20 (m, 1H, H-14), 1.12-0.95 (m, 2H, H-1b, H-11a), 0.86 (s, 3H, H-18), 0.80 (m, 1H, H-9) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CD₃OD) δ 155.5 (C-5), 140.5 (C-3a', C-7a' (X2)), 138.9 (C-3a', C-7a' (X2)), 126.5 (C-5', C-6' (X2)), 126.0 (C-5', C-6' (X2)), 121.9 (C-4', C-7' (X2)), 120.7 (C-6), 114.0 (C-4', C-7' (X2)), 82.0 (C-17), 70.9 (C-3), 51.3 (C-9), 44.4 (C-13), 41.3 (C-16), 38.4 (C-10), 36.7 (C-11), 35.0 (C-8), 33.4 (C-1), 32.1 (C-7), 30.6 (C-15), 29.3 (C-14) 28.7 (C-4), 27.5 (C-19), 25.7 (C-2), 21.9 (C-12), 17.4 (C-18) ppm.

(17R/S)- Espiro[3-hidroxiestra-1,3,5(10)-triene-17, 2'-benzimidazolina] (35)



A una solución de estrona (100 mg, 0.37 mmol) en tolueno anhidro (5 mL) fue adicionada una cantidad catalítica de APTS (15 mg, 0.08 mmol, 0.21 eq.). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 20 minutos, posteriormente fue adicionado el fenilendiamino (74 mg, 0.69 mmol, 2.0 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a 85 °C por 10 h. Después

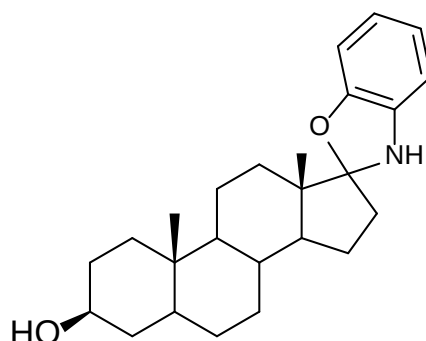
la mezcla fue diluida en DCM, y lavada con NaHCO₃, (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrado y concentrado a sequedad. El crudo de reacción fue purificado mediante columna cromatográfica (DCM: acetona: trietilamina 85:15:0.5) obteniendo **35** como un aceite naranja, (90 mg, 34%).

IR (cm⁻¹) 3259 (OH, NH), 2975-2867 (C-H alifático), 2011 (C-H aromático), 1609 (C-H doble enlace), 1453 (C=C), 1273 (C-N), 747 (=C-H).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7.56-7.46 (m, 2H, H-4', H-7'), 7.27-7.16 (m, 2H, H-5', H-6'), 7.09 (d, *J*₁₋₂ = 8.4 Hz, 1H, H-1), 6.55 (dd, *J*_{H-H} = 8.5, *J*_{H-H} = 2.7 Hz, 1H, H-2), 6.48 (d, *J*₄₋₂ = 2.6 Hz, 1H, H-4), 2.95 (m, 1H, H-16a), 2.76 (dd, *J*_{6ax-7ax} = 8.3, *J*_{6ax-7eq} = 4.3 Hz, 2H, H-6), 2.40-2.14 (m, 4H, H-12a, H-7a, H-11a, H-15a), 1.80 (m, 1H, H-16b), 1.62 (m, 1H, H-11b), 1.48-1.31 (m, 4H, H-12b, H-14, H-12b, H-15b), 1.29-1.17 (m, 2H, H-8, H-7b), 0.98 (d, *J*₁₈₋₁₈ = 7.2 Hz, 3H, H-18) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CD₃OD) δ 154.4 (C-3), 137.4 (C-5, C-3a', C-4' (X3)), 131.5 (C-10), 125.9 (C-4), 121.9 (C-5', C-6' (X2)), 114.3 (C-1), 113.9 (C-4', C-7' (X2)), 112.4 (C-2), 87.5 (C-17), 44.3 (C-14, C-13 (X2)), 43.5 (C-9), 39.0 (C-8), 29.7 (C-6), 28.9 (C-12), 28.3 (C-11), 26.3 (C-7), 26.2 (C-16), 25.1 (C-15), 11.3 (C-18) ppm.

(17*R/S*)-Espiرو[3β-hidroxi-5α-androstan-17, 2'-benzoxazolina] (39)



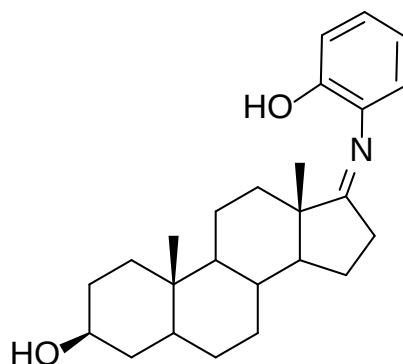
A una solución de *trans*-androsterona (100 mg, 0.34 mmol) en acetonitrilo (10 mL), se añadió líquido iónico, bisulfato de 1-metil-3-(4'-sulfobutil)-imidazolio (45 mg, 0.14 mmol, 0.41 eq.),

la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadió aminofenol (75 mg, 0.69 mmol, 2.0 eq.), y se mantuvo a reflujo durante 30 h, la reacción se detuvo mediante la adición de hielo y se mantuvo en agitación durante 30 minutos, luego se neutralizó con K_2CO_3 y se extrajo con AcOEt (3 x 50 mL), la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se llevó a sequedad. El compuesto fue obtenido mediante cromatografía en columna (DCM: MeOH 100: 0.005), se obtuvo el compuesto benzofusionado **39** como un aceite marrón (6 mg, 5%), mezcla de epímeros (44:56) y las iminas **41** como un aceite amarillo (4 mg, 3%).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.82-6.35 (m, 4H, H-Ar), 3.61 (m, 1H, H-3), 2.44 (m, 1H, H-9), 2.08 (m, 1H, H-8), 1.92 (m, 1H, H-16a), 1.86-1.76 (m, 3H, H-16b, H-5, H-15a), 1.72 (ddd, $J_{2a-2b} = 14.3$ Hz, $J_{2a-1} = 8.8$ Hz, $J_{2b-1} = 5.5$ Hz, 1H, H-2), 1.66 (m, 1H, H-1a), 1.57 (dt, $J_{6-5} = 7.8$ Hz, $J_{6-7} = 5.8$ Hz, 2H, H-6), 1.52 (ddd, $J_{4a-4b} = 8.9$ Hz, $J_{4-5} = 7.8$ Hz, $J_{4-3} = 3.6$ Hz, 1H, H-4a), 1.46 (m, 1H, H-7), 1.41 (dd, $J_{11a-11b} = 11.6$ Hz, $J_{11a-12} = 3.3$ Hz, 1H, H-11a), 1.33 (m, 1H, H-7), 1.28 (m, 1H, H-11b), 1.26 (m, 1H, H-15b), 1.21 (m, 1H, H-1b), 1.12 (m, 1H, H-4b), 0.97 (m, 2H, H-12), 0.86 (s, 3H, H-18), 0.83 (s, 3H, H-19), 0.70 (m, 1H, H-14) ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, $CDCl_3$) δ 134.3 (C-3a), 133.9 (C-3a), 129.6 (C-7a), 128.7 (C-7a), 128.0 (C-6'), 125.3 (C-6'), 125.0 (C-5'), 120.9 (C-5'), 119.4 (C-7'), 116.7 (C-7'), 116.1 (C-4'), 115.3 (C-4'), 104.2 (C-17), 100.7 (C-17), 71.2 (C-3), 50.8 (C-14), 45.9 (C-14), 42.3 (C-9), 39.2 (C-9), 38.8 (C-13), 37.8 (C-13), 36.9 (C-5), 36.5 (C-5), 35.9 (C-4), 34.0 (C-4), 33.5 (C-8), 33.1 (C-8), 32.8 (C-10), 32.5 (C-10), 32.3 (C-12), 32.2 (C-12), 28.0 (C-1), 27.2 (C-1), 26.6 (C-16), 26.4 (C-16), 25.6 (C-2), 24.7 (C-2), 23.9 (C-7), 23.4 (C-7), 23.3 (C-6), 21.1 (C-6), 20.6 (C-15), 19.7 (C-15), 19.0 (C-11), 18.8 (C-11), 14.4 (C-19), 11.8 (C-19), 10.9 (C-18), 10.4 (C-18) ppm.

17-[2'-Hidroxifenilimino]-5 α -androstan-3 β -ol (41)



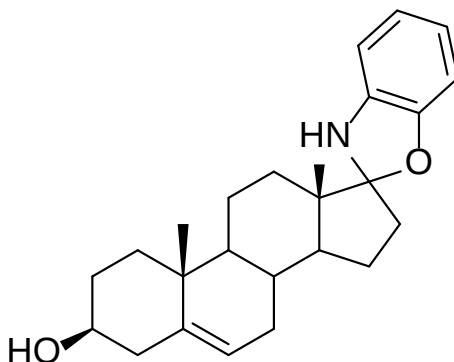
A una solución de *trans*-androsterona (400 mg, 1.38 mmol) en EtOH anhidro (10 mL) fue adicionada una cantidad catalítica de piperidina (80 μ L, 93 mg, 1.09 mmol, 0.79 eq.). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 20 minutos, posteriormente fue adicionado el aminofenol (150 mg, 1.38 mmol, 1.0 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a reflujo por 24 h. Después la reacción fue detenida mediante eliminación del disolvente concentrando a sequedad, la mezcla fue diluida en DCM, y lavada con NaHCO₃, (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrada y llevada a sequedad. El crudo de reacción fue purificado mediante columna cromatográfica (DCM: acetona: trietilamina 90:10:0.5) obteniendo **41** como un sólido rojizo (47 mg, 9%).

IR (cm⁻¹) 3358 (OH, NH), 2861 (C-H alifático), 2126 (C-H aromático), 1065 (C-N), 794 (=C-H).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (m, 1H, H-4'), 7.57 (m, 1H, H-3'), 7.30 (m, 1H, H-2'), 6.89 (m, 1H, H-5'), 4.21 (m, 1H, H-3), 3.79-3.28 (m, 2H, H-9, H-14), 2.42 (m, 1H, H-16a), 2.03 (m, 1H, H-11a), 1.84-1.49 (m, 4H, H-4, H-6), 1.43 (m, 2H, H-1), 1.35 (td, J_{2-1} = 8.6 Hz, J_{2-3} = 5.1 Hz, 2H, H-2), 1.34-1.28 (m, 4H, H-16b, H-8, H-12), 1.25 (m, 1H, H-5), 0.92 (s, 3H, H-18), 0.90 (s, 3H-H-19), 0.83 (m, 1H, H-11b) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CDCl₃) δ 167.7 (C-17), 132.0 (C-1', C-6' (X2)), 130.7 (C-2', C-3' (X2)), 128.5 (C-4', C-5' (X2)), 67.9 (C-3), 47.2 (C-14), 42.3 (C-9), 38.4 (C-4), 33.9 (C-16), 31.6 (C-13), 30.0 (C-2), 29.4 (C-5), 29.0 (C-10), 28.6 (C-8), 26.0 (C-15), 25.1 (C-7), 24.0 (C-6), 23.4 (C-1), 22.6 (C-12), 20.9 (C-11), 13.7 (C-19), 10.6 (C-18) ppm.

(17R/S)-Espiro[3 β -hidroxi-androst-5-en-17, 2'-benzoxazolina] (40)



A una solución de *trans*-dehidroandrosterona (300 mg, 1.04 mmol) en EtOH anhidro (10 mL) fue adicionada una cantidad catalítica de piperidina (240 μ L, 206 mg, 2.42 mmol, 2.32 eq.). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 20 minutos, posteriormente fue adicionado el aminofenol (454 mg, 4.16 mmol, 4.0 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a reflujo durante 16 h. Después la reacción fue detenida mediante eliminación del disolvente concentrando a sequedad, la mezcla fue diluida en DCM, y lavada con NaHCO₃, (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrado y concentrado a sequedad. El compuesto fue purificado mediante columna cromatográfica (DCM: acetona: trietilamina 95:5:0.5) obteniendo **40** como un sólido rojizo, (124 mg, 31%). Mezcla epimérica (62:38).

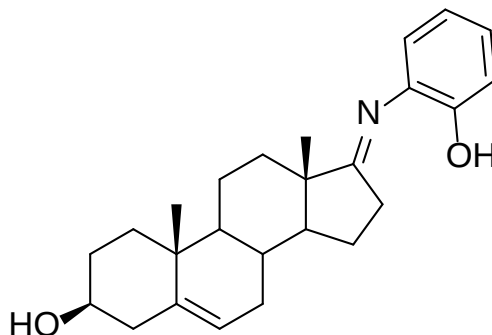
IR (cm⁻¹) 3410 (OH, NH), 3301-2921 (C-H alifática), 2119 (C-H aromático), 1655 (C-H doble enlace), 1568 (C=C), 1169 (C-N), 757 (=C-H).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7.53 (m, 4H, H-5', H-6'), 7.22 (m, 4H, H-4', H-7'), 5.32 (m, 1H, H-6), 3.64 (m, 1H, H-3), 2.52 (m, 2H, H-16), 2.38-2.07 (m, 4H, H-4, H-7), 1.94-1.77 (m, 3H, H-12b, H-8, H-15a), 1.75-1.58 (m, 4H, H-11, H-15), 1.48 (m, 2H, H-2), 1.45-1.20 (m, 3H, H-1, H-14), 1.17 (s, 3H, H-18), 1.08-1.02 (m, 2H, H-9, H-12b), 0.97 (s, 3H, H-19) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CD₃OD) δ 151.4 (C-3a'), 149.9 (C-3a'), 144.0 (C-7a'), 142.4 (C-5), 134.9 (C-7a'), 130.4 (C-6'), 128.8 (C-6'), 126.6 (C-5' (X2)), 121.9 (C-6), 117.2 (C-7' (X2)), 104.8 (C-4'), 101.7 (C-4'), 99.6 (C-17), 98.9 (C-17), 72.3 (C-3), 53.0 (C-14), 52.1

(C-13), 51.8 (C-9), 43.0 (C-4), 37.8 (C-12), 36.7 (C-16), 32.8 (C-2), 32.7 (C-1), 32.2 (C-8), 31.8 (C-7), 27.3 (C-10), 22.8 (C-15), 21.5 (C-11), 19.7 (C-19), 13.9 (C-18) ppm.

17-[2'-Hidroxifenilimino]- androst-5-en-3 β -ol (42)



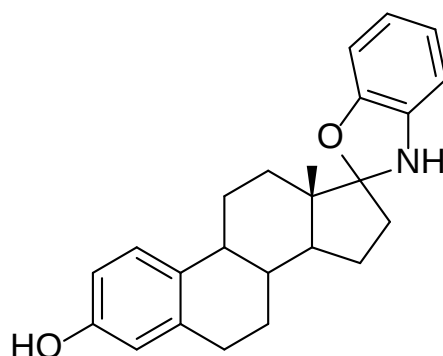
A una solución de *trans*-dehidroandrosterona (300 mg, 1.04 mmol) en EtOH anhidro (10 mL) fue adicionada una cantidad catalítica de piperidina (50 μ L, 40 mg, 0.5 mmol, 0.48 eq.). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 20 minutos, posteriormente fue adicionado el aminofenol (170 mg, 1.56 mmol, 1.5 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a reflujo durante 16 h. Después la reacción fue detenida mediante eliminación del disolvente concentrando a sequedad, la mezcla fue diluida en DCM, y lavada con NaHCO₃, (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrado y concentrado a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica (DCM: acetona: trietilamina 95:5:0.5) obteniendo el benzofusionado **40** como un sólido rojizo (39 mg, 10%), y como un aceite amarillo la mezcla de iminas **42** (24 mg, 6%). Mezcla de iminas (46:54).

IR (cm⁻¹) 3446 (N-H), 3325 (OH), 2933-2855 (C-H alifático), 2084 (C-H aromático), 1598 (C-H doble enlace), 1549 (C=C), 1232 (C-N), 746 (=C-H).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.58 (m, 4H, H-Ar), 5.33 (m, 1H, H-6), 3.65 (m, 1H, H-3), 2.35 (m, 2H, H-16), 2.14-1.85 (m, 3H, H-15a, H-4), 1.78 (m, 2H, H-7a, H-9), 1.61-1.40 (m, 3H, H-15b, H-7b, H-9), 1.37-1.27 (m, 3H, H-12, H-14), 1.22 (dd, J_{2a-2b} = 13.1 Hz, J_{2a-1} = 3.8 Hz, 1H, H-2a), 1.11 (m, 1H, H-2b), 1.05-0.88 (m, 4H, H-1, H-11), 0.87 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.70 (m, 1H, H-8) ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 180.5 (C-17), 171.2 (C-17), 146.0 (C-2'), 142.8 (C-2'), 135.2 (C-5), 129.6 (C-4'), 128.7 (C-1'), 128.5 (C-4'), 127.6 (C-1'), 127.0 (C-6'), 125.5 (C-6), 125.4 (C-5'), 125.0 (C-5'), 116.1 (C-6'), 104.2 (C-3'), 100.6 (C-3'), 71.3 (C-3), 70.6 (C-3), 70.0 (C-14), 69.1 (C-9), 63.7 (C-4), 32.2 (C-13), 31.9 (C-1), 31.7 (C-8), 30.9 (C-12), 29.7 (C-10), 29.7 (C-7), 28.3 (C-2), 26.4 (C-15), 23.4 (C-11), 22.7 (C-18), 21.0 (C-18), 19.3 (C-19), 14.0 (C-19) ppm.

(17*R/S*)- Espiro[3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17, 2'-benzoxazolina] (38)



A una solución de estrona (200 mg, 0.74 mmol) en EtOH anhidro (10 mL) fue adicionada una cantidad catalítica de piperidina (40 μL , 46 mg, 0.54 mmol, 0.73 eq.). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 20 minutos, posteriormente fue adicionado el aminofenol (121 mg, 1.11 mmol, 1.5 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación a reflujo durante 24 h. Después la reacción fue detenida mediante eliminación del disolvente concentrando a sequedad, la mezcla fue diluida en DCM, y lavada con NaHCO_3 (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada con Na_2SO_4 anhidro, filtrada y llevada a sequedad. El compuesto fue purificado mediante columna cromatográfica (DCM: acetona: trietilamina 98:2:0.5) obteniendo **38** como un sólido rojizo, (82 mg, 31%).

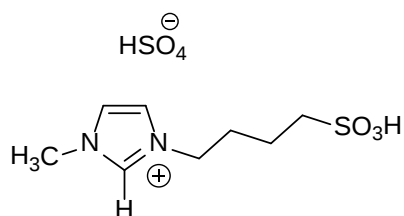
IR (cm^{-1}) 3376 (N-H), 3302 (OH), 2921-2858 (C-H alifático), 2113 (C-H aromático), 1579 (C-H doble enlace), 1454 (C=C), 1246 (C-N), 738 (=C-H).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (m, 1H, H-4), 7.59-7.20 (m, 2H, H-1, H-2), 7.06 (m, 1H, H-5'), 7.02-6.34 (m, 3H, H-4', H-6', H-7'), 2.91 (m, 2H, H-16), 2.50 (m, 1H, H-11a), 2.33 (m, 1H, H-11b), 2.13 (m, 1H, H-9a), 2.08-1.85 (m, 2H, H-15a, H-14b), 1.74 (m, 1H, H-

15b), 1.63-1.36 (m, 5H, H-7, H-8, H-12), 1.35-1.09 (m, 3H, H-14a, H-6), 0.91 (s, 3H, H-18) ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 153.7 (C-3), 138.0 (C-7a'), 131.9 (C-5), 129.6 (C-3a'), 128.7 (C-4), 126.5 (C-1), 125.4 (C-10), 116.2 (C-2), 115.3 (C-Ar), 112.9 (C-Ar), 104.1 (C-4'), 100.6 (C-17), 98.8 (C-7'), 50.4 (C-13), 44.0 (C-9), 38.3 (C-12), 35.9 (C-11), 31.6 (C-14), 29.7 (C-6), 29.5 (C-16), 26.5 (C-7), 25.9 (C-8), 21.6 (C-15), 13.9 (C-18) ppm.

Bisulfato de 1-metil-3-(4'-sulfobutil)-imidazolio (33)

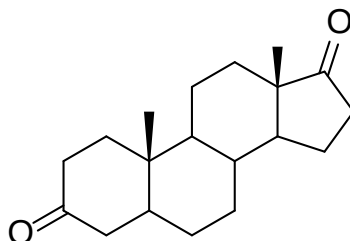


Una solución de 1-metilimidazol (**31**) (520 mg, 0.500 mL, 6.27 mmol) y 1,4-butanosultona (**32**) (555 mg, 0.417 mL, 0.85 mmol), en butanol (5.0 mL), fue puesta en agitación a 80 °C, durante 24 horas, transcurrido el tiempo de reacción fue lavada con éter dietílico 3 veces, y secada al alto vacío, posteriormente fue adicionado ácido sulfúrico (0.33 mL, 6.27 mmol), gota a gota, la mezcla se mantuvo en agitación durante 8 horas a 80 °C, obteniendo un líquido marrón, el cual fue usado sin purificar.

RMN ^1H (500 MHz, D_2O) δ 8.43 (s, 1H, H-2), 7.20 (s, 1H, H-5), 7.15 (s, 1H, H-4), 3.95 (2H, t, $J=5$ Hz y $J=10$ Hz, H-4'), 3.60 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 2.65 (2H, t, $J=5$ Hz, $J=10$ Hz, H-1'), 1.72 (m, 2H, H-3'), 1.44 (m, 2H, H-2') ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, D_2O) δ 135.7 (C-2), 123.5 (C-5), 122.0 (C-4), 49.9 (C-4'), 48.7 (C-1'), 35.5 ($\text{CH}_3\text{-N}$), 27.7 (C-3'), 20.7 (C-2') ppm.

Androst-5-eno-3, 17-diona (43)



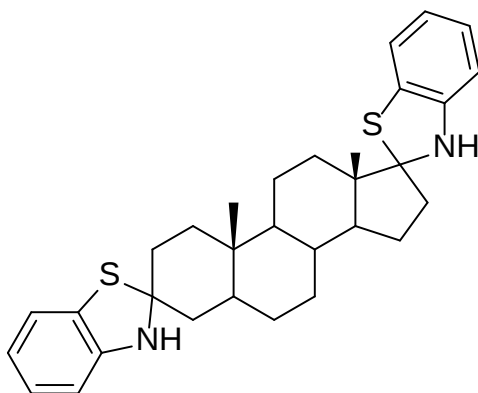
A una solución de *trans*-androsterona (600 mg, 2.06 mmol) en DCM (10 mL) fue adicionado PCC (1.33 g, 6.19 mmol, 3.0 eq.) y CaCO₃ (620 mg, 6.20 mmol, 3.0 eq.) bajo Ar, la mezcla fue agitada a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente filtrada sobre gel de sílice, con DCM (200 mL) y fue concentrada a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica (Hx: AcOEt 7:3) obteniendo **43** como un sólido blanco, (cuantitativa, 590 mg).

IR (cm⁻¹) 2920-2855 (C-H alifático), 1740, 1709 (C=O).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 2.37 (m, 1H, H-14), 2.31 (m, 1H, H-16b), 2.22 (m, 2H, H-15b, H-16a), 2.01 (m, 2H, H-4), 1.95 (m, 1H, H-8), 1.88 (m, 1H, H-15a), 1.75 (m, 2H, H-2), 1.63 (m, 1H, H-1b), 1.55 (m, 1H, H-1a), 1.47 (m, 2H, H-9, H-12b), 1.32 (m, 2H, H-11b, H-7a), 1.21 (m, 3H, H-11a, H-12a, H-7b), 0.98 (s, 3H, H-18), 0.93 (m, 1H, H-5), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.74 (m, 1H, H-6) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CDCl₃) δ 220.8 (C-17), 211.4 (C-3), 53.7 (C-14), 51.1 (C-9), 47.6 (C-13), 46.5 (C-4), 44.5 (C-5), 38.3 (C-2), 38.0 (C-1), 35.7 (X2, C-16, C-8), 34.8 (C-10), 31.4 (C-12), 30.4 (C-7), 28.5 (C-6), 21.7 (C-15), 20.6 (C-11), 13.7 (C-19), 11.3 (C-18) ppm.

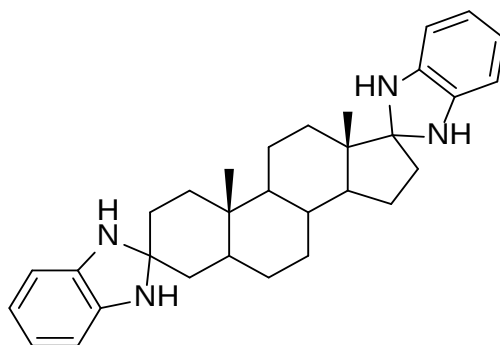
(3,17 *R/S*)-Diespiro[androst-5-en-3, 17, 2',2''-benzotiazolina] (44)



A una solución de la dicetona derivada de *trans*-androsterona (300 mg, 1.03 mmol) en tolueno (7 mL), fue adicionado PPTS (100 mg, 0.39 mmol, 0.38 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente fue adicionado aminotiofenol (775 mg, 0.646 mL, 6.19 mmol, 6.0 eq.) y la reacción fue puesta a reflujo bajo atmosfera de argón durante 7 horas, a continuación fue lavada con bicarbonato y extraída con acetato de etilo (3 x 50 mL), finalmente fue lavada con agua y extraída con DCM, la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. El compuesto fue purificado mediante columna cromatográfica (Hx: AcOEt: Et₃N 98:2:0.5). Obteniendo **44** como una mezcla epimérica como un aceite amarillo de forma cuantitativa (500 mg).

IR (cm⁻¹) 3455-3370 (OH, NH), 2954-2854 (C-H alifático), 2400-2250 (C-H aromático), 1719, 1608 (C=C), 1475 (C-N), 738 (C-S).

(3,17 *R/S*)-Diespiro[androst-5-en-3, 17, 2',2''-benzimidazolina] (45)



A una solución de la dicetona derivada de *trans*-androsterona (200 mg, 0.69 mmol) en MeOH (7 mL), fue adicionado PPTS (80 mg, 0.31 mmol, 0.45 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente fue adicionado *o*-fenilendiamina (446 mg, 4.13 mmol, 6.0 eq.) la mezcla fue puesta en agitación a 45 °C, bajo atmosfera de argón, durante 13 horas, la reacción fue lavada con bicarbonato y extraída con acetato de etilo (3 x 50 mL), a continuación fue lavada con agua y extraída con DCM (1 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. El crudo de reacción fue purificado mediante columna cromatográfica (DCM → DCM: MeOH 95:5) Obteniendo **45** como la mezcla epimérica, como un aceite amarillento (146 g, 45%).

IR (cm⁻¹) 3287 (OH, NH), 2927-2854 (C-H alifático), 2112-1916 (C-H aromático, C-H doble enlace), 1655, 1610 (C-H doble enlace), 1432 (C=C), 1273 (C-N), 1025 (C-N), 744 (=C-H).

CAPITULO II

II. Resumen

Se realizó la síntesis de diversos iminoazúcares híbridos constituidos por dos farmacóforos bien diferenciados: por un lado, un residuo de 1-desoxinojirimicina (DNJ), y, por otro lado, un fragmento antioxidante de tipo polifenólico (**figura II.1a**), que contribuya a reducir el estrés oxidativo inherente a enfermedades como la diabetes, o enfermedades de almacenamiento lisosomal. Fueron sintetizados 11 derivados, modificándose la longitud de la cadena del espaciador, así como los sustituyentes en el anillo aromático. En particular, el diseño de estos compuestos responde a un intento de que se comporten como inhibidores duales de las colinesterasas (acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE)), enzimas implicadas en el Alzheimer. Así pues, por un lado, el residuo del iminoazúcar, protonable en condiciones fisiológicas, puede imitar al sustrato natural de dichas enzimas (acetilcolina), por consiguiente, el amonio correspondiente interacciona con la región aniónica catalítica (CAS); por otro lado, el extremo aromático puede establecer interacciones de tipo de Van der Waals con la región aniónica periférica (PAS) de la enzima, enriquecida con aminoácidos con residuos aromático. Dicha región está implicada en la autoagregación de las placas amiloides, por tanto, la interacción con el inhibidor puede ralentizar este proceso característico del Alzheimer. Este punto fue confirmado mediante cálculos teóricos de tipo *docking*.

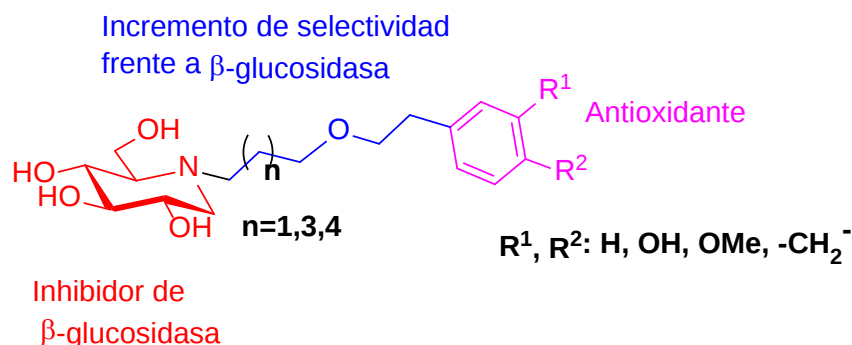


Figura II.1a. Diagrama general de iminoazúcares con porción fenólica

Dependiendo del patrón de sustitución en el anillo aromático, así como del tamaño del espaciador, se observó una buena selectividad frente a la BuChE (colinesterasa cuya actividad se incrementa sustancialmente en estados avanzados del Alzheimer). El compuesto cabeza de serie (**Figura II.1b**) se comportó como un potente inhibidor mixto de la BuChE ($IC_{50} = 1.8$ and $1.9 \mu M$), ligeramente más potente que el fármaco donepezilo; este modo de

acción está de acuerdo con que interaccione tanto con la región CAS, como PAS. Estos compuestos también carecen de actividad antiproliferativa significativa frente a células tumorales como no tumorales a una concentración de 100 μM , evidenciando una citotoxicidad reducida.

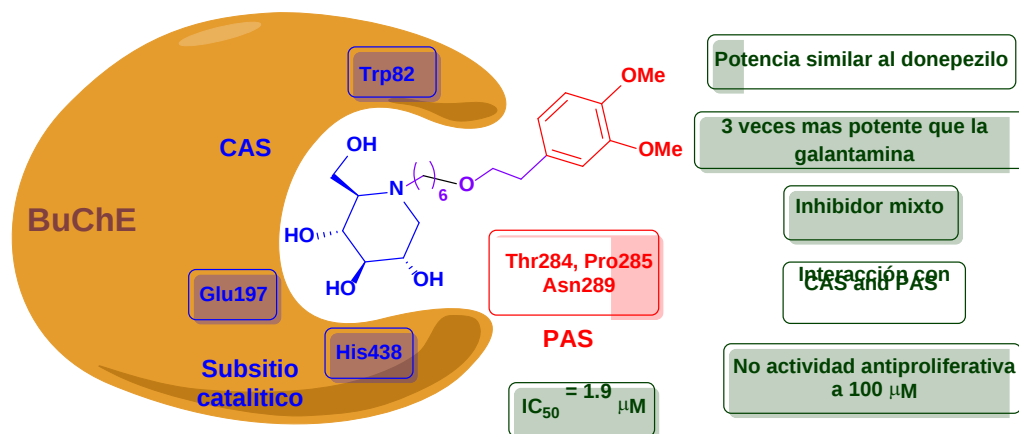


Figura II.1b. Compuesto cabeza de serie, con potente actividad frente a BuChE

Por otro lado, fueron sintetizadas diferentes ureas, tioureas y selenoureas derivadas de DNJ (**figura II.2**), con la finalidad de evaluar la influencia del tamaño de cadena espaciadora, el átomo de calcógeno y los sustituyentes de los anillos aromáticos en las propiedades biológicas (potenciales agentes anti-cáncer y/o anti-Alzheimer). Para la síntesis de estos compuestos se emplearon 3 tamaños de cadena espaciadora (3, 5 y 6), y se utilizaron como sustituyentes del anillo aromático, el metilo, el metoxilo y el bromo con la finalidad de evaluar sus efectos estereoelectrónicos.

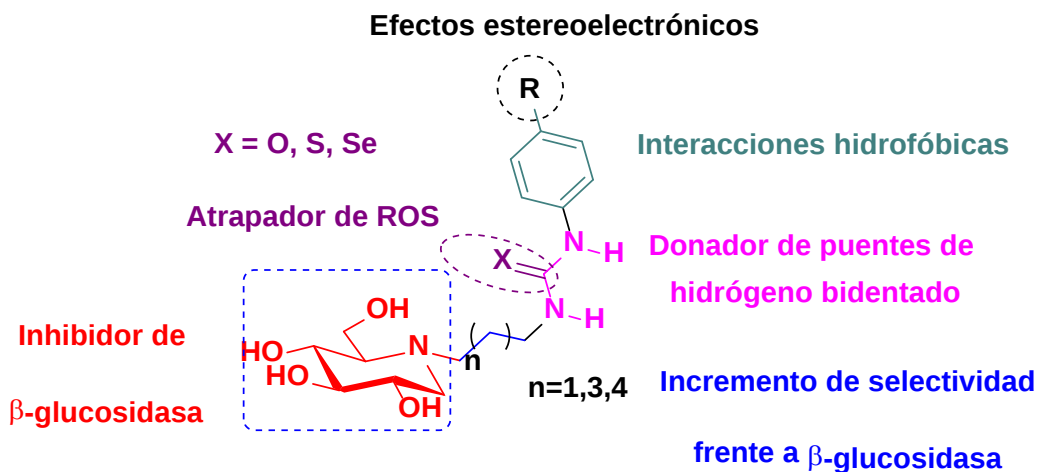


Figura II.2. Diagrama general de ureas, tioureas y selenoureas derivadas de desoxinojirimicina

A su vez se intentó la síntesis de derivados fenólicos a partir de azafagomina (**figura II.3**), un híbrido de DNJ e isofagomina. Con este tipo de estructuras se pretendía analizar la influencia de un segundo nitrógeno endocíclico en las propiedades anti-Alzheimer, con respecto a los derivados mostrados en la **figura II.1**. No obstante, el iminoazúcar no pudo ser alquilado con la cadena correspondiente, obteniéndose únicamente la azafagomina *N*-benzoilada, en 8 pasos de reacción.

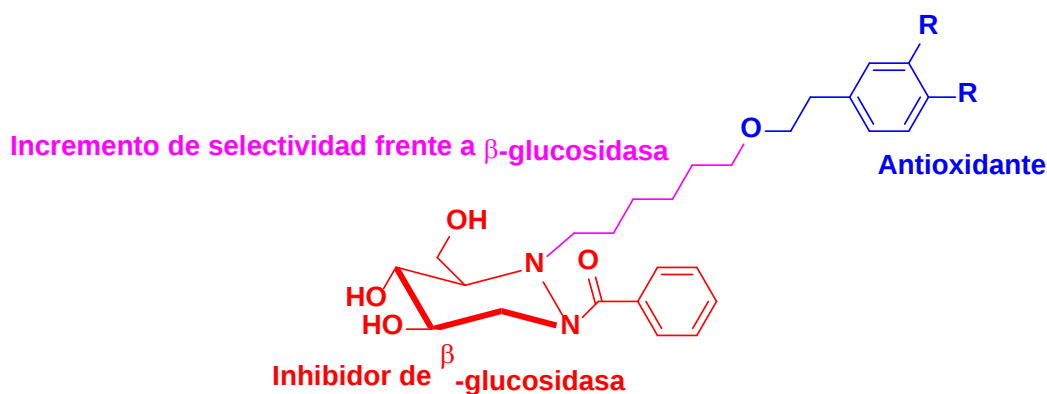


Figura II.3. Diagrama general de derivados de azafagomina

Finalmente se intentó la síntesis de análogos del ebselen y del donepezilo, fusionados con DNJ (**figura II.4**), como nuevos agentes anti-Alzheimer. Para ello se abordó la hibridación de la DNJ con un fragmento de tipo 1,2-benzoselenazol-3-ona (presente en el ebselen) o de 5,6-dimetoxi indanona (presente en el donepezilo), como potenciales inhibidores de colinesterasas. Desafortunadamente, no fue posible llevar a cabo la unión de la cadena carbonada, el residuo terminal aromático y el iminoazúcar. Diferentes aproximaciones sintéticas permitieron obtener, por una parte, la DNJ funcionalizada con la cadena espaciadora (5 y 6 átomos de carbono) con un hidroxilo terminal, y por otra, se preparó el selenoheterociclo del ebselen con una cadena de 5 carbonos sobre el átomo de nitrógeno.

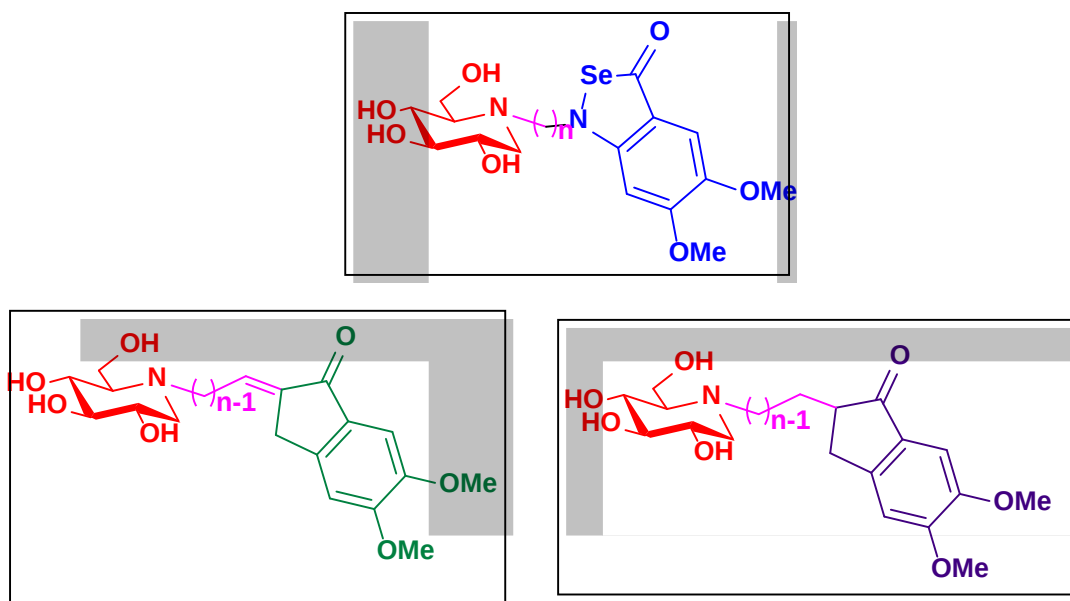


Figura II.4. Nuevos híbridos de iminoazúcares-donepezilo/ebselelin abordados en este capítulo

II. Abstract

The synthesis of various hybrid iminosugars consisting of two well differentiated pharmacophores was carried out: on the one hand, a 1-deoxynojirimycin (DNJ) residue, and on the other hand, a polyphenolic type antioxidant fragment, (**figure II.1a**), to reduce oxidative stress inherent in diseases such as diabetes, or lysosomal storage diseases. Eleven derivatives were synthesized, modifying the length of the spacer chain, as well as the substituents on the aromatic ring. In particular, the design of these compounds responds to an attempt to obtain compounds that behave as dual inhibitors of cholinesterases (acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE)), enzymes involved in Alzheimer's disease. Thus, the iminosugar residue, protonatable under physiological conditions, could mimic the natural substrate of these enzymes (acetylcholine), consequently, the corresponding ammonium ion interacts with the catalytic anionic region (CAS); furthermore, the aromatic side could establish van der Waals-type interactions with the peripheral anionic region (PAS) of the enzyme, enriched with amino acids with aromatic residues. This region is involved in the formation of amyloid plaques, therefore, the interaction with the inhibitor can slow down this characteristic process of Alzheimer's. This point was confirmed by docking-type theoretical calculations.

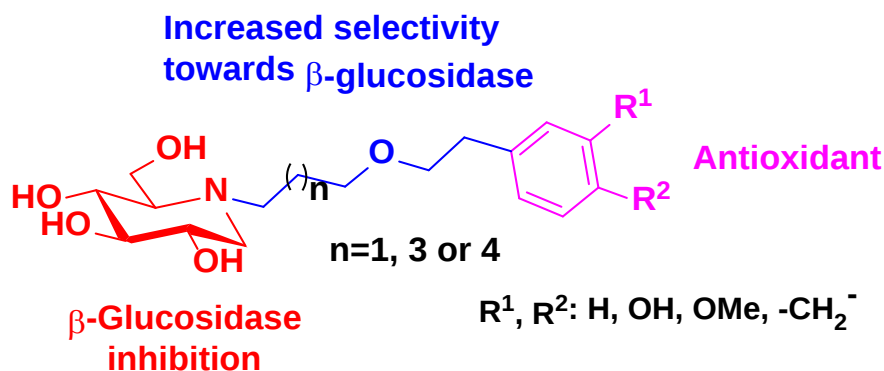
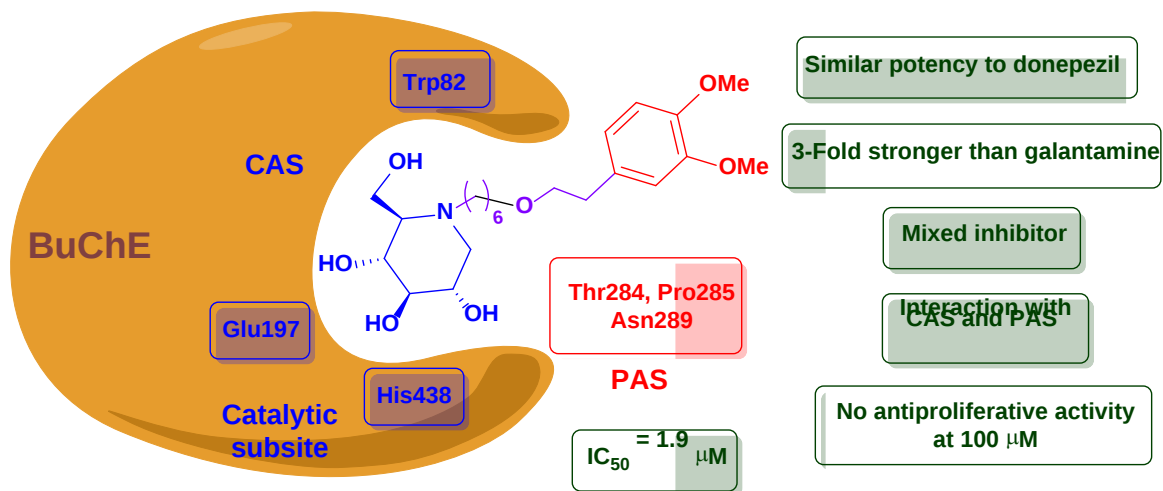


Figure II.1a. General diagram of iminosugars with phenolic portion

Depending on the substitution pattern in the aromatic ring, as well as the size of the spacer, a good selectivity was observed against BuChE (cholinesterase whose activity is substantially increased in advanced stages of Alzheimer's). The seeded compound (**figure II.1b**) behaved as a potent mixed inhibitor of BuChE ($\text{IC}_{50} = 1.8$ and $1.9 \mu\text{M}$), slightly more potent than the drug donepezil; this mode of action agrees with its interaction with both the

CAS and PAS regions. These compounds also lack significant antiproliferative activity against tumor and non-tumor cells at a concentration of 100 μM , evidencing reduced cytotoxicity.



Donepezil mimetics based on 1-DNJ: novel anti-Alzheimer's agents

Figure II.1b. Seed compound, with powerful activity against BuChE

On the other hand, different ureas, thioureas and selenoureas derived from DNJ were synthesized (**figure II.2**), in order to evaluate the influence of the spacer chain size, the chalcogen atom and the aromatic ring substituents on the biological properties (potential anti-cancer and / or anti-Alzheimer's agents). For the synthesis of these compounds, three spacer chain sizes (3, 5 and 6) were used, and methyl, methoxyl and bromine were used as substituents of the aromatic ring to evaluate their stereoelectronic effects.

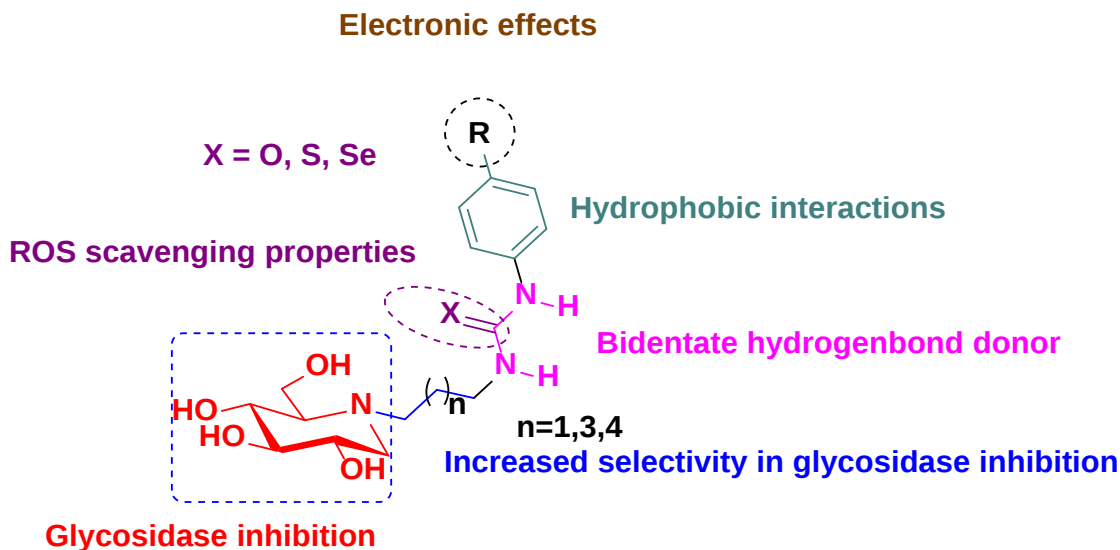


Figure II.2. General diagram of ureas, thioureas and selenoureas derived from deoxynojirimycin

In turn, the synthesis of phenolic derivatives was attempted from azaphagomine (**figure II.3**), a hybrid of DNJ and isofagomine. With this type of structures, it was intended to analyze the influence of a second endocyclic nitrogen on the anti-Alzheimer properties, with respect to the derivatives shown in **figure II.1**. However, the iminosugar could not be alkylated with the corresponding chain, obtaining only the *N*-benzoylated azaphagomine, in 8 reaction steps.

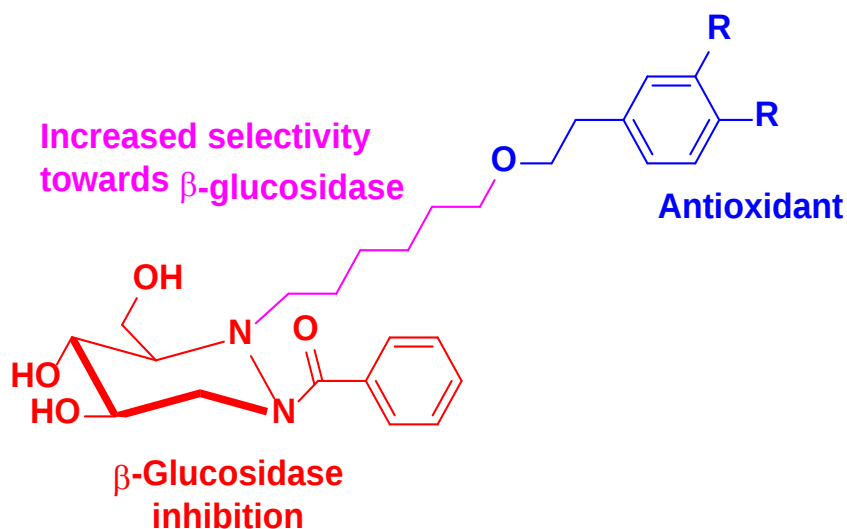


Figure II.3. General diagram of azaphagomine derivatives

Finally, the synthesis of ebselen and donepezil analogs, fused with DNJ (figure II.4), was attempted as new anti-Alzheimer agents. For this purpose, the hybridization of DNJ with a fragment of the 1,2-benzoselenazol-3-one type (present in ebselen) or of 5,6-dimethoxy indanone (present in donepezil), as potential cholinesterase inhibitors, were essayed. Unfortunately, it was not possible to attach the chain, terminal aromatic residue and the iminosugar. Different synthetic approaches allowed on one hand, the obtaining of a functionalized DNJ with the spacer chains (5 and 6 carbon atoms) bearing a terminal hydroxyl group, and on the other hand, the selenoheterocycle of ebselen with a chain of 5 carbons on the nitrogen.

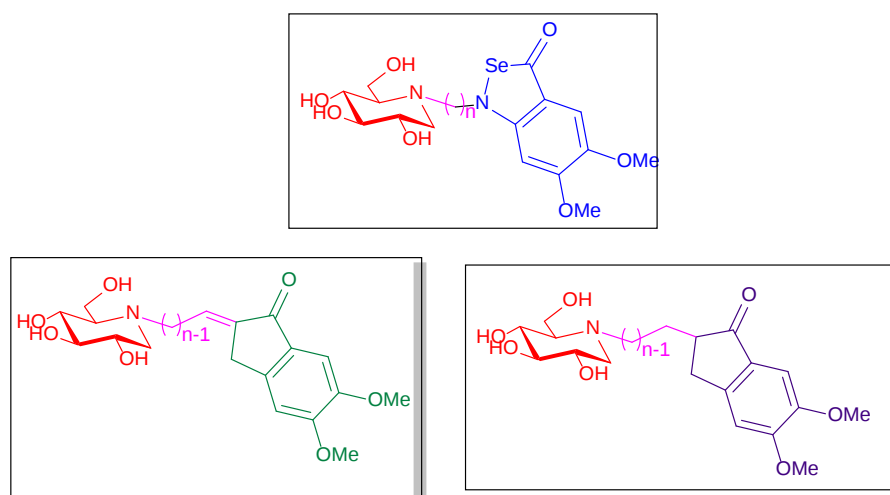


Figure II.4. New iminosugar-donepezil / ebselen hybrids discussed in this chapter

II.1. Introducción

Aquellos análogos de carbohidratos que contienen nitrógeno en la posición del oxígeno endocíclico son conocidos como iminoazúcares; por otro lado, la sustitución de cualquier átomo de carbono del anillo por un átomo de nitrógeno origina una familia de miméticos de carbohidratos conocida como azaazúcares.⁷⁴ El reemplazo formal de una posición del anillo sacarídico por un átomo de nitrógeno protonable en condiciones fisiológicas conduce a una especie que imita en términos de carga y geometría al estado de transición de la hidrólisis del sustrato de las glicosidasas, enzimas que controlan tanto la formación, como la hidrólisis de los enlaces glicosídicos.⁷⁵

Los imino y aza-azúcares polihidroxilados, desde el punto de vista farmacológico debido a sus fuertes propiedades inhibitorias frente a glicosidasas y glicosiltransferasas, han aumentado su importancia en el posible tratamiento de una serie de patologías.^{lxxvi}

Los iminoazúcares son de interés particular debido a su potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades mediadas por carbohidratos, así como infecciones virales, metástasis tumoral, diabetes o enfermedades de almacenamiento lisosomal;⁷⁵ también actúan como antimicrobianos, anticancerígenos e inmunosupresores.^{lxxvi}

Dentro de los imino y aza-azúcares con este tipo de propiedades biológicas destacan las piperidinas polihidroxiladas, como la 1-desoxinojirimicina (1-DNJ), la isofagomina o azafagomina (**figura II.5**).^{77,78}

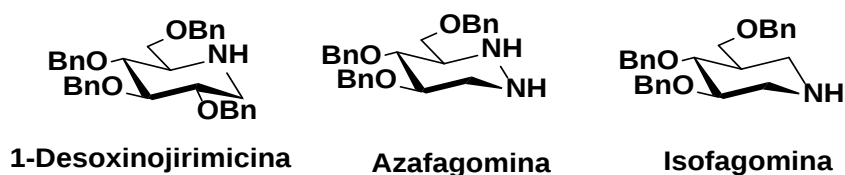


Figura II.5. Iminoazúcares

Los iminoazúcares han sido un objetivo importante tanto para la síntesis orgánica como para la química medicinal desde su descubrimiento en los años 60's. De este tipo de compuestos, uno de los más conocidos es la 1-DNJ,⁷⁹ la cual es un producto natural aislado de las hojas de morera⁸⁰ que exhibe una potente inhibición de α y β -glucosidasas. A partir de la 1-DNJ se han obtenido dos fármacos conocidos, el Miglitol® (*N*-(2-hidroxietil)-1-DNJ) y

la Zavesca® (*N*-butil-1-DNJ) (**figura II.6**), los cuales son usados para el tratamiento de diabetes no insulino dependiente y en la enfermedad de Gaucher, respectivamente.⁸¹ Por otro lado, la azafagomina es un híbrido de 1-DNJ y de isosfagomina, por lo que puede considerarse simultáneamente como un iminoazúcar y un aza-azúcar y es un inhibidor más potente que la propia desoxinojirimicina.⁸²

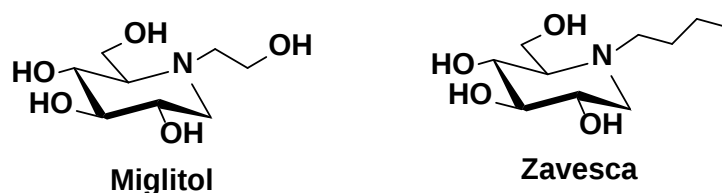


Figura II.6. Fármacos inhibidores de glucosidasas

Las glicosidasas están implicadas en procesos biológicos de gran importancia, como son, el metabolismo de carbohidratos, la formación de paredes celulares y el reconocimiento molecular; considerando que un mal funcionamiento de estas enzimas desencadena en graves patologías, se han vuelto una atractiva diana terapéutica.⁸³ Por todo esto el desarrollo de potentes y selectivos inhibidores de glicosidasas, podría abrir una nueva puerta para el tratamiento de este tipo de enfermedades.⁸⁴

Por todo lo anterior se planteó la posibilidad de preparar nuevos derivados de desoxinojirimicina y azafagomina y así observar la influencia entre tener uno o dos nitrógenos en la estructura base con respecto a la inhibición de glicosidasas; también se planteó la posibilidad de analizar la inhibición de dichos compuestos sobre acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), enzimas clave en el desarrollo del Alzheimer.^{lxxvi}

Esta enfermedad se presenta como pérdida progresiva de la memoria, disminución en la capacidad cognitiva; y dificultad para reconocer; la etiología de este padecimiento es tremendamente compleja, de naturaleza multifactorial y no es conocida por completo, pero existen algunos indicadores comunes en los pacientes de Alzheimer, como son los bajos niveles de la acetilcolina (neurotransmisor responsable de la función cognitiva), los depósitos beta-amiloides, la hiperfosforilación de la proteína tau, que conduce a la formación de ovillos neurofibrilares, el estrés oxidativo y la neuroinflamación.⁸⁵ Actualmente no existe ningún medicamento que pueda curar esta enfermedad, pero los principales fármacos dirigidos a ella

son inhibidores de la acetilcolinesterasa, enzima que hidroliza el neurotransmisor acetilcolina. Los fármacos actuales son: galantamina, donepezilo y rivastigmina (inhibidores de colinesterasas) y memantina (antagonista de receptores del ácido *N*-metil-D-aspartico, NMDA) (**figura II.7**).⁸⁶

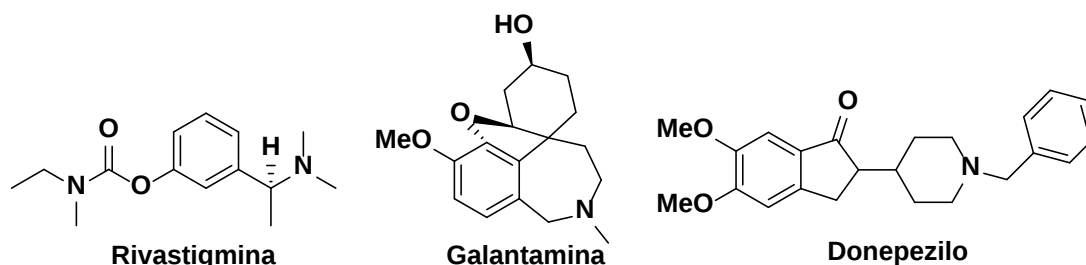


Figura II.7. Fármacos contra el Alzheimer

Teniendo en cuenta que existen datos considerables que demuestran que el selenio podría jugar importantes roles para frenar la progresión del Alzheimer,⁸⁵ se decidió sintetizar compuestos derivados de iminoazúcares que contuvieran dicho metaloide. El selenio es un nutriente mineral esencial con múltiples roles en el crecimiento y funcionamiento de las células animales; es conocido por proporcionar protección al eliminar el daño celular inducido por especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS, RNS). Un compuesto selenado con interesantes propiedades biológicas es el ebselen (2-fenil-1,2-benzoselenazol-3-ona) (**figura II.8**), un ejemplo clásico de miméticos de glutatión peroxidasa⁸⁷ (GPx), selenoproteínas que actúan como defensas naturales frente al estrés oxidativo al reducir peróxido de hidrógeno y alquilperóxidos hasta agua o alcoholes, respectivamente. Debido a esa acción, el ebselen ha demostrado ser útil en la protección celular frente a esas especies pro-oxidantes.⁸⁸ Recientemente, el ebselen ha mostrado también ser un mimético del catión litio, y como tal, un potencial fármaco para el tratamiento del trastorno bipolar.⁸⁹

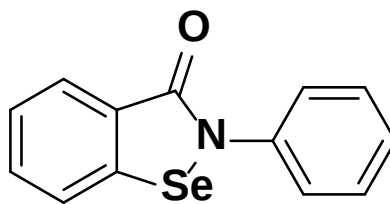


Figura II.8. Ebselen

II.2. Antecedentes

II.2.1. Iminoazúcares y aza-azúcares

Ambos son uno de los descubrimientos más interesantes y una de las más fascinantes obras de la naturaleza en el campo de la química de productos naturales.⁹⁰ Han pasado alrededor de 5 décadas desde que la nojirimicina, el primer iminoazúcar fue descubierto, (**figura II.9**),⁹⁰ llamada así ya que fue extraída como un metabolito de la fermentación de *Streptomyces nojiriensis*⁹¹ aunque en realidad fue aislada por primera vez de *S. roseochromogenes*; el descubrimiento de dicha molécula fue publicado en el año 1968 y fue altamente citado en las siguientes tres décadas como referencia en la búsqueda de nuevos iminoazúcares,⁹¹ mostrando actividad antibiótica y como inhibidor de glicosidasas.⁹⁰

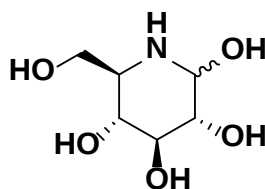


Figura II.9. Nojirimicina

La 1-desoxinojirimicina (**figura II.10**) también conocida como 1,5-dideoxi-1,5-imino-D-glucitol, fue preparada originalmente por la remoción del grupo hidroxilo anomérico de la nojirimicina y más tarde fue extraída del cultivo de bacterias y plantas.⁹⁰ En 1976 la desoxinojirimicina fue descubierta como un producto natural en la especie *Morus*,⁹¹ fue extraída de la raíz del árbol de mora y llamada moranolina.⁹⁰ El correspondiente derivado 2-desoxy, la fagomina (1,2,5-trideoxi-1,5-imino-D-arabino-hexitol), fue obtenido de una especie de trigo (*Fagopyrum esculentum*) en 1974.⁹¹

Los iminoazúcares actúan como análogos de los carbohidratos y se encuentran distribuidos en múltiples plantas y microorganismos, además poseen una alta diversidad estructural. Se ha encontrado que muchos de ellos tienen actividad en múltiples procesos biológicos, ya que inhiben un amplio rango de enzimas de interés clínico, entre ellas podemos encontrar a las glicosiltransferasas, al glicógeno fosforilasa, a una azúcar nucleosidomutasa y algunas metaloproteinasas.⁹² Los miméticos de los azúcares inhiben a las glicosidasas debido a que asemejan estructuralmente a la porción del azúcar del sustrato natural (glicósidos). Las

glicosidasas están involucradas en un amplio rango de importantes procesos biológicos, así como digestión intestinal, procesos post-translacionales de la cadena de azúcar de glicoproteína, el catabolismo lisosomal de glicoconjugados y reconocimiento célula-célula y virus-célula.⁹⁰ Estas similitudes estructurales a los carbohidratos hacen a los iminoazúcares importantes en la inhibición de enzimas relacionadas con la actividad de los carbohidratos, lo que podría ser la razón de su actividad en múltiples procesos biológicos.⁹²

Dentro de los imino y aza-azúcares una familia de gran importancia son las piperidinas polihidroxiladas. Un gran número de aza-azúcares han sido extraídos de fuentes naturales, principalmente de plantas, microorganismos y más recientemente de insectos y esponjas marinas.⁹³ Entre los imino y aza-azúcares presentes en la naturaleza, están la desoxinojirimicina, desoximanojirimicina, adenofoquina, fagomina y D-glucono- δ -lactama (**figura II.10**), estos son análogos estructurales de carbohidratos de tipo piranosa, se ha encontrado que este tipo de compuestos actúan como potentes inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas.⁹⁴

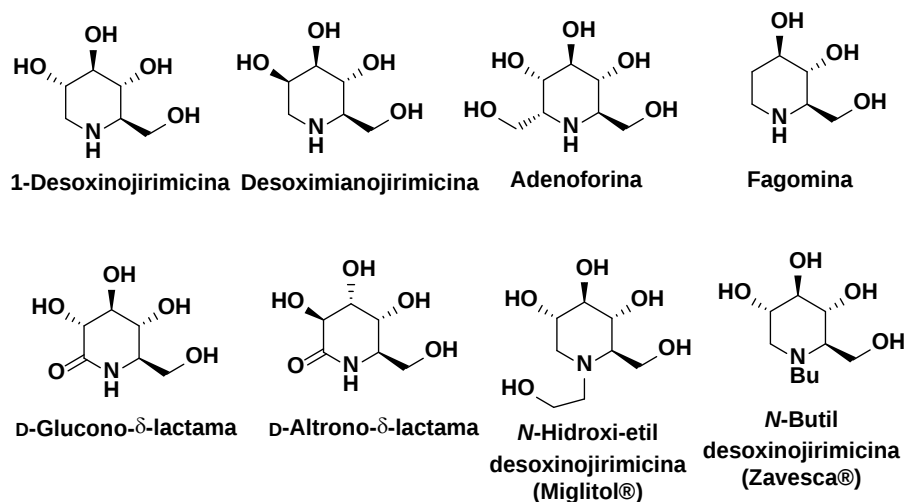


Figura II.10. Algunos ejemplos de polihidroxipiperidinas⁹⁴

Las familias de la desoxinojirimicina actúan como poderosos inhibidores de las rutas de glicosilación.⁹⁵ Como consecuencia de la inhibición de la *N*-alquilación de oligosacáridos procesados en el retículo endoplasmático, las rutas de desdoblamiento de proteínas dependientes de glicosilación se bloquean.⁹⁵

En años recientes se han desarrollado otras estrategias para modificar la estructura de iminoazúcares la cual consiste en insertar sustituyentes electroattractores. Esta idea está

basada en el hecho de que grupos electroattractores fuertes pueden afectar grandemente el pKa del iminoazúcar, que podría tener interesantes consecuencias en el mecanismo de acción contra ciertas glicosidasas.⁹⁶

II.2.2. Glicosidasas

Son enzimas que catalizan la hidrólisis de glicósidos en hemiacetales y alcoholes y aquí son responsables del primer paso en su degradación o catabolismo. Los glicósidos son los compuestos orgánicos más abundantes en la biosfera, por lo que las glicosidasas están igualmente extendidas. En la historia de las enzimas la química de las glicosidasas juega un rol crucial: una glicosidasa (la β -glucosidasa de almendra) fue la enzima estudiada por Emile Fisher que le ayudo a postular el modelo *llave-cerradura* para explicar la especificidad de las enzimas.⁹⁷

Las glicosidasas son enzimas muy abundantes y esenciales en todos los sistemas vivos para realizar el procesado metabólico de los carbohidratos: desde la degradación de cada polisacárido como almidón, celulosa, o quitina hasta el más alto grado de sofisticación en secuencias de desglucosilación-reglucosilación en la maduración y funcionalización de glicoproteínas. Las glicosidasas que catalizan la hidrólisis de *O*-glicosidos y tioglicosidos pertenecen a la clase EC 3.2.1, mientras que las proteínas que catalizan la hidrólisis de enlaces *N*-glicosílicos, tales como las nucleósido hidrolasas, se clasifican EC 3.2.2.⁹⁸

A pesar de que las glicosidasas son esencialmente catabólicas, degradando glicósidos, las α -glucosidasas y α -manosidasas también juegan un rol clave en la fase temprana de la biosíntesis de glicoproteínas y su maduración, en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi.⁹¹ Generalmente las glicosidasas tienen dos grupos ácidos carboxílicos en el sitio activo en forma de carboxílico y carboxilato. Esto significa que la actividad de la enzima es dependiente de pH, ya que a un pH donde ambos carboxilatos estén protonados o no protonados la enzima es inactiva.⁹⁷

Las enzimas constituyen un blanco terapéutico de gran interés en química medicinal, ya que sus funciones anómalas están relacionadas con el desarrollo de múltiples enfermedades, así como las enfermedades de almacenamiento lisosomal, la diabetes o el cáncer. Por otro lado, también participan en el reconocimiento carbohidrato-carbohidrato asociados a infecciones microbianas.⁹⁹

II.2.3. Enfermedades de almacenamiento lisosomal

Estas enfermedades son un grupo heterogéneo de patologías genéticas caracterizadas por una función defectuosa en una de las enzimas lisosomales de tipo glicosidasa. Este déficit produce una degradación metabólica parcial de los glicósidos complejos y consecuentemente su acumulación en los lisosomas.¹⁰⁰ Este tipo de enfermedades son desórdenes autosómicos recesivos excepto la enfermedad de Hunter y la enfermedad de Fabry, que se encuentran ligadas al cromosoma X.¹⁰¹

La patogénesis de esta enfermedad es mucho más compleja que la simple acumulación de catabolitos. Estas también incluyen anormalidades en la homeostasis de calcio, activación de transducción de rutas apoptóticas y alteración en el transporte de membrana.¹⁰¹

Clínicamente las enfermedades de almacenamiento lisosomal neuropáticas están caracterizadas por variabilidad en los fenotipos clínicos dependiendo de las diferentes enfermedades. Sin embargo, en muchos casos hay disfunción neuronal progresiva y muerte temprana.¹⁰²

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal que se presentan a nivel cerebral, de modo contrario al resto de las enfermedades de este tipo no pueden ser tratadas con terapia de reemplazo enzimático, debido a que este es inefectivo, ya que las enzimas administradas no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Por lo que se ha explorado una terapia alternativa haciendo uso de chaperonas, en donde una molécula pequeña se usa para inducir el desplegamiento de la proteína la cual pasaría el control del retículo endoplasmático lo que facilitaría que la enzima llegara al lugar de acción en los lisosomas.¹⁰³ Muchas chaperonas con potencial farmacológico se han identificado para su uso en las principales enfermedades de almacenamiento lisosomal, así como la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Fabry, con algunas ventajas en los tratamientos clínicos.¹⁰⁴ Los inhibidores de glicosidasas pueden ser empleados como chaperonas, una terapia para el tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosomal, donde un inhibidor, en concentraciones subinhibitorias se utiliza para reestablecer el plegamiento correcto de la enzima deficiente; de esta manera, se puede recobrar parte de su función y contribuir a hidrolizar los glicósidos correspondientes.

La enfermedad de Gaucher es la más frecuente de las enfermedades de almacenamiento lisosomal con acumulación patológica de un esfingolípido llamado glucocerebrosido o glucosilceramida.¹⁰⁵

Hay 3 tipos de la enfermedad de Gaucher y se pueden resumir de la siguiente forma:

Tipo 1: forma no neuropática, la más común y la menos severa, puede afectar a pacientes de todas las edades y está caracterizada por un extenso rango de signos y síntomas.

Tipo 2: forma neuropática de tipo infantil, es muy rara y severa, con un comienzo en el primer año de vida y muerte antes de los dos.

Tipo 3: forma neuropática juvenil, es caracterizada por envolver progresivamente al cerebro y comienza los síntomas en épocas cercanas a la niñez.¹⁰⁵

Esta enfermedad es causada por deficiencia de la β -glucocerebrosidasa cuyo gen está localizado en el cromosoma 1. Esta enzima hidroliza al glucocerebrosido, que es un componente de las membranas de la red de células blancas de la sangre. Esto sugiere que la acumulación de glucosilesfingosina en el cerebro contribuye al daño cerebral en pacientes con enfermedad de Gaucher, a pesar de que el mecanismo de neurotoxicidad no está entendido del todo.¹⁰⁶

II.2.4. Inhibidores de glicosidasas

Tienen un gran potencial para el tratamiento de la diabetes, infecciones virales, enfermedades de almacenamiento lisosomal y cáncer metastásico.⁹⁰

Biela-Banas y colaboradores han preparado un rango de diferentes iminoazúcares como miméticos de galactosidasas, los cuales fueron evaluados como inhibidores de GALC, de este modo se identifica a la iso-galacto-fagomina (**figura II.11**) como un potente inhibidor.¹⁰⁷

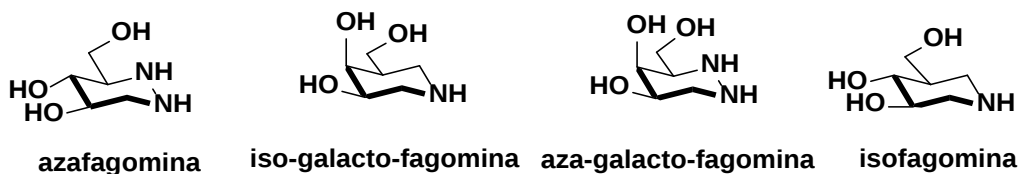


Figura II.11. Inhibidores de glicosidasas¹⁰⁷

De acuerdo con algunos reportes de la literatura se ha observado por cristalografía que análogos de galactosa que contienen nitrógeno pueden ser potentes inhibidores de GALC de ratón de tipo salvaje, por ejemplo, con aza-galacto-fagomina e iso-galacto-fagomina (**figura II.12**), se pueden observar valores de inhibición del rango nanomolar.¹⁰⁸

Debido a la naturaleza anfifílica de los sustratos naturales se especula que la adición de cadenas alquílicas extendidas puede incrementar la afinidad de unión entre GALC y el ligando, y, consecuentemente resultar en chaperonas con mejor actividad, la presencia de cadenas alquílicas también podría mejorar la selectividad enzimática y las propiedades de distribución de un fármaco potencial contra desórdenes neurológicos como la enfermedad de Krabbe por ser más lipofílico.¹⁰³

López y Bols han preparado anteriormente una serie de derivados de azafagomina que tienen como blanco a las glucosidasas, a su vez estudiaron el grado de selectividad entre la α -glucosidasa de levadura y la β -glucosidasa de almendra dulce, ellos encontraron que la cadena alquílica en el nitrógeno de la posición dos permite incrementar la selectividad inhibitoria para β -glucosidasa significativamente, con *N*-2-propil-fenil-azafagomina (**figura II.12**) resulta alrededor de 5000 veces más selectiva para β -glucosidasa que para α -glucosidasa.¹⁰⁹

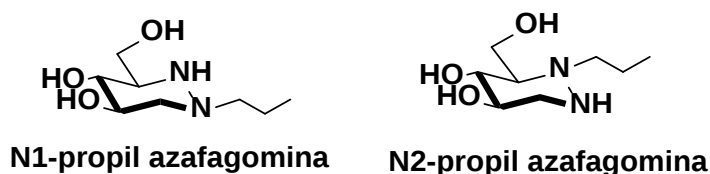


Figura II.12. Derivados propil fenil-azafagomina

Hasta ahora hay alrededor de 35 aza-azúcares naturales que actúan como inhibidores de glicosidasas, sin embargo, el aislamiento de forma pura de fuentes naturales es un trabajo muy laborioso y caro. Por lo que un número grande de rutas sintéticas para formar aza-azúcares han sido publicadas a la fecha, el desarrollo de nuevas estrategias sintéticas para la síntesis tanto de aza-azúcares naturales como no naturales de forma fácil, partiendo de material con un alto nivel de estereocontrol está siendo siempre solicitado en la química orgánica.⁹⁴ Entre los inhibidores de glicosidasas más potentes tenemos a los ejemplos de la **figura II.13**.⁹⁷

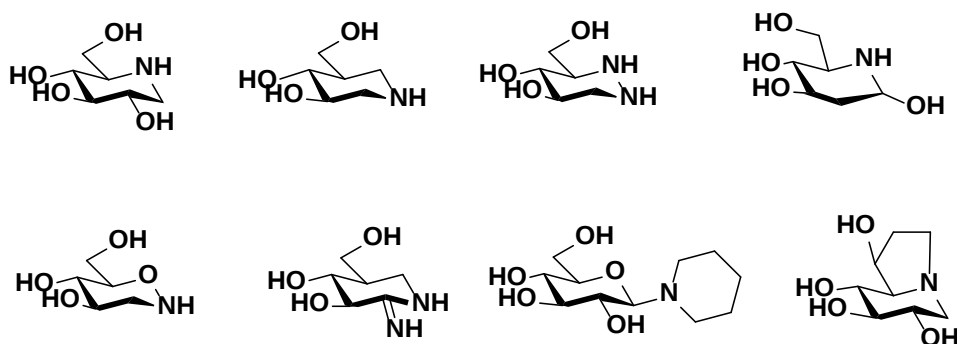


Figura II.13. Imino y aza-azúcares como potentes inhibidores de glicosidasas

Muchos de los inhibidores clásicos de glicosidasas caen en las siguientes categorías: pirrolidinas polihidroxiadas, piperidinas, o bicíclicos como indolizidinas, pirrolizidinas o nortropanos (**figura II.14**), pero el número de familias ha aumentado intensamente en las últimas décadas.¹¹⁰

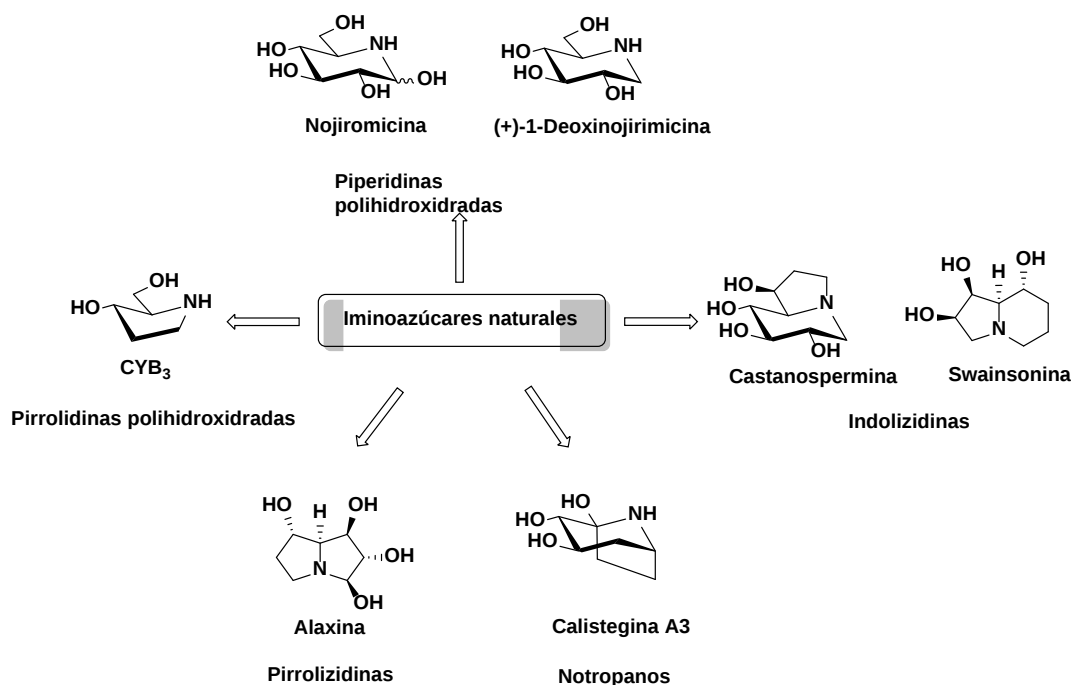


Figura II.14. Iminoazúcares naturales.⁹⁹

II.2.5. Piperidinas polihidroxiadas

Son anillos de seis miembros basados en iminoazúcares. Desde el primer aislamiento de derivados de piperidinas polihidroxiadas de productos naturales, como la nojirimicina la cual una vez aislada se descubrió que era inestable debido al grupo hidroxilo de la posición

anomérica ya que sufre el Rearreglo de Amadori (**figura II.15**). Este reordenamiento implica la deshidratación de la función hemiaminal lo cual conduce a la formación de la correspondiente imina y finalmente la hidrólisis del intermediario cetónico.¹¹¹ Por otro lado, está la desoxinojirimicina la cual con la pérdida del grupo hidroxilo se vuelve mucho más estable, y es una de los iminoazúcares más estudiados hoy en día. Muchos otros análogos sintéticos se han desarrollado usando varios enfoques (*N*-alquilación, sustitución del grupo hidroxilo, o grupos hidroxilo, adición de halógenos, etc.) con la finalidad de mejorar el espectro de actividad.¹¹²

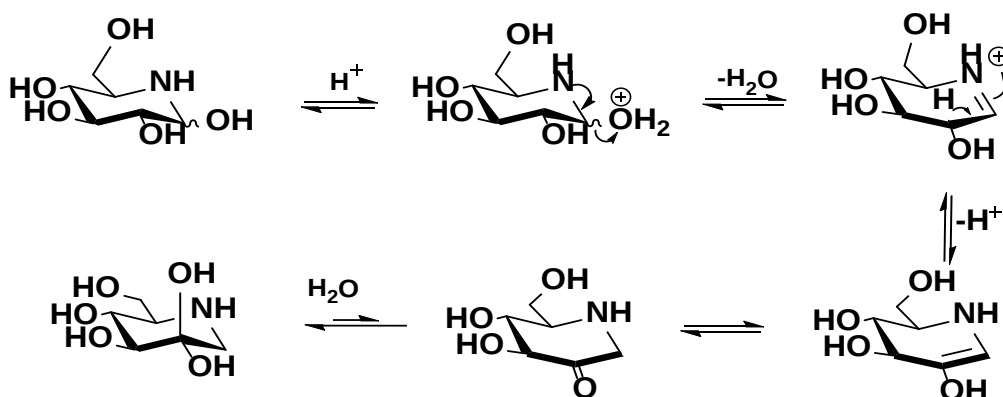


Figura II.15. Rearreglo de Amadori

Otro enfoque para la síntesis de inhibidores basados en piperidinas más potentes es incrementar la lipofilicidad usando cadenas grasas y fragmentos aromáticos como accesorios. Este postulado que favorece la interacción hidrofóbica intermolecular involucrando bolsillos hidrofóbicos del sitio activo de la enzima, podría permitir inhibidores más potentes y selectivos.¹¹⁰

II.2.6. Azafagomina

Es una hidracina polihidroxilada cíclica con la configuración *D*-gluco teniendo una estructura híbrida entre un iminoazúcar y un azaazúcar.⁹⁹ En la búsqueda de inhibidores más potentes y selectivos derivados de azafagomina, López y Bols consideraron la posibilidad de una alquilación de 1-azafagomina en la posición 2-*N* con fragmentos hidrófobos; de esta manera se pretendía favorecer el establecimiento de interacciones del inhibidor con *bolsillos hidrofóbicos* de la β -glucosidasa, y favorecer de esta manera la selectividad con respecto a la

α -glucosidasa. La posición 1-*N* fue previamente alquilada por Bols, observando que esto reduce la actividad; la alquilación de la posición pseudoendocíclica de isofagomina (equivalente a *N*-2 en azafagomina) fue realizada por Zhu y colaboradores, conduciendo a inhibidores de la β -glucocerebrosidasa en el rango nanomolar bajo.¹¹³

El paso clave en la obtención de los derivados *N*-alquilados en la posición 2-*N* fue la aminación reductiva de la azafagomina per-*O*-bencilada y acetilada en 1-*N*, con diversos aldehídos (**figura II.16**).¹¹⁰

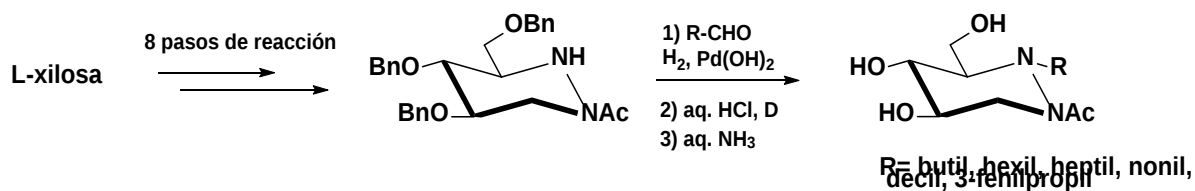


Figura II.16. Diagrama de reacción de derivados de azafagomina alquilados en *N*-2

Los derivados totalmente desprotegidos fueron evaluados como inhibidores de α -glucosidasa de levadura y β -glucosidasa de almendra, los compuestos se evaluaron a un pH de 6.8.¹¹⁴ Los datos de inhibición indican que la sustitución en la posición *N*-2 con cadenas grasas disminuye fuertemente la actividad frente α -glucosidasa, sugiriendo que este tipo de sustitución ejerce un importante impedimento estérico en la interacción enzima-inhibidor. Sin embargo, mejora fuertemente la inhibición de β -glucosidasa especialmente para el derivado *N*-(3-fenilpropil) (**figura II.17**) con un valor de inhibición $K_i=32$ nM, 10 veces más potente que la azafagomina nativa. Estos resultados son debidos probablemente a la interacción favorable de los residuos hidrofóbicos con el sitio activo de β -glucosidasa. Por lo tanto, se observa una fuerte selectividad sobre β -glucosidasa.¹¹⁰

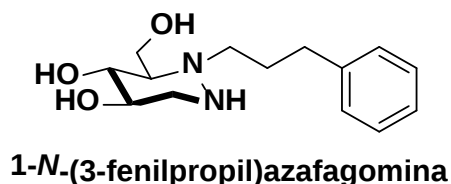


Figura II.17. Derivado de azafagomina con mejor actividad inhibitoria

II.2.7. Actividad biológica de iminoazúcares

La inhibición de glicosidasas es la actividad biológica más conocida y más estudiada de los iminoazúcares, pero presentan un campo mucho más amplio de actividades.⁹⁰

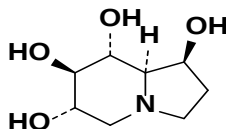


Figura II.18. Castanospermina

En las últimas tres décadas se ha demostrado que algunos inhibidores de la β -glucosidasa del retículo endoplasmático, en particular la 1-desoxinojirimicina y derivados de la castanospermina (**figura II.18**), inhiben la morfogénesis de virus envueltos.¹¹⁵ Muchos derivados de la desoxinojirimicina y de la castanospermina han demostrado reducir la viremia del virus del dengue y proteger (modelo de ratón) de dosis letales de dicho virus, así como del virus de encefalitis japonesa, virus del ébola, y virus de Marburgo. También demostraron disminución en la viremia *in vivo* en marmotas infectadas crónicamente con el virus de la hepatitis, un modelo para hepatitis B humana; además los derivados de desoxinojirimicina han demostrado buena eficacia contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).¹¹⁵ Estos estudios demuestran que las glicosidasas son unas excelentes dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos agentes antivirales.¹¹⁵

Además, los 1-desoxi-aza-azúcares son usados como agentes terapéuticos para el tratamiento de varias condiciones como el cáncer, el VIH, el virus de la hepatitis C, la diabetes, el virus de la influenza y otros desordenes metabólicos relacionados con los carbohidratos.¹¹⁶

Wu y colaboradores han descrito, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, la actividad como inmunosupresores de lactamas derivadas de iminoazúcares (**figura II.19**).⁹²

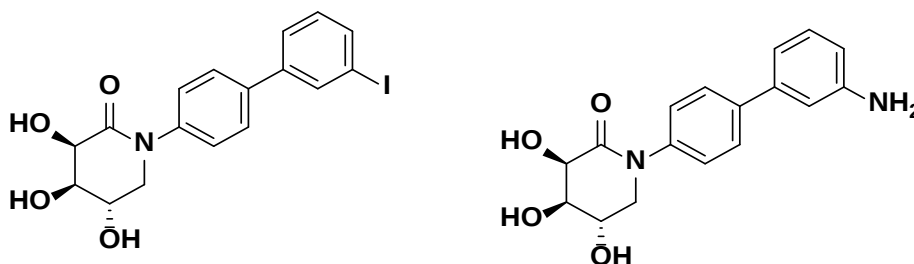


Figura II.19. Compuestos N-arilados de tipo lactamas

Numerosos imino y azúcares han mostrado actividades farmacológicas relevantes¹¹⁷, como antidiabéticos,¹¹⁸ anticancerígenos,¹¹⁹ antifúngicos,¹²⁰ antiprotozoarios¹²¹ o antivirales,¹²² entre otros. En este sentido, Sirona Biochem Corp. acaba de anunciar¹²³ el lanzamiento de un intenso programa de búsqueda de nuevos antivirales para combatir la pandemia causada por COVID-19, en el que los iminoazúcares son una de las tres categorías del estudio. Esta elección está fuertemente apoyada por el Centro de Shanghai de la Asociación Mundial de Laureados. También se ha descubierto que los iminoazúcares son eficaces contra la fibrosis quística,¹²⁴ una enfermedad autosómica recesiva que causa un daño severo en múltiples órganos, particularmente en el sistema respiratorio. Los iminoazúcares pueden actuar como correctores de la mala regulación de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR)^{125,126} una proteína de clase transportadora ABC que controla el contenido de iones y agua en las células epiteliales, o alternatively pueden reducir la respuesta inflamatoria de patógenos, como *P. aeruginosa*.¹²⁷ Más recientemente, la conjugación de iminoazúcares con sulfonamidas resultó en la inhibición de anhidrasas carbónicas humanas relevantes.¹²⁸ Sin embargo, un campo que aún permanece relativamente inexplorado en relación con los iminoazúcares es la enfermedad de Alzheimer. El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa devastadora, considerada hoy en día la forma más prevalente de demencia, y representa aproximadamente el 70% del total de casos.¹²⁹ Provoca un severo deterioro de la funcionalidad cognitiva, neurodegeneración e incluso síntomas parkinsonianos, llevando al paciente a una completa dependencia incluso para la realización de las tareas diarias.¹³⁰ Según el Informe mundial sobre el Alzheimer de 2019, se han diagnosticado aproximadamente 50 millones de personas en todo el mundo.¹³¹

II.2.8. Fármacos derivados de iminoazúcares

Como se ha comentado previamente, actualmente se comercializan dos fármacos que derivan de iminoazúcares. Por un lado, la *N*-butil-desoxinojirimicina (NB-Desoxinojirimicina) se ha aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. Se sabe que NB-DNJ imita al estado de transición de tipo oxocarbonio para la hidrólisis del sustrato de la α -glucosidasa I y las relaciones estructura-actividad ayudan a definir el epítipo de reconocimiento para la enzima.⁹⁵

La presencia de una cadena *N*-alquilada es necesaria para la inhibición de la ceramida glucosiltransferasa y un incremento en la longitud de la cadena alquílica proporciona un modesto incremento en la potencia inhibitoria. Por otro lado, la inhibición de α -glicosidasa, es independiente de la cadena *N*-alquilada y de cambios en la longitud de esta. Los estudios estructura-actividad sugieren que el hidroxilo de la posición C-3 es esencial para la inhibición de ambas enzimas, por otro lado cambios en los hidroxilos de C1 y C6 (**figura II.20**) permiten modificar la pérdida de la inhibición de las transferasas.⁹⁵

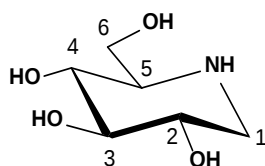


Figura II.20. Desoxinojirimicina numerada

Los derivados sintéticos de la 1-desoxinojirimicina, así como la *N*-hidroxietil-desoxinojirimicina (Miglitol o Glyset) y *N*-butil-desoxinojirimicina (Zavesca) están totalmente aprobados para el tratamiento de la diabetes no insulino dependiente y para la enfermedad de Gaucher respectivamente.⁹⁴

La producción a escala industrial de desoxinojirimicina mediante cultivos bacterianos hizo posible la introducción al mercado de Glyset® y Zavesca®.⁹⁰

Los derivados de desoxinojirimicina *N*-sustituida son una importante clase de moléculas en química medicinal y en el descubrimiento de fármacos, es comercializada como Miglitol un agente antidiabético (en diabetes tipo 2) y actúa como un inhibidor de amplio espectro de muchas glicosidasas intestinales (maltasa, sucrasa y lactasa). La *N*-butil-desoxinojirimicina (Zavesca) fue desarrollado como un inhibidor de la glucoceramida sintasa y es utilizado en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal como la enfermedad de Gaucher. Los sucesos terapéuticos de estas moléculas sirven como inspiración para aumentar la búsqueda y mejorar los reportes sobre derivados de desoxinojirimicina *N*-sustituidos que han aparecido en los últimos años.¹³²

II.2.9. Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia en nuestros días, sobre todo en personas de edad avanzada y está asociada con la pérdida progresiva de la memoria, dificultad en la capacidad cognitiva y dificultad para reconocer. Se estima que 46 millones de personas padecían esta enfermedad para el año 2015 y que el número aumentara al doble dentro de unos 20 años estimando unos 131.5 millones de personas con Alzheimer para el año 2050.¹³³ Otro aspecto preocupante es que, aunque el Alzheimer se ha asociado clásicamente a personas mayores, la edad media de los pacientes ha disminuido significativamente.¹³⁴ Desde el punto de vista fisiopatológico, la enfermedad de Alzheimer es una de las enfermedades más complejas en la actualidad, cuya etiología multifactorial ni siquiera se comprende del todo. Esto dificulta enormemente la búsqueda de un tratamiento. Los sellos más reconocidos son¹³⁵ el depósito de placas amiloides tóxicas, ovillos neurofibrilares (a través de la hiperfosforilación de las proteínas tau) y niveles bajos del neurotransmisor acetilcolina, que se asocia con el deterioro cognitivo.

Al estudiar la demencia, es muy importante comprender la base de los antecedentes neuropatológicos. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer, se sabe que la acumulación de estructuras anormales como placas seniles y ovillos neurofibrilares es un sello distintivo. Si la enfermedad presenta solo la hiperfosforilación de la proteína tau, el grado y la distribución del depósito de esta proteína pueden estar asociados con síntomas clínicos. Sin embargo, la EA también se acompaña de depósito de placas β -amiloide e incluso atrofia, entre otras.¹³⁶

Actualmente no existe ningún fármaco que pueda curar el Alzheimer, y los tratamientos son meramente paliativos. Los principales fármacos dirigidos a esta enfermedad son inhibidores de la acetilcolinesterasa como la galantamina, el mejor fármaco de este tipo es el donepezilo, sin embargo, este solo revierte los síntomas por un corto tiempo,⁸⁵ por lo que es necesario encontrar fármacos que se enfoquen en mejorar estos efectos.

En años recientes se ha acumulado información que indica que la mejor estrategia de tratamiento podría incorporar un enfoque multifactorial, enfocado en enfermedades de múltiples facetas, empleando ligandos multidiana dirigidos,¹³⁷ es decir una molécula con varios farmacóforos que interaccionan con distintas dianas terapéuticas, esto podría ser muy

efectivo en el tratamiento de enfermedades complejas, ya que tendría la habilidad de interactuar con múltiples blancos relacionados con dicha enfermedad.¹³⁸

El donepezilo, la rivastigmina, la galantamina, y la memantina, están aprobados por la FDA para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Con excepción de la memantina, la acción de estos fármacos es la inhibición de la acetilcolinesterasa con incremento consecutivo de las concentraciones cerebrales de acetilcolina. Estos compuestos solo tienen una eficacia moderada y a menudo confieren escaso o nulo beneficio en las etapas tardías de la enfermedad; se relacionan con una mejoría en las funciones cognitivas del paciente.¹³⁹

En relación con los iminoazúcares, se descubrió recientemente que ZavescaVR reduce la producción de placas β -amiloide en un modelo celular.¹⁴⁰ Compain y colaboradores analizaron la inhibición de la colinesterasa de una serie de iminoazúcares con diferentes tipos de sustituyentes y estereoquímica.¹⁴¹

II.2.10. Selenio y derivados

El selenio es un nutriente mineral esencial con múltiples roles en el crecimiento y funcionamiento de las células animales; este metaloide es conocido por proveer protección eliminando el daño celular inducido por radicales libres y otras especies pro-oxidantes, debido a su potente acción antioxidante. En los humanos, los niveles de selenio disminuyen con la edad y existen datos considerables que demuestran que el selenio podría jugar considerables roles en la progresión del Alzheimer.⁸⁵ Por esto ha crecido el interés en este microelemento en relación con desórdenes neurológicos.

El ebselen es, una selenamida cíclica y un ejemplo clásico de miméticos de la glutatión peroxidasa, el cual protege a las células catalizando la reducción de peróxidos con glutatión, también ha demostrado ser un sustrato para la tioredoxina reductasa humana. Un reciente estudio demostró que el ebselen podría ser usado como un potencial agente anti-Alzheimer basados en su habilidad para inhibir la fosforilación de la proteína tau inducida por hierro.⁸⁸ El efecto farmacológico del ebselen incluye actividad antiinflamatoria y antioxidante, los cuales están ampliamente relacionados con la etiología de la enfermedad de Alzheimer.⁸⁵

II.3. Objetivos

- Sintetizar diversos iminoazúcares híbridos constituidos por dos farmacóforos bien diferenciados: por un lado, un residuo de 1-desoxinojirimicina, que garantice la inhibición de glicosidasas, y, por otro lado, un fragmento antioxidante, de tipo polifenólico (**figura II.21**), que contribuya a reducir el estrés oxidativo inherente a enfermedades como la diabetes, o enfermedades de almacenamiento lisosomal, a su vez, ya que el iminoazúcar puede imitar al catión del sustrato natural de las colinesterasa también fueron sintetizados como posibles moléculas contra Alzheimer.

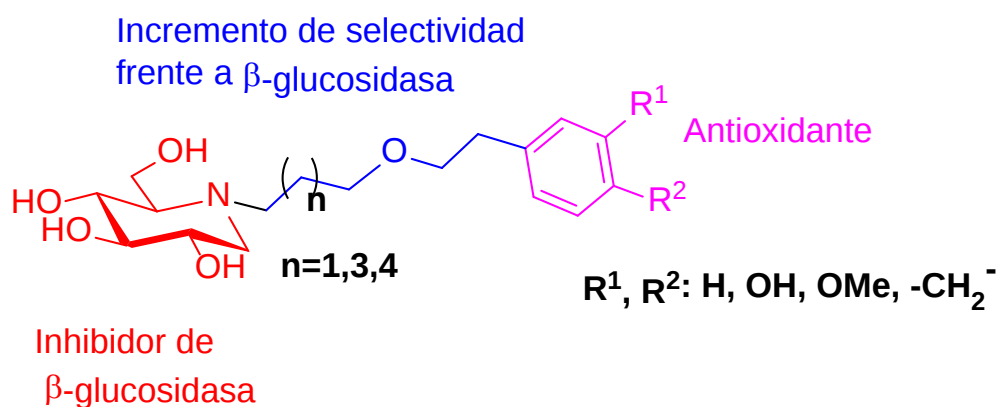


Figura II.21. Diagrama general de iminoazúcares con porción fenólica

- Sintetizar otra familia de iminoazúcares híbridos que presenten por un lado a la 1-desoxinojirimicina y por otro un linker con carácter antioxidante y que además actúe como un fuerte donador de puentes de hidrogeno, (urea, tiourea y selenourea); de esta manera se analizará la influencia del átomo de calcógeno en las propiedades biológicas analizadas (cáncer o Alzheimer). Se incluirá un extremo aromático que pueda establecer interacciones hidrofóbicas con ciertas regiones de los receptores biológicos (**figura II.22**),

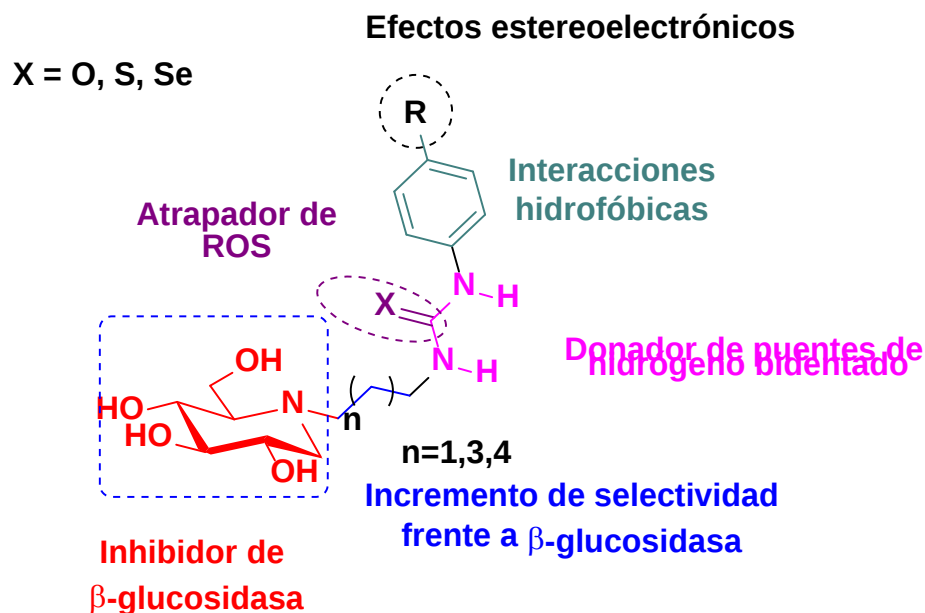


Figura II.22. Modelo de compuestos de tipo selenourea, urea y tiourea

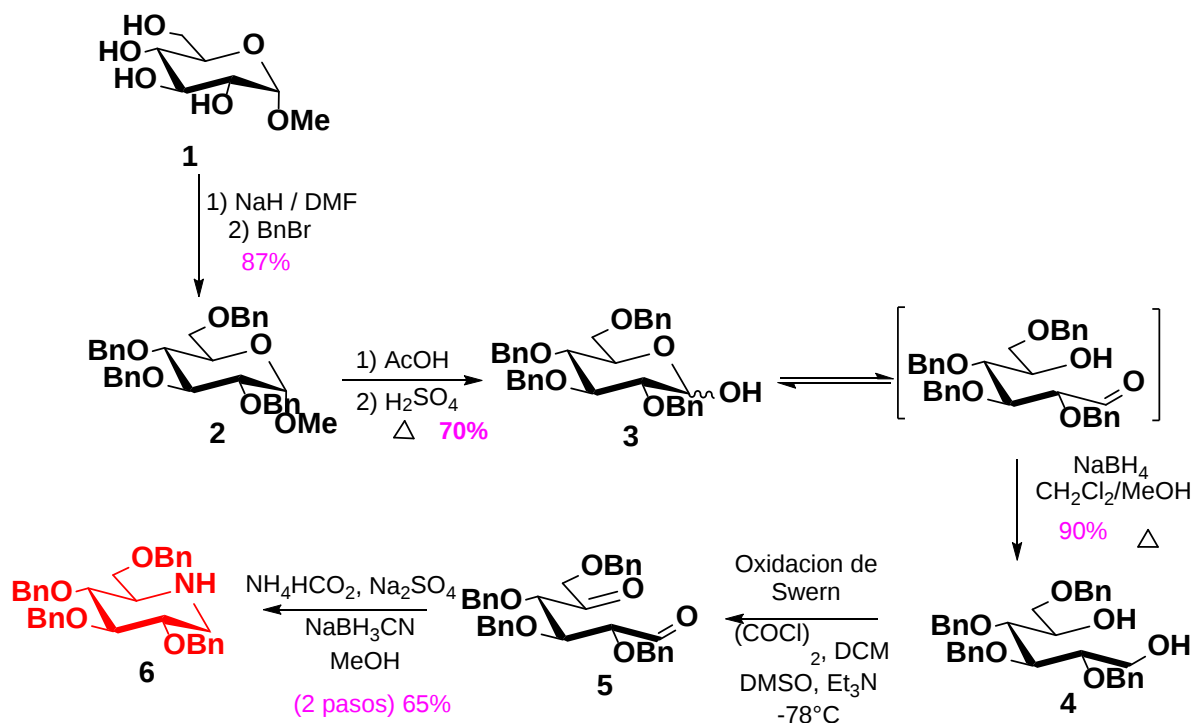
- Evaluación de la actividad biológica de los derivados sintetizados en cuanto a su posible inhibición de enzimas de interés terapéutico (glicosidasas, AChE, BuChE), así como actividad antiproliferativa frente a un panel de células tumorales de tumores sólidos humanos.
- Establecer relaciones estructura-actividad, que muestren la influencia de las modificaciones estructurales en la actividad biológica: número de átomos de nitrógenos endocíclicos en el fragmento del iminoazúcar, tipo y longitud del espaciador, tipo y posición de los sustituyentes en el residuo aromático.
- Preparación de híbridos de iminoazúcares y ebselen/donepezilo como potenciales inhibidores de AChE, y por consiguiente, potenciales agentes anti-Alzheimer.

II.4. Discusión de Resultados y análisis espectroscópico

Como se ha comentado en el resumen de objetivos anterior, en la presente sección se persigue la preparación de híbridos de la 1-DNJ con diversos fragmentos de tipo fenólico, ureas/tioureas/selenoureas, benzoselenazolona o indanona, para la obtención de nuevos derivados bioactivos con actividad antiproliferativa o anti-Alzheimer.

II.4.1. Obtención de 1-desoxinojirimicina per-*O*-bencilada

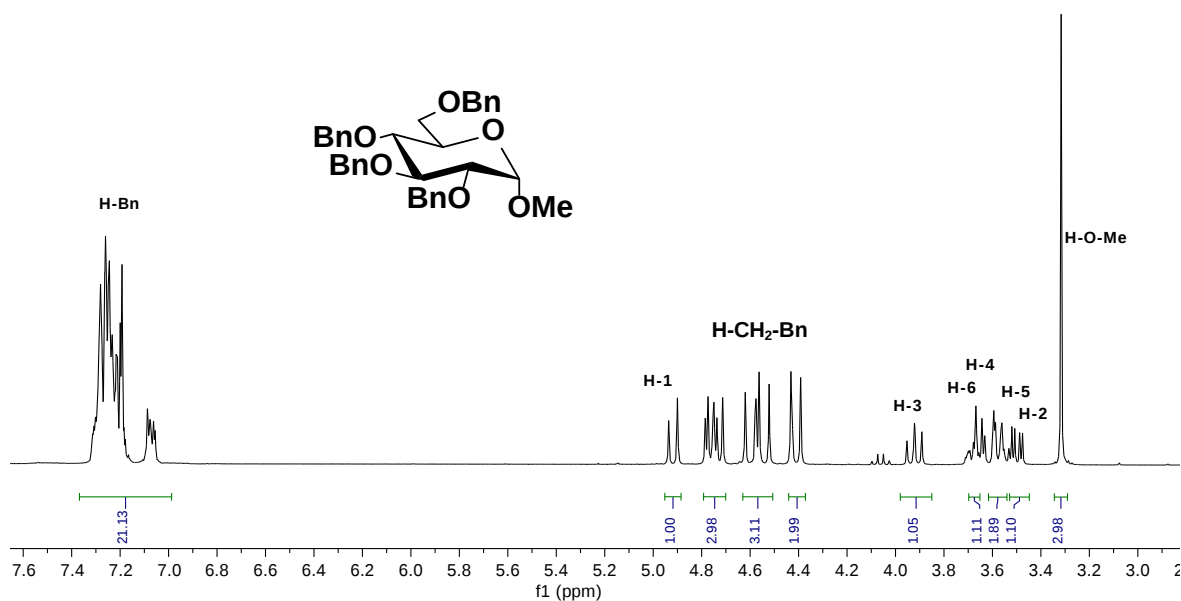
La materia prima de partida de la mayoría de los derivados propuestos en la presente sección es la 1-DNJ adecuadamente protegida en sus grupos hidroxilos (compuesto **6**); para la síntesis de esta es necesario llevar a cabo 5 pasos de reacción a partir del metil α -D-glucopiranosido comercial (**esquema II.1**), con un 36% de rendimiento global. Dichos pasos se tratarán con más detalle a continuación.



Esquema II.1. Síntesis de 1-desoxinojirimicina (**6**)

II.4.1.1. Reacción de protección del α -D-glucopiranosido

En la primera etapa del proceso se llevó a cabo la protección de los grupos hidroxilos del glucósido comercial **1** en forma de éteres bencílicos. Para ello se empleó bromuro de bencilo, e hidruro de sodio como base en DMF. La reacción transcurrió a temperatura ambiente durante 15 horas; a continuación, la reacción fue tratada y purificada en columna cromatográfica, dando lugar al compuesto **2** con un rendimiento del 87%. A continuación, se muestra el espectro de ^1H -RMN de **2** (**espectro II.1**); en dicho espectro destaca la señal simple en 3.31 ppm, que corresponde al grupo metoxilo de la posición anomérica. Entre 3.5-4.0 ppm resuenan las señales H-2 a H-6 del monosacárido, mientras que el protón anomérico (H-1), lo hace a aproximadamente 4.9 ppm; esta suele ser la señal más desapantallada de un carbohidrato, dado que el carbono anomérico es el único unido a dos átomos de oxígeno, lo cual provoca un fuerte desapantallamiento en el protón unido a él. Por otro lado, la constante de acoplamiento $J_{1,2} = 3.8$ Hz muestra claramente que se trata del anómero α . Entre 4.39-4.78 ppm resuenan los grupos metilenos de los bencilos, y entre 7.04-7.31 ppm, los protones aromáticos de los grupos protectores.

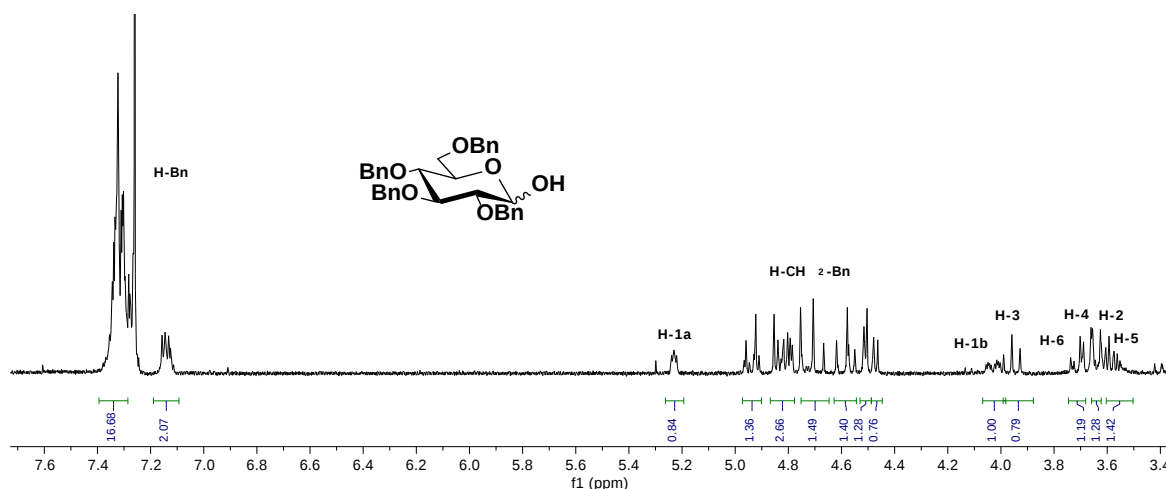


Espectro II.1. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) del metil α -D-glucopiranosido bencilado (**2**)

II.4.1.2. Reacción de hidrolisis del metilglicósido

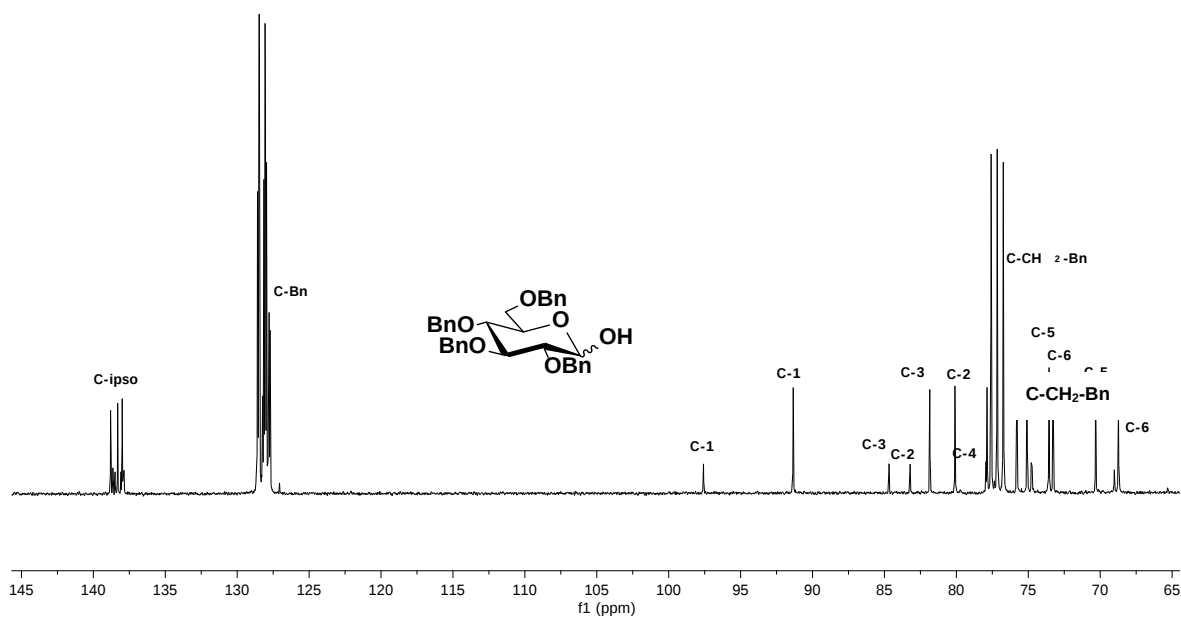
Una vez protegida la molécula se procedió a hidrolizar en medio ácido (AcOH - H_2SO_4) el glicósido **2**, para obtener el azúcar reductor **3**. Tras el procesado de la reacción y

la purificación en columna, el producto **3** fue obtenido con un 70% de rendimiento. En su espectro de ^1H -RMN (**espectro II.2**) se observa que, en comparación con el compuesto **2**, ha desaparecido la señal del metoxilo, confirmando que ha tenido lugar la hidrólisis del enlace glicosídico. Por ello, el compuesto **3** es un azúcar reductor, y a consecuencia del proceso de mutarrotación, coexistirán en equilibrio los dos anómeros (α y β), cuyas señales se observan en el espectro. La señal del protón H-1 del anómero α se encuentra desapantallada en torno a 1 ppm con respecto al anómero β ; ello es debido a que, en este último, dicho protón se encuentra en disposición axial, y por consiguiente, es apantallado por los enlaces C-H del carbohidrato. En la región comprendida entre 4.46-4.96 ppm se conservan los protones de los grupos metilenos de los grupos bencilos, y entre 7.09-7.39 ppm, los protones aromáticos de los mismos.



Espectro II.2. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de α,β -D-glucopiranosido bencilado (**3**)

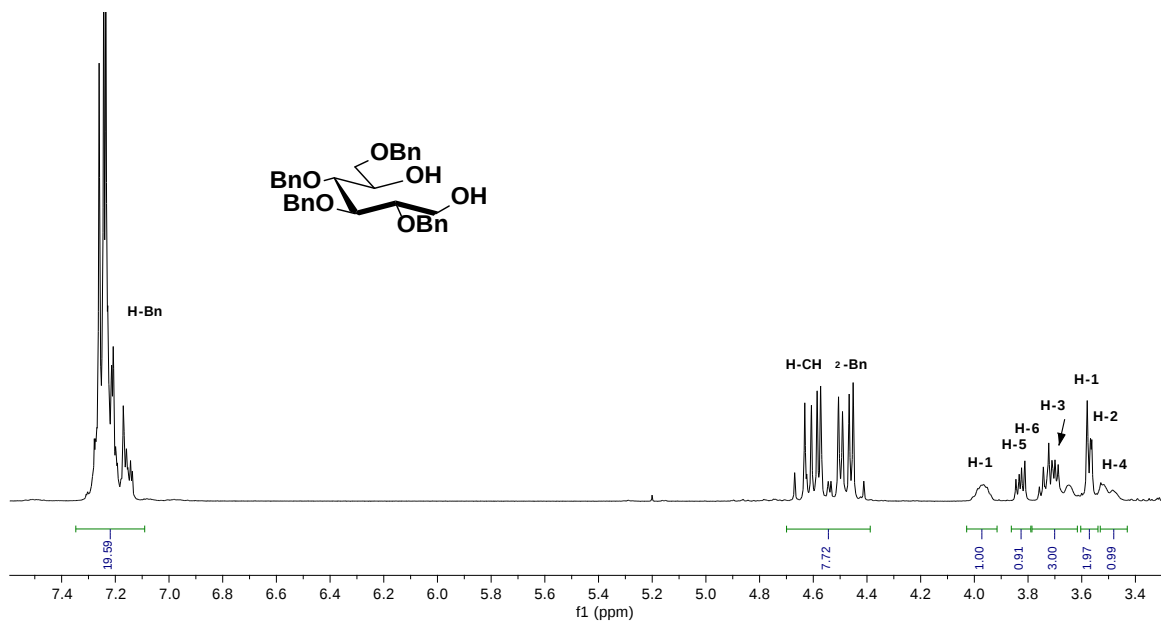
El espectro de RMN de ^{13}C muestra una información análoga, observándose las señales para ambos anómeros (**espectro II.3**)



Espectro II.3. Espectro de ^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de α,β -D-glucopiranosido bencilado (3)

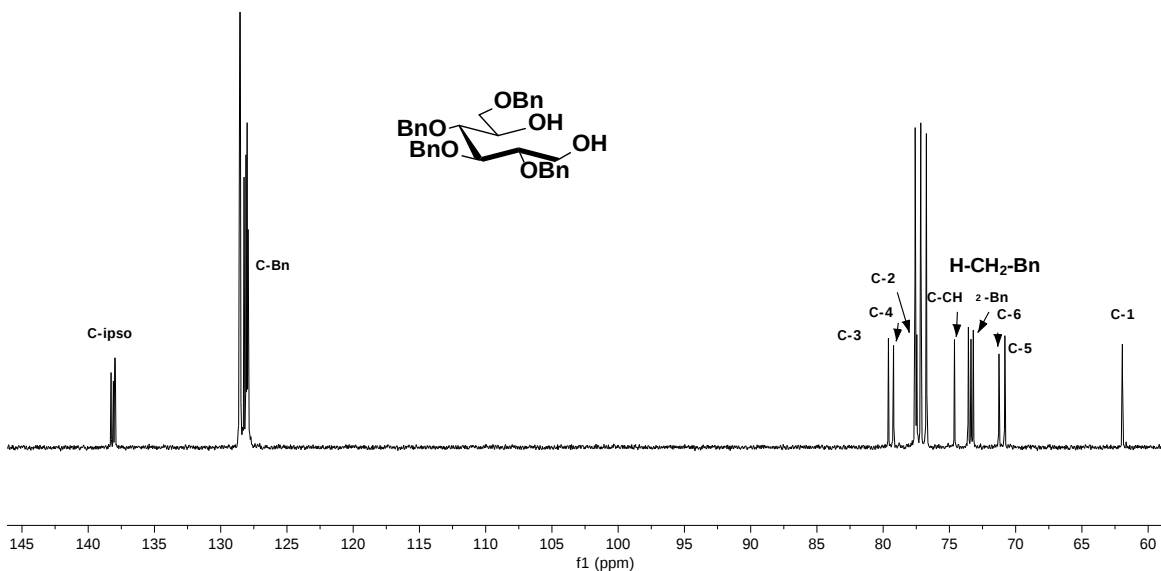
II.4.1.3. Reacción de reducción del hemiacetal

Debido a que en el paso anterior se llevó a cabo la hidrólisis del glicósido, se generó un hemiacetal, cuyo aldehído latente puede reducirse. Para esto se intentó en primer lugar una reducción con LiAlH_4 como agente reductor, pero no se observó ningún cambio en la reacción, a pesar de modificar los equivalentes y las condiciones experimentales. Por ello se decidió cambiar el agente reductor por NaBH_4 , en una mezcla DCM-MeOH a reflujo durante 15 horas. En estas condiciones sí se obtuvo el glucitol **4** con un rendimiento del 90% tras purificación cromatográfica. Como consecuencia del proceso de reducción, se ha transformado el azúcar reductor en un alditol (poliol). De esta manera, el compuesto resultante **4** ya no existe en forma de dos anómeros. En el espectro de ^1H -RMN (**espectro II.4**) puede comprobarse que las constantes de acoplamiento $J_{2,3}$, $J_{3,4}$, $J_{4,5}$ ya no muestran valores elevados (en torno a 8-9 Hz), característicos de la disposición antiperiplanar de dichos protones en la silla $^4\text{C}_1$ de los derivados de glucosa.



Espectro II.4. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) del diol 4

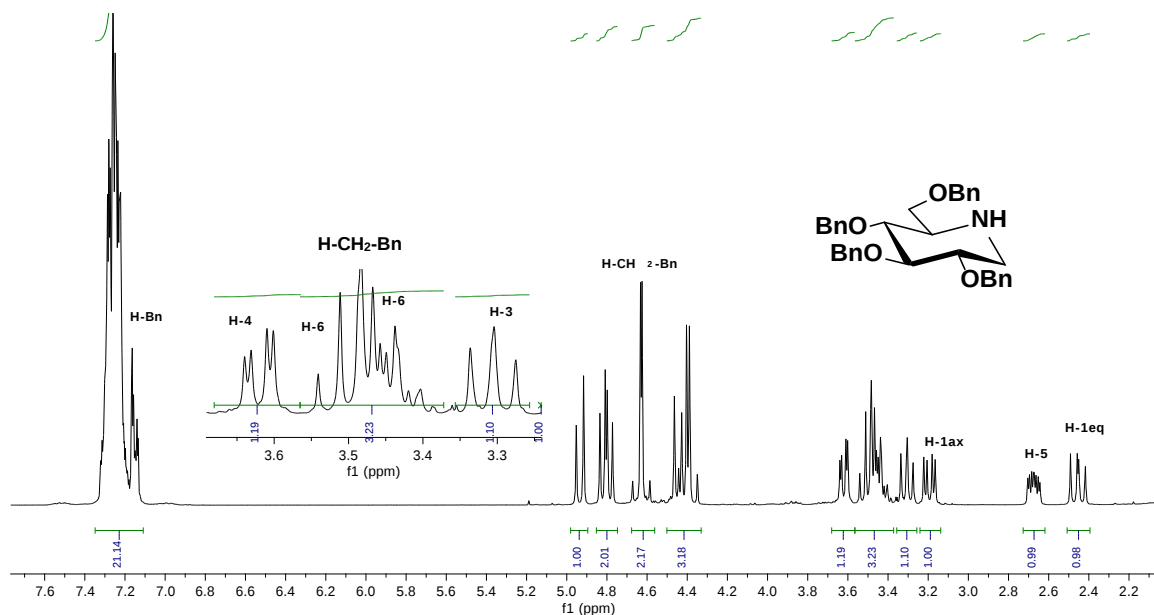
Por otro lado, el espectro de ^{13}C -RMN (**espectro II.5**) muestra claramente la desaparición de los carbonos anoméricos en torno a 90 ppm, y la transformación de C-1 en un carbono de tipo hidroximetilo, con un desplazamiento químico en torno a 60 ppm.



Espectro II.5. Espectro de ^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del diol 4

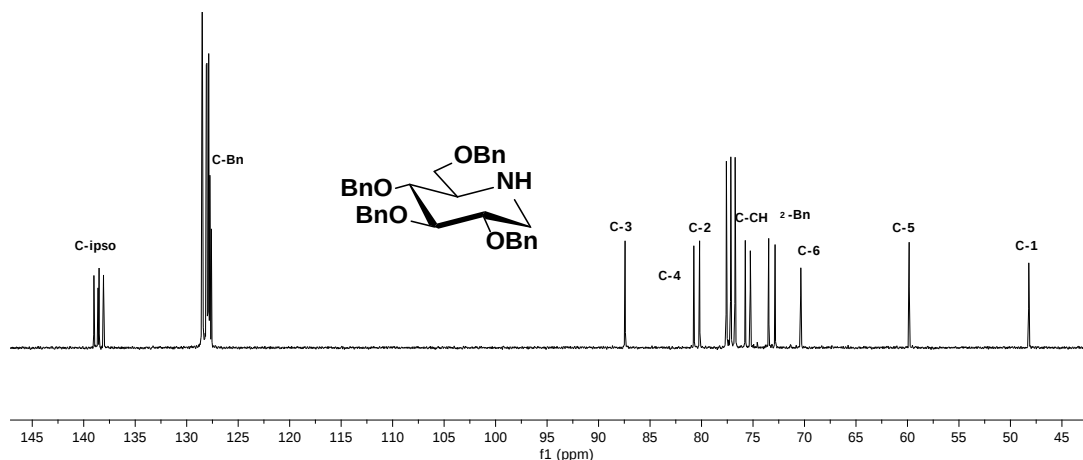
II.4.1.4. Oxidación de Swern y doble aminación reductiva

Una vez obtenido el glucitol **4** se procedió a transformar los hidroxilos desprotegidos de **4** en el derivado dialdehídico **5**, mediante la oxidación de Swern. El producto generado durante la oxidación es inestable, por lo que es necesario realizar la aminación reductiva *in situ*, sin purificación de **5**. Para la oxidación de Swern se utilizó cloruro de oxalilo, DMSO y Et₃N en DCM; una vez realizada la reacción, se procedió a intentar la aminación reductiva; para lo cual se intentó emplear acetato de amonio, pero la reacción no procedió. La transformación ocurrió de manera exitosa usando en su lugar formiato de amonio, como fuente de nitrógeno y NaBH₃CN como agente reductor, dando lugar a la 1-desoxinojirimicina bencilada (**6**) como un aceite amarillo, en un rendimiento del 65%, tras purificación cromatográfica. En el espectro de ¹H RMN (**espectro II.6**) en 2.40 ppm se observa al protón anomérico ecuatorial, como un doble de dobles. Hacia frecuencias altas en 2.70 ppm como una señal múltiple al protón de C-5; los cuales se encuentran más apantallados que en el espectro del diol **4** debido a la ausencia de oxígenos adyacentes, y a la cercanía al átomo de nitrógeno. Estas dos señales son indicativas de la formación del iminoazúcar, Alrededor de 3.20 ppm como una señal doble de dobles se encuentra el protón anomérico axial.



Espectro II.6. Espectro de ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) de 1-desoxinojirimicina per-O-bencilada (**6**)

Por otro lado, en el espectro de carbono (**espectro II.7**), se observa a frecuencias bajas por 47.0 ppm al carbono anomérico, seguido por el carbono 5 sobre 50.0 ppm. Estas dos señales confirman la formación del iminoazúcar al apantallarse unas 15.0 ppm con relación a las señales del compuesto **4**.



Espectro II.7. Espectro de ^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de 1-desoxinojirimicina per-*O*-bencilada (**6**)

II.4.2. Preparación de fragmentos para alquilación del iminoazúcar

Una vez obtenido el iminoazúcar adecuadamente protegido, se procedió a la preparación de las fracciones que se unieron a dicho azúcar; para ello se emplearon las siguientes materias primas (**figura II.23**).

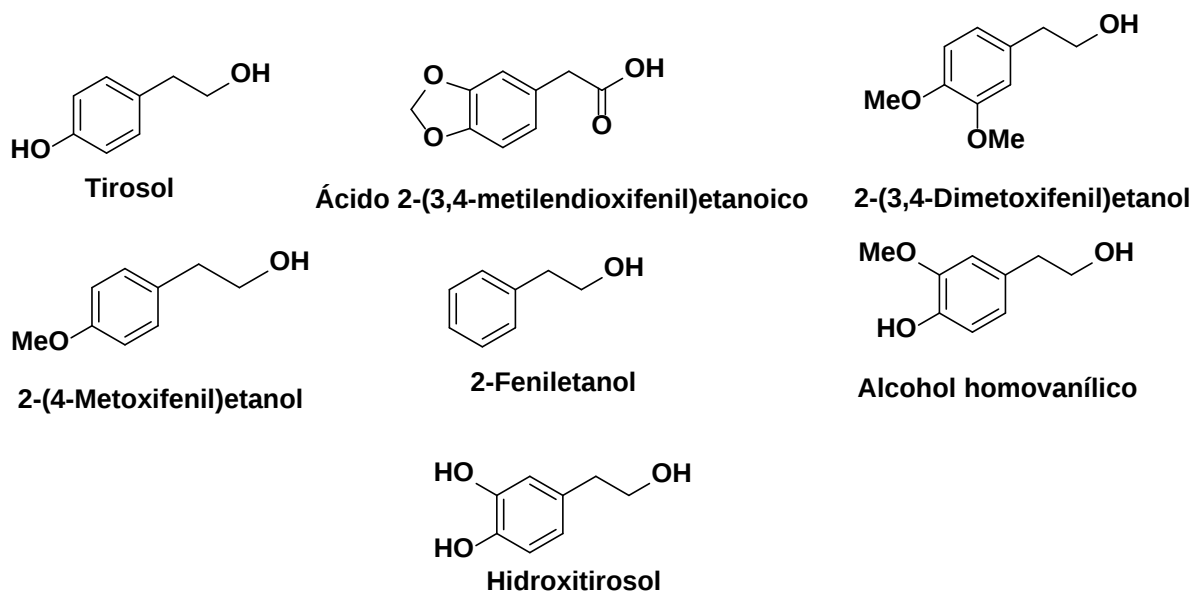
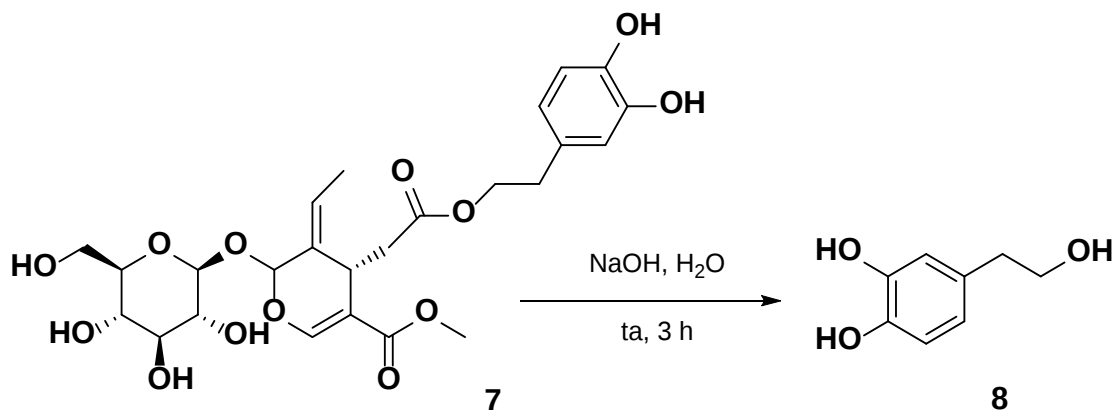


Figura II.23. Materias primas empleadas para la síntesis de nuevos iminoazúcares

Se planteó la incorporación de fragmentos fenólicos al iminoazúcar a través de un espaciador; por un lado, el fragmento de anillo aromático puede establecer interacciones hidrofóbicas con ciertas regiones de las enzimas que se pretende inhibir, y por otro, los hidroxilos fenólicos pueden proporcionar protección antioxidante frente al estrés oxidativo. Se emplearon fragmentos con hidroxilos libres, o bien con éteres metílicos, que pueden ser hidrolizados *in vivo* a través de mono- y dioxigenasas.¹⁴² Las estructuras mostradas en la **figura II.23** se enlazarán al iminoazúcar protegido **6** a través de un espaciador hidrocarbonado. Entre ellas destaca espacialmente hidroxitirosol (**8**) (HT o 2-(3',4'-dihidroxifenil)etanol), responsable de algunas de las numerosas propiedades benéficas del aceite de oliva y presente en el olivo en la forma del glucósido oleuropeína (**7**); Gran parte de sus propiedades biológicas se deben a la presencia de la función catecol (*o*-dihidroxibenceno).

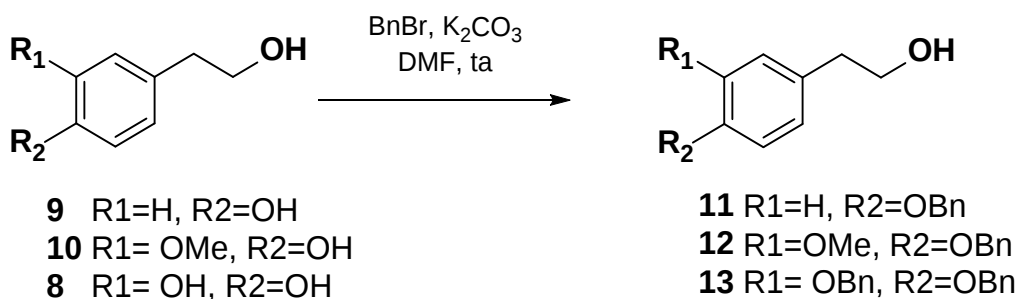
El HT fue obtenido en esta Tesis Doctoral a partir de un extracto de hoja de olivo comercial, el cual contiene entre un 25% y 40% de oleuropeína (**7**); un glicósido secoiridoide especialmente abundante en la hoja del olivo. Para ello la oleuropeína se sometió a una reacción de hidrólisis en medio básico para dar el hidroxitirosol (**8**) (**esquema II.2**), junto con otros subproductos.



Esquema II.2. Obtención de hidroxitirosol (**8**)

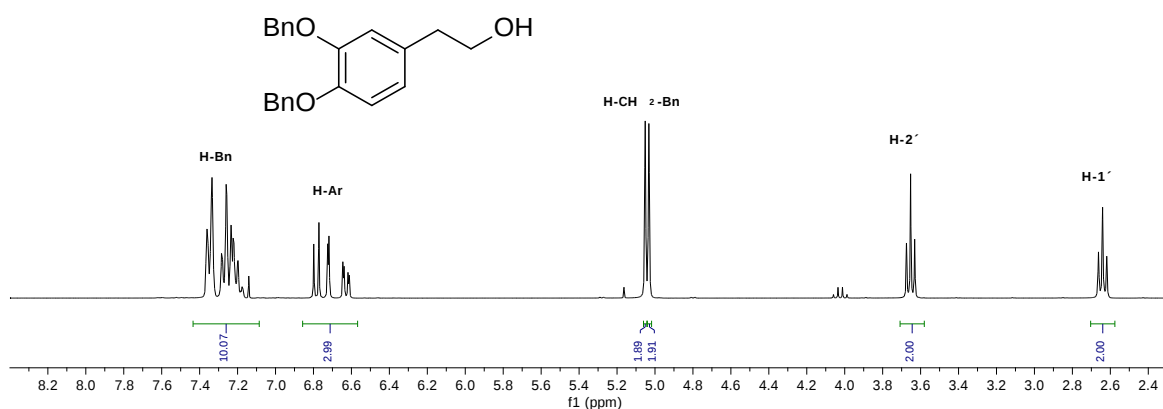
La primera etapa para la síntesis de los derivados fenólicos; fue la protección quimioselectiva de los hidroxilos fenólicos, utilizando bromuro de bencilo como agente protector y carbonato de potasio como base en DMF; solo fue necesario proteger bajo estas condiciones al tirosol (**9**), al alcohol homovanílico (**10**) y al hidroxitirosol (**8**) (**esquema II.3**).

Dicho procedimiento puede realizarse debido a la diferencia de acidez entre los hidroxilos fenólicos ($pK_a \approx 10$) y los hidroxilos alquílicos ($pK_a \approx 16$).

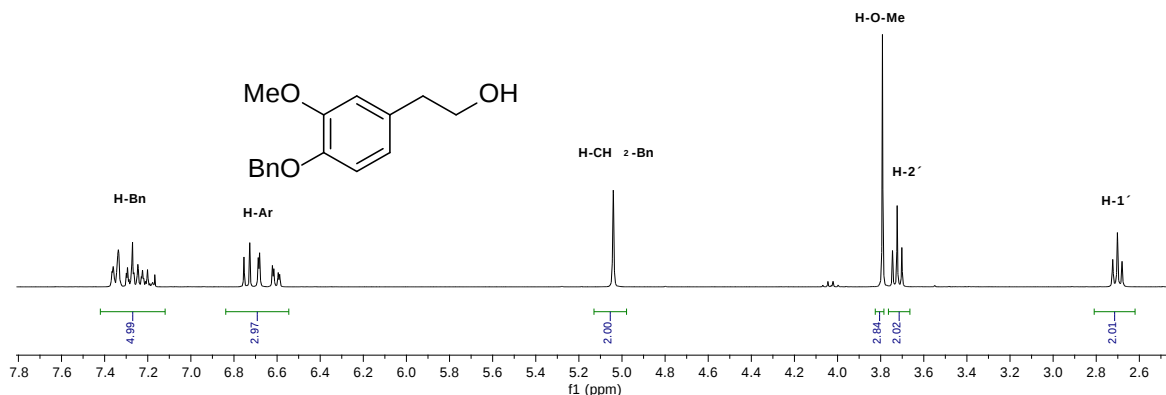


Esquema II.3. Protección quimioselectiva del tirosol (**9**), alcohol homovanílico (**10**) e hidroxitirosol (**8**)

A continuación, se puede observar el espectro de los derivados bencilados del HT (**13**) (**espectro II.8**) y del alcohol homovanílico (**12**) (**espectro II.9**), en los cuales hay dos señales triples correspondientes a la cadena unida al anillo aromático, uno más desplazado a frecuencias altas que el otro. En el caso del alcohol homovanílico se observa una señal simple en 3.79 ppm correspondiente al metilo del grupo metoxilo del anillo aromático. A frecuencias altas sobre 5.00 ppm se encuentra la señal de los CH₂ de bencilo, y en la zona de aromáticos se encuentran dos grupos de señales, uno entre 6.60 ppm y 6.80 ppm el cual corresponde a los protones del anillo aromático del HT o del alcohol homovanílico y posteriormente se encuentran entre 7.10 ppm y 7.40 ppm los protones bencílicos.

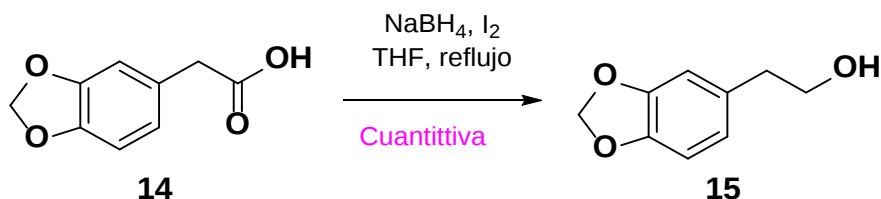


Espectro II.8. Espectro de ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) de HT bencilado (**13**)



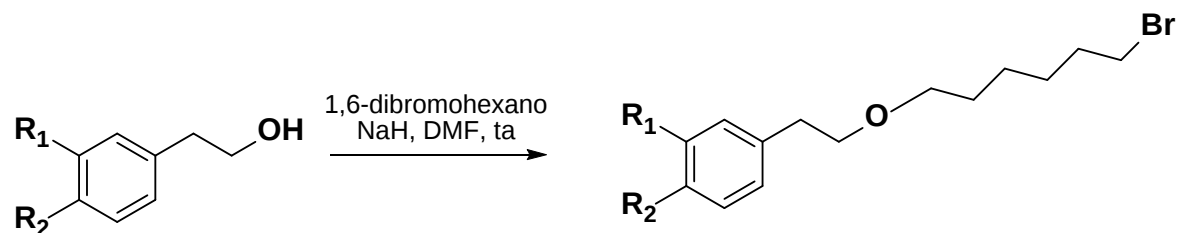
Espectro II.9. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de alcohol homovanílico bencilado (**12**)

En el caso del ácido 2-(3,4-metilendioxfenil)etanoico (**14**) fue necesario reducir el carbonilo para obtener el alcohol correspondiente (**esquema II.4**). Para esto se realizó una reacción de reducción utilizando NaBH_4 y yodo en THF a reflujo durante 24 horas; bajo estas condiciones se genera BH_3 *in situ*, que reduce al grupo carboxilo. La reacción fue tratada y purificada en cromatografía en columna, obteniendo un rendimiento cuantitativo.



Esquema II.4. Reacción de reducción del ácido 2-(3,4-metilendioxfenil) etanoico (**14**).

Una vez protegidos o reducidos los compuestos, se sometieron a una síntesis de Williamson empleando un exceso de 1,6-dibromohexano para las 7 materias primas (**esquema II.5**); utilizando hidruro de sodio como base en DMF a temperatura ambiente durante 5 horas; las reacciones fueron tratadas y purificadas mediante cromatografía en columna, obteniéndose rendimientos de buenos a moderados, para todos los compuestos preparados, los cuales se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas.

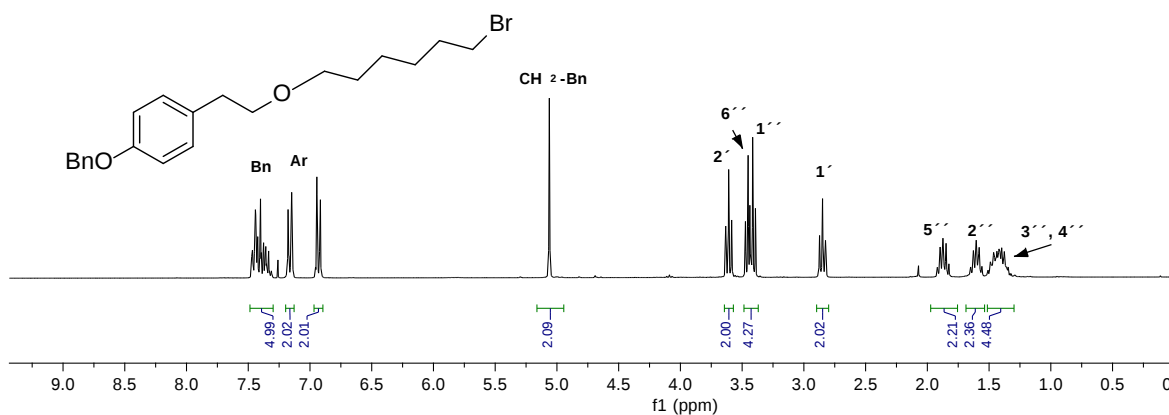


- 11** $R_1=H, R_2=OBn$
12 $R_1=OMe, R_2=OBn$
15 $R_1=CH_2OCH_2=R_2$
16 $R_1=H, R_2=H$
17 $R_1=H, R_2=OMe$
18 $R_1=OMe, R_2=OMe$
13 $R_1=OBn, R_2=OBn$

- 19** $R_1=H, R_2=OBn$
20 $R_1=OMe, R_2=OBn$
21 $R_1=CH_2OCH_2=R_2$
22 $R_1=H, R_2=H$
23 $R_1=H, R_2=OMe$
24 $R_1=OMe, R_2=OMe$
25 $R_1=OBn, R_2=OBn$

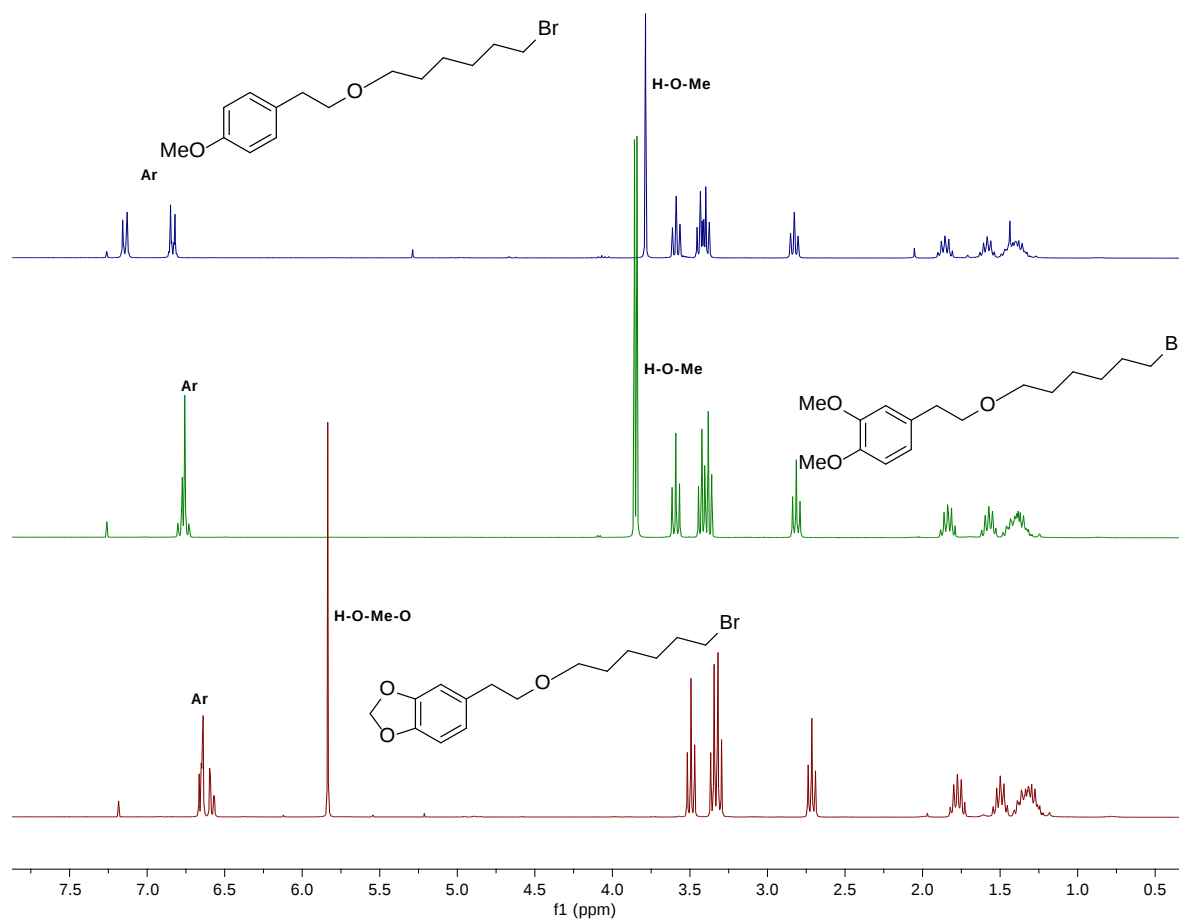
Esquema II.5. Reacción de alquilación de materias primas

En el espectro de 1H RMN del derivado de tirosol (**19**), se observa a frecuencias bajas entre 1.29 ppm y 1.96 ppm, los protones de los carbonos intermedios de la cadena alquílica, sobre 3.00 ppm, se encuentra una señal triple correspondiente a los protones del carbono unido al anillo aromático. Entre 3.36 ppm y 3.50 ppm, se pueden ver dos señales triples que se asignaron a los protones de los extremos de la cadena alquílica de bromo terminal. En 3.61 ppm, se puede ver otra señal triple, la cual corresponde a los protones del carbono unido al oxígeno de la cadena original (**espectro II.10**).



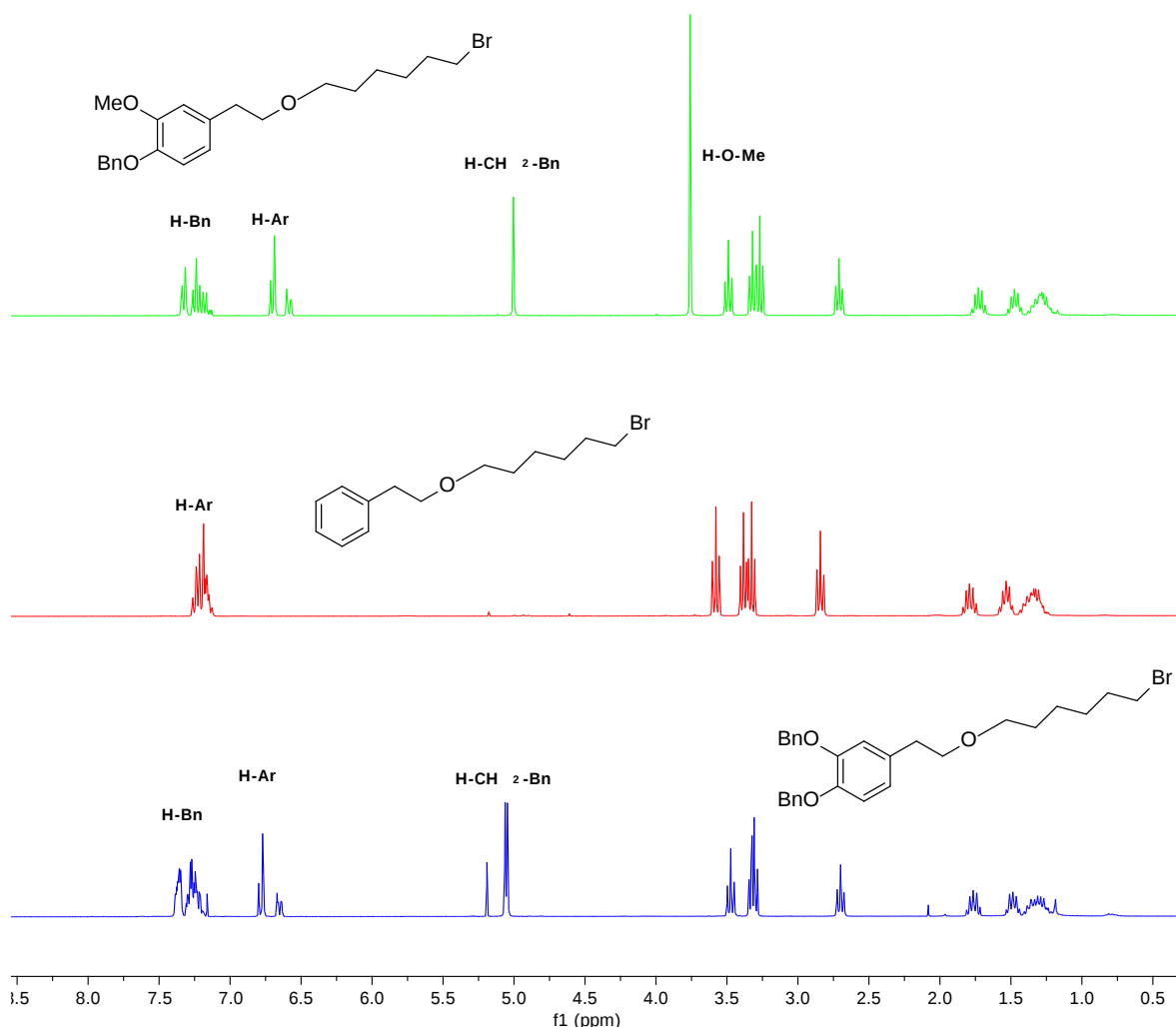
Espectro II.10. Espectro de 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) de tirosol bencilado alquilado con 1,6-bromohexanol (**19**)

De igual forma en los otros 6 espectros se observa el mismo patrón de señales con la única diferencia, de las señales correspondientes a los diferentes sustituyentes de los anillos aromáticos (**espectro II.11 y II.12**).



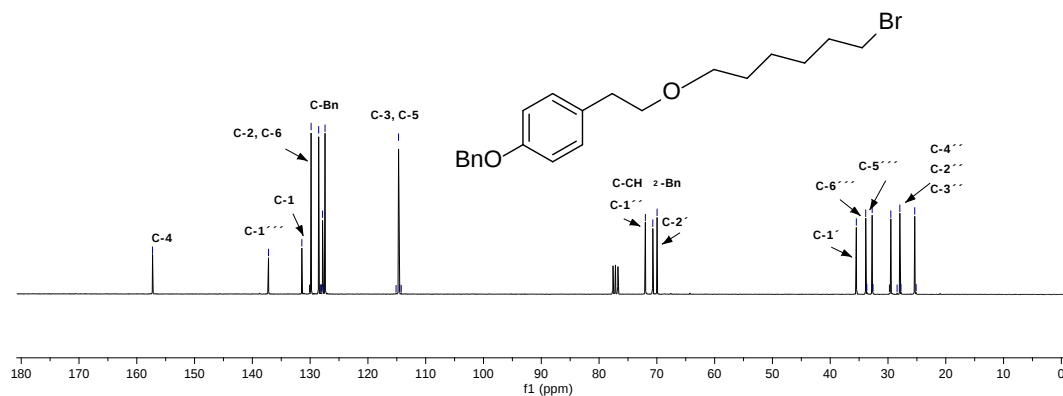
Espectro II.11. Espectro ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de derivados metoxilado (**23**), dimetoxilado (**24**) y acetal (**21**)

Ya sean metoxilos, bencilos, o CH_2 de acetal, las señales pertenecientes a las cadenas alifáticas mantienen el mismo patrón.



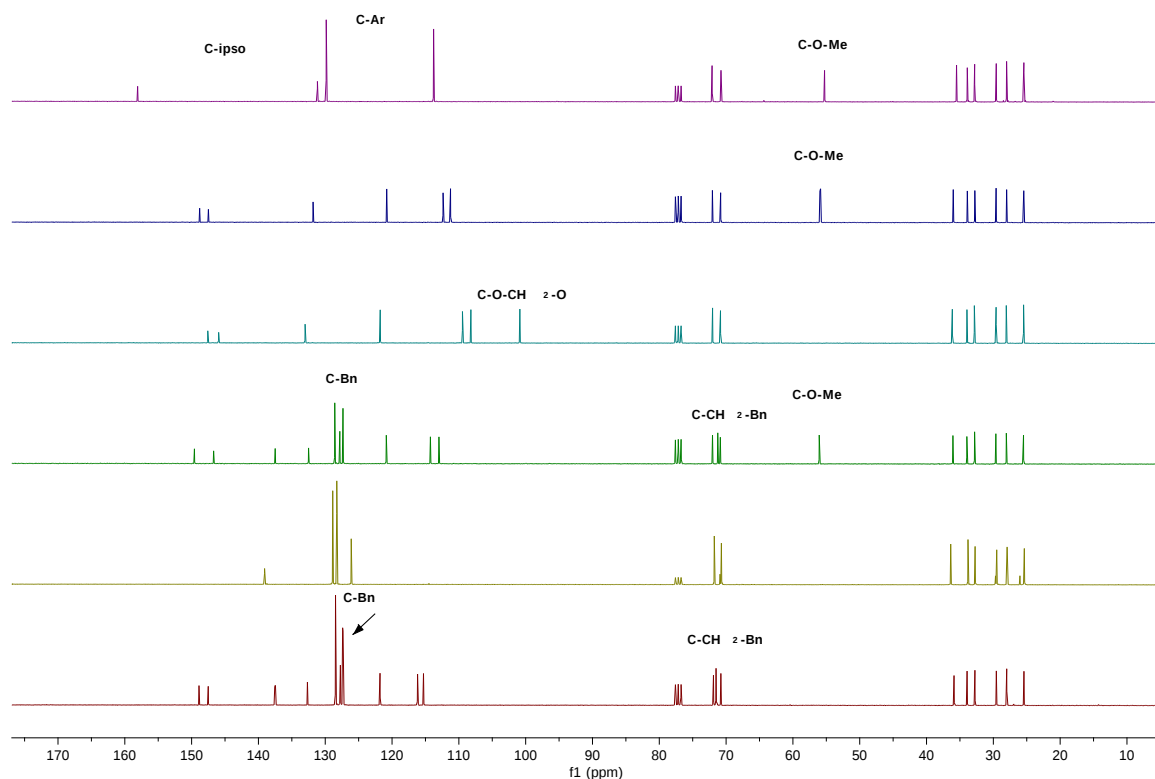
Espectro II.12. Espectro ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de derivados alcohol homovanílico (**20**), fenólico (**22**) y HT (**25**)

Por otro lado, en el espectro de carbono del tirosol alquilado (**19**) (**espectro II.13**) se pueden observar, entre 20.0 ppm y 40.0 ppm todos los carbonos pertenecientes a la cadena alifática. Sobre 70.0 ppm se encuentran los carbonos de la cadena unida al anillo aromático y al carbono del CH_2 de bencilo. Hacia frecuencias altas entre 110.0 ppm y 130.0 ppm, se encuentran los carbonos bencílicos y a los CH del anillo aromático. Entre 130.0 ppm y 160.0 ppm se pueden ver los carbonos ipso que soportan a la cadena alifática y más desplazado aquel que soporta al grupo bencilo.



Espectro II.13. Espectro ^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de tirosol bencilado alquilado con 1,6-dibromohexano (**19**)

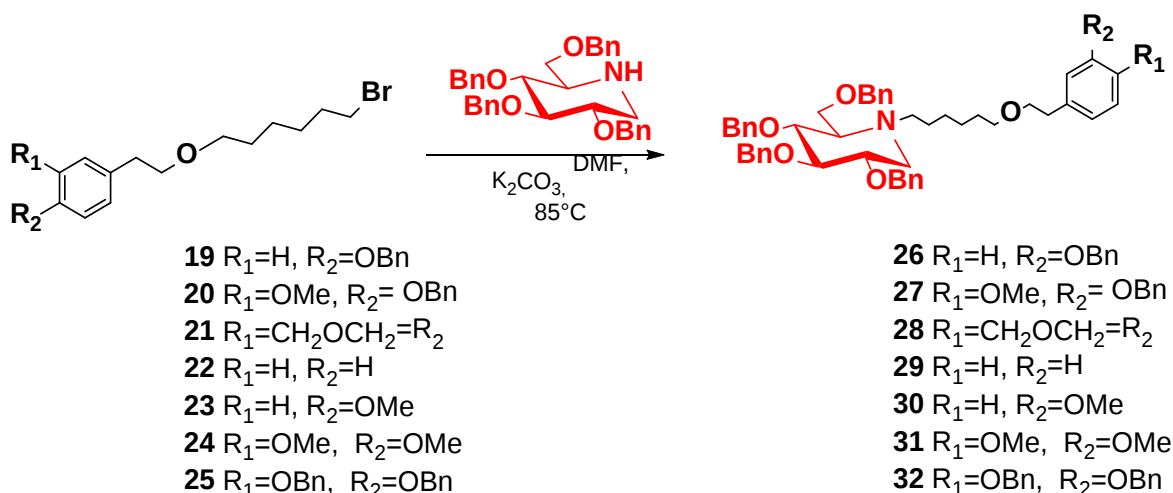
A su vez, igual que en el caso de los espectros de protón, la secuencia de señales en todos los espectros de carbono (**espectro II.14**), es similar, la única diferencia entre ellos son las señales de los sustituyentes del anillo aromático y el patrón de sustitución que cada uno presenta. Los espectros se muestran en el mismo orden que los espectros de protón, (metoxilado, dimetoxilado, acetal, alcohol homovanílico, fenólico y HT).



Espectro II.14. Espectro ^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de derivados metoxilado (**23**), dimetoxilado (**24**), acetal (**21**), alcohol homovanílico (**20**), fenólico (**22**) y HT (**25**)

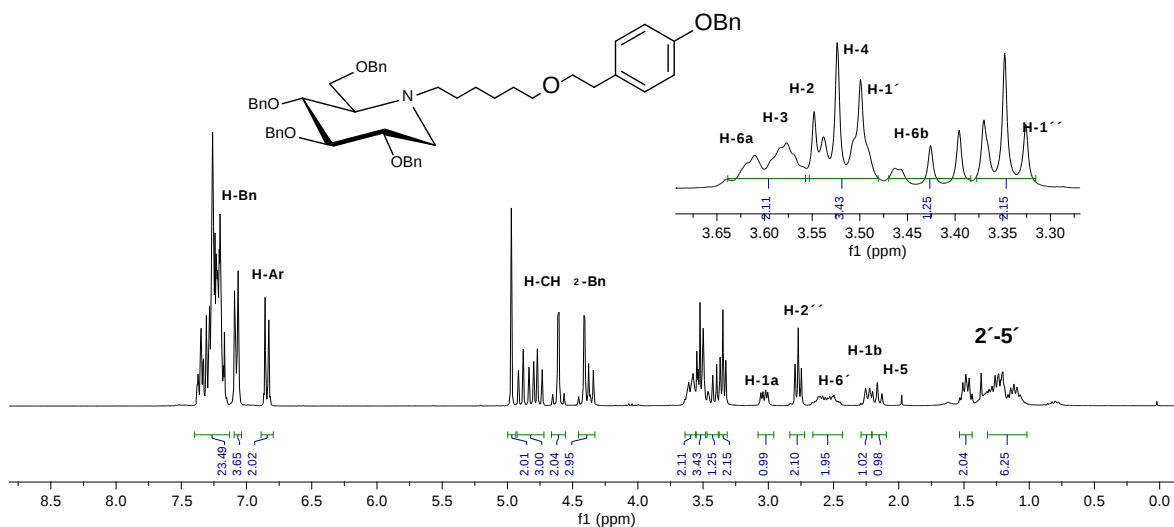
II.4.3. Alquilación del iminoazúcar

Una vez alquilados los compuestos se procedió a la reacción de alquilación de la desoxinojirimicina protegida (6) (**esquema II.6**), de nuevo una reacción de tipo S_N2. Para ello se empleó un exceso de los derivados **19-25** con relación al azúcar en DMF, utilizando como base carbonato de potasio. Las reacciones procedieron a 85 °C durante 15 horas, cada reacción fue tratada y purificada por cromatografía en columna.



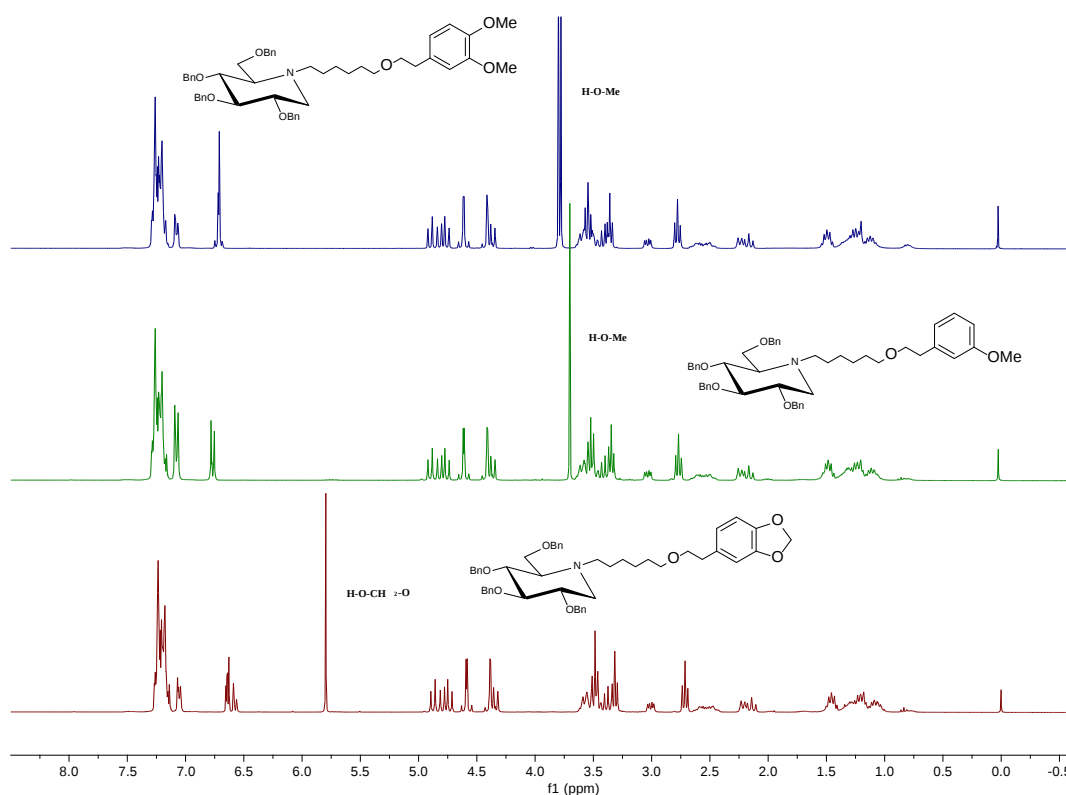
Esquema II.6. Reacción de alquilación de la desoxinojirimicina per-*O*-bencilada

En el espectro de ¹H RMN del derivado de 1-desoxinojirimicina protegida con tirosol (**26**) (**espectro II.15**), se pueden observar a frecuencias bajas las señales correspondientes a los 8 protones de los carbonos intermedios del espaciador. Entre 2.00 ppm y 2.70 ppm se encuentran los protones de los carbonos terminales de dicha cadena. En 2.75 ppm se observa una señal triple que corresponde a los protones de C-2'', carbono unido al anillo aromático. En 3.00 ppm se observa uno de los protones del carbono anomérico; alrededor de 3.30 ppm hay otra señal triple la cual corresponde a los protones del carbono unido a oxígeno. Entre 4.30 ppm y 5.00 ppm se pueden visualizar los protones de los CH₂ de bencilo, en la región de aromáticos se pueden ver dos juegos de señales, el primero entre 6.75 ppm y 7.20 ppm que corresponde a los protones de la porción fenólica y el siguientes entre 7.20 ppm y 7.50 ppm a los bencilos del iminoazúcar.

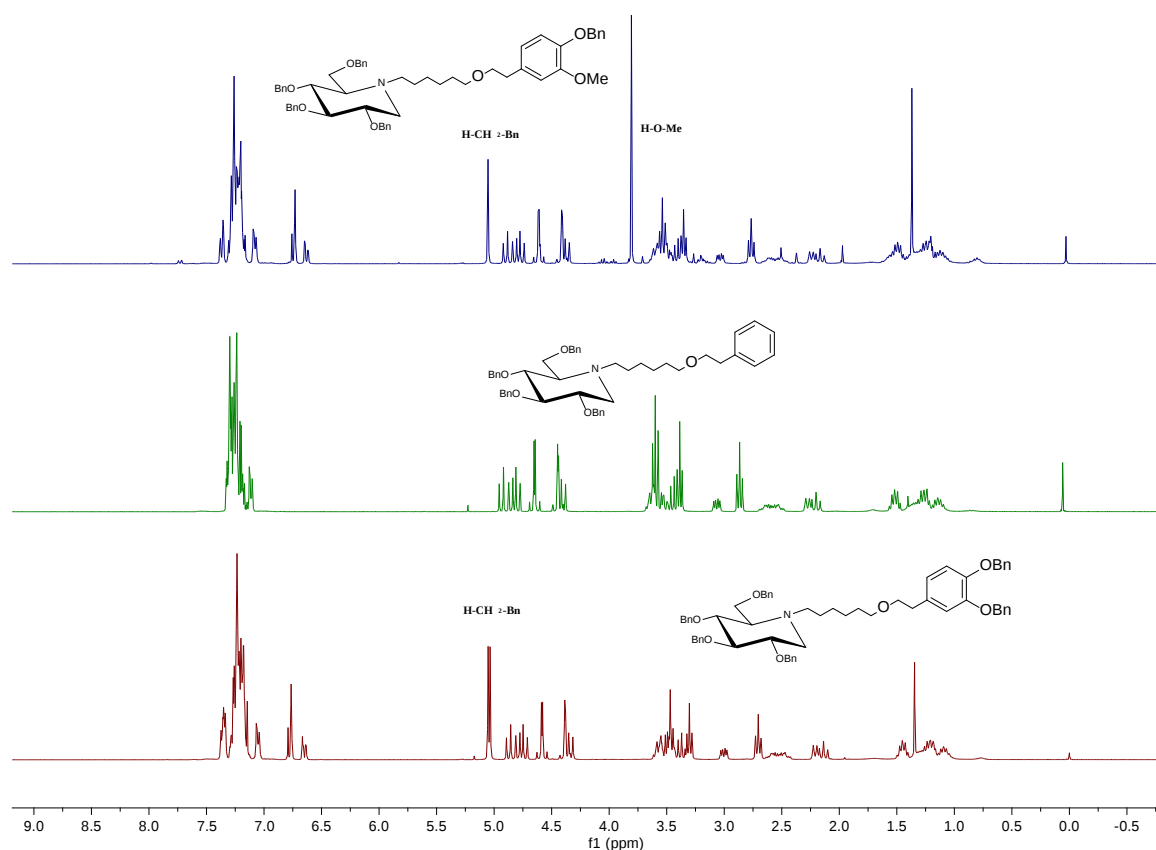


Espectro II.15. Espectro ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de derivado de tirosol (26)

De igual manera se observan los espectros de los otros 6 derivados (**espectro II.16 y II.17**), observando el mismo patrón de señales, teniendo como única diferencia las señales de los sustituyentes del anillo aromático.

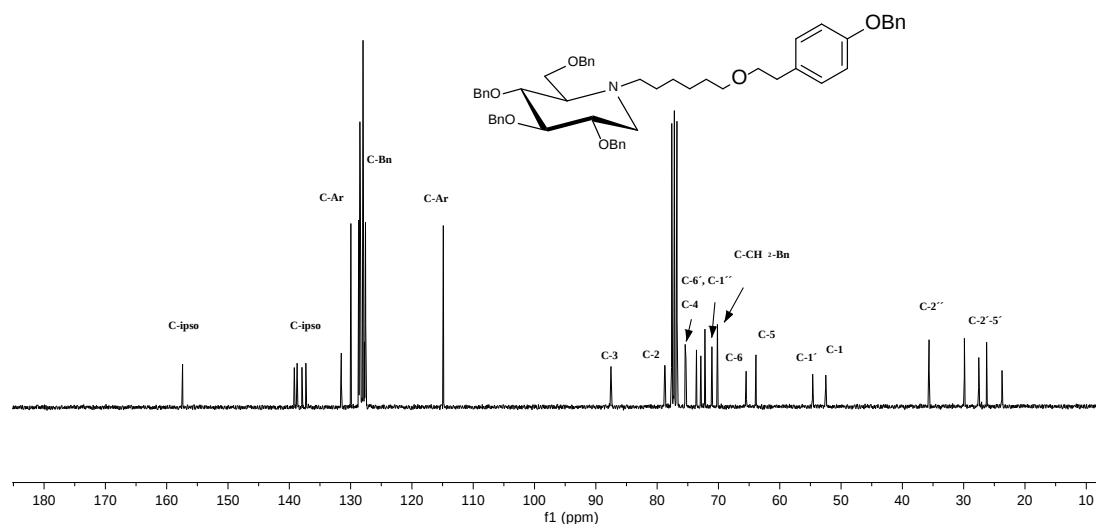


Espectro II.16. Espectro ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de derivados: dimetoxilado (31), metoxilado (30) y acetal (28)



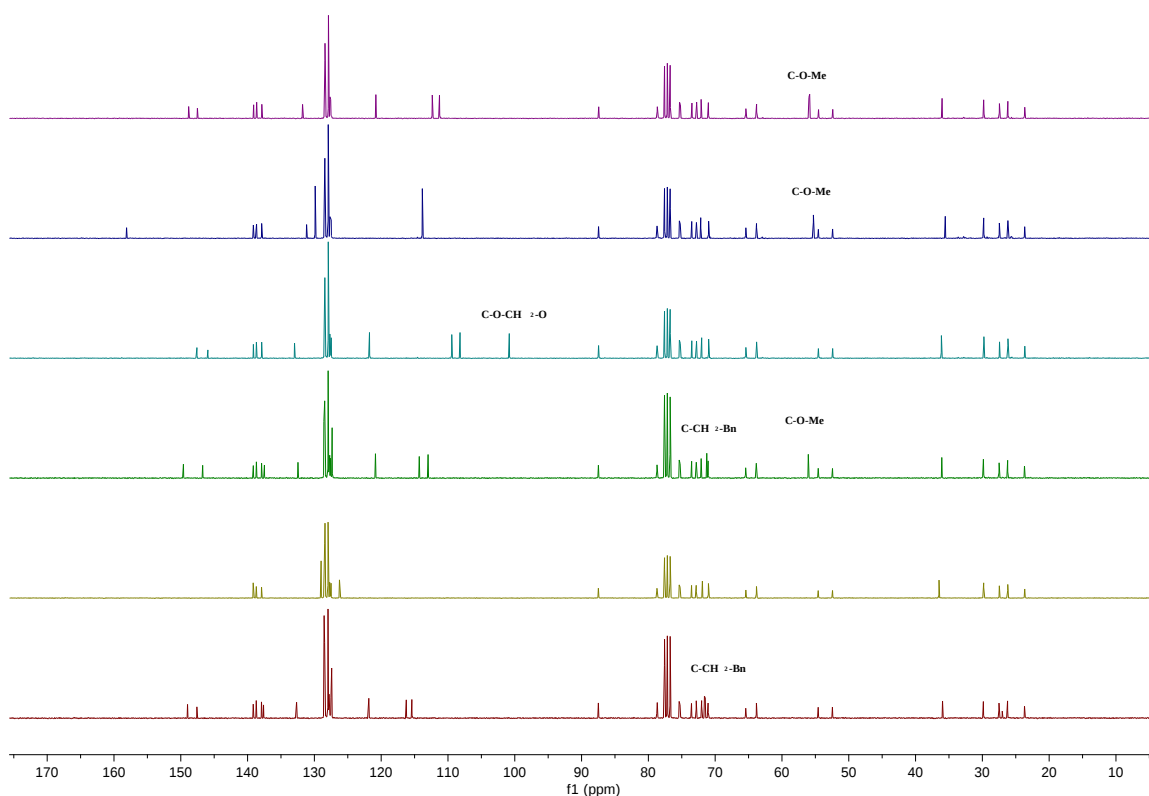
Espectro II.17. Espectro ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de derivados de alcohol homovanílico (27),
fenólico (29) y HT (32)

A su vez en el espectro de carbono del derivado de tirosol (26) (**espectro II.18**) se puede observar a frecuencias bajas entre 20.0 ppm y 35.0 ppm las señales correspondientes a los carbonos centrales de la cadena alifática unida al iminoazúcar. Hacia frecuencias altas entre 55.0 ppm y 75.0 ppm se observan los carbonos terminales de la cadena espaciadora; de manera intermedia, los carbonos de los CH_2 de bencilos. Sobre la región de aromáticos a partir de 115.0 ppm, se encuentran dos señales, que corresponden a dos carbonos cada una, y pertenecen al anillo aromático de la porción fenólico. En medio de estas dos señales se observan todas las señales pertenecientes a los bencilos, y entre 130.0 ppm y 160.0 ppm se pueden ver todos los carbonos ipso de la molécula.



Espectro II.18. Espectro ^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de derivado de tirosol (26)

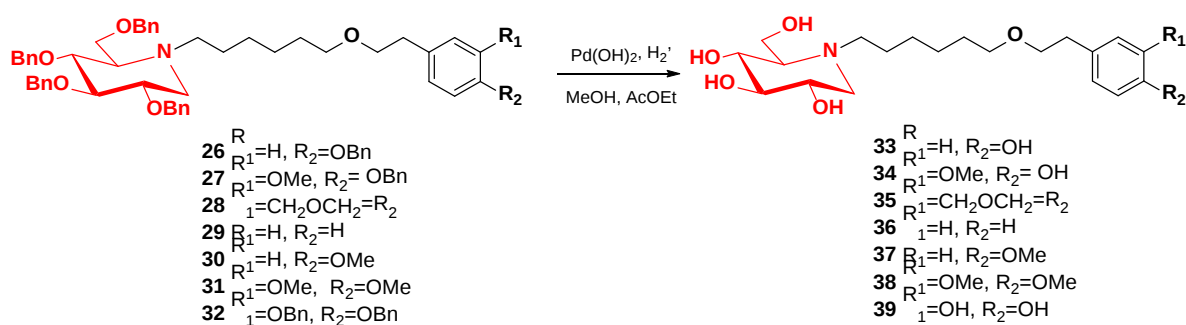
De manera similar, se observan las señales en los espectros de los otros 6 derivados, se pueden ver las señales de los diferentes sustituyentes en cada uno de los espectros (**espectro II.19**). Los espectros presentan el mismo orden que los espectros de protón.



Espectro II.19. Espectros ^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de derivados: dimetoxilado (31), metoxilado (30), acetal (28), alcohol homovanílico (27), fenólico (29) y HT (32)

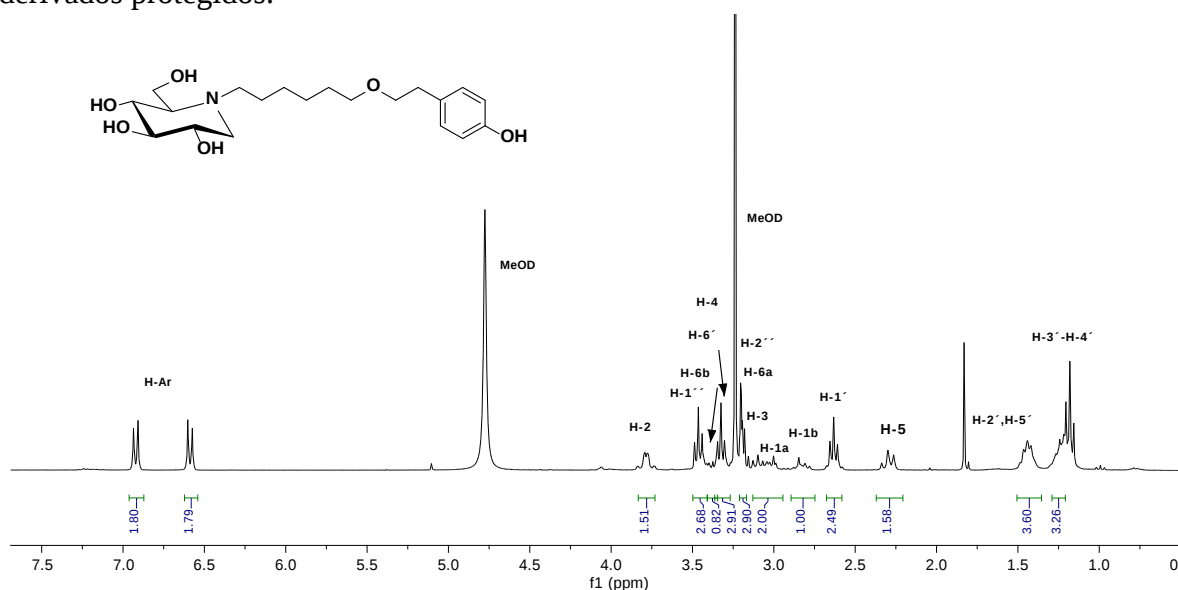
II.4.4. Desprotección de grupos hidroxilo

Una vez obtenidos todos los compuestos alquilados (**26-32**) se procedió a hidrogenarlos para desproteger los hidroxilos (**esquema II.7**); para esto se utilizó H_2 a presión atmosférica, $Pd(OH)_2/C$ como catalizador, en una mezcla acetato de etilo: metanol 1:1, o DCM: metanol 1:1. Las desprotecciones se llevaron a cabo en presencia de unas gotas de AcOH con objeto de neutralizar el medio básico proporcionado por el iminoazúcar, lo cual ralentiza el proceso de hidrogenación de los grupos bencilos.



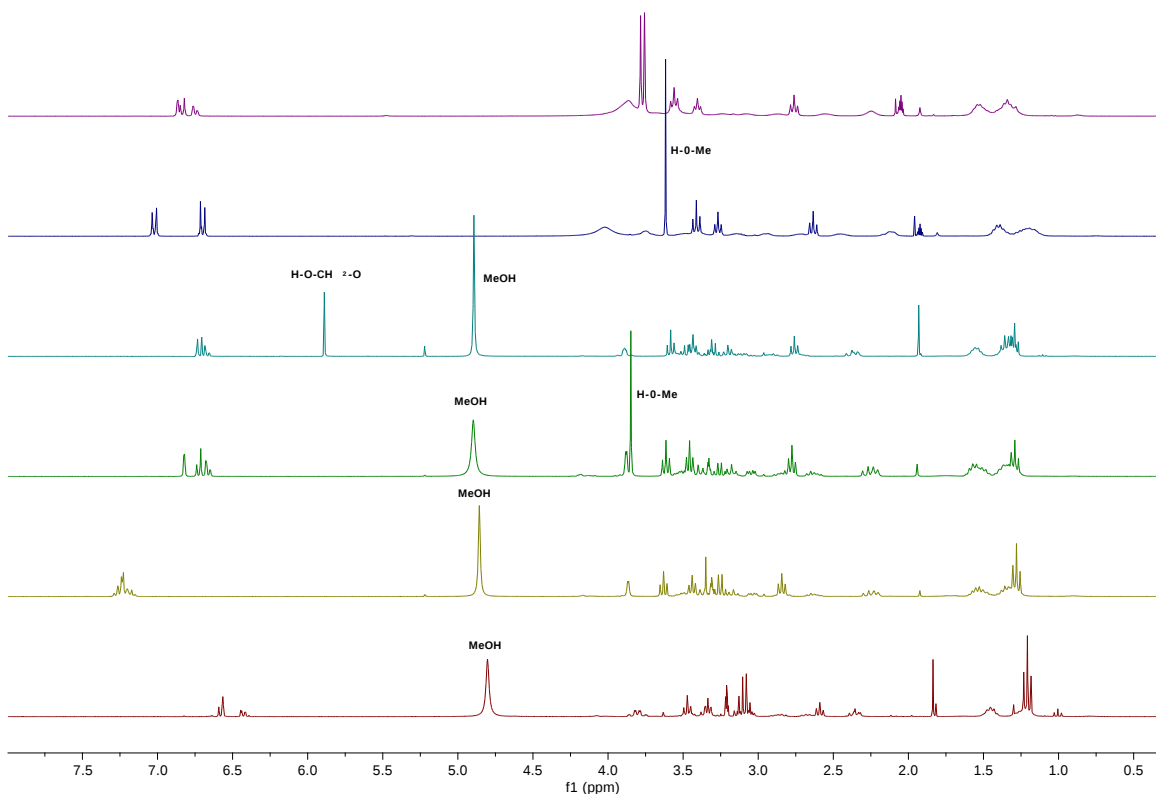
Esquema II.7. Desprotección de los compuestos **26-32**

En el espectro de 1H RMN, del derivado de tirosol (**33**) (**espectro II.20**) se observa la ausencia de los protones bencílicos, y de los CH_2 de bencilo, lo que indica que todos los hidroxilos han sido desprotegidos, el resto de las señales se observan casi igual que en los derivados protegidos.



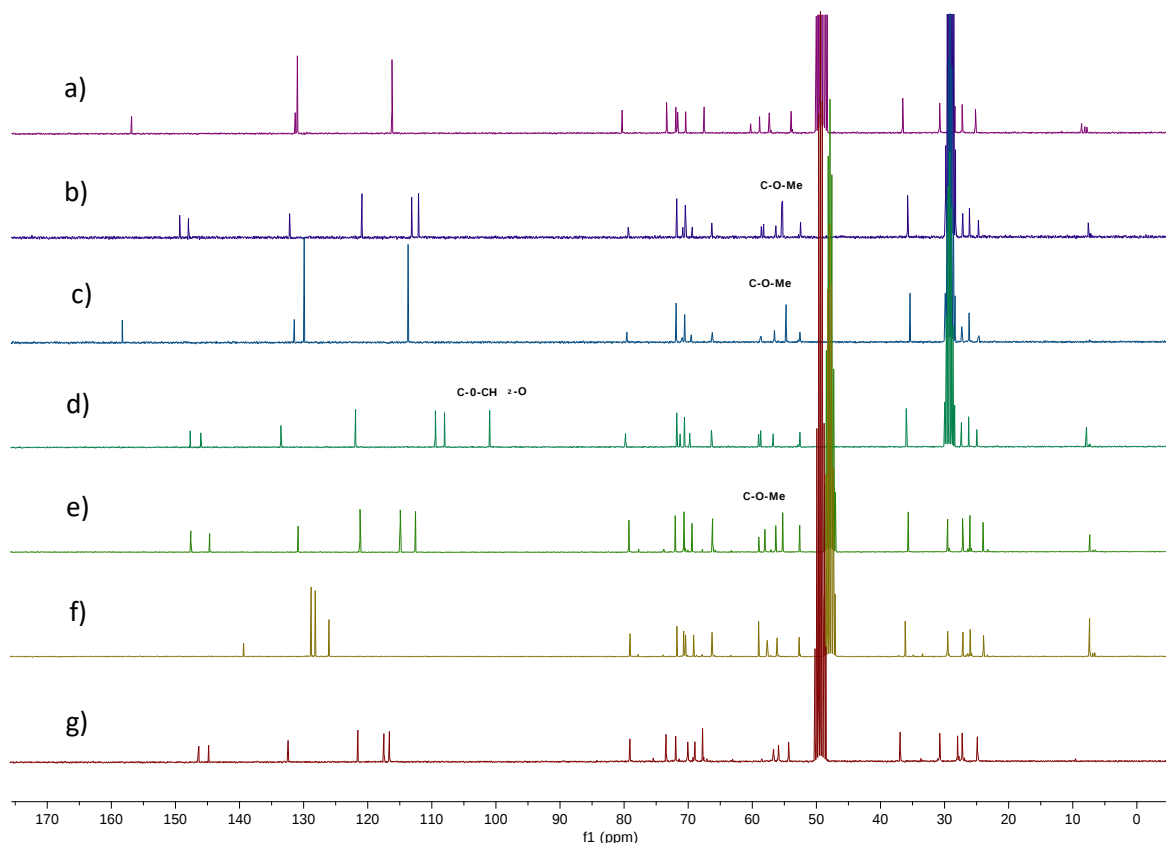
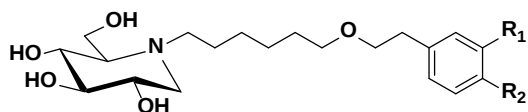
Espectro II.20. Espectro 1H RMN (300 MHz, CD_3OD) de derivado de tirosol (**33**)

De igual forma que en el caso anterior, en el espectro ^1H RMN de los 6 derivados restantes (**espectro II.21**) se observa el mismo patrón de señales, más la presencia de las señales de los sustituyentes en cada caso.



Espectro II.21. Espectros ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de derivados de 1-desoxinojirimicina: dimetoxilado (**38**), metoxilado (**37**), acetal (**35**), alcohol homovanílico (**34**), fenólico (**36**), HT (**39**)

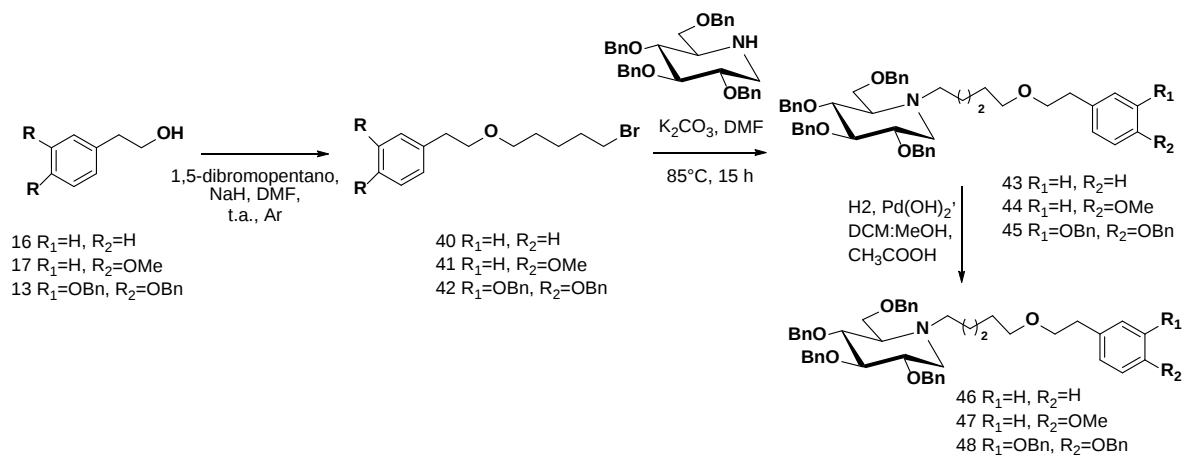
En los espectros de carbono (**espectro II.22**) se observa la ausencia de los grupos bencilo. Se pueden observar a frecuencias altas los carbonos ipso, dependiendo del caso, ya sean uno, dos o tres. En el caso del derivado de tipo acetal, se puede observar, el carbono del CH_2 alrededor de 100.0 ppm. En los derivados metoxilado (**37**), dimetoxilado (**38**) y de alcohol homovanílico (**34**) se ven los carbonos de los metilos de los grupos metoxilos alrededor de 55.0 ppm; entre 50.0 y 80.0 ppm los carbonos del esqueleto del iminoazúcar, y entre 20.0 y 40.0 ppm se observa la presencia de los carbonos de la cadena unida directamente al iminoazúcar. En todos los casos se presenta el mismo patrón en las señales, a excepción de los aromáticos, ya que tienen diferentes patrones de sustitución.



Espectro II.22. Espectro ^{13}C RMN (75.5 MHz, CD_3OD , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de derivado de 1-desoxinojirimicina: a) tirosol (**33**), b) dimetoxilado (**38**), c) metoxilado (**37**), d) acetal (**35**), e) alcohol homovanílico (**34**), f) fenólico (**36**), g) HT (**39**)

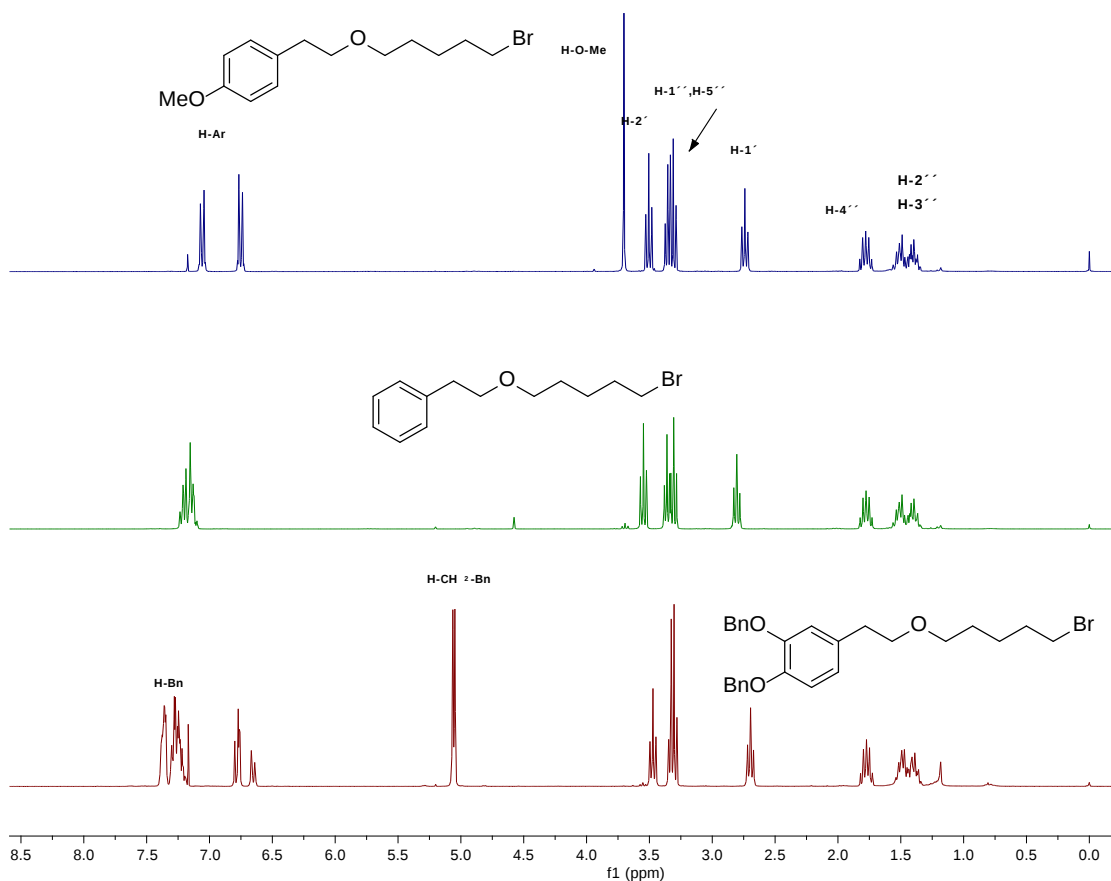
II.4.5. Obtención de derivados con espaciador de 5 átomos de carbono

Una vez obtenidos los compuestos con un espaciador de 6 átomos de carbono, se decidió probar con un tamaño diferente de cadena en algunos de los compuestos, con objeto de analizar la influencia del tamaño de la cadena en las propiedades biológicas. Así pues, para el espaciador de 5 átomos de carbono (**esquema II.8**), fueron sintetizados los compuestos con el derivado de un metoxilo, el del hidroxitirosol y el del feniletanol. Para la síntesis de estos compuestos se utilizó el mismo protocolo de síntesis que en el caso anterior, pero utilizando el 1,5-dibromopentano como agente alquilante.



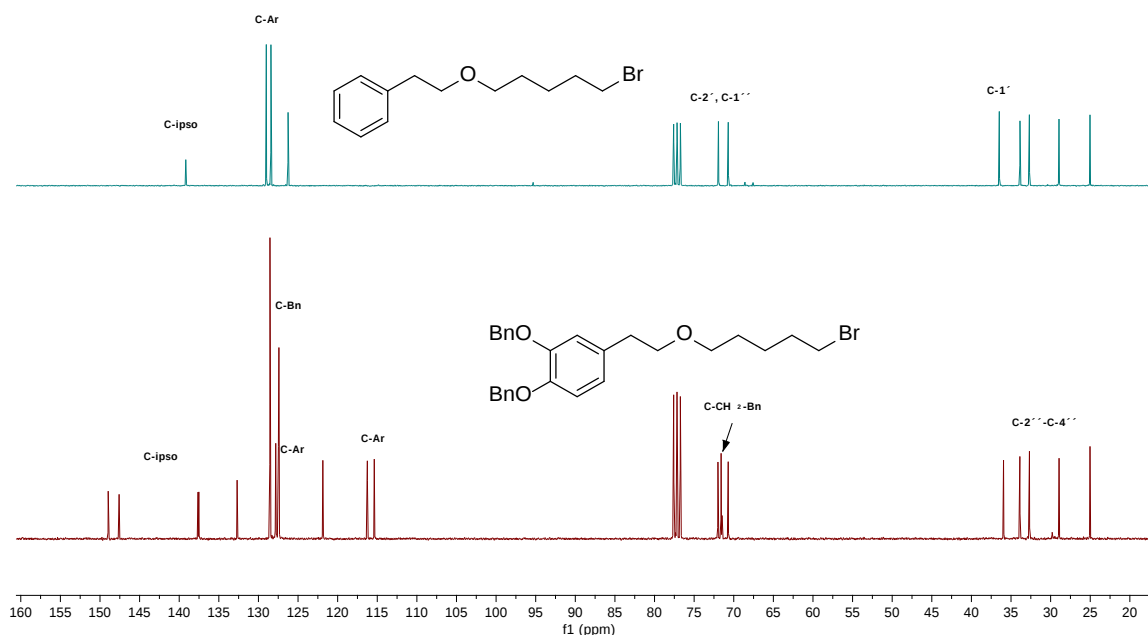
Esquema II.8. Alquilación de la desoxinojirimicina con espaciador de 5 átomos de carbono

De igual modo que para la cadena de 6, lo primero fue alquilar las porciones fenólicas con el 1,5-dibromopentano. Esta reacción se llevó a cabo en condiciones muy similares a las anteriores, la alquilación se comprobó mediante RMN tanto de protón como de carbono.



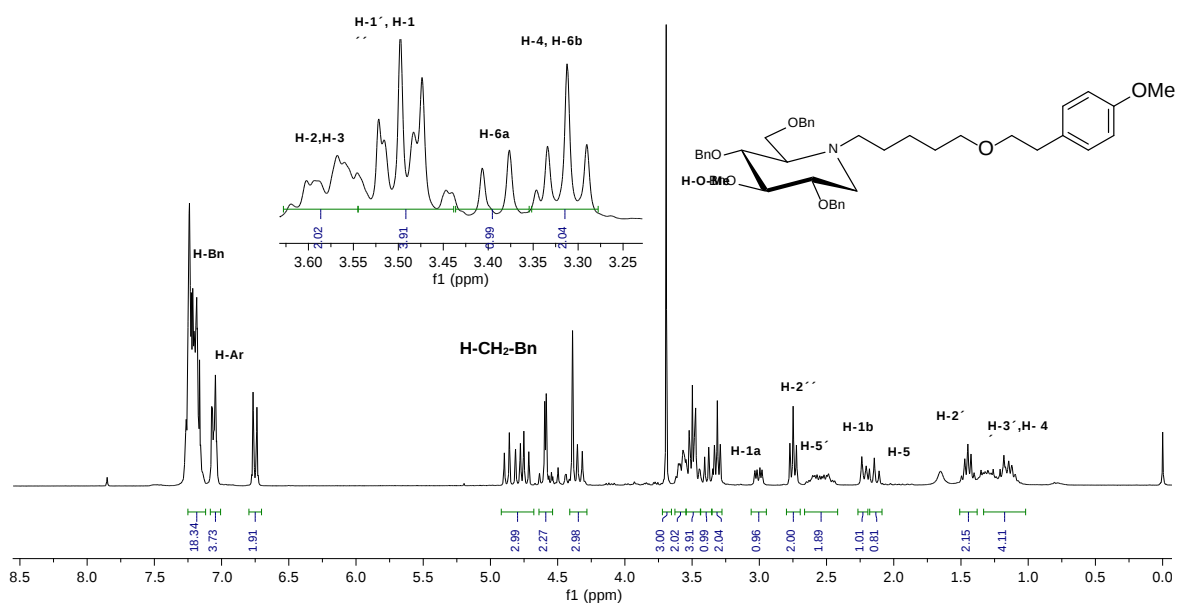
Espectro II.23. Espectro de 1H RMN (300MHz, $CDCl_3$) de compuestos fenólicos alquilados con 1,5-dibromopentano

En los espectros de protón (**espectro II.23**) se puede observar, a frecuencias bajas, como dos señales múltiples entre 1.00 ppm y 2.00 ppm, a los protones de los carbonos intermedios de la cadena alifática. Hacia frecuencias altas se observan cuatro señales triples, entre 2.50 ppm y 3.50 ppm, las cuales corresponden a los carbonos terminales de ambas cadenas; en el caso del derivado metoxilado se encuentra una señal simple por 3.50 ppm, la cual corresponde al metilo del grupo metoxilo (**41**). El derivado **40** no presenta sustituyentes y en el derivado del HT (**42**), se observan los protones de los CH₂ de bencilos, por 5.00 ppm. En la zona de aromáticos entre 6.50 ppm y 7.50 ppm se pueden ver los protones bencílicos, y los del anillo fenólico. Por otro lado, en los espectros de carbono (**espectro II.24**), se puede observar entre 25.0 ppm y 35.0 ppm las señales de los 4 carbonos intermedios de la cadena alquílica. Sobre 35.0 ppm se encuentra el carbono adyacente al anillo aromático. Alrededor de 70.0 ppm se pueden ver los carbonos unidos al oxígeno del éter; en el derivado de HT, se observan los carbonos de los CH₂ de bencilo en las mismas frecuencias. En el derivado fenólico se observan 3 señales entre 115.0 ppm y 130.0 ppm, que corresponden a los 5 CH del anillo aromático; por 140.0 ppm resuena el carbono ipso. En el caso del derivado de HT, entre 115.0 ppm y 130.0 ppm, se ubican 3 señales correspondientes a los 3 CH del anillo aromático; posteriormente se encuentra un conjunto de señales pertenecientes a los grupos bencilos, y entre 127.0 ppm y 150.0 ppm los 5 carbonos ipso, de la molécula.



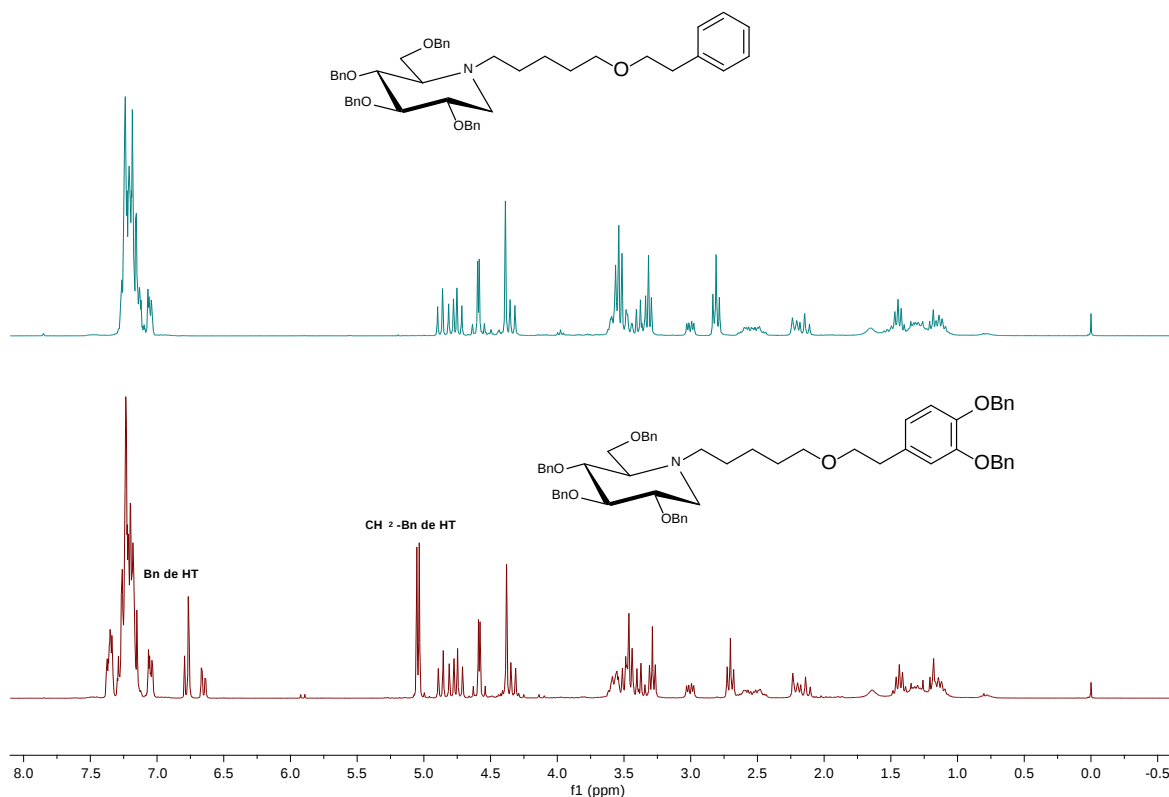
Espectro II.24. Espectro de ¹³C RMN (300MHz, CDCl₃) de compuestos fenólicos alquilados con 1,5-dibromopentano

Posteriormente se llevó a cabo la alquilación de la 1-desoxinojirimicina protegida, con los compuestos formados; mediante las mismas condiciones de reacción que los derivados de cadena de 6; en estas se observó un rendimiento ligeramente menor que en los derivados anteriores. La presencia de los compuestos fue comprobada mediante resonancia magnética nuclear y mediante espectroscopia de masas. En el espectro de ^1H RMN del derivado metoxilado (**44**) (**espectro II.25**) se puede observar, el mismo patrón de señales que en los derivados de cadena de 6. A frecuencias bajas entre 1.00 ppm y 1.50 ppm se pueden observar los protones de la cadena espaciadora. Entre 2.50 ppm y 2.70 ppm se encuentran los protones de los carbonos del éter de la cadena. En 3.70 ppm se observan una señal simple que integra para tres protones y corresponde a los protones del metoxilo; en la zona de aromáticos se presentan dos grupos de señales, el primero entre 6.70 ppm y 7.10 ppm que corresponde a los protones del anillo fenólico y el segundo entre 7.10 ppm y 7.25 ppm corresponde a los protones bencílicos.



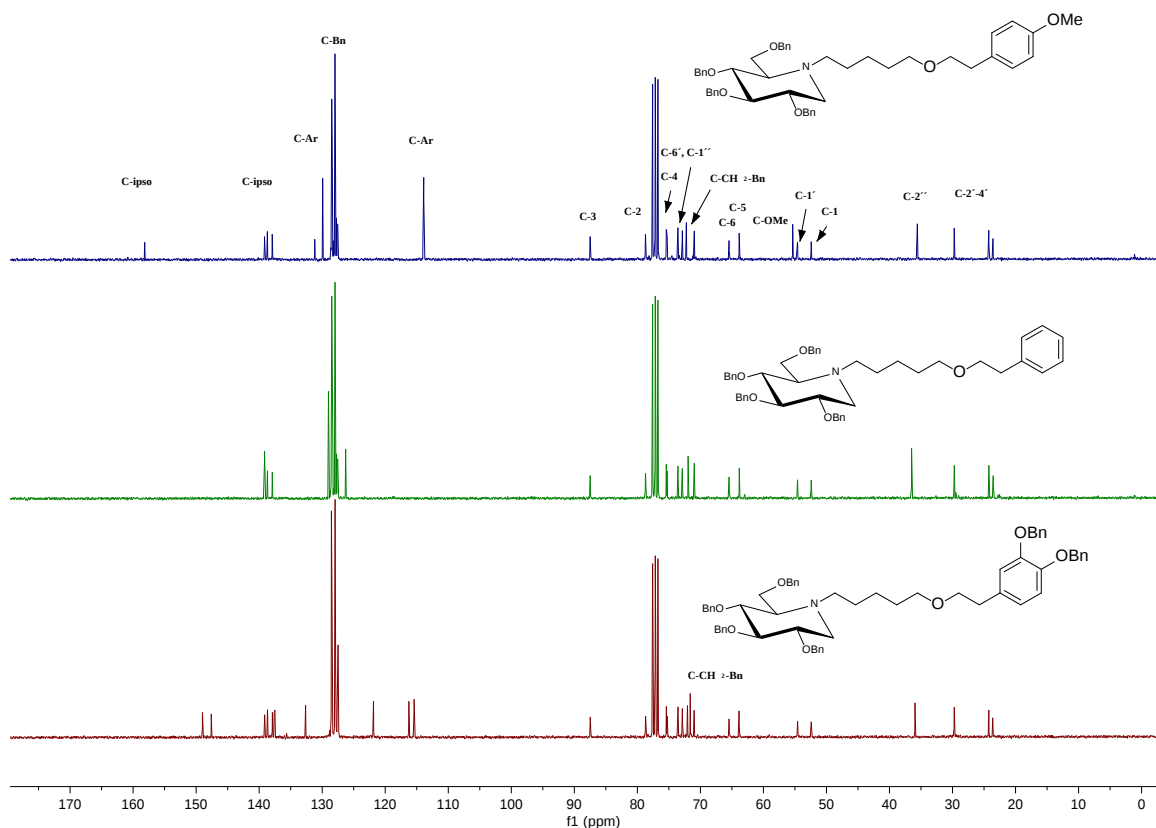
Espectro II.25. Espectro de ^1H RMN (300MHz, CDCl_3) del derivado metoxilado alquilado con 1,5-dibromopentano (**44**)

En los espectros de ^1H RMN (**espectro II.26**) de los derivados fenólicos (**43**) y el de HT (**45**) se observa el mismo patrón de señales, salvo por el número de grupos bencilos. En el derivado de HT se observan 2 grupos más entre 6.50 ppm y 7.00 ppm, sobre 5.00 ppm se observan dos singuletes más, pertenecientes a los CH_2 de bencilo del HT.



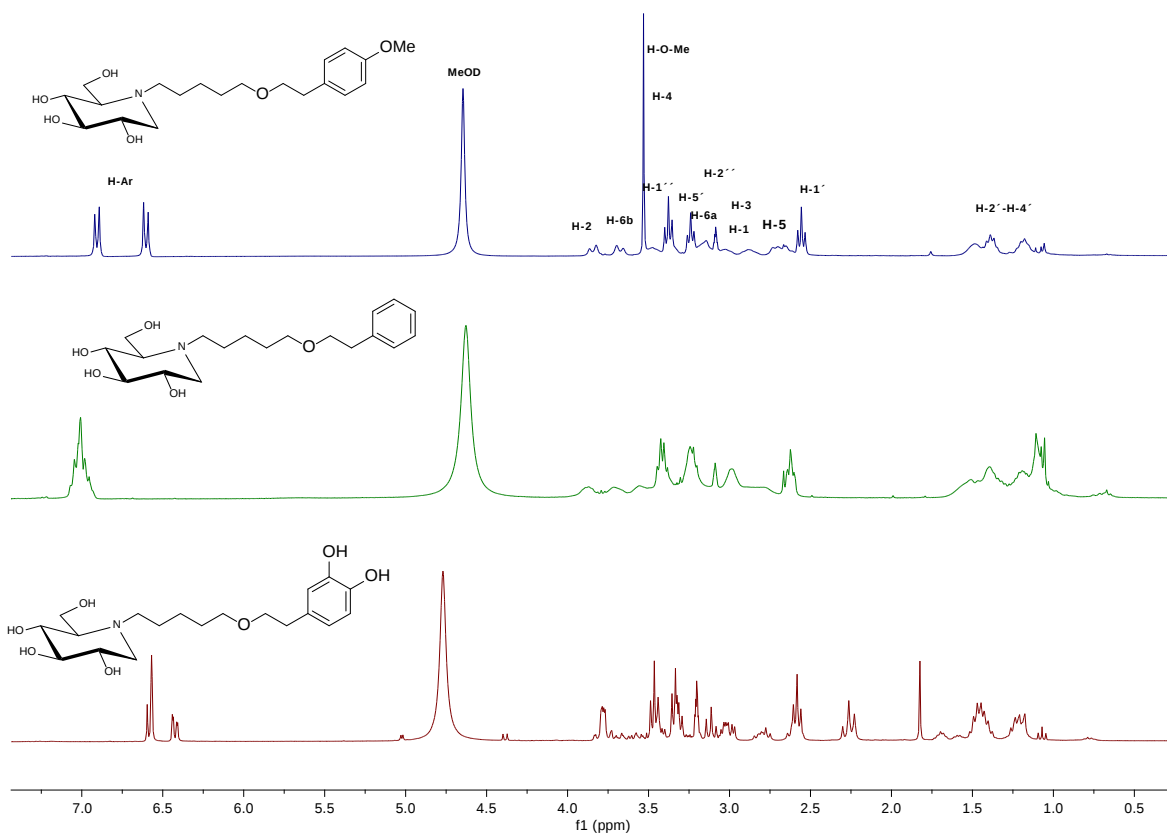
Espectro II.26. Espectros de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de compuestos fenólicos alquilados con 1,5-dibromopentano derivados de desoxinojirimicina

En los espectros de carbono (**espectro II.27**) se puede observar entre 20.0 ppm y 35.0 ppm los carbonos de la cadena que funge como espaciador, entre 50.0 y 90.0 ppm los carbonos del esqueleto del iminoazúcar, y el resto de los carbonos de la cadena alifática. También se encuentra al carbono del metoxilo, del compuesto metoxilado **44**. En estas mismas frecuencias se encuentran los carbonos de los CH_2 de bencilo y en el caso del derivado del HT (**45**), se observan dos carbonos más. Hacia frecuencias altas a partir de 110.0 ppm se pueden ver los carbonos aromáticos, primero los CH del anillo de la porción fenólica, seguidos por los CH bencílicos, y por último los carbonos ipso.



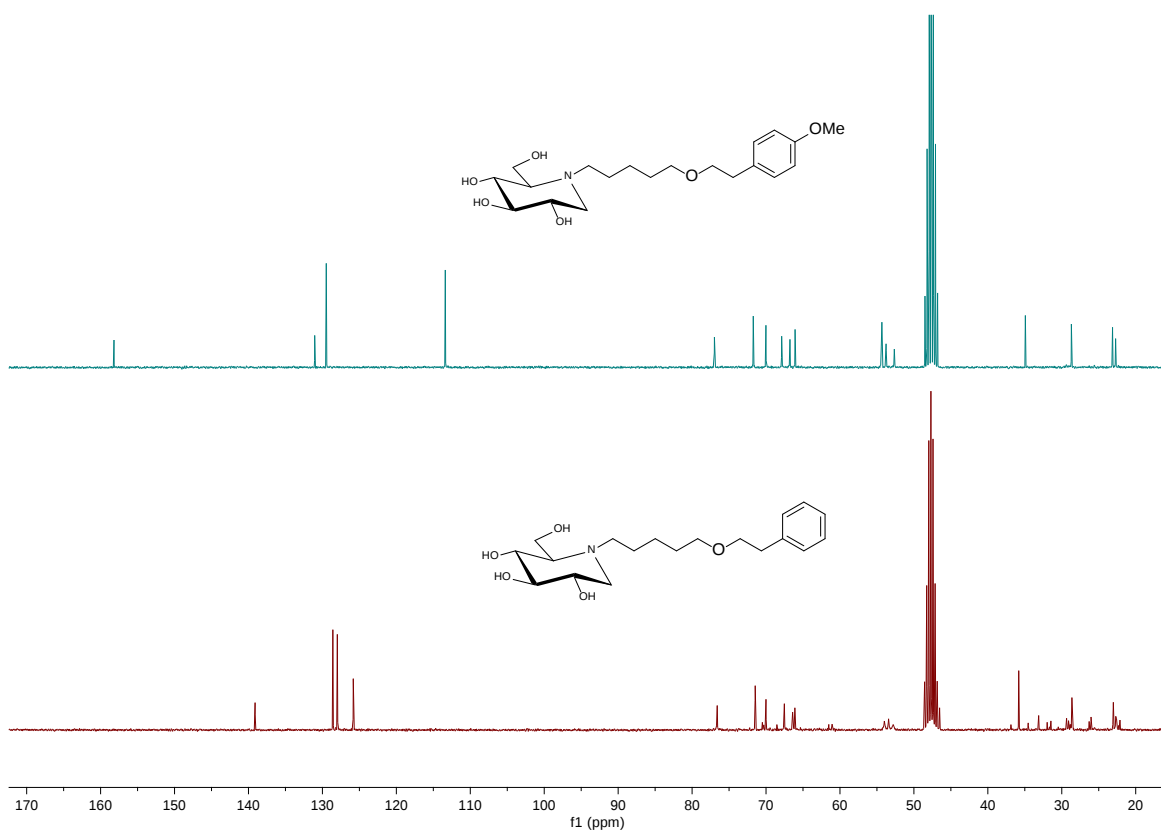
Espectro II.27. Espectros de ^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de compuestos fenólicos alquilados con 1,5-dibromopentano derivados de desoxinojirimicina

Finalmente, los compuestos fueron sometidos a una hidrogenación catalítica, con la finalidad de desproteger los hidroxilos, dichas reacciones procedieron de manera cuantitativa, y fueron caracterizadas mediante técnicas espectroscópicas. En los espectros de ^1H RMN (**espectro II.28**), podemos observar las mismas señales que en las moléculas protegidas a excepción de los protones bencílicos y los CH_2 de bencilo.



Espectro II.28. Espectros de ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) de compuestos fenólicos alquilados con 1,5-dibromopentano desprotegidos derivados de desoxinojirimicina

En los espectros de carbono (**espectro II.29**), se observa el mismo comportamiento, que en los derivados con espaciador de 6 carbonos. A frecuencias bajas, los carbonos de la cadena alifática, posteriormente a frecuencias más altas los carbonos de los extremos de las cadenas y los carbonos del esqueleto del iminoazúcar. A diferencia de los espectros de los derivados protegidos, ya no se observan los carbonos de los CH_2 de bencilo; en el caso del derivado metoxilado (**47**), podemos observar en 66.0 ppm al carbono del metoxilo, finalmente se observan los carbonos de los CH del anillo aromático y a frecuencias más altas, los carbonos ipso.



Espectro II.29. Espectro de ^{13}C RMN (75.5 MHz, CD_3OD) de compuestos fenólicos alquilados con 1,5-dibromopentano desprotegidos

La formación de los compuestos también fue confirmada mediante espectroscopia de masas (**figura II.24**).

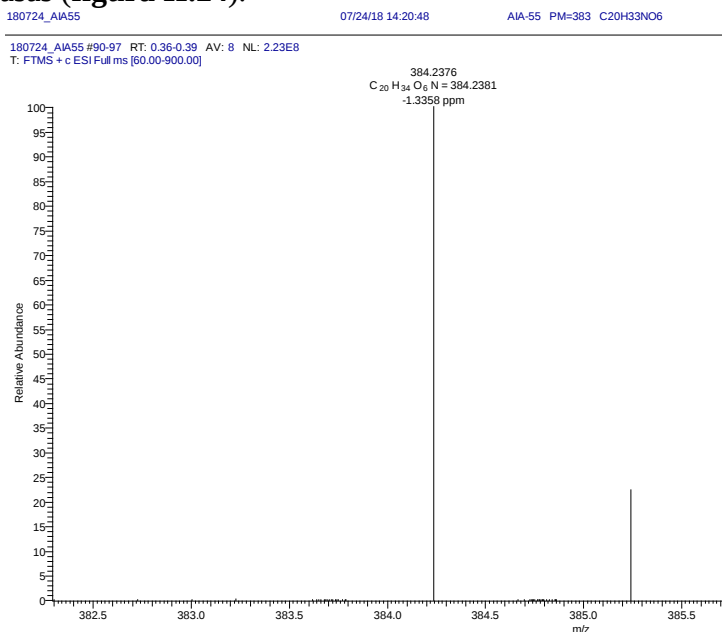


Figura II.24a. Espectro de masas de derivado metoxilado desprotegidos con espaciador de 5 carbonos

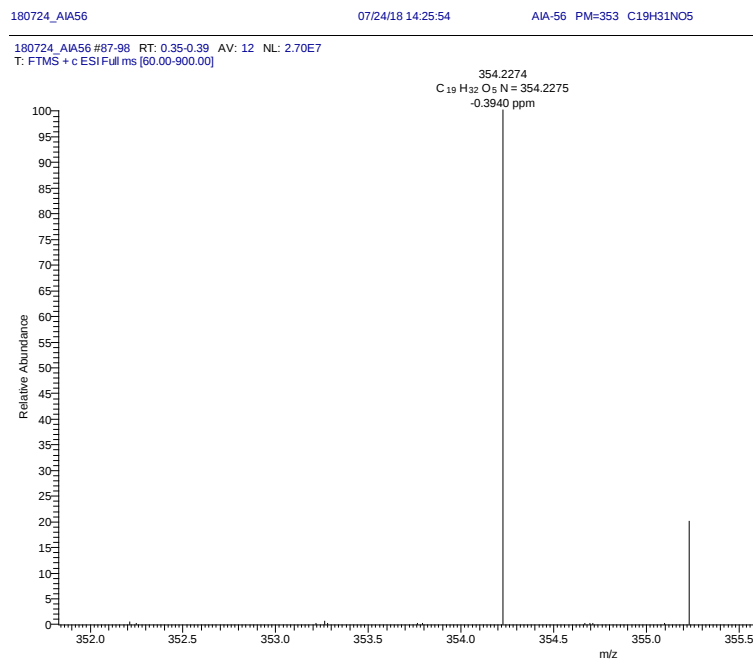


Figura II.24b. Espectro de masas de derivado fenólico desprotegidos con espaciador de 5 carbonos

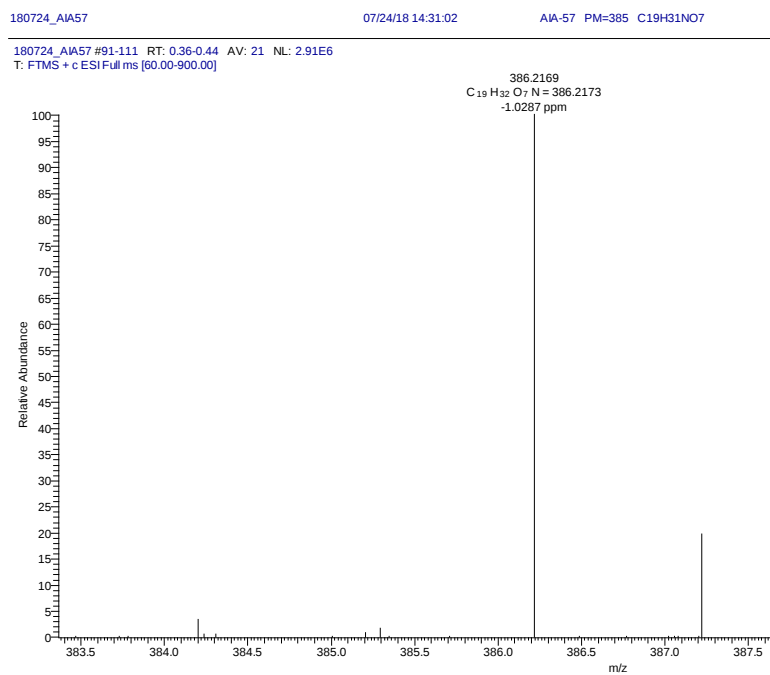
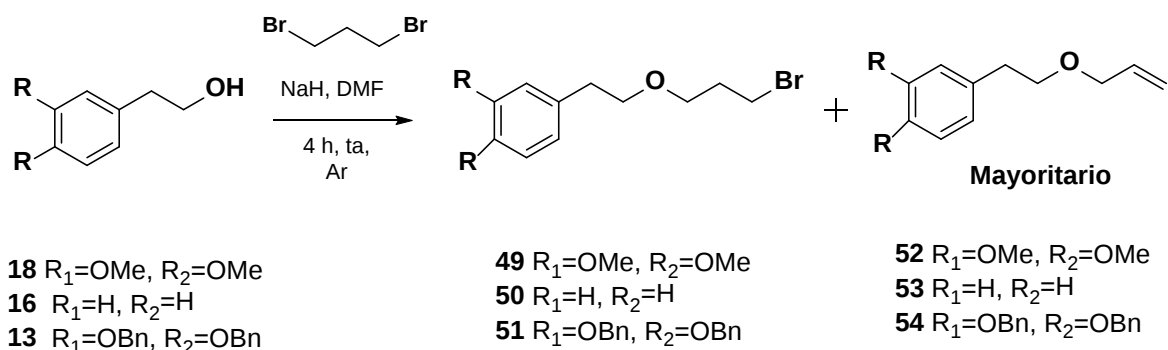


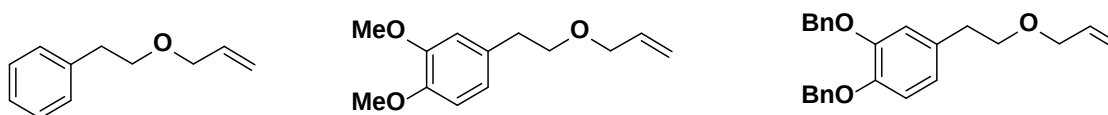
Figura II.24c. Espectro de masas de derivado HT desprotegido con espaciador de 5 carbonos

II.4.6. Obtención de derivados con espaciador de 3 átomos de carbono

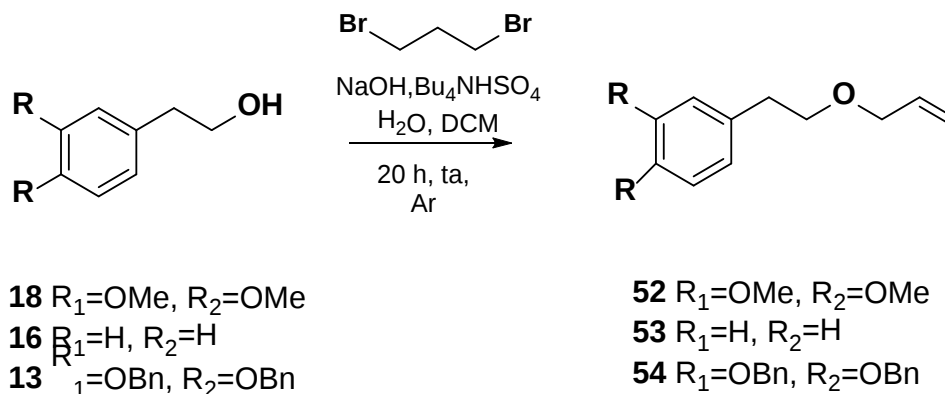
Por otro lado, se decidió sintetizar 3 compuestos con el espaciador de 3 átomos de carbono, no obstante, los intentos de alquilación del hidroxilo alifático (**esquemas II.9 y II.10**) resultaron infructuosos, y condujeron de manera mayoritaria a una reacción de eliminación de tipo E2 promovida por el medio básico.



Esquema II.9. Reacción alquilación de alcoholes con 1,3-dibromopropano (método 1)



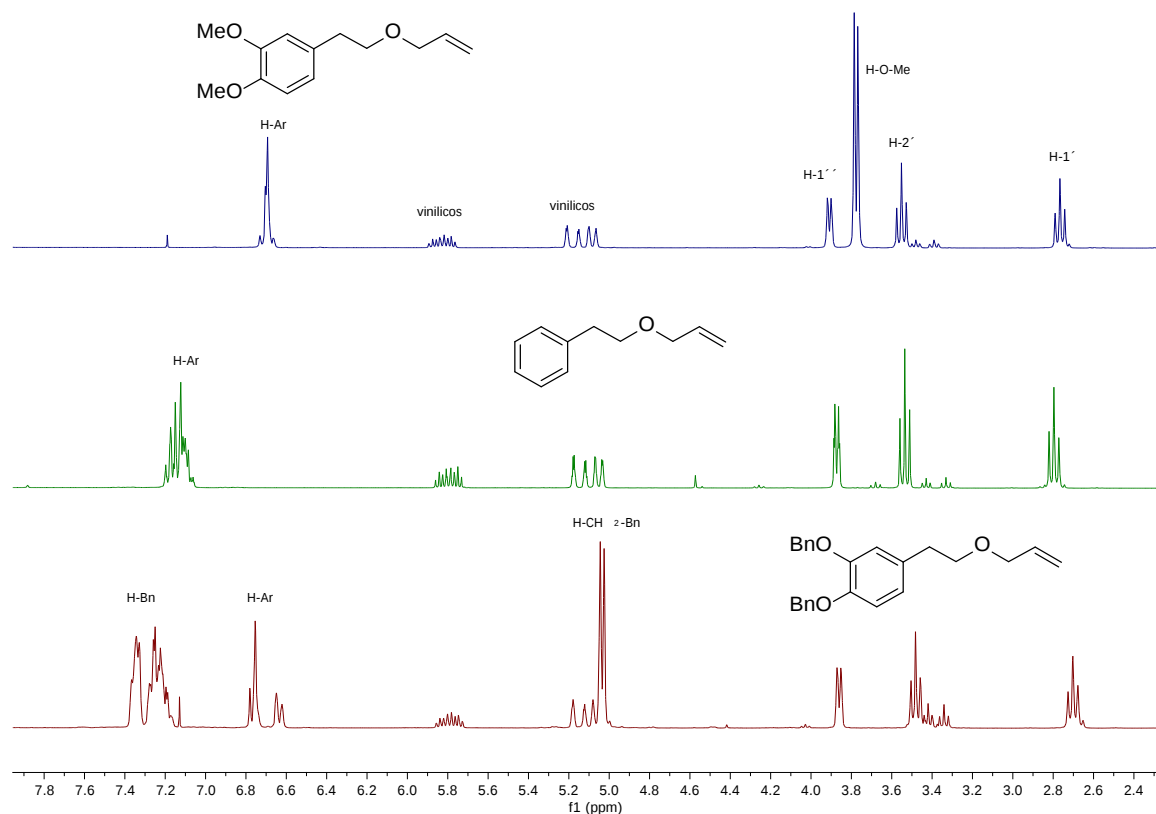
Esquema II.9-A. Compuestos formados en la reacción de alquilación en medio básico



Esquema II.10. Reacción alquilación de alcoholes con 1,3-dibromopropano (método 2)

La formación de este tipo de compuestos se pudo corroborar fácilmente mediante los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (**espectro II.30**), en los que se observan

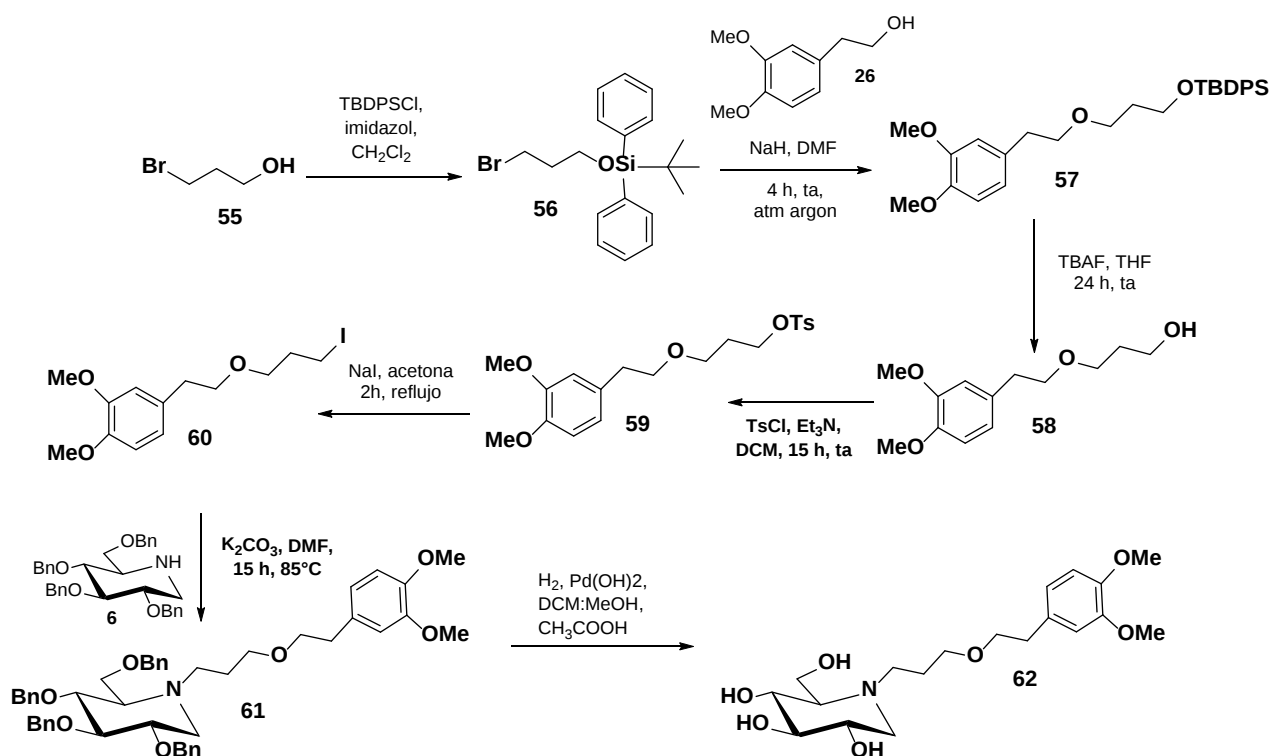
dos grupos de señales correspondientes a los protones vinílicos (aproximadamente a 5.10 y 5.80 ppm), lo que corrobora la eliminación del bromo terminal.



Espectro II.30. Espectros de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de compuestos fenólicos alquilados con 1,3-dibromopropano (reacción de eliminación)

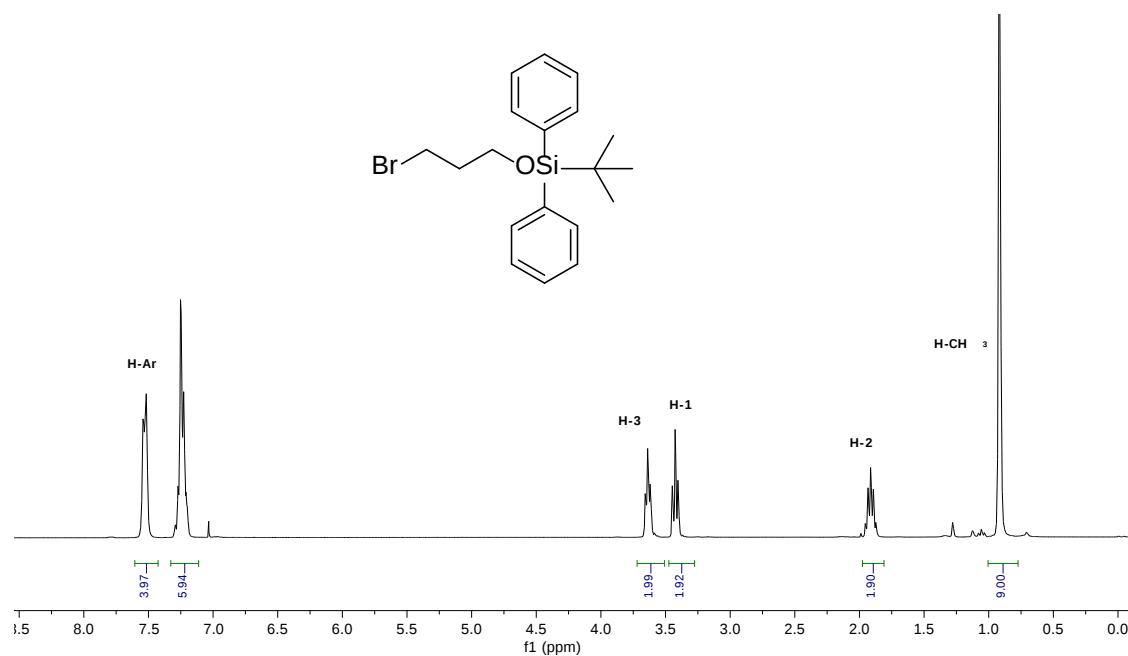
Como alternativa, se decidió partir del 3-bromo-propanol; en un principio se decidió realizar la síntesis de dos derivados con espaciador de cadena de 3, el derivado dimetoxilado y el de fenilo. Sin embargo, solo fue posible obtener el derivado dimetoxilado. El primer paso para la síntesis de este compuesto fue la protección del hidroxilo del bromo propanol, con TBDPSCl, usando imidazol como base en diclorometano. Su formación fue confirmada mediante RMN de protón; en el espectro (**espectro II.31**), se puede ver la presencia de una señal simple que integra para 9 protones, los cuales son los tres metilos del grupo *tert*-butilo. Posteriormente se observan dos señales triples y un quinteto, señales que corresponden a los 6 protones de la cadena alifática. A frecuencias altas en la zona de aromáticos se observan los 10 protones de los dos anillos aromáticos del grupo protector. Una vez protegido el compuesto se alquiló con el dimetoxifeniletanol; el producto fue purificado por cromatografía en columna y caracterizado mediante RMN de protón (**espectro II.32**), en el

cual se presentan por 2.00 ppm, los dos metoxilos del dimetoxifeniletanol con el cual fue alquilado. También se observan dos señales triples adicionales pertenecientes a la zona alquílica de la porción del dimetoxilo, y tres protones más sobre 6.70 ppm como una señal múltiple, con estas nuevas señales se confirma la alquilación del compuesto. Una vez obtenido este compuesto se eliminó el grupo protector mediante una reacción con TBAF; posteriormente se realizó una reacción de tosilación para hacer mejor grupo saliente al hidroxilo y proseguir con un desplazamiento nucleofílico con NaI para dar lugar a **60**. El siguiente paso fue la alquilación de la 1-DNJ bencilada **6** con el compuesto **60**. En condiciones similares a las mencionadas con anterioridad, obteniendo el derivado protegido con cadena de 3 carbonos **62** (esquema II.11). No obstante, tras varios intentos de desprotección de este compuesto en condiciones de hidrogenación estándar, se observó un lento avance de la reacción.

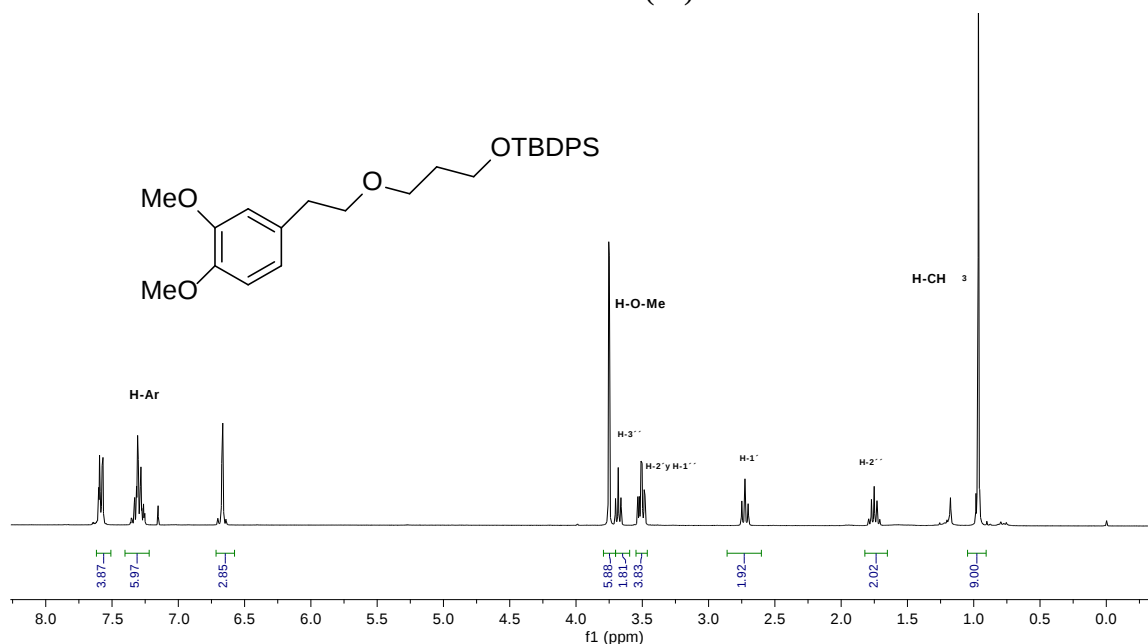


Esquema II.11. Reacción para formación de derivado de desoxinojirimicina con 3 átomos de carbono

Solo los dos primeros pasos de la ruta y el ultimo fueron caracterizados, mediante RMN.

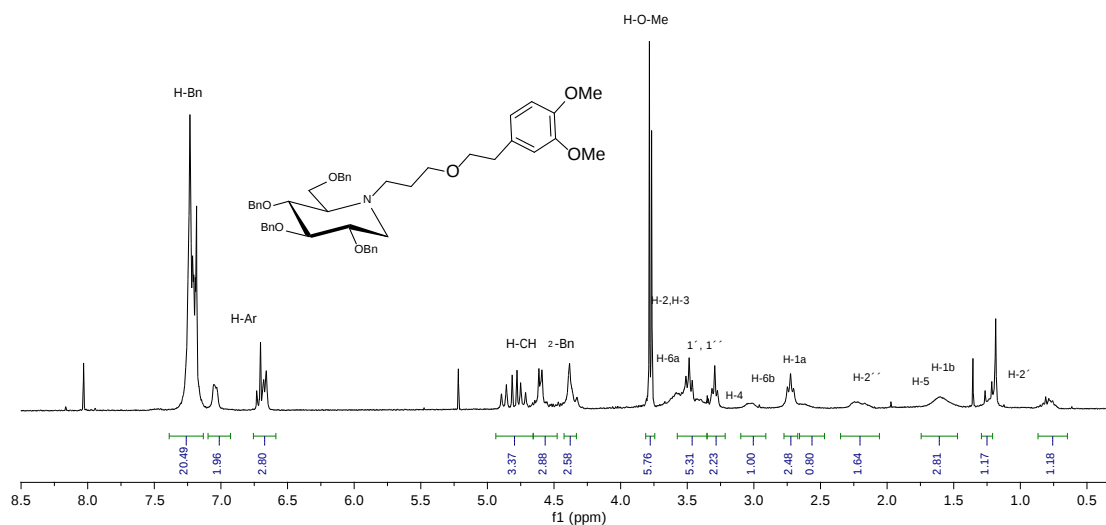


Espectro II.31. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de bromo propanol protegido con TBDPSCl (56)



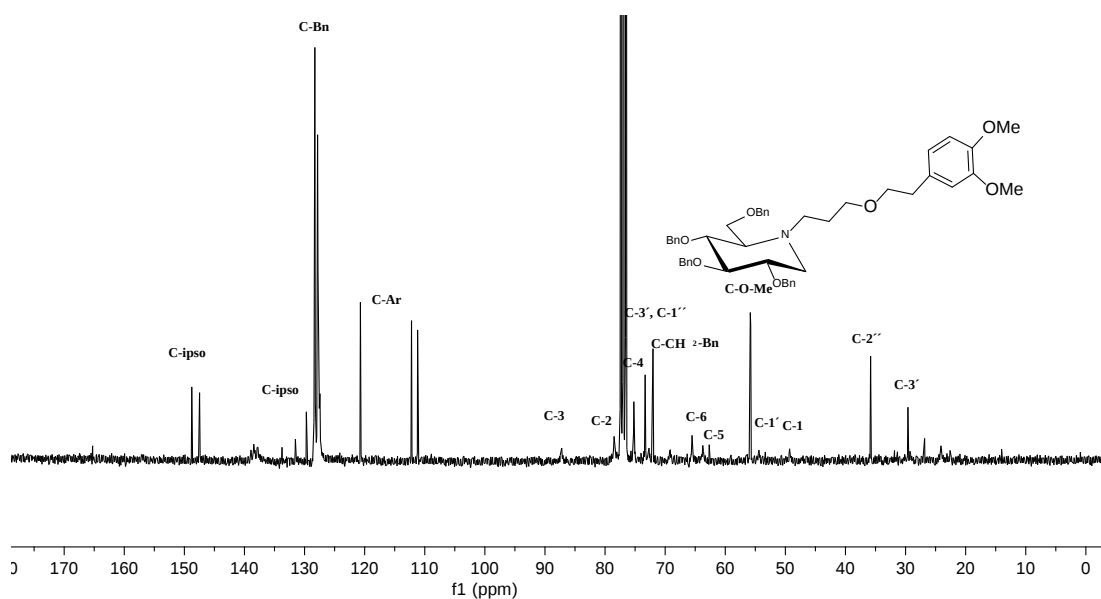
Espectro II.32. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de bromo propanol protegido con TBDPSCl, alquilado con dimetoxifeniletanol (57)

En el caso de la cadena de tres carbonos sólo fue posible obtener el derivado dimetoxilado, el cual presenta en el espectro de ^1H RMN (**espectro II.33**) el mismo patrón de señales que los espectros con espaciador de 5 y de 6, observando dos señales simples en 3.78 ppm, las cuales corresponden a los grupos metoxilos, que sustituyen al anillo aromático.



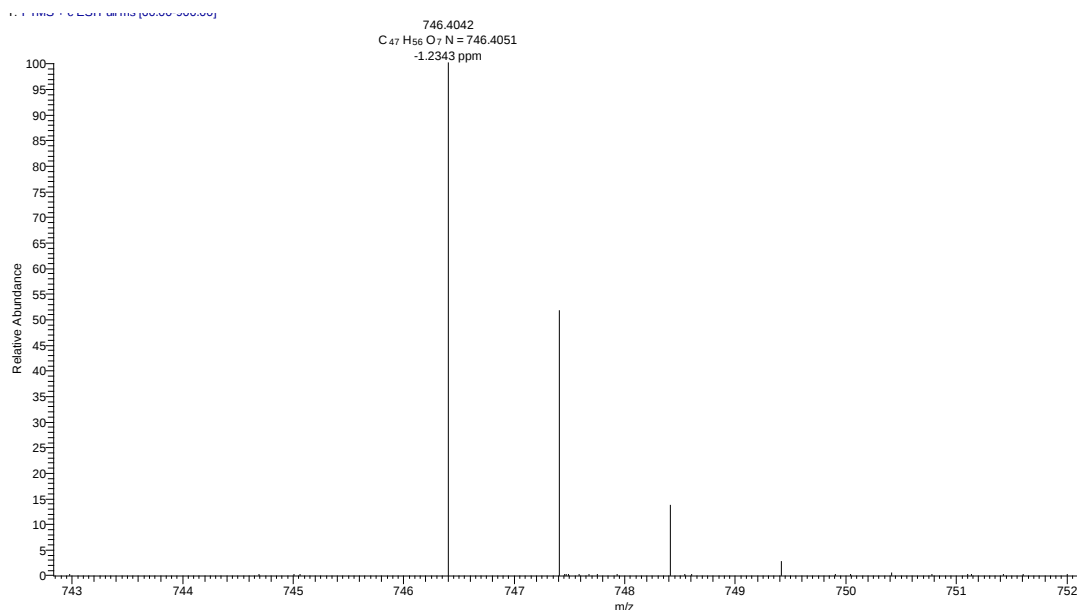
Espectro II.33. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de derivado dimetoxilado con espaciador de 3 (**61**)

En el espectro de carbono (**espectro II.34**) se observan a frecuencias bajas los carbonos de la cadena alifática; por 55.0 ppm se encuentran los dos carbonos de los metoxilos, los cuales presentan el mismo desplazamiento químico. A continuación, se encuentra el resto de los carbonos del iminoazúcar y entre estos los CH_2 de bencilo y los carbonos del éter. Hacia frecuencias altas entre 110.0 ppm y 120.0 ppm los CH del anillo aromático, seguidos por los CH de los bencilos y por ultimo los carbonos ipso.



Espectro II.34. Espectro de ^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de derivado dimetoxilado con espaciador de 3 (**61**)

La formación del compuesto fue confirmada por espectroscopia de masas (**espectro II.35**).



Espectro II.35. Espectro de masas de derivado dimetoxilado con cadena de 3 (**61**)

II.4.7. Formación de ureas, tioureas y selenoureas derivadas de iminoazúcares

En este apartado se planteó la combinación de 1-desoxinojirimicina con funciones de tipo *N*-aril ureido, tioureido y selenoureido (**figura II.25**). Estas funciones pueden contribuir sustancialmente a la modulación de las propiedades biológicas de los derivados aquí diseñados (actividad antiproliferativa y/o anti-Alzheimer). Por un lado, pueden actuar como donadores de puentes de hidrógeno bidentados, y de esta manera establecer interacciones con enzimas clave. Por otro lado, el anillo aromático puede establecer interacciones hidrofóbicas modulables a través del efecto estereoelectrónico de sus sustituyentes. Y finalmente, la naturaleza del calcógeno (S, O, Se) puede también influir de manera notable; por ejemplo, en el caso de las selenoureas pueden también comportarse como potentes antioxidantes en la eliminación de ROS.

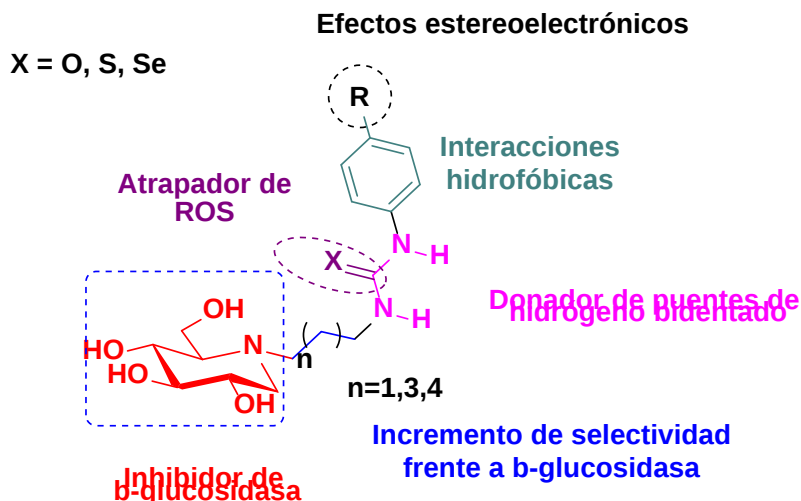
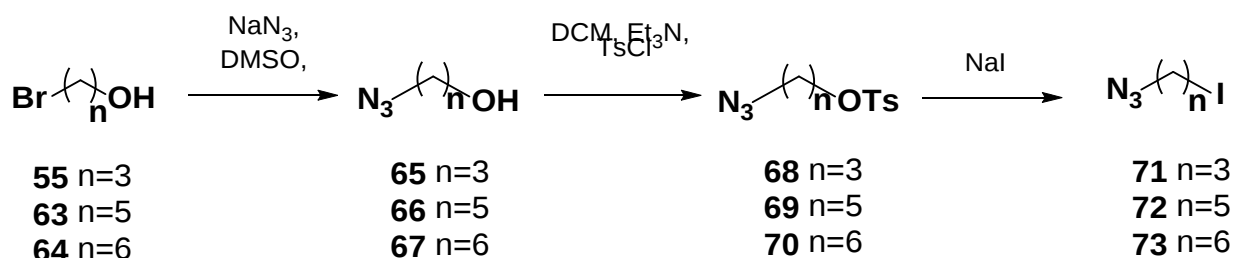


Figura II.25. Diagrama general de ureas, tioureas y selenoureas derivadas de desoxinojirimicina

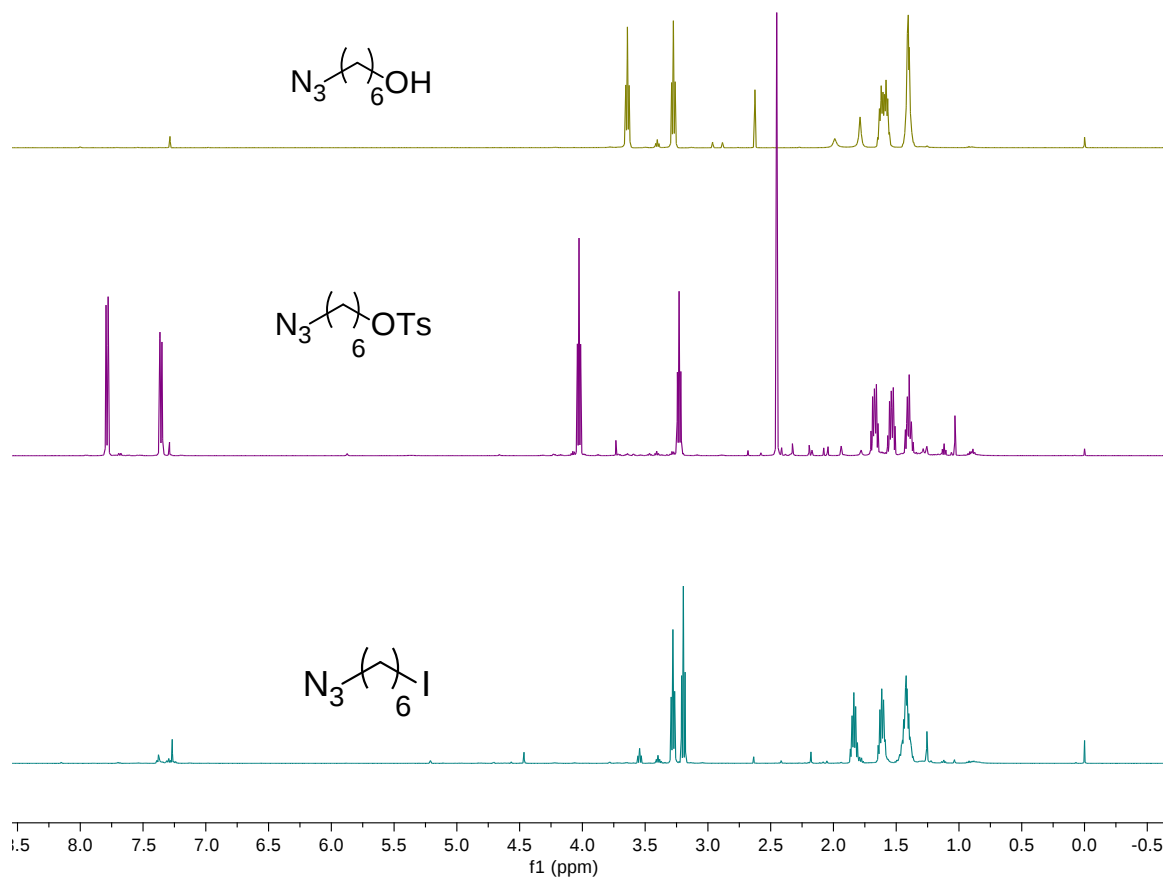
Fueron sintetizados un numero reducido de derivados, en los cuales se varió el calcógeno $X=O, S, Se$, y se modificó el tamaño de cadena espaciadora, $n=3, 5$ o 6 , para así poder evaluar la influencia de estos, en las actividades ensayadas, y finalmente establecer una relación estructura-actividad.

El primer paso para la obtención de este tipo de compuestos fue funcionalizar cadenas hidrocarbonadas de 3, 5 y 6 átomos de carbono con un átomo de yodo en un extremo, como grupo saliente, y una función azido en el otro extremo; dichos compuestos fueron sintetizados a partir del 3-bromopropan-1-ol, 5-bromopentan-1-ol y 6-bromohexan-1-ol respectivamente. Estos fueron sometidos a una reacción de sustitución nucleofílica con NaN_3 , la cual procedió de manera cuantitativa, y no fue necesaria ninguna purificación. Posteriormente se llevó a cabo la tosilación del alcohol, proceso que transcurrió con un rendimiento comprendido entre el 40% y el 60%. Es importante destacar la importancia de controlar el tiempo de reacción, con objeto de evitar reacciones de eliminación, reacción secundaria que se observó principalmente en las cadenas de 5 y 3 carbonos. Finalmente se realizó una segunda sustitución nucleofílica con NaI , sobre el grupo tosilo, para dar lugar a la formación de las yodo-azidas **71-73** (esquema II.12).



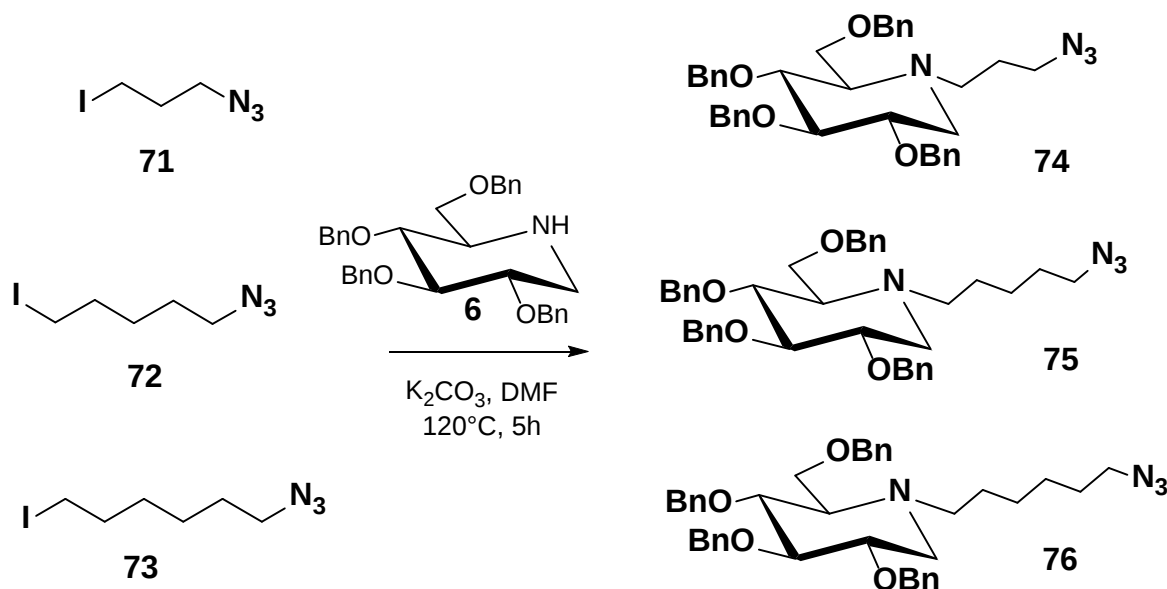
Esquema II.12. Síntesis de las yodo azidas **71-73**

En el **espectro II.36** se observan claramente las diferencias en las posiciones 1 y 6 en la secuencia de tosilación y desplazamiento nucleofílico sobre el azido-alcohol **64**. Puede observarse el desapantallamiento del metileno unido a oxígeno al ser el alcohol tosilado (aproximadamente de 3.7 a 4.0 ppm) y su apantallamiento tras el desplazamiento con yoduro (hasta aproximadamente 3.3 ppm).



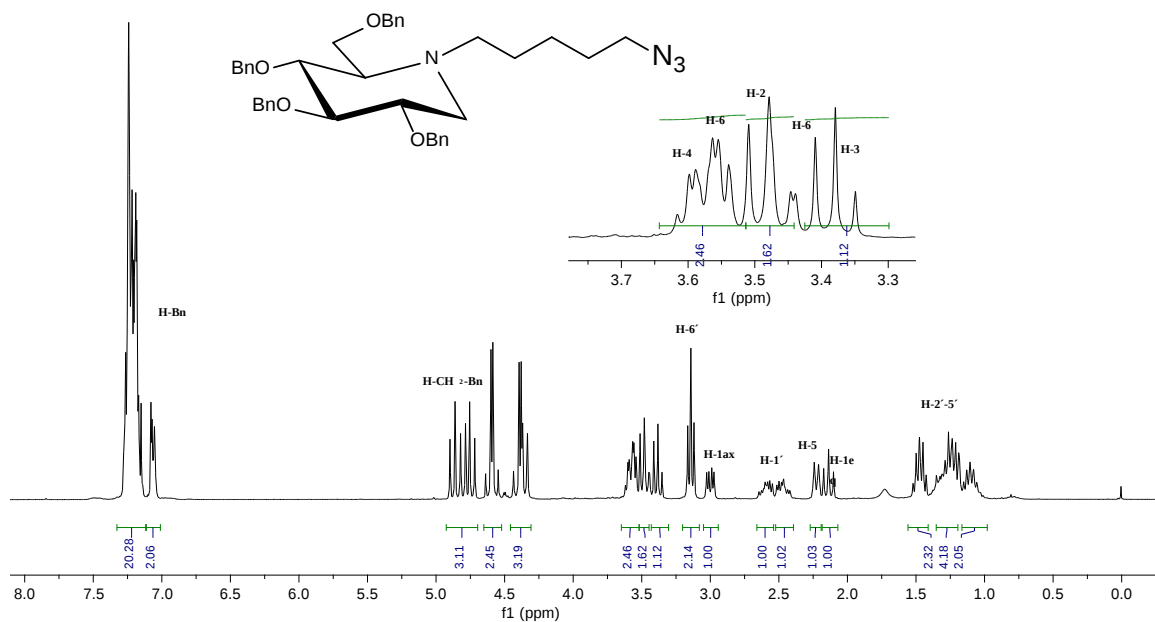
Espectro II.36. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) comparativo de 6-azida-hexanol y la azida yodada

A partir de las cadenas yodadas de 3, 5 y 6 átomos de carbono con azida terminal se llevó a cabo la *N*-alquilación de la 1-desoxinojirimicina protegida (**6**) (**esquema II.13**); debido al fuerte impedimento estérico ocasionado por los grupos bencilos, especialmente de la posición C-6, la alquilación del nitrógeno se encuentra dificultada. Por ello, se requirió de la presencia de base (K_2CO_3) y altas temperaturas (120 °C); aun así, los rendimientos no superaron el 50% tras purificación cromatográfica.

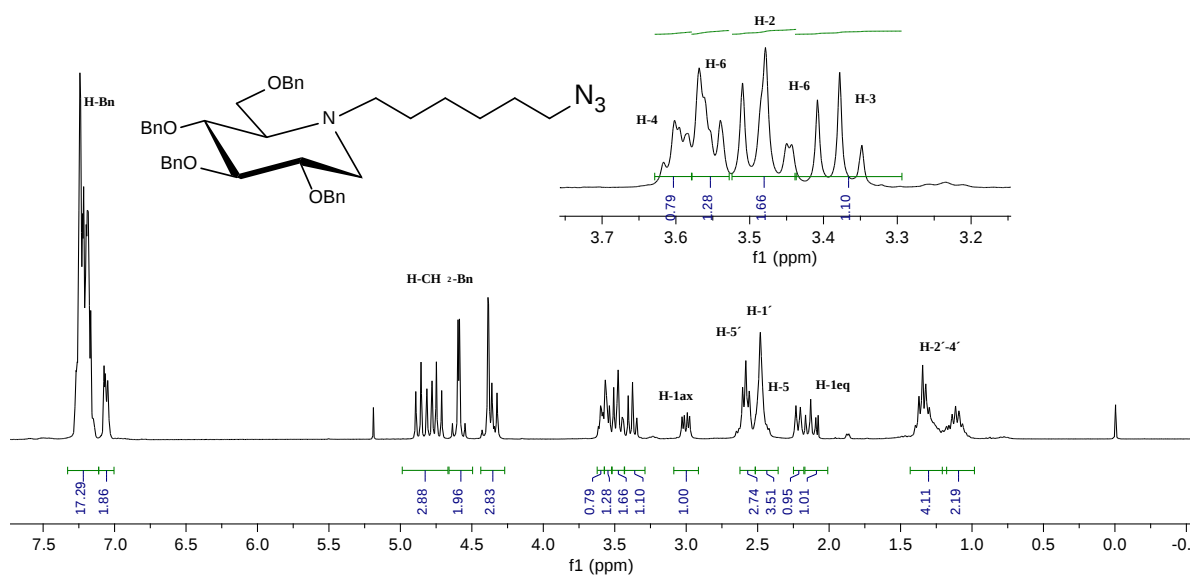


Esquema II.13. Reacción para la *N*-alquilación de 1-desoxinojirimicina con las yodo-azidas **71-73**

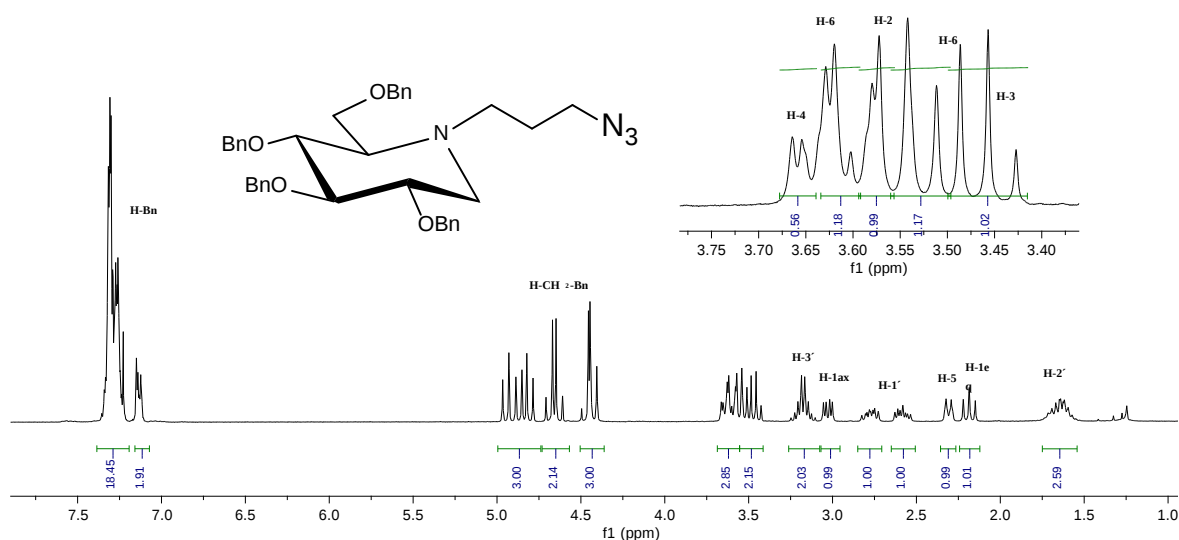
La formación de estos compuestos se corrobora mediante 1H RMN, en los espectros (**espectro II.37, II.38, II.39**) se pudo observar la presencia del iminoazúcar. Los protones anoméricos y el protón de C-5 del se observan a frecuencias más bajas debido al efecto electrónico del nitrógeno, en 3.00 ppm como una señal doble de dobles, el protón anomérico axial, y en 2.12 ppm el protón anomérico ecuatorial, ligeramente más desplazado a frecuencias altas como un doble de triples se ve la presencia del protón de C-5, por otro lado se encuentran los protones de las cadenas con azida terminal, con las que fue alquilado el nitrógeno. Entre 1.00 ppm y 1.80 ppm los protones medios de la cadena, ya sean 2, 6 u 8 protones según el caso; para los protones de los extremos se observan entre 2.30 y 3.30 ppm, ligeramente más desplazados a frecuencias altas, los protones unidos a la azida, debido al ligero efecto protector que esta genera.



Espectro II.37. Espectro de ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) de derivado de desoxinojirimicina 75

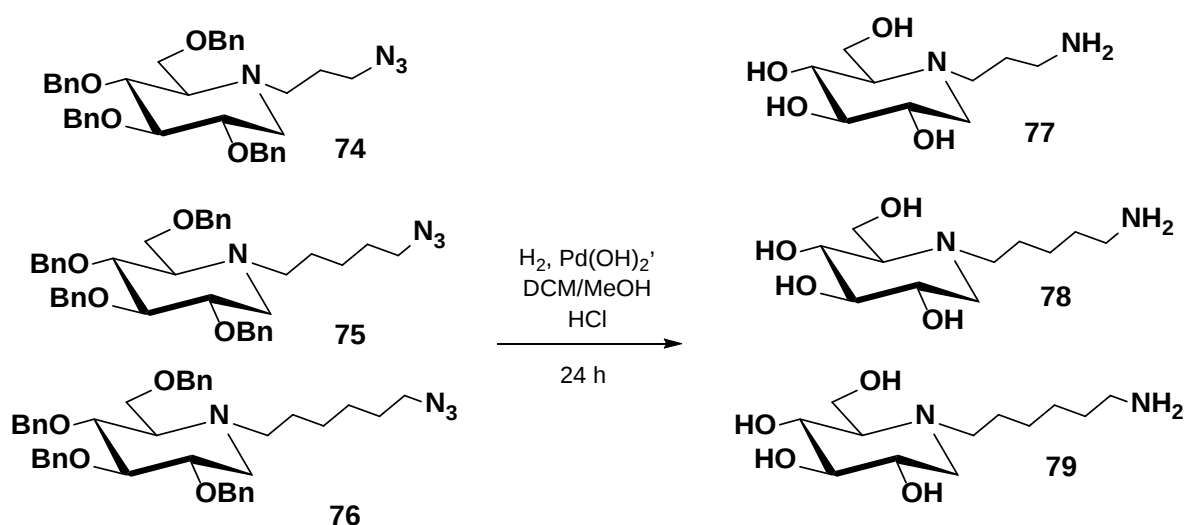


Espectro II.38. Espectro de ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) de derivado de desoxinojirimicina 76



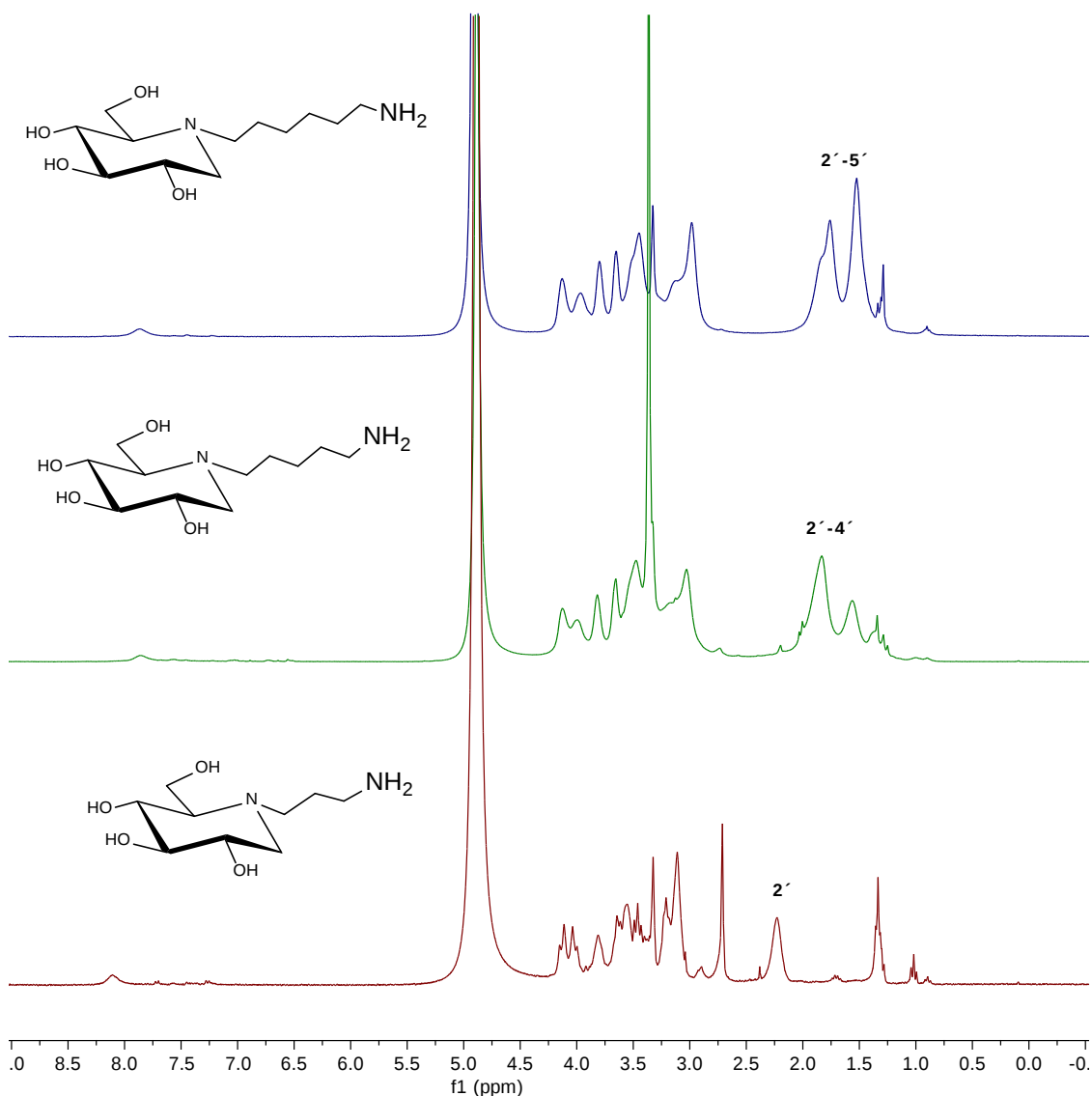
Espectro II.39. Espectro de ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) de derivado de desoxinojirimicina **74**

Posteriormente estos compuestos fueron hidrogenados mediante catálisis heterogénea, empleando Pd(OH)₂/C como catalizador; se empleó como disolvente una mezcla de DCM:MeOH, debido a la gran diferencia de solubilidad de las materias primas y de los productos finales. También fue necesario adicionar unas gotas de HCl, con la finalidad de neutralizar el medio básico provocado por el iminoazúcar, que ralentizaría o incluso evitaría la hidrogenación de los grupos bencilo (**esquema II.14**). De esta forma se obtuvieron los derivados **77-79**.



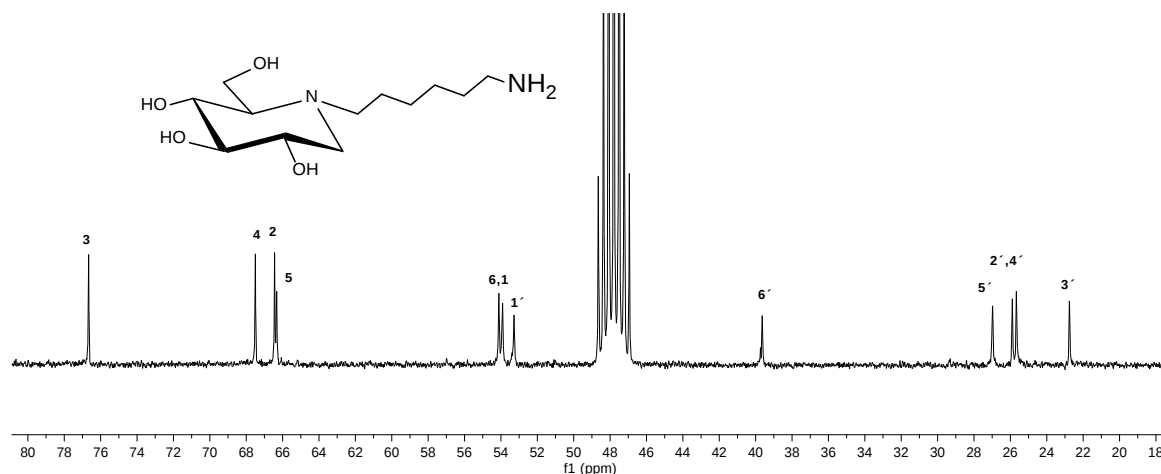
Esquema II.14. Reacción para desprotección de hidroxilos y reducción de azida terminal

La formación de dichos compuestos fue corroborada mediante resonancia magnética nuclear, al ya no observar los protones aromáticos entre 7.00 ppm y 8.00 ppm, debido a la desprotección de los grupos hidroxilos. Las señales se observan anchas y poco definidas, pero es posible observar los protones del iminoazúcar entre 2.80 ppm y 4.30 ppm, así como las señales correspondientes a los protones de los carbonos centrales de las cadenas (**espectro II.40**).



Espectro II.40. Espectro ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) desoxinojirimicina alquilada con cadenas de 3, 5 y 6 átomos de carbono con amina terminal

En el espectro de ^{13}C RMN (**espectro II.41**) se puede observar la ausencia de los carbonos aromáticos, por lo que solo existen señales entre 20.0 ppm y 80.0 ppm; a modo de ejemplo se presenta el espectro del iminoazúcar desprotegido alquilado con cadena de 6 átomos de carbono.



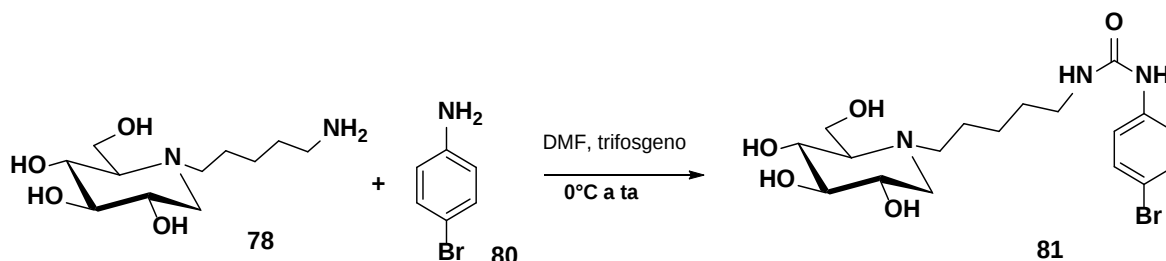
Espectro II.41. Espectro ^{13}C RMN (75.5 MHz, CD_3OD) desoxinojirimicina alquilada con cadena 6 con amina terminal (**79**)

Una vez obtenida la desoxinojirimicina alquilada con diferentes tamaños de cadena con amina terminal se procedió a la preparación de las ureas, tioureas y selenoureas.

II.4.7.1. Formación de urea de *p*-bromoanilina

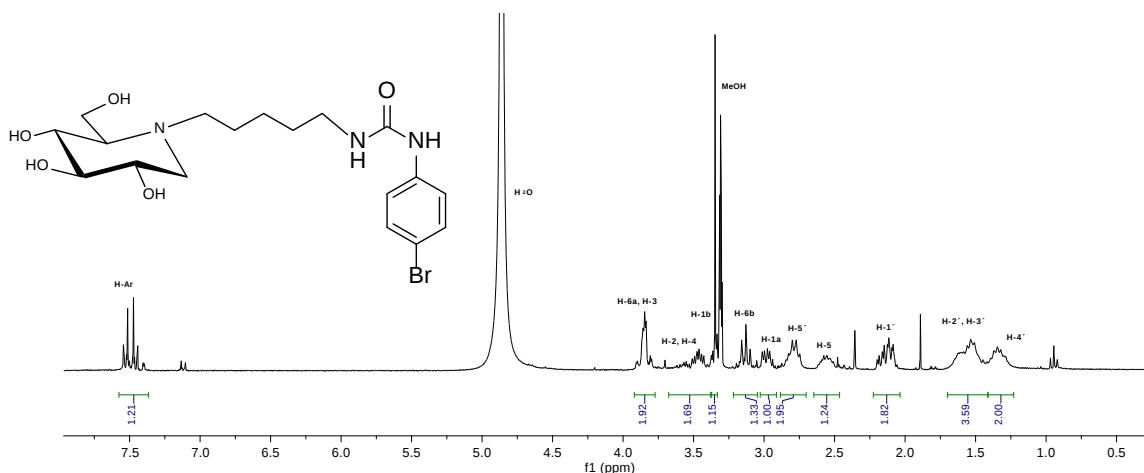
Para la formación de la urea de la *p*-bromoanilina, se empleó *p*-bromoanilina la cual se hizo reaccionar con trifosgeno en DMF, para obtener el correspondiente isocianato, seguido de la adición *in situ* del aminoderivado de la 1-DNJ **78** (**esquema II.15**). Se intentó llevar a cabo el acoplamiento del isocianato con el derivado de 1-DNJ per-*O*-bencilado, con objeto de favorecer el proceso de purificación; no obstante, y de manera totalmente inesperada, en la reacción de hidrogenación, se eliminó el átomo de bromo sobre el anillo aromático. Un problema importante a la hora de acceder a las ureas mostradas es su purificación, al ser compuestos con una polaridad apreciable. A consecuencia de ello, las columnas cromatográficas debieron ser dopadas con Et_3N , la cual resultó imposible de eliminar por evaporación en el rotavapor, posiblemente debido al establecimiento de

interacciones intensas por enlaces de hidrógeno con el compuesto deseado. Por lo que las reacciones fueron realizadas nuevamente para ser purificadas mediante tratamiento con resina ácida Amberlita® IR-120(H⁺).

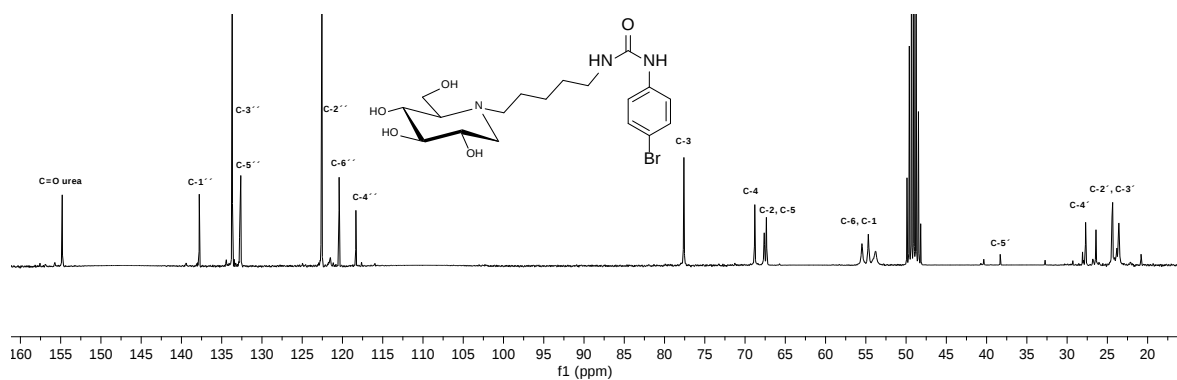


Esquema II.15. Reacción de formación de la urea de *p*-bromoanilina (**81**)

La formación de la urea (**81**) fue corroborada mediante RMN de ¹H (**espectro II.42**) y de ¹³C (**espectro II.43**), observando la presencia de los protones aromáticos del sustituyente de la urea, entre 7.30 ppm y 7.49 ppm. Una de las señales más características del iminoazúcar es un doble de dobles en 3.00 ppm que corresponde al protón axial del carbono anomérico. En el espectro de carbono aunado a las señales de los carbonos del derivado **78**, se observa la presencia de los carbonos del anillo aromático entre 120.0 ppm y 140.0 ppm, una señal en 154.9 ppm perteneciente al carbono carbonílico de la urea, señal confirmatoria de la formación de la urea.

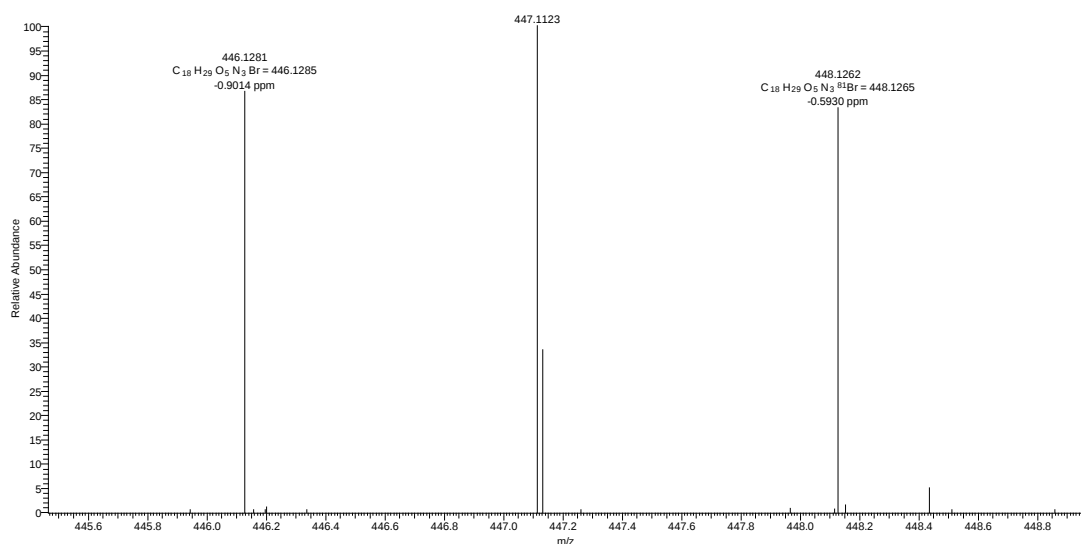


Espectro II.42. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) de urea de desoxinojirimicina (**81**)



Espectro II.43. Espectro de RMN ^{13}C (75.5 MHz, CD_3OD) de urea de desoxinojirimicina (**81**)

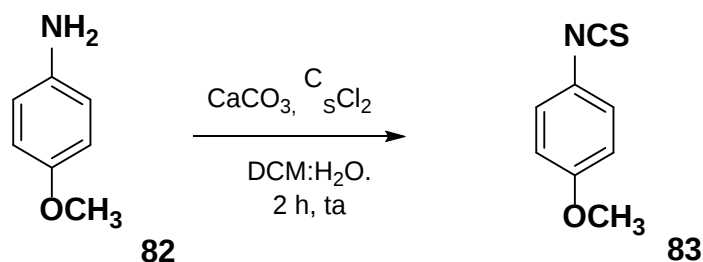
Finalmente, la formación de este compuesto fue también corroborada mediante espectrometría de masas de alta resolución; dicho espectro muestra claramente la presencia del átomo de bromo, al exhibir dos picos con una diferencia de 2 unidades de masa, y con una relación aproximadamente 1:1. (**espectro II.44**).



Espectro II.44. Espectro de masas de alta resolución de urea de *p*-bromoanilina (**81**)

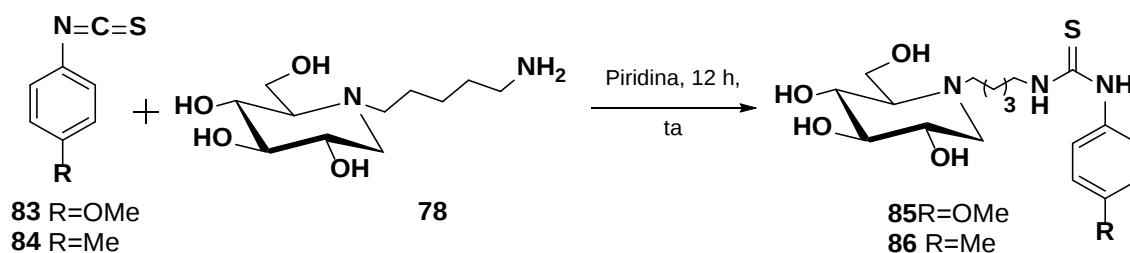
II.4.7.2. Síntesis de tioureas

Las tioureas fueron sintetizadas por adición nucleofílica de los aminoderivados de 1-DNJ sobre los isotiocyanatos de *p*-toluidina y *p*-anisidina; en este último caso, el compuesto no es comercial, y se preparó mediante tratamiento de la *p*-anisidina con tiofosgeno como agente tionante, en un medio trifásico ($\text{DCM-H}_2\text{O-CaCO}_3$) (**esquema II.16**).



Esquema II.16. Síntesis de isotiocianato de *p*-anisidina **83**

Estos isotiocianatos se hicieron reaccionar con el aminoderivado de 1-DNJ desprotegido **78** en piridina (**esquema II.17**). Inicialmente se empleó Et_3N como catalizador básico; no obstante, e igual que ocurrió en el caso de las ureas, resultó imposible de eliminar por completo.



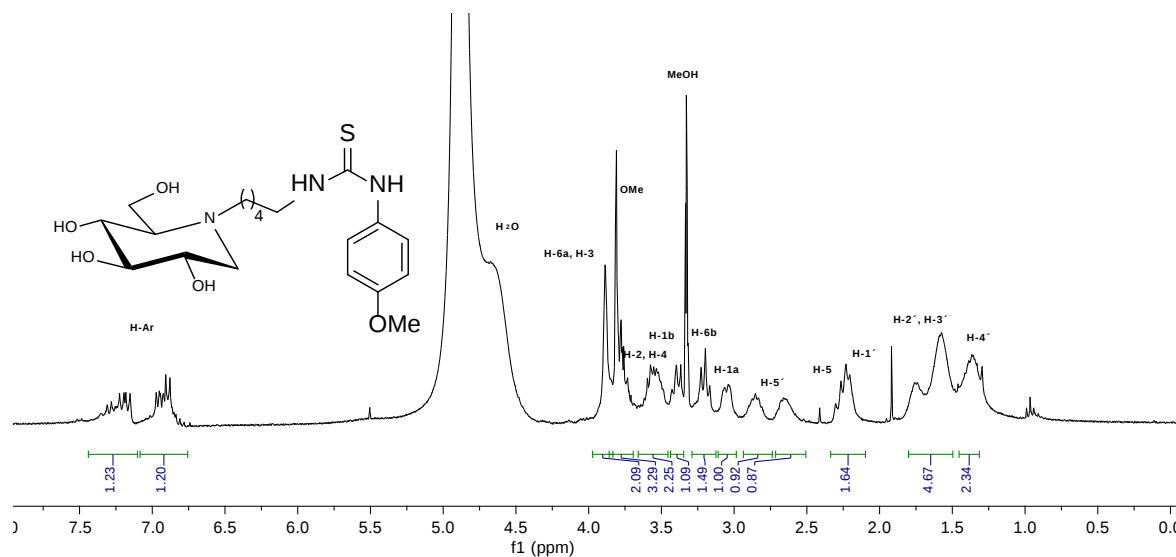
Esquema II.17. Reacción para la formación de tioureas

Con objeto de no emplear Et_3N como agente dopante de la columna, se realizaron lavados con DCM, con los cuales se eliminaron gran parte de las impurezas de la reacción.

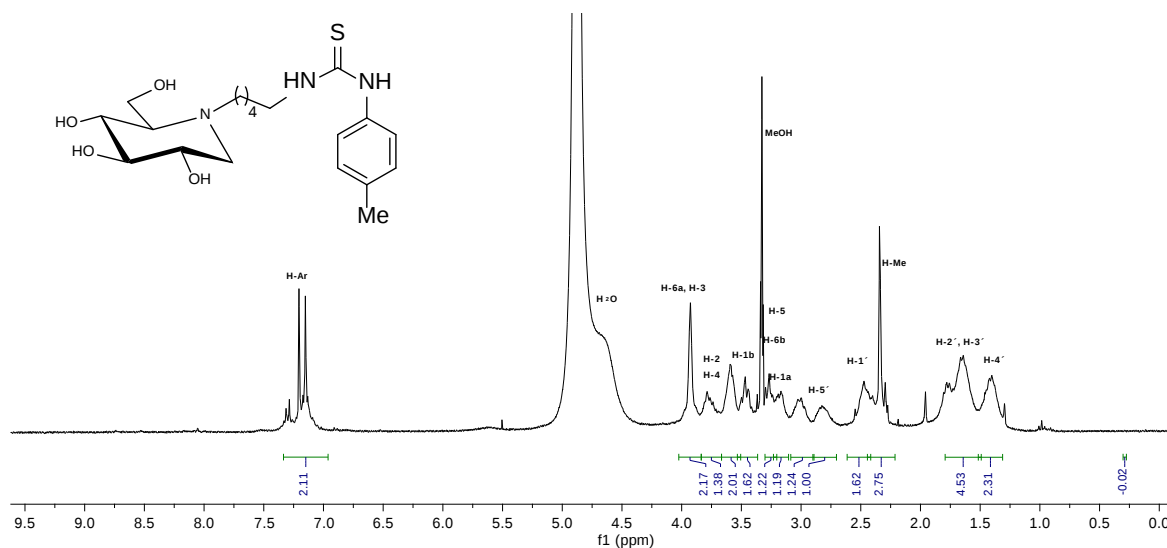
Para confirmar la obtención de los compuestos, estos fueron analizados mediante RMN de ^1H y de ^{13}C , y por espectroscopia de masas.

En los espectros de protón (**espectros II.45 y II.46**) se observa la presencia de los protones aromáticos del sustituyente de la tiourea entre 6.74 ppm y 7.43 ppm; como señal más característica del iminoazúcar está el protón ecuatorial del carbono anomérico, como una señal doble de dobles en 3.00 ppm; sobre 2.60 ppm se encuentra el protón de C-5. Entre 2.92 ppm y 2.54 ppm se presentan los protones de C-5' pertenecientes a la cadena alifática, que actúa como espaciador entre el iminoazúcar y la tiourea, dichos protones sufren la influencia de la tiourea por lo que se encuentran más desapantallados. Por otro lado, a frecuencias más bajas debido al efecto protector del nitrógeno del iminoazúcar, se encuentran

los protones de C-1', los cuales se observan entre 2.14 ppm y 2.03 ppm. La secuencia de señales en los espectros de ambas tioureas sigue el mismo patrón; la diferencia más evidente entre ellos es la señal simple del metilo en 2.33 ppm, en la tiourea del *p*-tolilo (**86**), y el metoxilo de la tiourea de la *p*-anisidina (**85**) en 3.33 ppm.



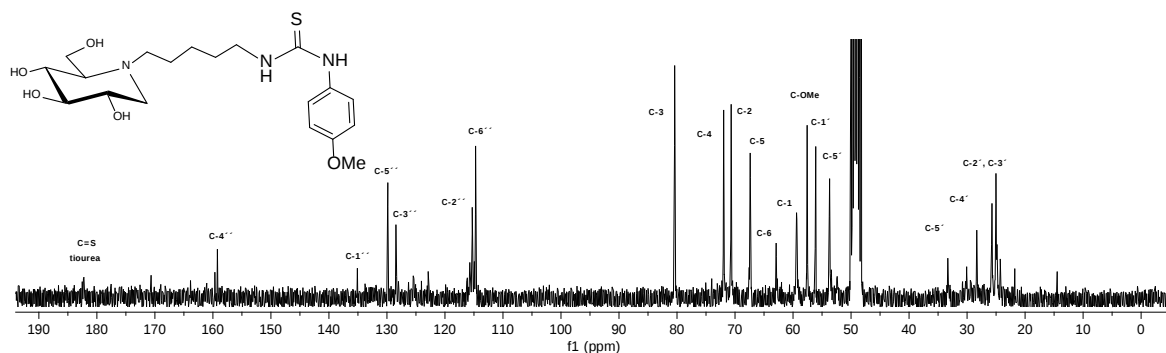
Espectro II.45. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) de tiourea de *p*-anisidina (**85**)



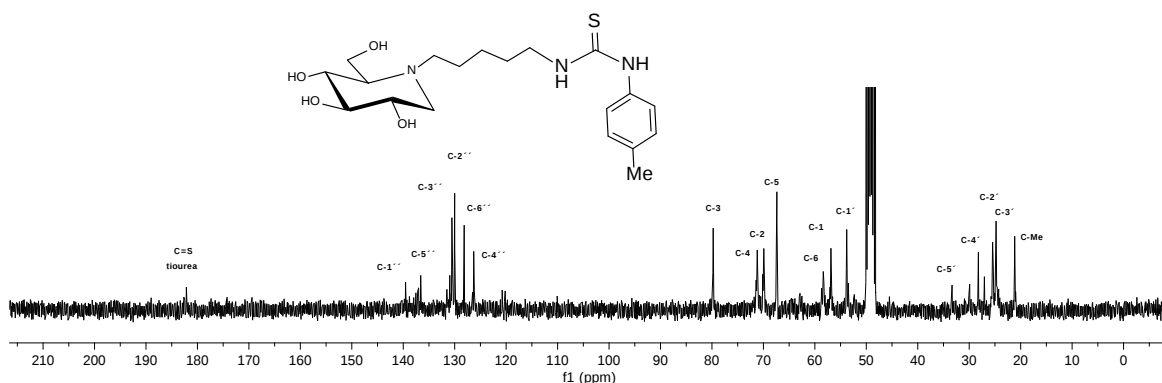
Espectro II.46. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) de tiourea de *p*-tolilo (**86**)

Por otro lado, en los espectros de carbono (**espectros II.47 y II.48**) se observa una señal en 182.2 ppm para la tiourea de la *p*-anisidina (**85**) y en 182.2 ppm para la del *p*-tolilo (**86**), las cuales corresponden a los grupos tiona ($\text{C}=\text{S}$) de las tioureas. En la región de los

aromáticos se puede ver a los carbonos del anillo aromático que sustituye a las tioureas. En el caso de la tiourea de la *p*-anisidina, C-4'', se encuentra más desplazado hacia frecuencias altas debido al efecto del oxígeno del metoxilo que sustituye al anillo. En el caso del esqueleto del iminoazúcar y la cadena, mantienen el mismo patrón de señales que en los casos anteriores. Se pueden observar los carbonos del metilo y metoxilo que actúan como sustituyentes del anillo aromático, en 21.0 ppm y 57.6 ppm respectivamente.

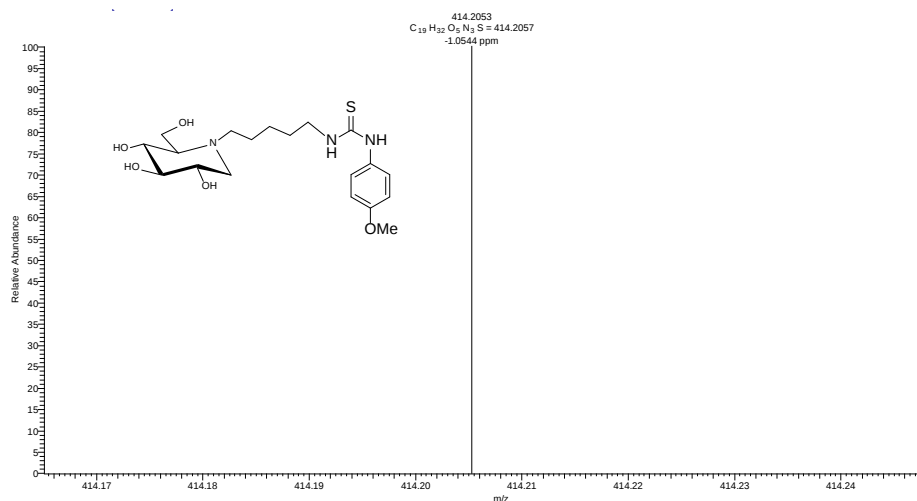


Espectro II.47. Espectro de ¹³C RMN (75.5 MHz, CD₃OD) de tiourea de *p*-anisidina (**85**)

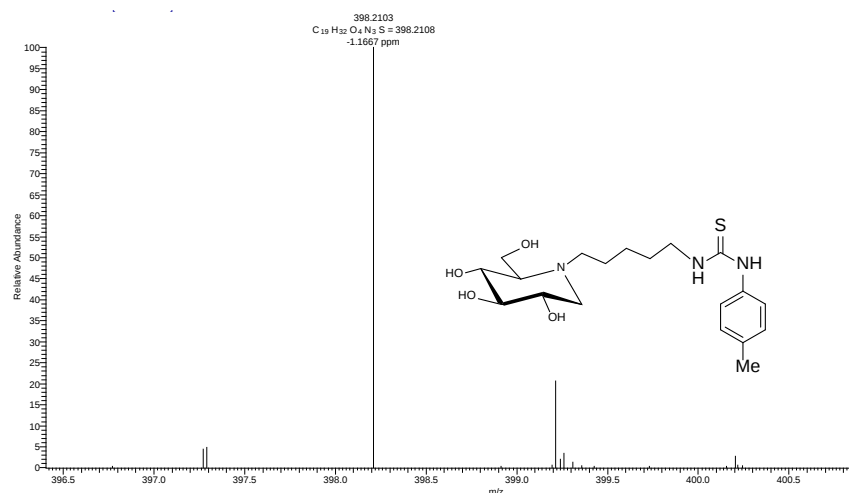


Espectro II.48. Espectro de ¹³C RMN (75.5 MHz, CD₃OD) de tiourea de *p*-tolilo (**86**)

Finalmente se realizó la espectroscopia de masas para corroborar la formación de ambas tioureas (**espectro II.49 y II.50**).



Espectro II.49. Espectro de masas de alta resolución de urea de *p*-anisidina (**85**)

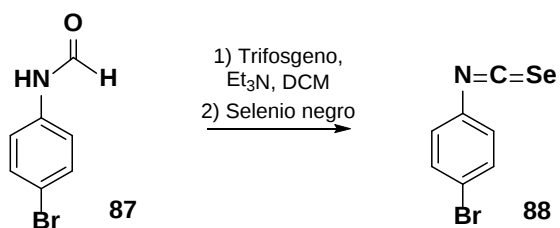


Espectro II.50. Espectro de masas de alta resolución de urea de *p*-tolilo (**86**)

II.4.7.3. Formación de selenoureas

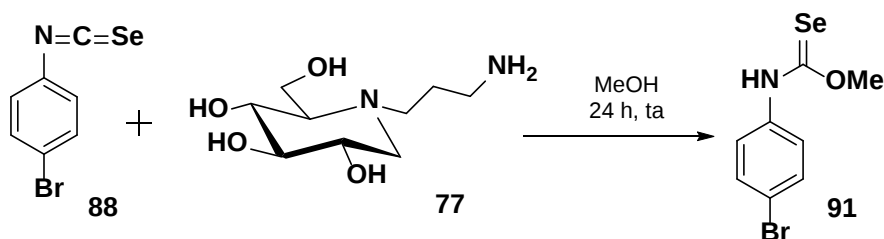
Por otro lado, también se formó el isoselenocianato a partir de la formamida de la *p*-bromoanilina (**esquema II.18**); esta reacción tiene lugar mediante deshidratación de la formamida promovida por el trifosgeno, para dar un isonitrilo intermedio no aislado, seguido de acoplamiento *in situ* con selenio negro elemental. La formación de este compuesto resultó ser muy sensible a la humedad, así como a la escala empleada; así pues, con escalas no superiores a 300 mg, así como mediante el empleo de disolventes secos y malla molecular

en la reacción, se obtuvo con un rendimiento del 60%. La reacción del isoselenocianato **88** con los derivados de 1-DNJ **77** y **79** condujo a las correspondientes selenoureas **89** y **90**.

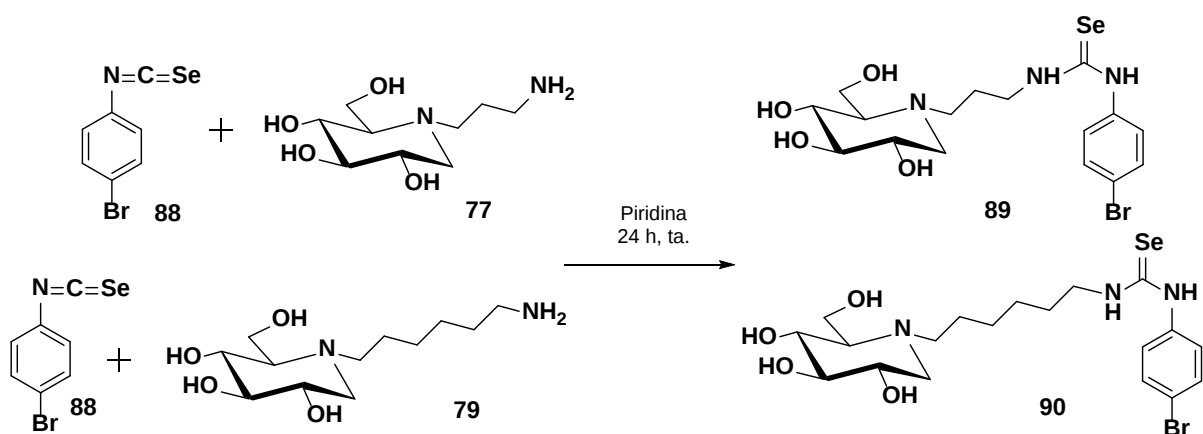


Esquema II.18. Formación del isoselenocianato **88**

El intento de formar las selenoureas deseadas, mediante el acoplamiento de **77** y **88** en MeOH resultó infructuoso (**esquema II.19**). Ya que el único producto aislado fue el correspondiente selenocarbamato de metilo, formado por el ataque nucleofílico inesperado del MeOH sobre **76**.

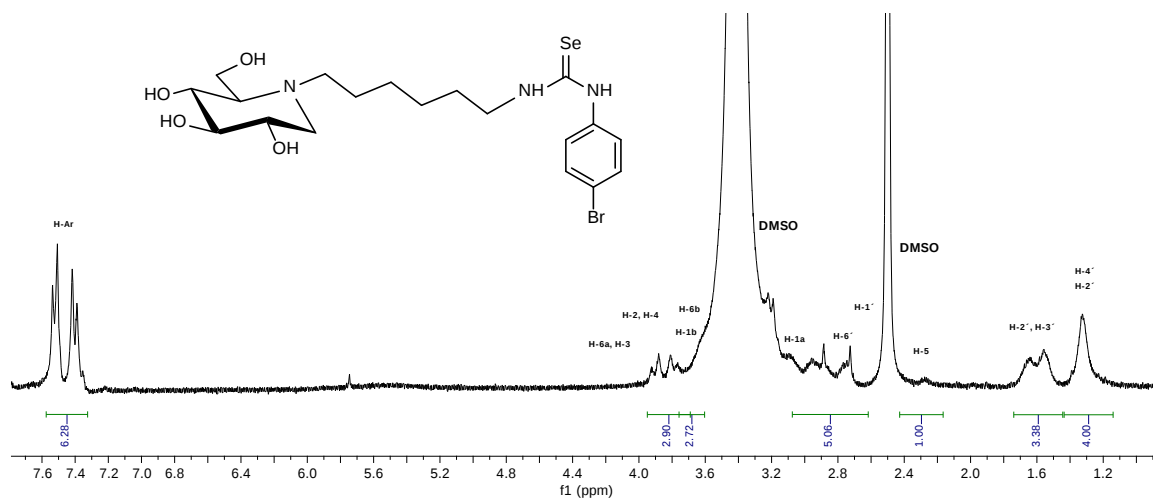


Esquema II.19. Formación de selenocarbamatos



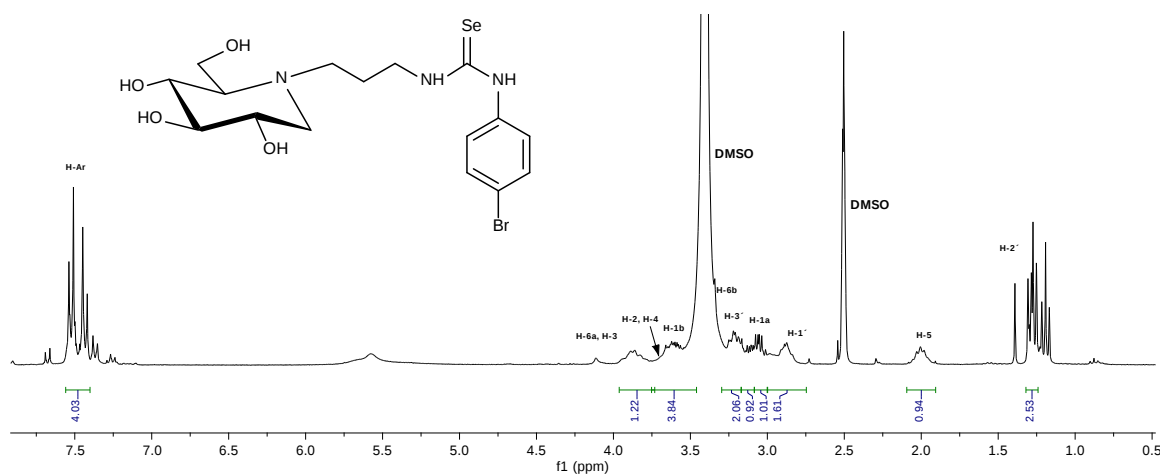
Esquema II.20. Formación de selenoureas

Posteriormente se repitió la reacción, utilizando como disolvente piridina, la cual también actúa como base y ayuda a neutralizar el clorhidrato de la amina formado en la reacción anterior; con esta metodología la reacción procedió de forma cuantitativa de acuerdo con la TLC (**esquema II.20**). Los intentos de purificación de las selenoureas preparadas mediante cromatografía en columna resultaron infructuosos, ya que sólo se observó descomposición en sílica. Se optó entonces por, una vez finalizada la reacción, llevar a cabo lavados con ciclohexano con objeto de eliminar el exceso del isoselenocianato. Dichos compuestos son bastante inestables en solución, por lo que obtener los espectros de RMN resultó bastante complicado, únicamente fue posible obtener los espectros de ^1H RMN, ya que se presentaba descomposición del compuesto durante el experimento. En el espectro de ^1H RMN de las selenoureas (**espectro II.51 y II.52**), se pueden observar las señales de los protones aromáticos entre 7.00 y 7.70 ppm, seguido por los protones del iminoazúcar a frecuencias más bajas de 2.70 a 3.20 ppm y finalmente los protones de la cadena espaciadora entre 1.00 y 2.20 ppm.



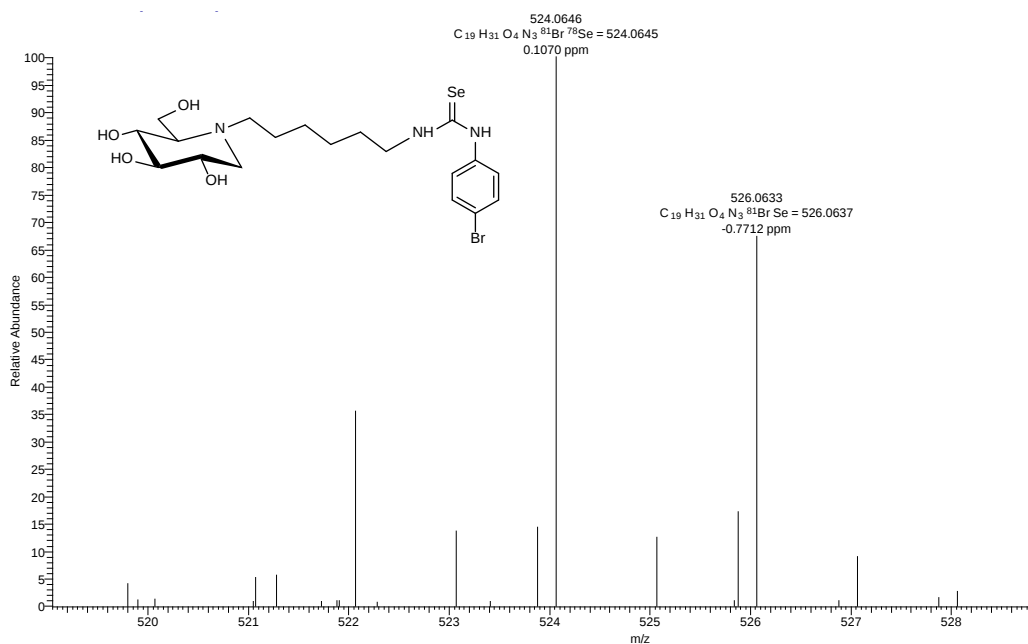
Espectro II.51. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de selenourea de 6 (**90**)

La elucidación de los espectros de resonancia se vio un poco impedida debido a que las señales del iminoazúcar se ven traslapadas con las señales del DMSO; además, probablemente debido a la existencia de conformeros a consecuencia del grupo selenoureido, las señales se encuentran bastante ensanchadas.

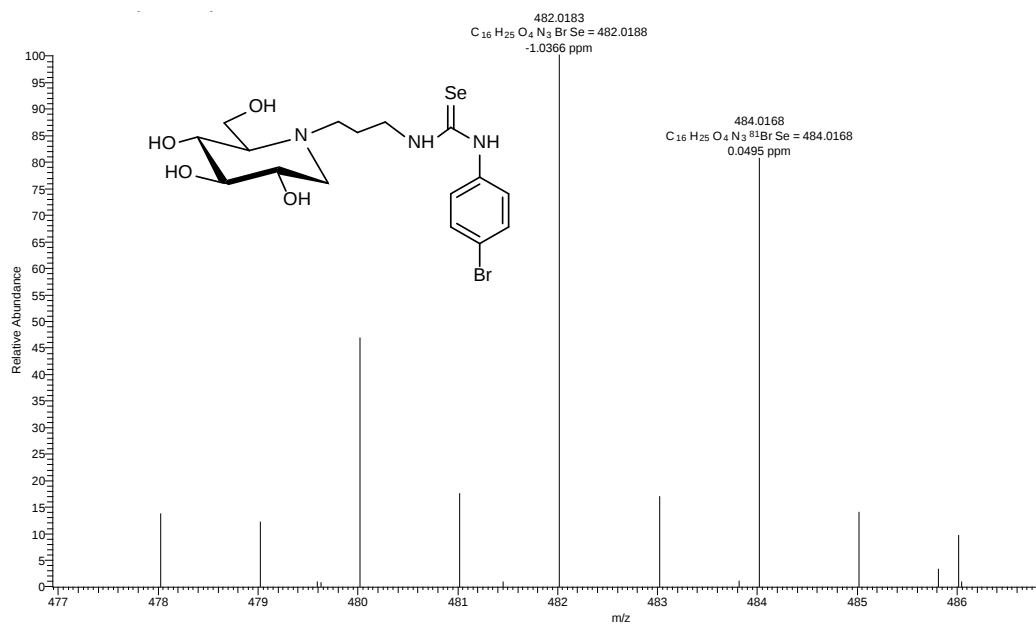


Espectro II.52. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) de selenourea de 3 (**89**)

Finalmente, para confirmar la existencia de las selenoureas se obtuvieron los espectros de masas de alta resolución (**espectro II.53 y II.54**) con los que se observó la presencia de los iones moleculares de ambos isotopos del bromo en los dos casos.



Espectro II.53. Espectro de masas de alta resolución de selenourea **90**

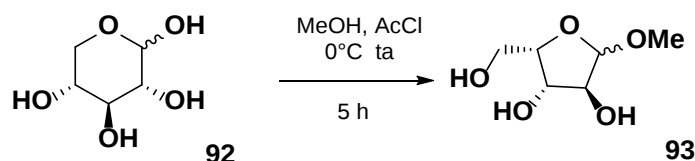


Espectro II.54. Espectro de masas de alta resolución de selenourea **89**

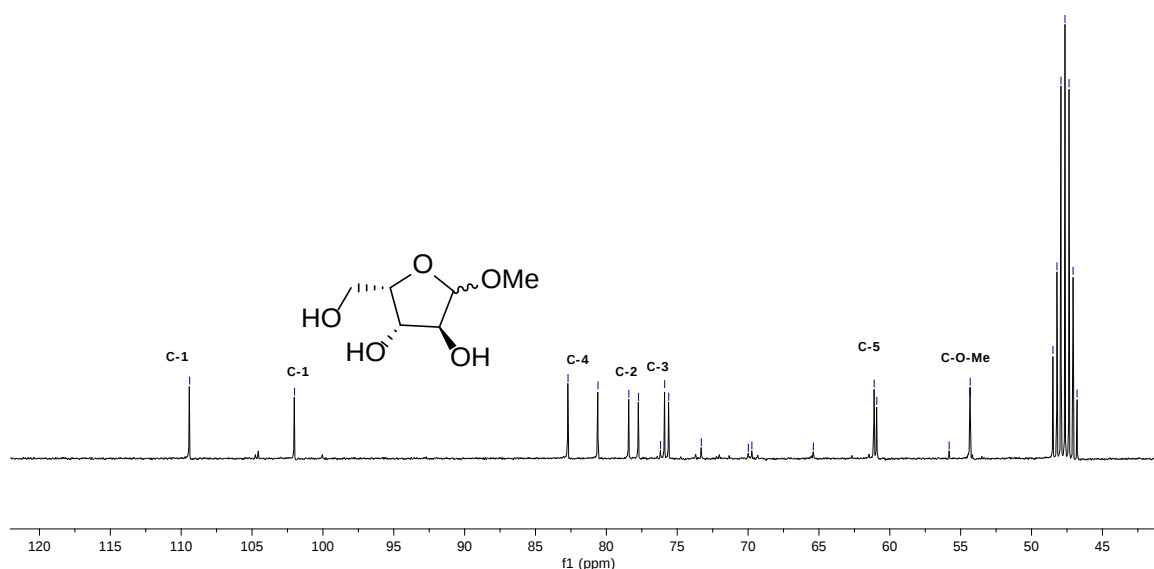
II.4.8. Síntesis de derivados de azafagomina

Con objeto de comprobar si la presencia de un átomo de nitrógeno adicional en el cuerpo del iminoazúcar ejercía algún efecto sobre la actividad biológica, se planeó llevar a cabo la obtención de derivados análogos a los anteriores sobre azafagomina, iminoazúcar que presenta dos átomos de nitrógeno endocíclicos en forma de hidrazina. Para la obtención de la azafagomina adecuadamente protegida se empleó el método descrito por Viuff y Jensen¹⁰³, con algunas modificaciones.

A partir de la L-xilosa se formó de manera cuantitativa el correspondiente metil furanósido por tratamiento con cloruro de acetilo en metanol; en esta reacción de glicosilación, se genera HCl *in situ*, que actúa como catalizador, por reacción del MeOH con AcCl (**esquema II.21**). Para corroborar la presencia de la forma furano del azúcar se realizó un espectro de resonancia magnética nuclear de carbono ^{13}C RMN (**espectro II.55**), en el cual se pudo observar el desplazamiento del carbono 4 a frecuencias más altas debido al cambio estructural del azúcar. En el espectro se observan todas las señales dobles debido a la presencia de ambos anómeros.

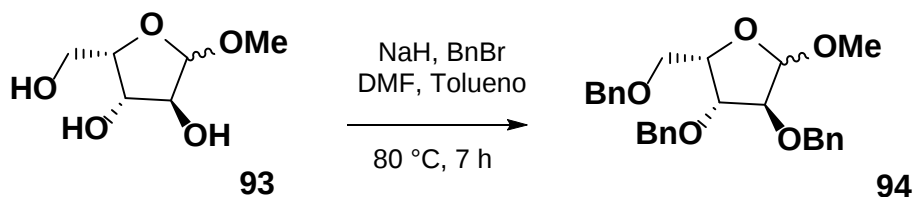


Esquema II.21. Reacción de transformación de L-xilosa a su forma metil furanósido



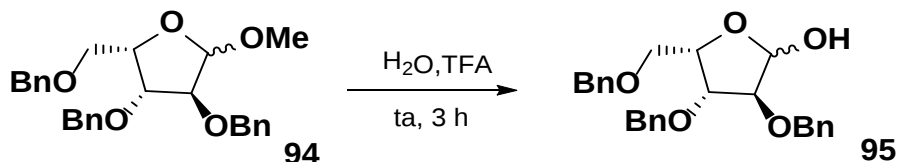
Espectro II.55. Espectro de ^{13}C RMN (75.5 MHz, CD_3OD) de metil-L-xilopiranososa (93)

Una vez obtenida la forma furano se procedió a proteger todos los hidroxilos libres de la molécula, para lo cual se utilizó bromuro de bencilo como agente protector e hidruro de sodio como base (**esquema II.22**).

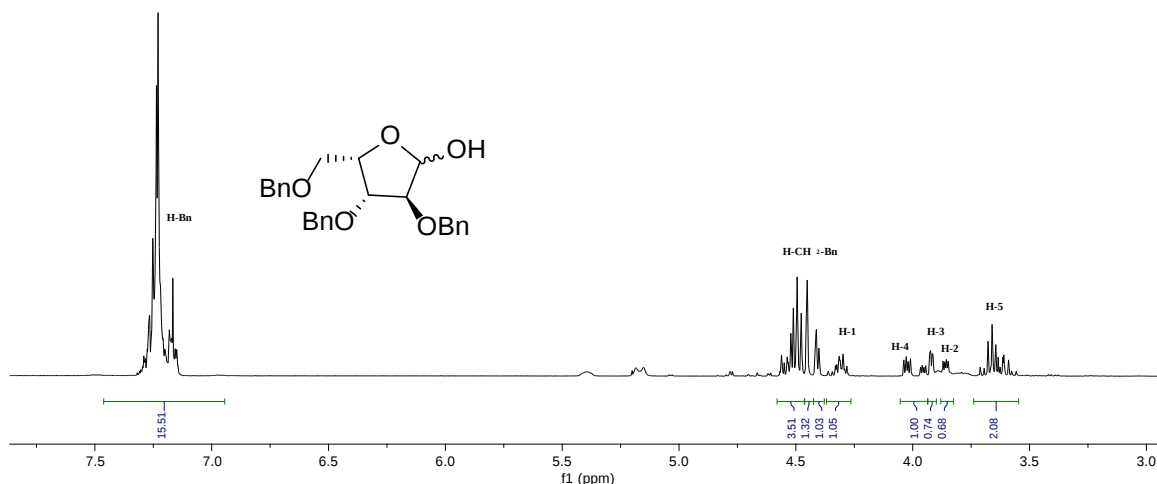


Esquema II.22. Reacción de protección de forma furano de L-xilosa (93)

Continuando con la síntesis se hidrolizó el metil glicósido (94) utilizando una solución acuosa de TFA al 80% (**esquema II.23**). En el espectro de resonancia (**espectro II.56**) se puede observar la ausencia del grupo metilo, lo que confirma que la hidrolisis se llevó a cabo.

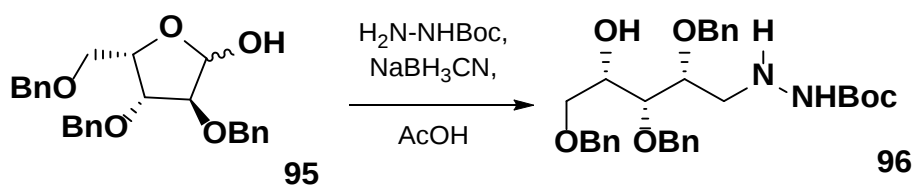


Esquema II.23. Reacción de hidrolisis del metoxilo de 94

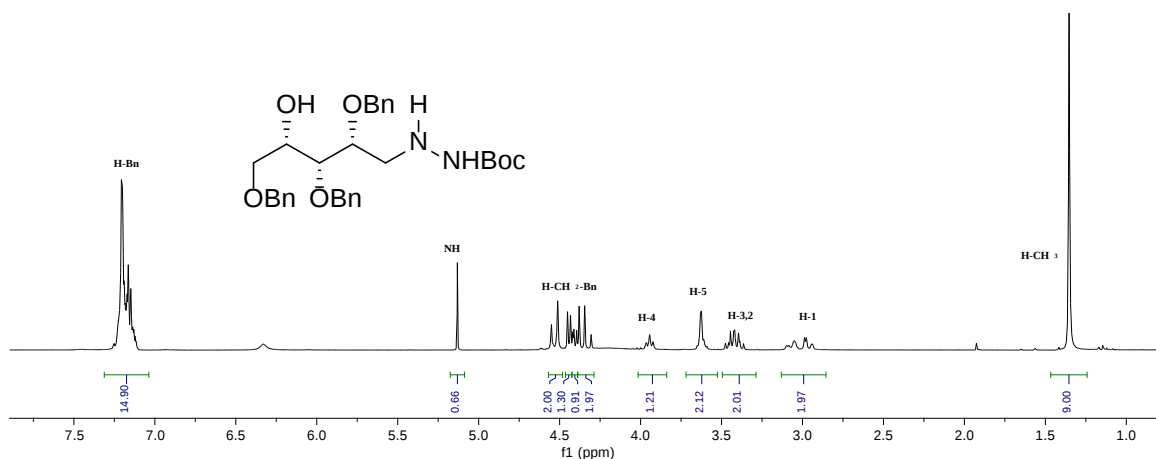


Espectro II.56. Espectro de ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) de L-xilofuranosa bencilada (95)

Posteriormente se realizó una aminación reductiva, utilizando *tert*-butilcarbazato, ácido acético y cianborohidruro de sodio como agente reductor en metanol (**esquema II.24**). En este paso de reacción el carbohidrato **95**, un azúcar reductor que se encuentra en equilibrio con su forma aldehídica abierta, esta sufre el ataque del *tert*-butilcarbazato, dando lugar a la aminación reductiva; esto se observa claramente en el espectro de RMN de protón (**espectro II.57**) observando un desplazamiento hasta 3.00 ppm de los protones de C-1, debido al efecto desapantallante que generan los átomos de nitrógeno, con relación a los átomos de oxígeno; por otro lado también se observa una señal simple en 1.35 ppm la cual integra para 9 protones y corresponde a los metilos del grupo Boc.



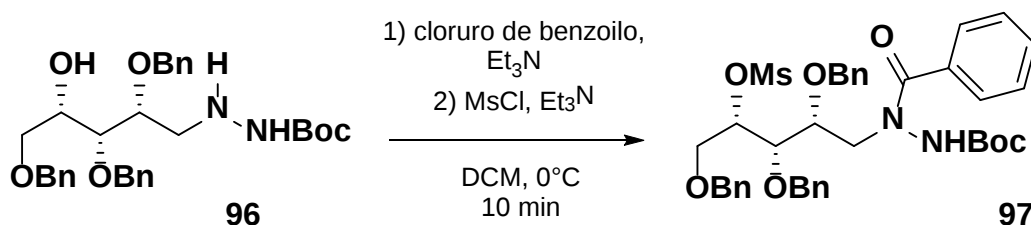
Esquema II.24. Aminación reductiva entre **95** y *tert*-butilcarbazato



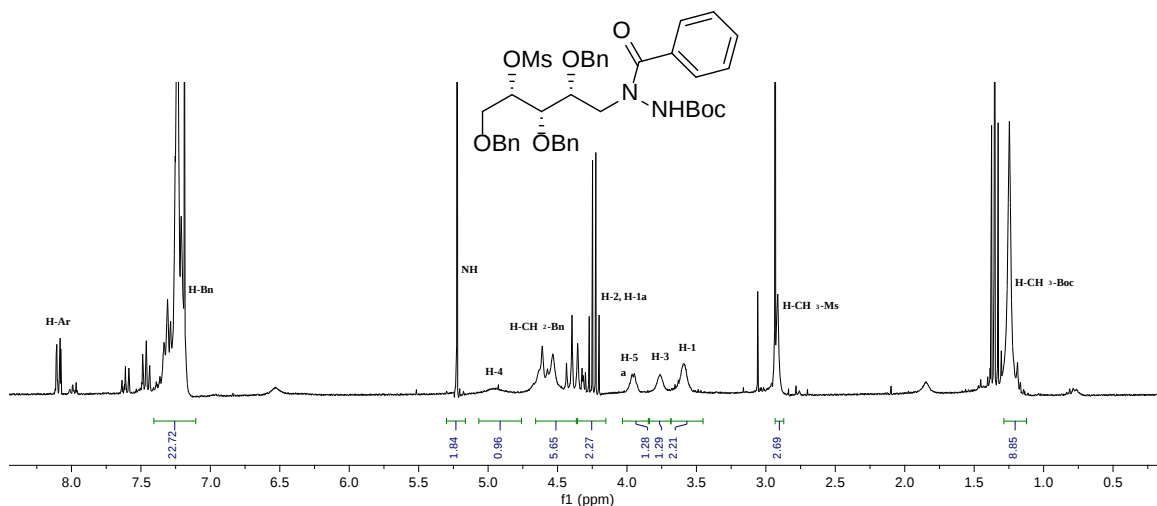
Espectro II.57. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de *tert*-butil 2-((2R,3R,4S)-2,3,5-tris(benziloxi)-4-hidroxipentil)hidrazina-1-carboxilato (**96**)

Para dirigir la alquilación de uno de los nitrógenos, fue necesario proteger selectivamente a uno de ellos; para ello se utilizó cloruro de benzoílo, protegiendo de esta manera al segundo nitrógeno. Esta es una reacción que procede de forma cuantitativa; una vez transcurrida la benzoilación, se realizó una reacción de mesilación, con la finalidad de favorecer la ciclación entre el N-1, una vez desprotegido, y el carbono que porta el mesilo

(esquema II.25). En el espectro de resonancia (**espectro II.58**) se puede observar la presencia de los protones correspondientes al benzoilo entre 7.00 y 8.50 ppm. A su vez se encuentra una señal simple en 2.91 ppm que integra para 3 protones, correspondiente al metilo de grupo mesilo.

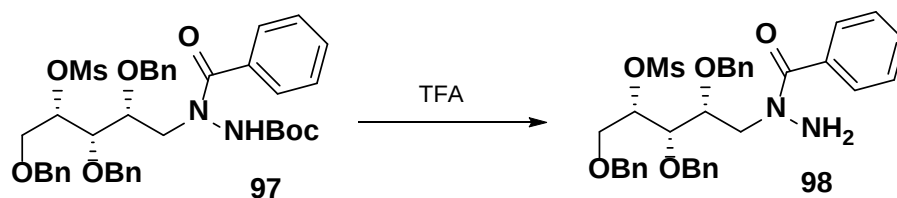


Esquema II.25. Reacción de benzilación y mesilación para formación de azafagomina

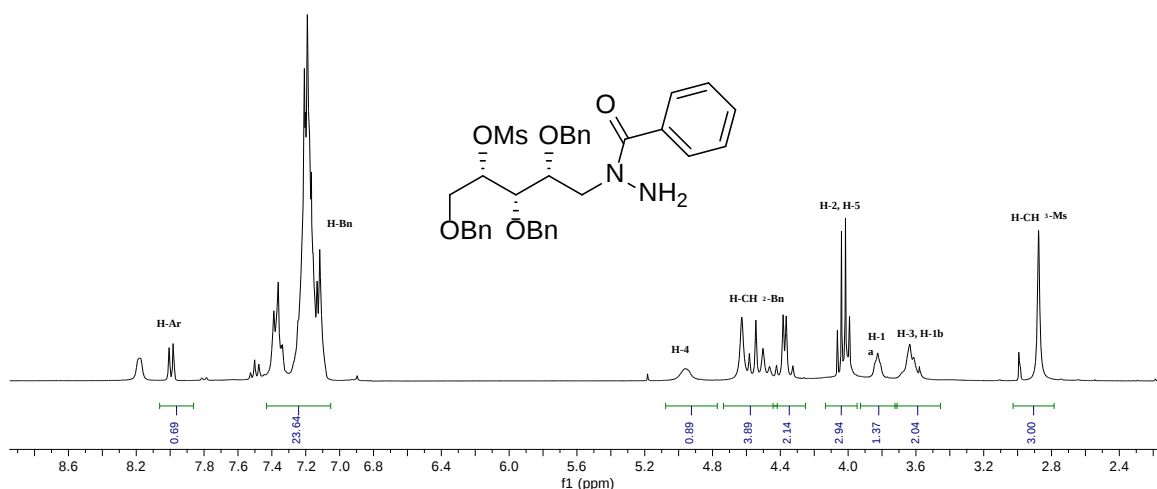


Espectro II.58. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de tert-butil 2-benzoil-2-((2R,3S,4S)-2,3,5-tris(benziloxi)-4-((metilsulfonyl)oxi)pentil)hidrazina-1-carboxilato (**97**)

Para inducir la ciclación de la azafagomina fue necesario eliminar el grupo Boc, para lo cual se utilizó ácido trifluoroacético a temperatura ambiente (**esquema II.26**). En el espectro de resonancia de protón (**espectro II.59**) podemos observar la pérdida de la señal simple en 1.24 ppm perteneciente al grupo Boc. De esta manera la amina queda libre lo que favorece el ataque nucleofílico sobre el carbono 4.



Esquema II.26. Reacción de eliminación del grupo Boc.

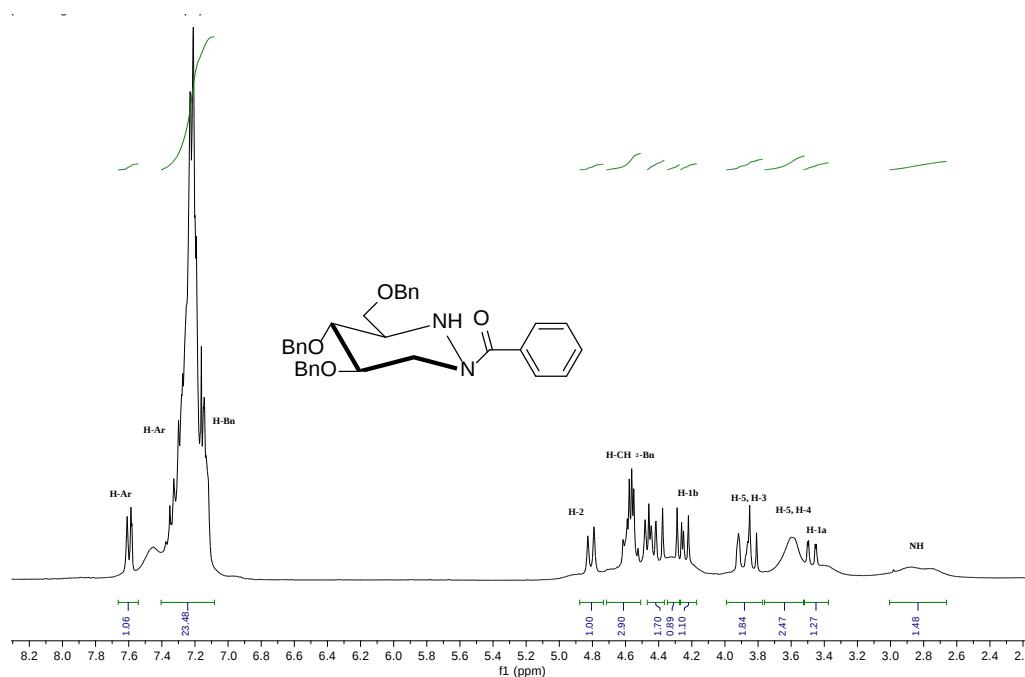


Espectro II.59. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de (2S,3S,4R)-5-(1-benzoylhidrazinil)-1,3,4-tris(benziloxi)pentan-2-il metanesulfonato (**98**)

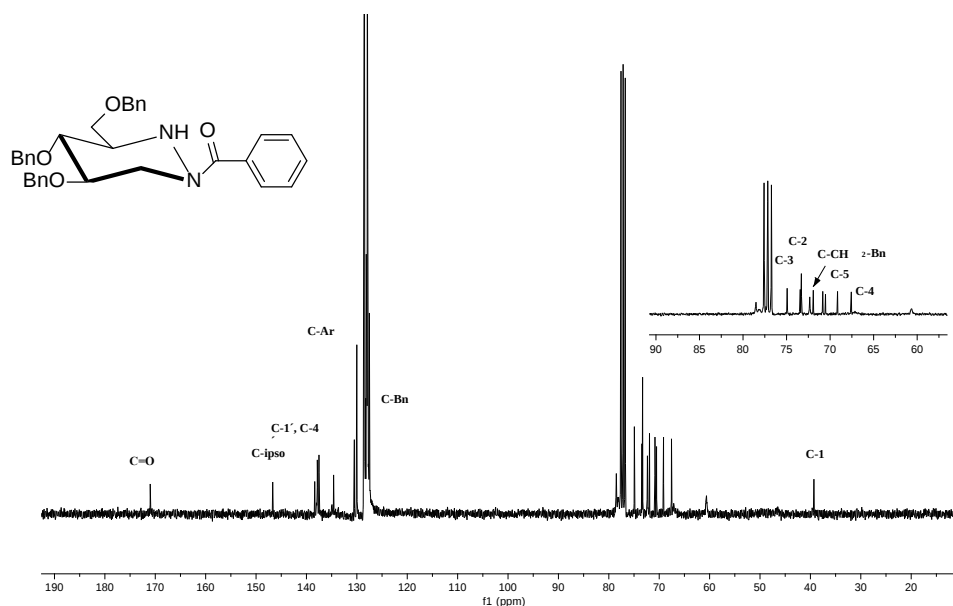
Una vez eliminado el grupo Boc se indujo la ciclación mediante calentamiento en presencia de una base no nucleofílica (*N,N*-diisopropiletilamina o base de Hünig); (**esquema II.27**). En el espectro de resonancia de ^1H RMN (**espectro II.60**), se puede observar el desplazamiento del protón de C-4 a frecuencias más bajas, y además ya no se observa la presencia de la señal simple del grupo mesilo. Por otro lado, en el espectro de ^{13}C RMN (**espectro II.61**), se encuentra la señal del carbono carbonílico del benzoilo en 171.0 ppm, también se observa la señal de C-1 en 39.3 ppm, y la del C-4 en 67.5 ppm, ambas señales se encuentran desplazadas a frecuencias bajas debido a la influencia de los átomos de nitrógeno.



Esquema II.27. Reacción de ciclación de azafagomina bencilada



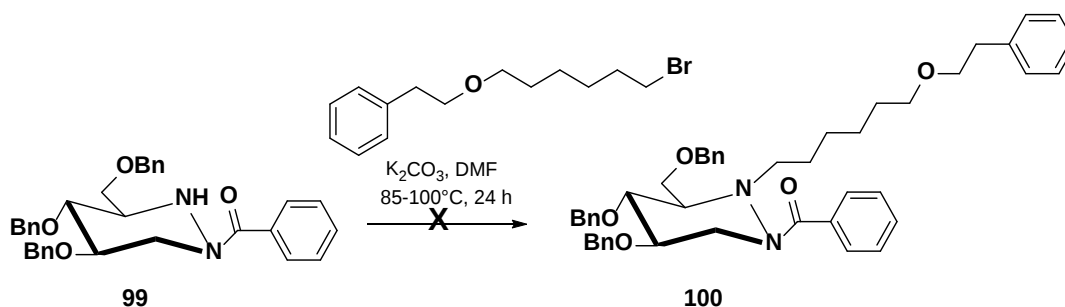
Espectro II.60. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de azafagomina benzoilada bencilada (**99**)



Espectro II.61. Espectro de ^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de azafagomina benzoilada bencilada (**99**)

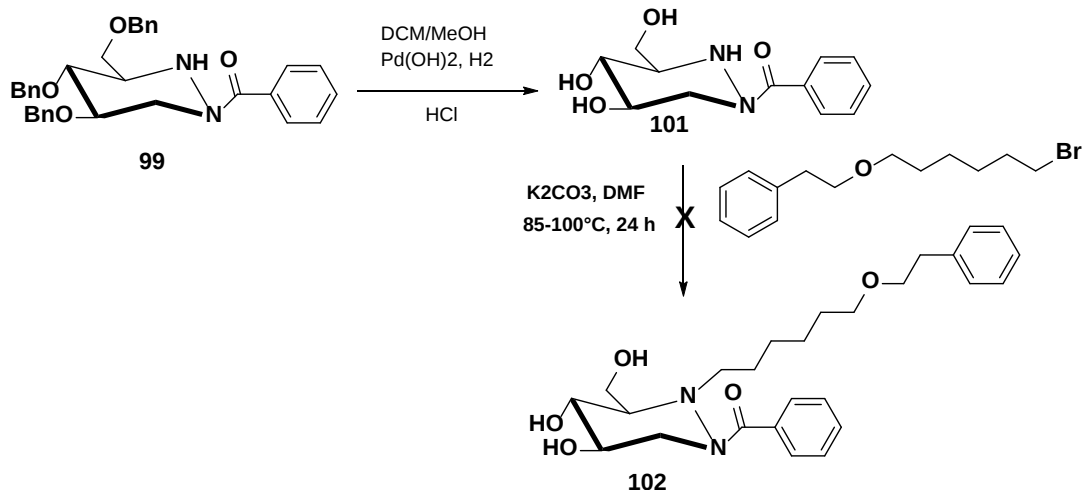
Una vez obtenida la azafagomina *N*-benzoilada per-*O*-bencilada se abordó la reacción de alquilación del nitrógeno libre mediante las condiciones de alquilación probadas anteriormente con la desoxinojirimicina (**esquema II.28**). La reacción no tuvo lugar, probablemente por impedimento estérico, por lo que se decidió desproteger los bencilos

mediante hidrogenación catalítica, lo cual fue confirmado mediante el correspondiente espectro de ^1H RMN (**espectro II.62**).

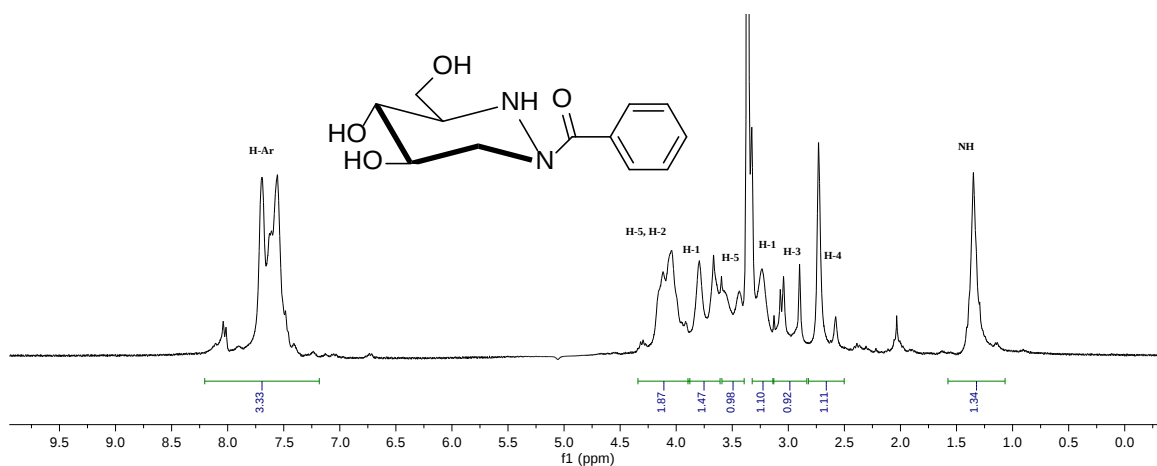


Esquema II.28. Reacción de alquilación de azafagomina protegida

Se intentó alquilar de esta forma, una vez desprotegidos los hidroxilos del iminoazúcar siguiendo las mismas condiciones probadas anteriormente (**esquema II.29**). No obstante, a pesar de usar condiciones enérgicas, no se obtuvo el producto deseado, sino que sólo se observó degradación de las materias primas.

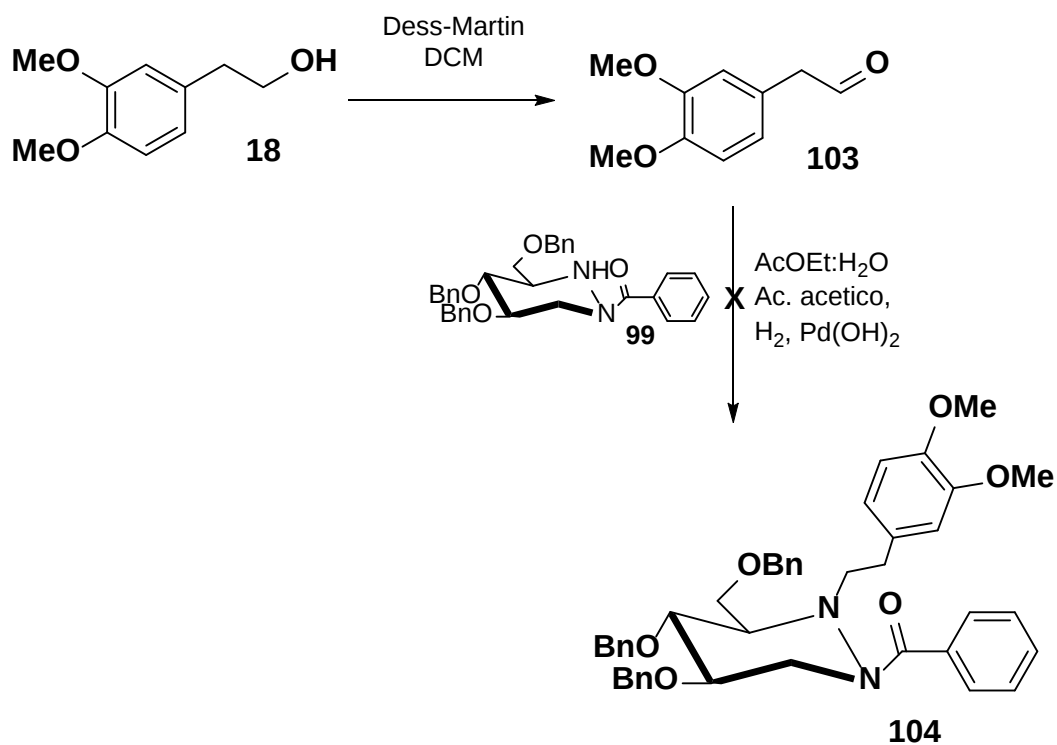


Esquema II.29. Reacción de desprotección y alquilación de azafagomina benzoilada



Espectro II.62. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) de azafagomina benzoilada (**101**)

Tras estos intentos fallidos se probó una aminación reductiva (**esquema II.30**), con el aldehído **103**, obtenido mediante oxidación en condiciones suaves del 2-(3',4'-dimetoxifenil)etanol empleando el reactivo de Dess-Martin. Desafortunadamente, la reacción tampoco tuvo lugar.



Esquema II.30. Reacción para acoplar azafagomina al dimetoxifeniletanal mediante animación reductiva

Tras todas las pruebas fallidas se decidió abandonar esta ruta de síntesis.

II.4.9. Derivados de ebselen y donepezilo

Considerando los problemas encontrados en la sección anterior, se planteó la síntesis de otros derivados de iminoazúcares como potenciales agentes anti-Alzheimer. En este caso, se abordó la combinación de 1-DNJ como posible mimético del catión amonio de la acetilcolina, con otros dos fragmentos que podrían interaccionar con la PAS de las colinesterasas: por un lado, el selenaheterociclo 1,2.benzoselenazol-3-ona, presente en el ebselen, así como un residuo de indanona, localizada en el fármaco donepezilo.

Para obtener dichos compuestos se plantearon dos rutas sintéticas, las cuales tienen el mismo intermedio derivado de 1-DNJ. Las rutas propuestas para ambos casos se describen a continuación.

II.4.9.1. Síntesis de derivados de ebselen

Se planteó la posibilidad de sintetizar derivados de ebselen, ya que no sólo es un potente antioxidante, sino que también se ha descrito la inhibición de la AChE por este selenoderivado.¹⁴³ A tal efecto se decidió conectar ambos farmacóforos, el iminoazúcar y el selenoheterociclo a través de una cadena hidrocarbonada (5 ó 6 átomos de carbono) (**figura II.26**). También se planteó modificar los sustituyentes sobre el fragmento aromático.

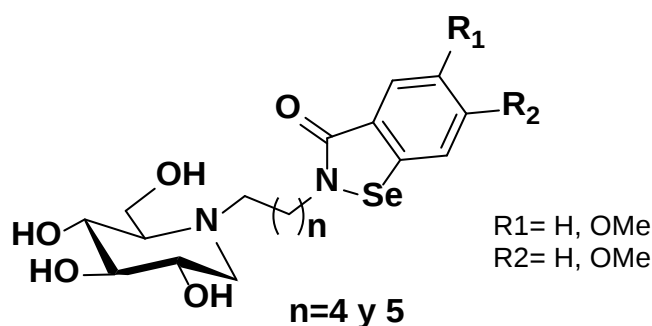
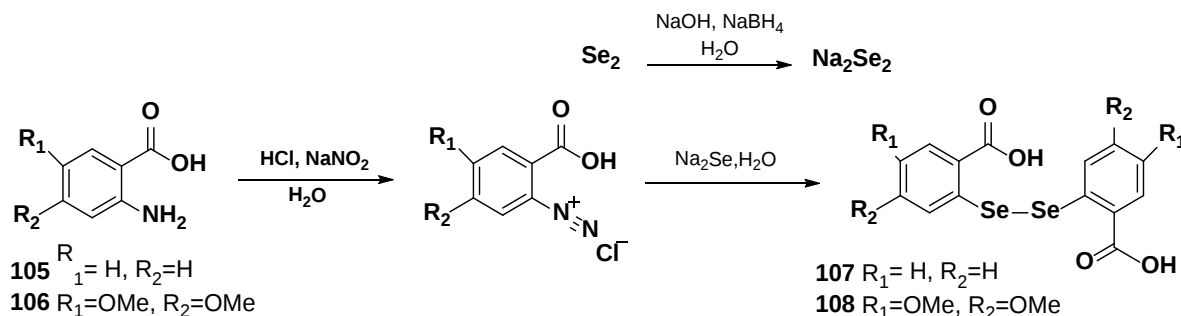


Figura II.26. Derivados de ebselen, planteados para síntesis

Para esto la primera ruta planteada para la síntesis consistió en la formación de cadenas de 5 y 6 átomos de carbono funcionalizadas con un grupo azido en un extremo y yodo en el otro; estos derivados fueron discutidos anteriormente en la formación de ureas,

tioureas y selenoureas. En un inicio la cadena de 6 átomos de carbono se utilizó para alquilar al nitrógeno de la 1-desoxinojirimicina, en presencia de K_2CO_3 , en DMF; esta alquilación procede con un rendimiento muy moderado, de alrededor del 30 %. Posteriormente el compuesto fue hidrogenado, para obtener el iminoazúcar desprotegido con amina terminal **79**; debido a que el selenio envenena los catalizadores empleados en la hidrogenación, es necesario llevar a cabo esta etapa previa a la incorporación del selenoheterociclo.

A continuación, fue sintetizado el cloruro de benzoil-2-cloroselenilo **109** a partir de ácido antranílico comercial (o su derivado 3,4-dimetoxilado) en tres etapas (**esquemas II.31 y II.32**). En primer lugar, los ácidos antranílicos fueron tratados con HCl y $NaNO_2$ para la formación de las correspondientes sales de diazonio, las cuales fueron tratadas *in situ* con Na_2Se_2 ; reactivo generado mediante la reducción de selenio. En la formación de Na_2Se_2 es esencial controlar el tiempo y temperaturas de reacción, así como los equivalentes del agente reductor, ya que existe la posibilidad de observar la formación del tri y tetra-selenuro, imposibles de separar ya que presentan el mismo Rf.

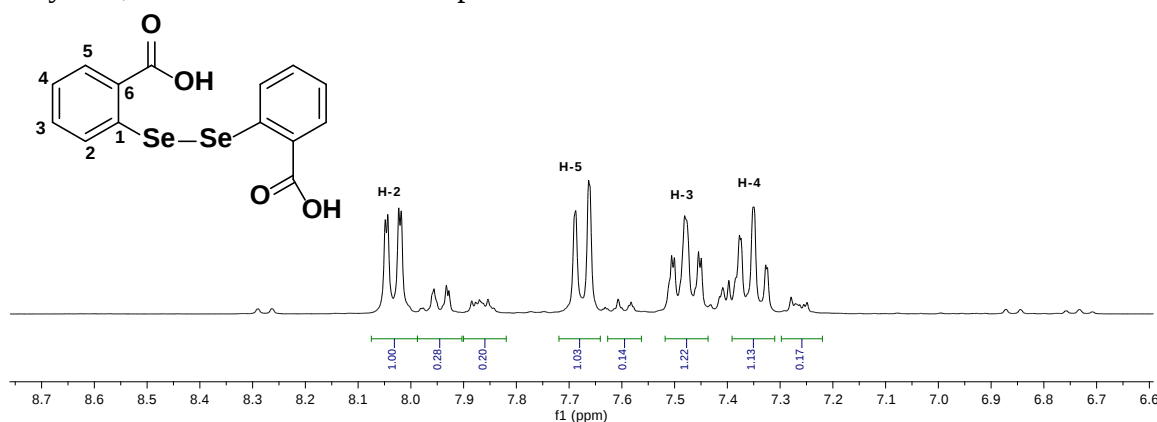


Esquema II.31. Reacción de formación de diselenuros

De esta forma se obtienen los diselenuros simétricos **107** y **108**; la formación de los compuestos fue corroborada mediante RMN de protón y de carbono, en las cuales se pueden observar algunas impurezas, presumiblemente trazas del tri y tetra-selenuro, sin embargo, la cantidad de estos compuestos no causa mayor inconveniente. La información espectroscópica fue comparada con la de la literatura, confirmando la formación de ambos compuestos.

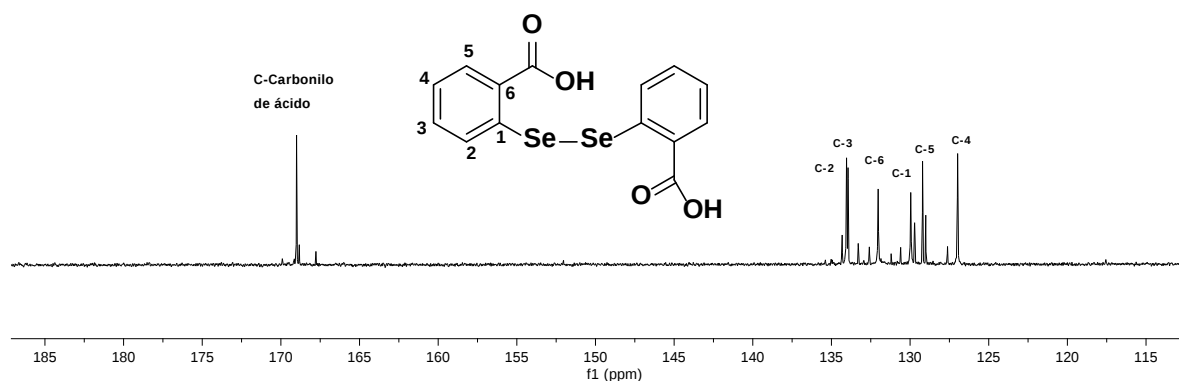
En el espectro de protón del diselenuro del ácido antranílico (**espectro II.63**), se pueden ver trazas de un segundo compuesto el cual puede ser el tri o tetra selenuro; debido a

que la molécula es simétrica solo se observa un juego de señales. A desplazamientos químicos en torno a 8 ppm se encuentra una señal doble de dobles con una J grande ($J_{2-3}=7.7$ Hz) y una pequeña ($J_{2-4}=1.4$ Hz) la cual corresponde al protón del carbono 2. Alrededor de 7.7 ppm se encuentra otro doble de dobles, que corresponde al protón de 5, el cual siente la influencia del ácido carboxílico. Finalmente, entre 7.5 ppm y 7.3 ppm se ubican los protones H-3 y H-4, en forma de dobles de triples.



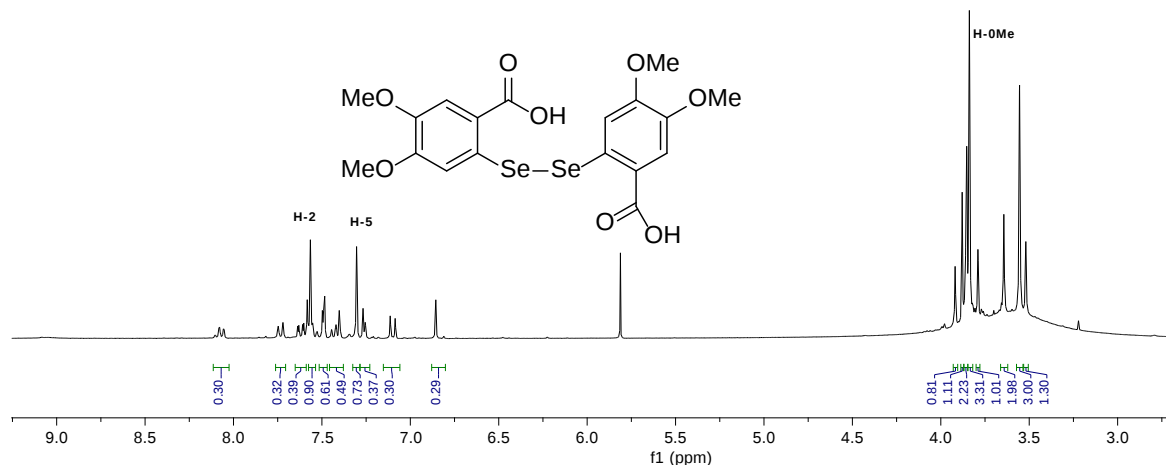
Espectro II.63. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de diselenuro de ácido antranílico (107)

En el espectro de carbono (**espectro II.64**) se puede observar alrededor de 170.0 ppm al carbono carbonílico del ácido carboxílico. A frecuencias más bajas entre 135.0 ppm y 125.0 ppm se encuentran los carbonos aromáticos, entre estos se observan los carbonos ipso observando un mayor desplazamiento hacia frecuencias altas, del carbono que sostiene al ácido carboxílico sobre 132.0 ppm.



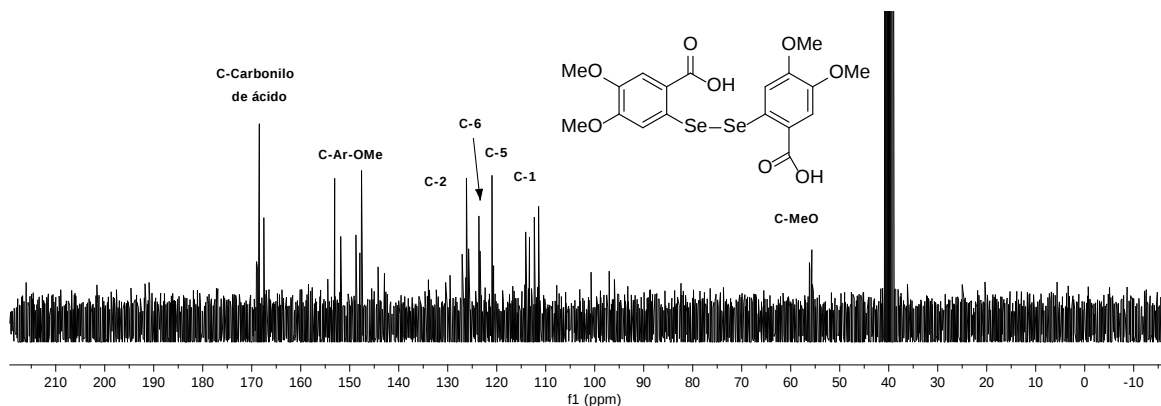
Espectro II.64. Espectro de ^{13}C RMN (75.5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de diselenuro de ácido antranílico (107)

En el caso del derivado dimetoxilado, se observa en el espectro (**espectro II.65**) la formación de 3 subproductos adicionales al compuesto deseado, lo cual no se observa en placa. Se puede ver claramente como producto mayoritario al compuesto deseado; a frecuencias bajas, se encuentra una serie de singuletes que corresponden a los protones de los CH₃ de los metoxilos. A frecuencias altas entre 7.00 ppm y 7.50 ppm se presentan dos singuletes, el más desplazado a frecuencias altas pertenece al protón de C-2 el cual siente la influencia del selenio.



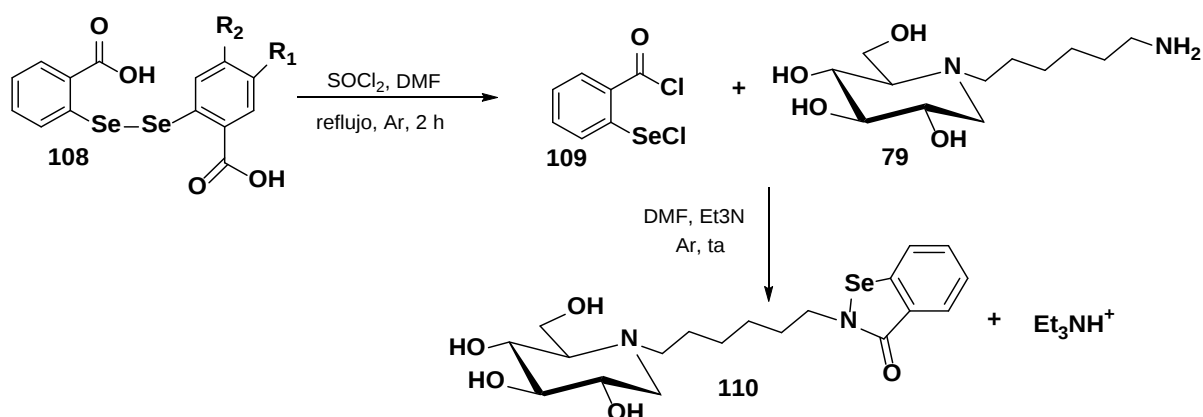
Espectro II.65. Espectro de ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) de diselenuro de ácido antranílico dimetoxilado (**108**)

En el espectro de carbono (**espectro II.66**) se observan a frecuencias bajas por 55.0 ppm dos señales que pertenecen a los dos metoxilos; en la zona de aromáticos, entre 110.0 ppm y 125.0 ppm los protones aromáticos, en este caso 4 de los carbonos son cuaternarios y presentan diferencias en el desplazamiento debido al sustituyente.



Espectro II.66. Espectro de ¹³C RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) de diselenuro de ácido antranílico dimetoxilado (**108**)

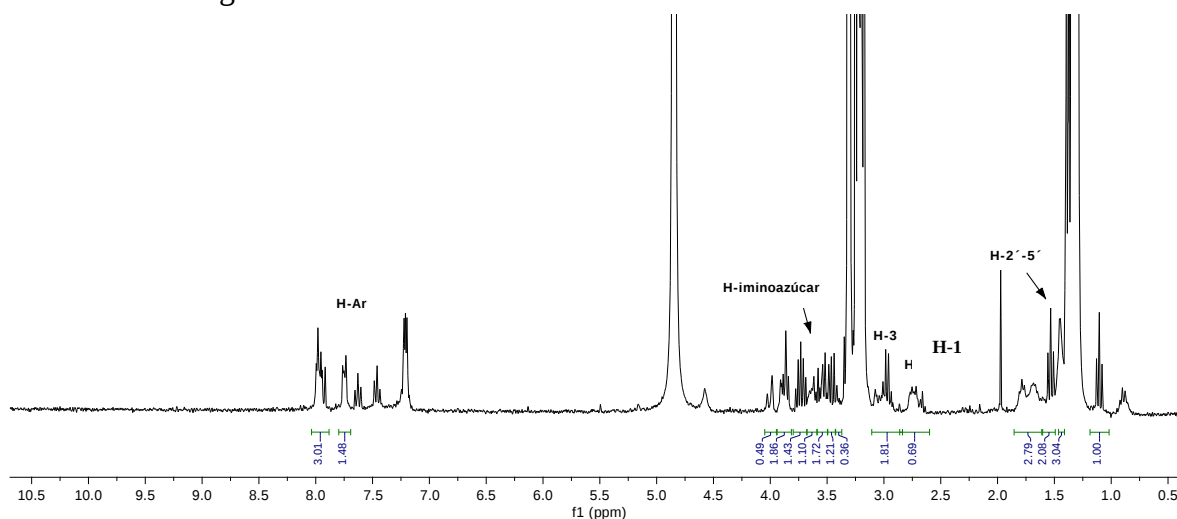
Una vez obtenidos los diselenuros se procedió a realizar el anclaje con la desoxinojirimicina con amina terminal en cadena de 6; para obtener dichos compuestos fue necesario formar el derivado **109**, mediante tratamiento de los diselenuros correspondientes con SOCl_2 y DMF como catalizador (**esquema II.32**). De esta forma, la función ácido se transforma en cloruro de ácido, y el diselenuro en el grupo clorselenilo. Posteriormente este se hizo reaccionar con el iminoazúcar **79** utilizando trietilamina como base; el grupo amino terminal de dicho compuesto actúa como nucleófilo sobre el carbonilo del cloruro de ácido y sobre el átomo de selenio de **109**, que tiene carácter electrofílico. Aunque en los espectros de RMN se observaron señales que sugerían que la reacción prevista había tenido lugar (**espectro II.67**), no fue posible la obtención del compuesto puro, ni por cromatografía en columna, ni mediante acetilación seguido de purificación, ni mediante cromatografía en capa fina preparativa. En el primer caso, durante la purificación debido a la alta polaridad del compuesto, llevó a utilizar un sistema altamente polar, lo que condujo a la contaminación del compuesto con las sales de trietilamonio (Et_3NH^+) formadas durante la reacción (**espectro II.67-A**). En el caso de la acetilación no fue posible llevar a cabo la acetilación total de los hidroxilos del iminoazúcar, por lo que esta técnica fue descartada y finalmente durante la purificación en capa fina, se observó una degradación del compuesto.



Esquema II.32. Reacción de formación de derivados de ebselén

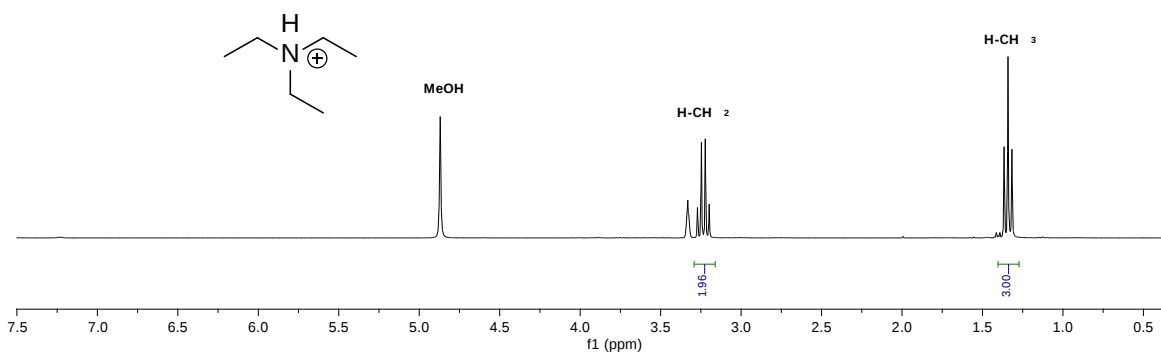
En el espectro de RMN de protón (**espectro II.67**) se pudo observar, la presencia de una serie de multipletes entre 1.00 ppm y 2.00 ppm los cuales corresponden a los protones de los carbonos centrales de la cadena espaciadora. Alrededor de 2.80 ppm se encuentra un multiplete que corresponde al protón de C-5 del iminoazúcar y alrededor de 3.00 ppm otro

multiplete el cual corresponde a los protones de C-1; por otro lado, entre 3.20 ppm y 4.00 ppm resuenan una serie de multipletes correspondientes al resto de los protones del iminoazúcar y los protones de ambos extremos de la cadena espaciadora. Finalmente, en la zona de aromáticos entre 7.00 ppm y 8.00 ppm se encuentran los 4 protones del anillo aromático del fragmento del ebselen.



Espectro II.67. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) de derivado de ebselen de iminoazúcar con cadena de 6 (**110**)

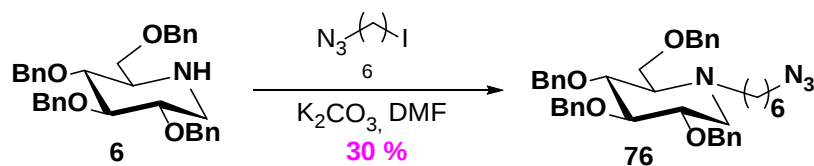
Al observar el espectro sin ampliar lo que se observa de manera muy mayoritaria son las señales de las sales de trietilamonio que se formaron durante la reacción.



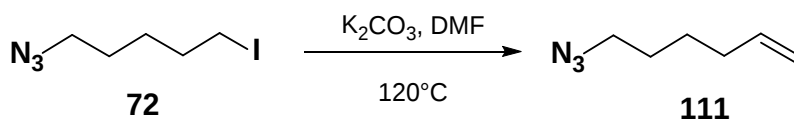
Espectro II.67-A. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) de sales de trietilamonio formadas durante la reacción de derivados de ebselen

Tras el primer intento fallido se decidió sintetizar el iminoazúcar bencilado con azida terminal **76**; sin embargo, dichas reacciones se obtuvieron en rendimientos muy bajos entre un 25 y 30%, para la cadena de 6, las reacciones fueron probadas tanto a 120 °C como a 85

°C (**esquema II.33**). Los mejores resultados se obtuvieron a 85 °C debido a que al aumentar la temperatura se observa una mayor reacción de eliminación sobre el yodo terminal de **72**, obteniendo el producto de eliminación **111** (**esquema II.34**), evitando de esta forma la alquilación del iminoazúcar. Esto ocurrió en mucho mayor grado en el caso del azido-yodo-pentano.

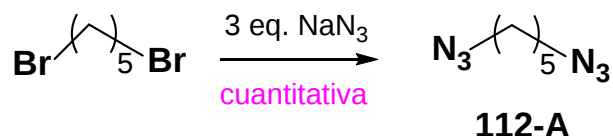


Esquema II.33. Alquilación de iminoazúcar con yodo-azida



Esquema II.34. Reacción secundaria dentro de la reacción de alquilación

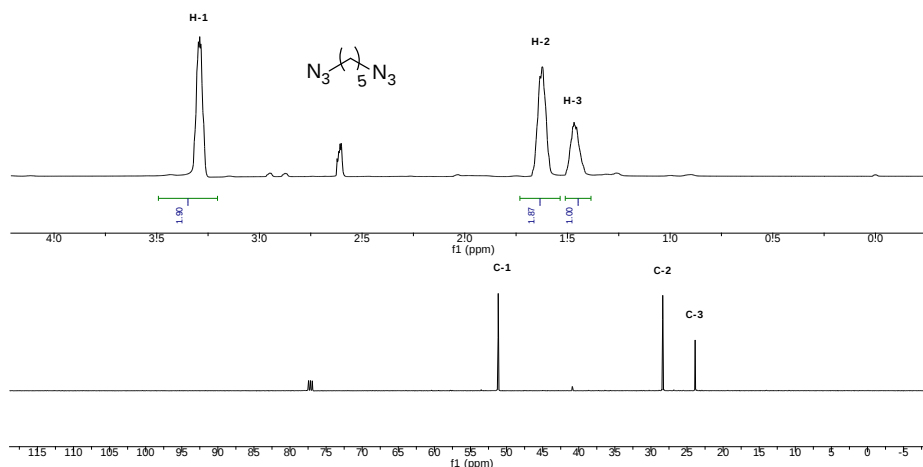
Debido al bajo rendimiento observado en la alquilación del iminoazúcar con la yodo-azida, se decidió formar el derivado del ebselen sobre la cadena, para la posterior alquilación del iminoazúcar con este fragmento. Así pues, se partió del 1,5-dibromopentano, el cual se hizo reaccionar con azida de sodio, en un primer intento la reacción se manejó con 3 equivalentes de azida de sodio (**esquema II.35**), pero se obtuvo el diazido.



Esquema II.35. Formación de diazido-pentano

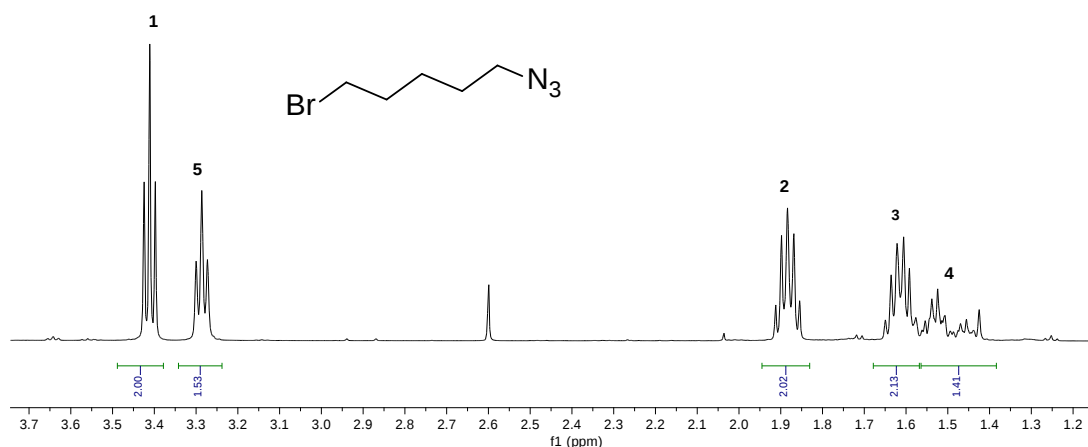
Esto se pudo observar claramente en los espectros de RMN (**espectro II.68**), en el cual se presenta solo la mitad de las señales debido a la simetría de **112**. Se pueden ver 3 grupos de señales tanto en el espectro de protón como en el de carbono; se ve una señal más desplazada a frecuencias altas por 3.20 ppm, la cual corresponde al protón más cercano a la azida y a su vez la señal por 50.0 ppm corresponde a ese carbono, un poco más a frecuencias

bajas tanto en protón como en carbono tenemos al carbono siguiente y al protón que se encuentra unido a este y finalmente hacia frecuencias más bajas encontramos al carbono y protón de 3.



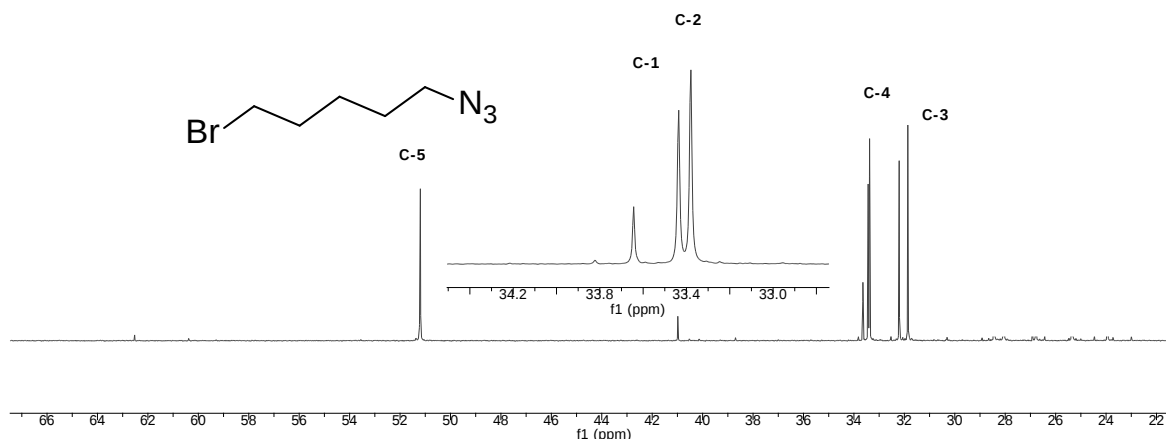
Espectro II.68. Espectro ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.5 MHz, CDCl_3) de diazido pentano (112-A)

Por lo que la reacción se intentó nuevamente, obteniendo la azida bromo pentano, empleando únicamente 1 equivalente de azida de sodio, observando su formación en el espectro de RMN (**espectro II.69**). En el espectro de protón se observa un multiplete en 1.45 ppm el cual corresponde al protón de C-4, hacia frecuencias altas en 1.60 ppm y en 1.90 ppm se encuentran dos quintetos los cuales corresponden a los protones de C-3 y C-4. Finalmente se pueden ver dos tripletes que pertenecen a los protones de C-1 y C-5 en 3.30 ppm y 3.40 ppm respectivamente.



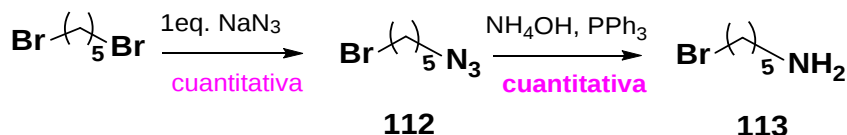
Espectro II.69. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de azida-bromo-pentano (112-B)

En el espectro de carbono (**espectro II.70**), se observan 5 señales, 4 de ellas entre 31 ppm y 34 ppm, de las cuales 3 pertenecen a los carbonos intermedios de la cadena. El más desapantallado de estos corresponde al carbono C-1, y finalmente, en torno a 51 ppm C-5, unido al grupo azido.



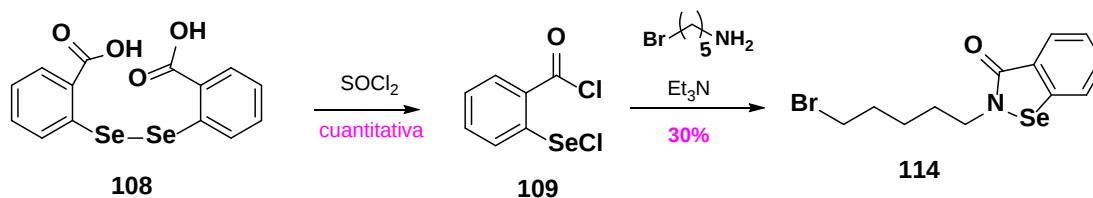
Espectro II.70. Espectro de ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de azida-bromo-pentano (**112-B**)

A continuación, el compuesto **112** fue reducido en condiciones de Staudinger; para ello, en primer lugar, se trató con PPh_3 para formar un iminofosforano no aislado, que fue hidrolizado en medio básico (NH_4OH) (**esquema II.36**).



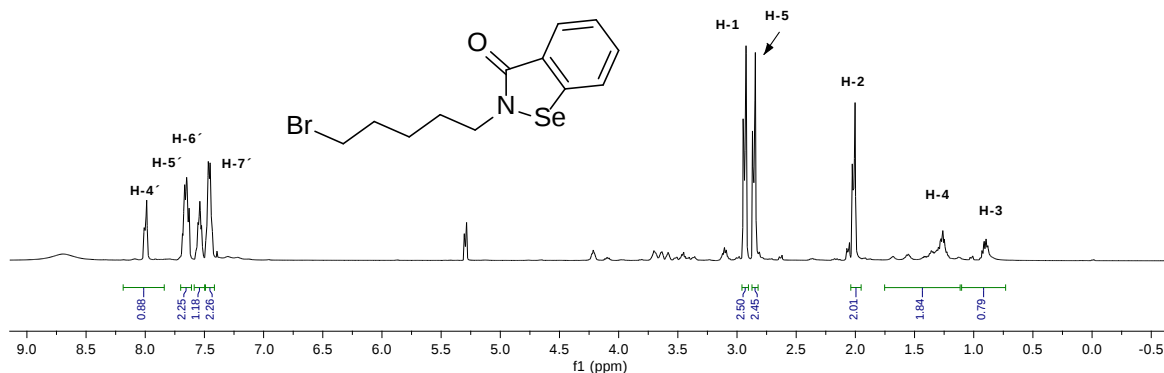
Esquema II.36. Obtención de la bromo-amina-pentano.

Posteriormente el compuesto **109** se hizo reaccionar con la 1-amina-5-bromo-pentano **113** catalizada con trietilamina, lo que dio lugar al derivado del ebselen con la cadena bromada de 5 átomos de carbono **114** (**esquema II.37**).



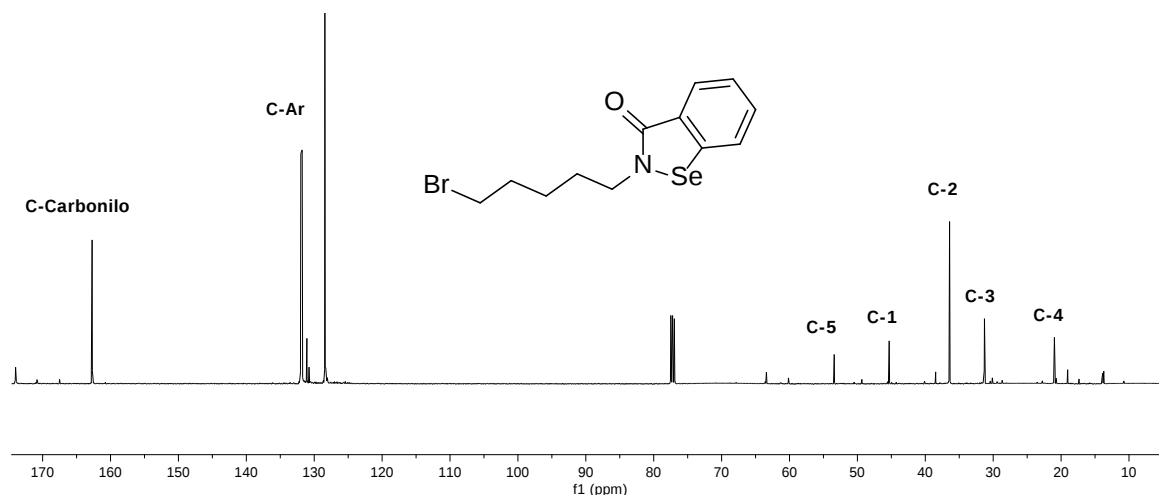
Esquema II.37. Formación de derivado del ebselen **114**

En este caso la reacción incluyó nuevamente trietilamina, ya que la ausencia de hidroxilos hace a la molécula mucho menos polar, lo que facilita su separación de las sales de trietilamonio. En esta reacción se observa la formación de múltiples subproductos, de los cuales únicamente se caracterizó, el compuesto de interés. Este fue caracterizado mediante resonancia magnética nuclear. En el espectro de protón (**espectro II.71**) se observó a frecuencias bajas entre 0.50 y 1.50 ppm dos multipletes los cuales corresponden a los protones de C-3 y C-4. En 2.00 ppm, se puede ver otro multiplete que pertenece al protón del carbono 2, el cual todavía siente el efecto del Br; por 2.80 ppm se encuentra otro multiplete que corresponde al protón de C-5 y de manera proximal se haya otro multiplete casi en 3.00 ppm, el cual se asigna al protón de C-1, estos protones se encuentran desplazados debido al efecto de desprotección tanto del bromo, como del anillo del ebselen; en la zona de los aromáticos encontramos 4 multipletes, los cuales corresponden a todos los protones aromáticos.



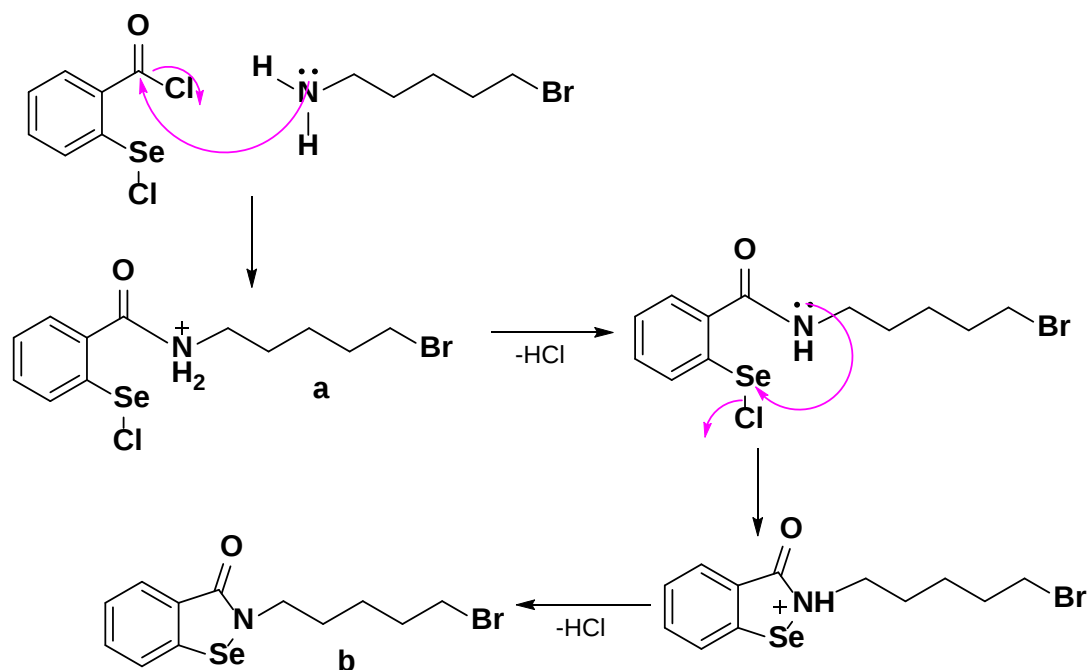
Espectro II.71. Espectro ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) molécula de ebselen alquilada con bromopentano (**114**)

Por otro lado, en el espectro de carbono (**espectro II.72**) se observa a frecuencias bajas entre 20.0 ppm y 55.0 ppm, 5 señales, las cuales pertenecen a los carbonos de la cadena alifática. Los carbonos más desplazados entre 40.0 ppm y 50.0 ppm son el carbono 5 y el carbono 1. Entre 125.0 ppm y 135.0 ppm se encuentran los carbonos aromáticos y finalmente el carbono que de la pauta de formación del anillo es el carbono carbonílico por 162.0 ppm.



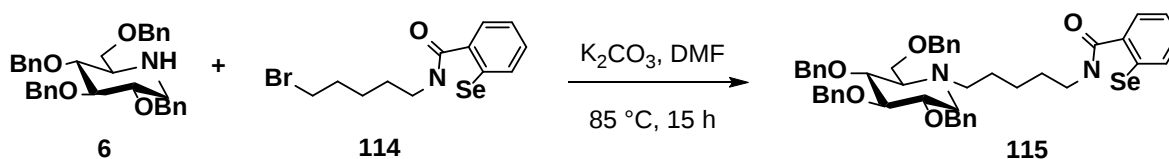
Espectro II.72. Espectro ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) molécula de ebselen alquilada con bromo-pentano (**114**)

El mecanismo de reacción para la formación del selenoheterocilo derivado del ebselen se muestra en el esquema siguiente (**esquema II.38**). La reacción se inicia con el ataque nucleofílico de la amina de **113** sobre el carbono carbonílico del cloruro de ácido, seguido de un ataque nucleofílico intramolecular sobre el selenio del cloruro de selenilo, para obtener **114**.



Esquema II.38. Mecanismo de reacción de formación de derivado de ebselen **114**

Una vez obtenido dicho compuesto se realizó la alquilación sobre el nitrógeno del iminoazúcar, con carbonato de potasio en DMF a 85 °C (**esquema II.39**). En placa su pudo observar la formación de un compuesto menos polar, y un consumo parcial de la materia prima. No obstante, debido a la pandemia provocada por el COVID-19, dicha reacción no ha podido ser purificada y el compuesto deseado, aislado y caracterizado.



Esquema II.39. Formación de derivado del ebselen con iminoazúcar en cadena de 5

II.4.9.2. Síntesis de derivados de donepezilo

Por otro lado, se abordó también la síntesis de análogos del donepezilo (**figura II.27**) como potenciales inhibidores de colinesterasas.

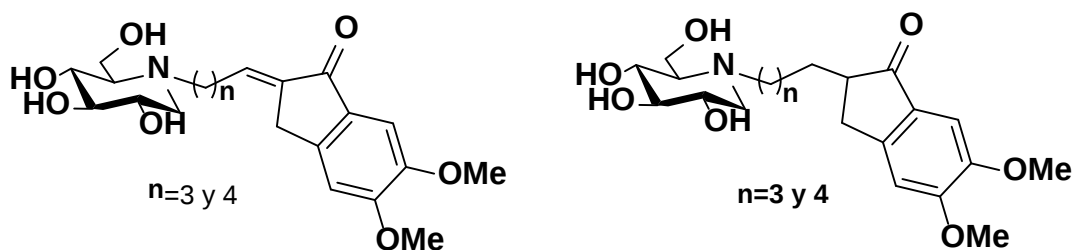
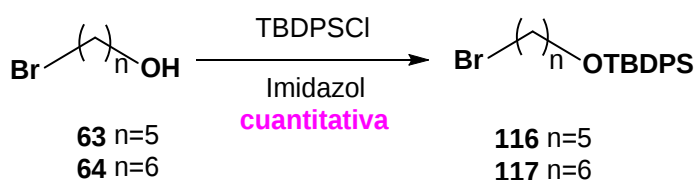


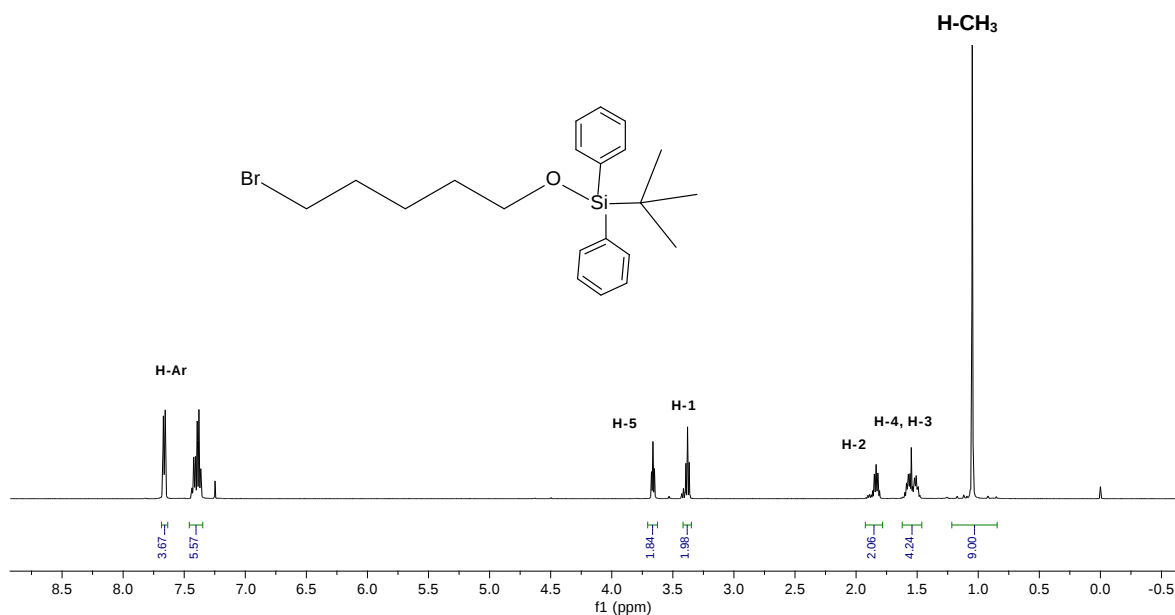
Figura II.27. Análogos de donepezilo diseñados para síntesis

Para ello se sintetizaron dos espaciadores a partir de 6-bromohexanol y 5-bromopentanol; se requirió en primer lugar la protección del grupo hidroxilo terminal con TBDPSCI, utilizando como base al imidazol (**esquema II.40**), transcurriendo con un rendimiento cuantitativo.



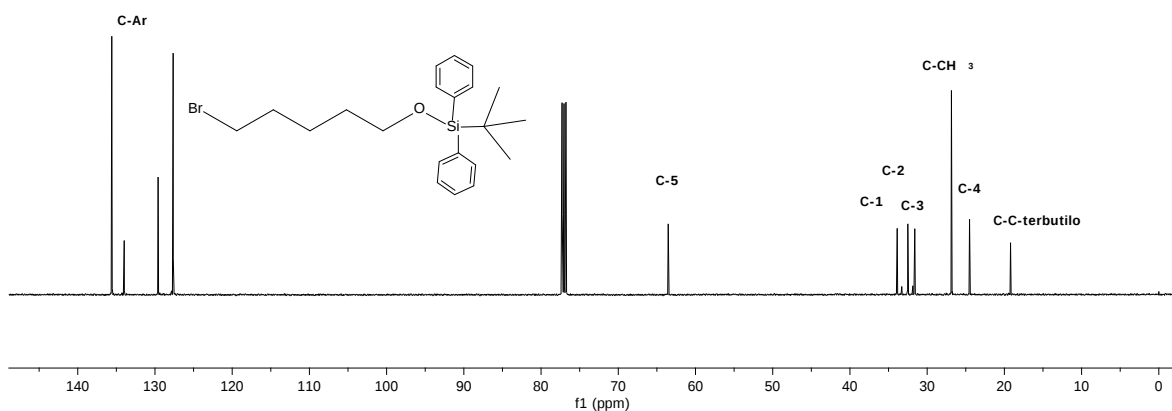
Esquema II.40. Protección de 5-bromopentanol y 6-bromohexanol con TBDPSCI

Para confirmar la protección del grupo hidroxilo se analizaron los compuestos por RMN, a modo de ejemplo se presenta el 5-bromopentanol protegido; en el espectro de protón (**espectro II.73**) se puede observar a frecuencias altas, los 8 protones aromáticos del grupo protector; entre 3.20 ppm y 3.80 ppm dos señales triples, las cuales pertenecen al protón de C-5 y de C-1. Hacia frecuencias más bajas entre 1.50 ppm y 2.00 ppm se encuentran 2 señales múltiples las cuales se asignaron a los protones de C-2, C-3 y C-4. Finalmente, en 1.00 ppm resuena un singlete que integra para los 9 protones del grupo terbutilo. Lo que indica que el hidroxilo fue protegido.



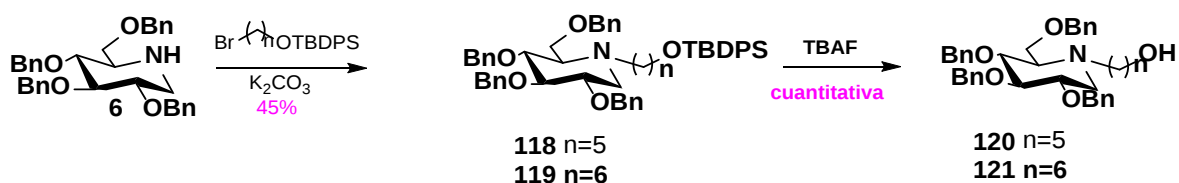
Espectro II.73. Espectro ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) de 5-bromopentanol protegido con TBDPSCI (116)

En el espectro de carbono (**espectro II.74**) de igual que en el espectro de protón se observan a frecuencias altas los 10 carbonos de los anillos aromáticos del grupo protector; alrededor de 62.0 ppm, el carbono 5 el cual se desplaza hacia frecuencias altas debido al efecto desprotector del oxígeno y del silicio. Entre 30.0 ppm y 35.0 ppm se encuentran 3 señales correspondientes a los carbonos 1, 2 y 3, seguido de una señal en 25.0 ppm en la cual se agrupan los 3 carbonos de los metilos del grupo *terc*-butilo. A continuación, se puede ver la señal del carbono 4 y finalmente cerca de 20.0 ppm el carbono cuaternario que corresponde al carbono base del grupo *terc*-butilo.



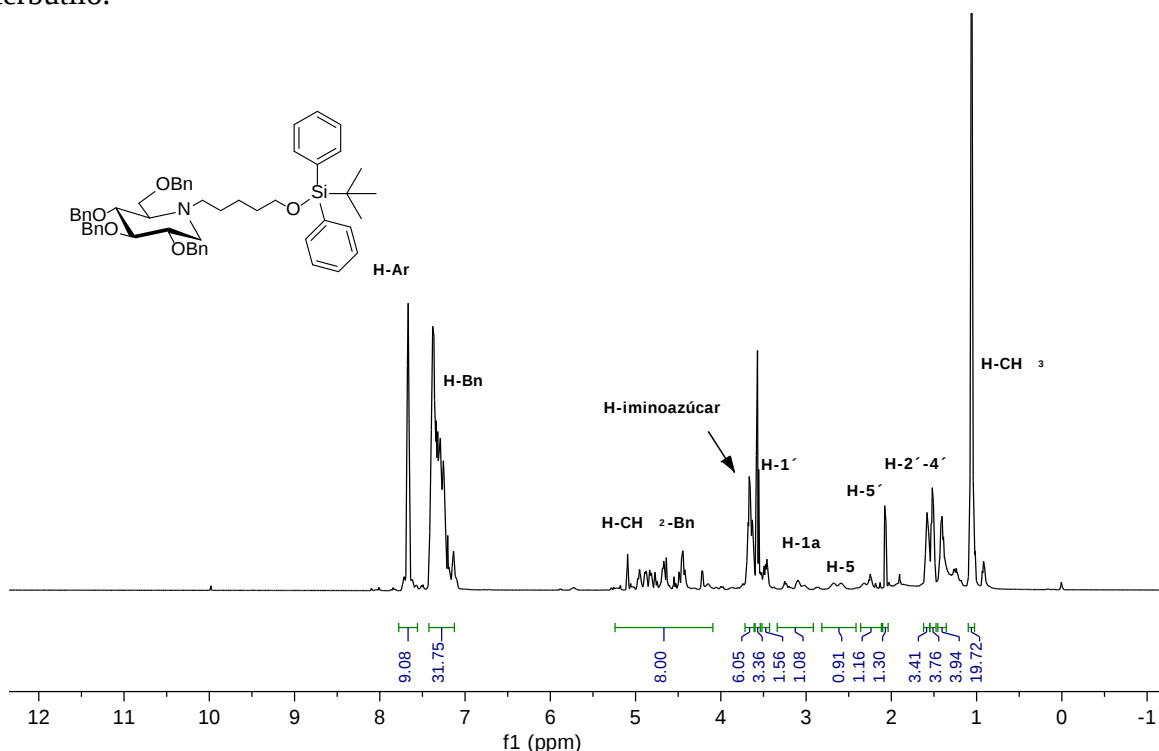
Espectro II.74. Espectro ¹³C RMN (125.5 MHz, CDCl₃) de bromo-pentanol protegido con TBDPSCI (116)

Una vez obtenidos los espaciadores, se emplearon para la alquilación del iminoazúcar **6** mediante una reacción con carbonato de potasio en DMF; al contrario de los casos anteriores, transcurrió satisfactoriamente a 120 °C. A continuación, el hidroxilo fue desprotegido con TBAF, obteniendo el hidroxilo libre (**esquema II.41**).



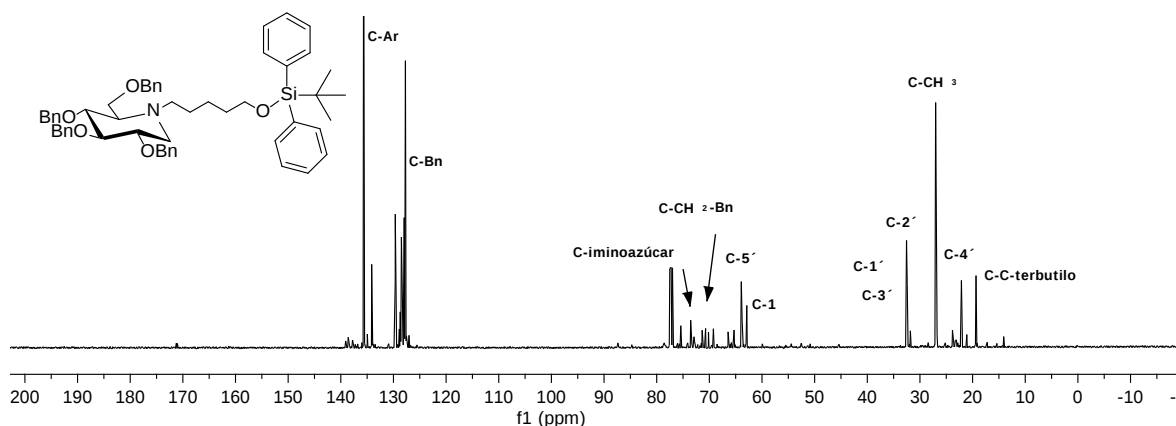
Esquema II.41. Reacción para obtención de iminoazúcar alquilado con alcohol terminal

Los compuestos fueron caracterizados mediante RMN. En el espectro de protón (**espectro II.75**) se encuentran las señales características del iminoazúcar, las de la cadena alquílica y las del grupo protector, observando los 10 protones adicionales de los dos fenilos en la zona de aromáticos y una señal simple por 1.00 ppm, la cual corresponde a los tres metilos del terbutilo.



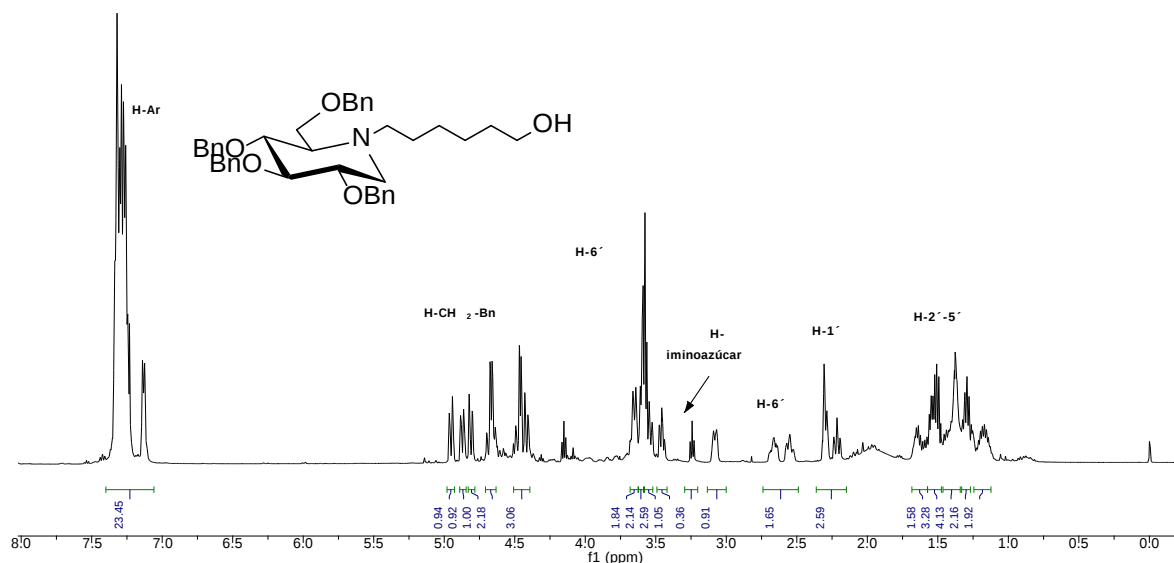
Espectro II.75. Espectro ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de iminoazúcar alquilado con bromopentanol protegido con TBDPS (**118**)

En el espectro de carbono (**espectro II.76**), se observa claramente la formación del compuesto. Se encuentran todas las señales características del iminoazúcar, y los carbonos de la cadena alifática y del grupo protector, observando el carbono cuaternario del grupo terbutilo antes de 20.0 ppm.



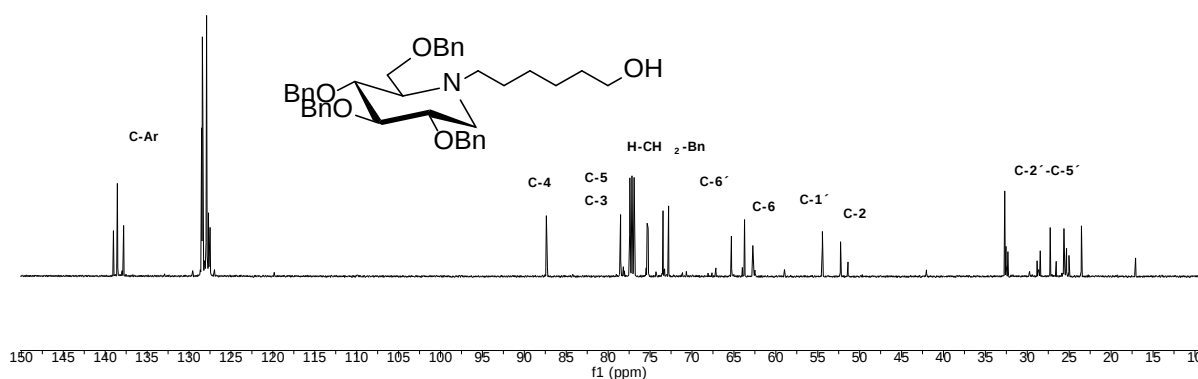
Espectro II.76. Espectro ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de iminoazúcar alquilado con bromopentanol protegido con TBDPS (**118**)

En el espectro de protón (**espectro II.77**) del compuesto desprotegido con hidroxilo terminal de cadena de 6 (**121**) se puede observar entre 1.00 ppm y 1.50 ppm 3 señales múltiples, que integran para 6 protones los cuales corresponden a los protones de los carbonos intermedios de la cadena hidroxilada. Por 2.20 ppm se encuentra otra señal múltiple que corresponde a los protones del carbono próximo al iminoazúcar. Sobre 2.60 ppm se encuentran dos señales múltiples que fueron asignados a los protones del carbono que sostiene al hidroxilo. Sobre 3.10 ppm se presenta un doble de doble que pertenece al protón 1a del iminoazúcar. Claramente se observa la eliminación del grupo protector, ya que no se observa el singulete en 1.00 ppm, del grupo terbutilo, ni los protones aromáticos de los fenilos.



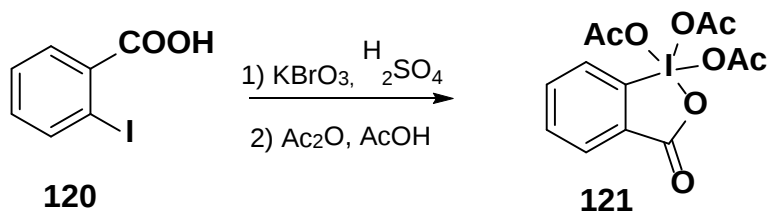
Espectro II.77. Espectro de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) de iminoazúcar con hidroxilo terminal en cadena de 6 (**121**)

Con ayuda del espectro de carbono (**espectro II.78**), se pudo corroborar la formación del compuesto. Observando entre 20.0 ppm y 35.0 ppm los carbonos centrales de la cadena alifática; entre 50.0 ppm y 85.0 ppm encontramos a los carbonos del iminoazúcar, los carbonos terminales de la cadena y los CH₂ de bencilo. Comparando este espectro con el del compuesto anterior se pudo ver que el grupo TBDP- ya no está presente, lo que indica que la desprotección del hidroxilo fu exitosa.



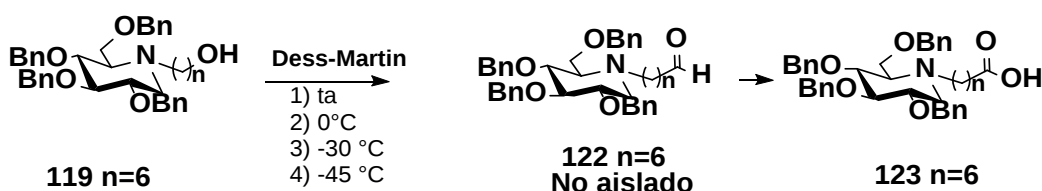
Espectro II.78. Espectro de ¹³C RMN (125.5 MHz, CDCl₃) de iminoazúcar con hidroxilo terminal en cadena de 6 (**121**)

Posteriormente fue sintetizado el reactivo de Dess-Martin a partir de ácido o-yodobenzoico, con la finalidad de oxidar el hidroxilo y obtener el aldehído correspondiente (**esquema II.42**).



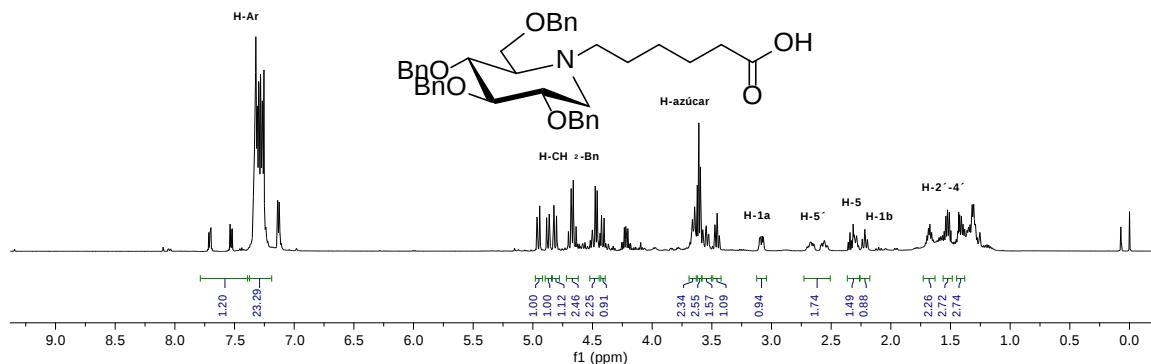
Esquema II.42. Reacción para formación de reactivo de Dess-Martin

Una vez obtenido esté, se realizó la reacción de oxidación del grupo hidroxilo (**esquema II.43**), sin embargo, de manera totalmente inesperada, el hidroxilo se sobreoxidó hasta ácido carboxílico, independientemente de las condiciones experimentales empleadas, en cuanto a equivalentes del agente oxidante, temperatura o tiempo.



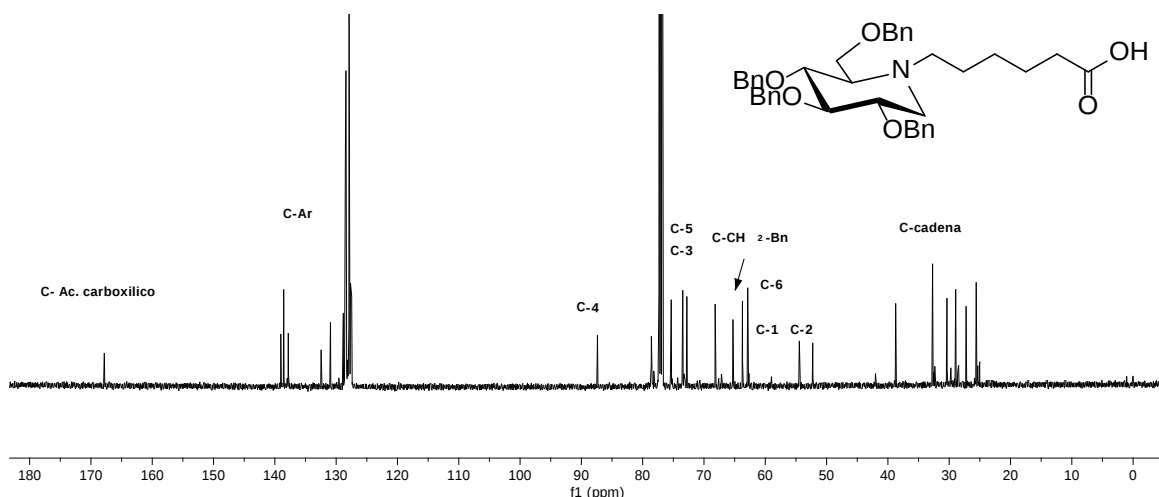
Esquema II.43. Reacción de oxidación con Dess-Martin sobre iminoazúcar con alcohol terminal

La formación del ácido **123** se confirmó mediante RMN, en el espectro de protón (**espectro II.79**) realmente no se observa ninguna señal que nos indique la formación del ácido carboxílico, pero no presenta la señal de aldehído esperada.



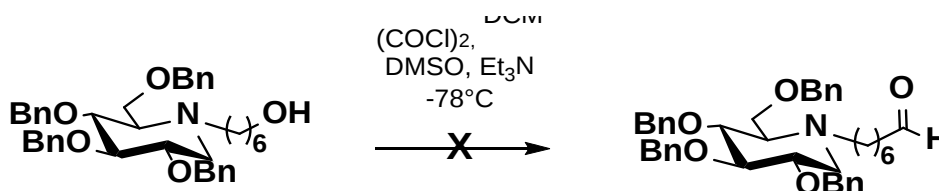
Espectro II.79. Espectro ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) de iminoazúcar con ácido carboxílico terminal (**123**)

Sin embargo, el espectro de carbono (**espectro II.80**) permite confirmar la formación del ácido carboxílico, en lugar del aldehído buscado, al observar el carbono carbonílico alrededor de 170.0 ppm, lo que indica un carbono de ácido, en lugar de una señal en 190.0 ppm que correspondería a un carbono de aldehído.



Espectro II.80. Espectro ^{13}C RMN (125.5 MHz, CDCl_3) de iminoazúcar con ácido carboxílico terminal (**123**)

Alternativamente se decidió emplear la oxidación de Swern (**esquema II.44**), sin embargo, debido a fallas en el ultraenfriador esta se realizó a $-66\text{ }^\circ\text{C}$, por lo que no se llevó a cabo.



Esquema II.44. Reacción de oxidación de Swern sobre iminoazúcar con alcohol terminal

La reacción también fue probada con PCC, pero se observó descomposición de la materia prima. Debido a la naturaleza alifática de la cadena y a la longitud de esta es probable que el aldehído sea altamente reactivo, por lo que se transforme muy rápidamente en el ácido carboxílico; por otro lado, existe la posibilidad de que se forme un diol sobre el carbono terminal de la cadena, si existe agua presente en el medio, transformándose en el ácido correspondien

II.5. Actividad biológica

II.5.1. Evaluación de inhibición enzimática

Los diez derivados de 1-DNJ preparados en el presente trabajo (33-39, 46-48) se sometieron a ensayos de inhibición en dos familias de enzimas: glicosidasas y colinesterasas. Para la evaluación de los compuestos sobre las enzimas se realizó un cribado inicial de la concentración del inhibidor a 100 μM ; para aquellos compuestos que a esta concentración presentaron una inhibición mayor al 50%, fueron obtenidos los parámetros cinéticos (K_M y V_{max}), los cuales fueron utilizados para calcular las constantes de inhibición (K_i). A su vez también fue calculado el tipo de inhibición en los compuestos más potentes, mediante el método de Cornish-Bowden.¹⁴⁴

Como se mencionó anteriormente, las glicosidasas desempeñan un papel fundamental en el control no solo de las vías metabólicas donde están presentes los carbohidratos, sino también de muchos otros eventos bioquímicos importantes, como los procesos de comunicación o reconocimiento de célula a célula. Aquí, se ha probado un panel de cinco glicosidasas disponibles comercialmente, como modelos de enfermedades mediadas por carbohidratos: α -glucosidasa (de *Saccharomyces cerevisiae*), β -glucosidasa (de almendras), α -galactosidasa (de granos de café verde) y β -galactosidasa (de *Aspergillus oryzae* y de *E. coli*). Las deficiencias en dichas enzimas están asociadas a diabetes, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry y gangliosidosis, respectivamente 3. La evaluación de la capacidad inhibitoria frente a las glicosidasas se logró utilizando la metodología informada por Bols y colaboradores.¹⁴⁵ Se utilizaron *p*-nitrofenilglicósidos (*o*- para β -galactosidasas) como sustratos modelo, y se controló espectrofotométricamente la liberación de los *p*-nitrofenolatos correspondientes a pH 6,8 (λ_{max} = 400 o 420 nm para *p*- u *o*-nitrofenolatos, respectivamente). Los resultados se muestran en la **tabla 2**, donde se presentan los valores de IC_{50} y las constantes de inhibición, junto con el tipo de inhibición. La 1-DNJ es un buen inhibidor de la α -galactosidasa y moderado de la α -glucosidasa (IC_{50} = 16 y 35 μM , respectivamente), y un inhibidor débil de la β -glucosidasa (IC_{50} = 71 μM).

Tabla 2a. Inhibición enzimática para compuestos seleccionados **33-39** y **46-48** (IC_{50} , K_i en μM)

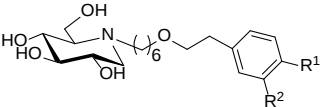
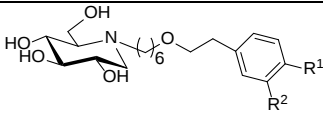
Compuestos				
	Enzimas			
	α -Glucosidasa (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	β -Glucosidasa (almendras)	α -Galactosidasa (granos de café verde)	β -Galactosidasa (<i>Asp. Oryzae</i>)
36 n = 6 R ¹ =R ² =H	$IC_{50} = 126$ $K_{ia} = 93 \pm 32$ (Competitiva)	$IC_{50} = 4.6$ $K_{ia} = 6.5 \pm 0.1$ (Competitiva)	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
33 n = 6 R ¹ =OH, R ² =H	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} = 12$ $K_{ia} = 17 \pm 5$ (Competitiva)	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
37 n = 6 R ¹ =OMe, R ² =H	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} = 6.0$ $K_{ia} = 4.5 \pm 0.7$ (Competitiva)	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
39 n = 6 R ¹ =R ² =OH	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} = 15$ $K_{ia} = 11 \pm 4$ (Competitiva)	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
38 n = 6 R ¹ =R ² =OMe	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} = 14$ $K_{ia} = 15 \pm 3$ (Competitiva)	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
34 n = 6 R ¹ =OH, R ² =OMe	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} = 8.2$ $K_{ia} = 9.6 \pm 0.8$ (Competitiva)	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
35 n = 6 R ¹ , R ² = -O-CH ₂ -O	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} = 8.4$ $K_{ia} = 9.0 \pm 3.0$ (Competitiva)	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
46 n = 5 R ¹ =R ² =H	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} = 28 \mu M$ $K_{ia} = 23 \pm 4$ (Competitiva)	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
47 n = 5 R ¹ =OMe, R ² =H	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} = 25$ $K_{ia} = 14 \pm 6$ (Competitiva)	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
48 n = 5 R ¹ =R ² =OH	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 50$	N.T.	N.T.
(1-DNJ)	$IC_{50} = 35$	$IC_{50} = 71$	$IC_{50} = 16$	$IC_{50} > 100$
Galantamina	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.

Tabla 2b. Inhibición enzimática para compuestos seleccionados **33-39** y **46-48** (IC_{50} , K_i en μM)

Compuestos			
	Enzimas		
	β -Galactosidasa (<i>E. coli</i>)	AChE (<i>anguila electrica</i>)	BuChE (suero equino)
36 n = 6 R ¹ =R ² =H	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
33 n = 6 R ¹ =OH, R ² =H	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
37 n = 6 R ¹ =OMe, R ² =H	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
39 n = 6 R ¹ =R ² =OH	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} = 76$
38 n = 6 R ¹ =R ² =OMe	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} = 5.8 \mu M$ $K_{ia} = 9.3 \pm 1.2$ $K_{ib} = 5.2 \pm 0.5$ (Mixta)	$IC_{50} = 1.9 \mu M$ $K_{ia} = 1.4 \pm 0.4$ $K_{ib} = 4.5 \pm 1.4$ (Mixta)
34 n = 6 R ¹ =OH, R ² =OMe	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} = 7.3$ $K_{ia} = K_{ib} = 17 \pm 5$ (No-competitiva)	$IC_{50} = 1.8 \mu M$ $K_{ia} = 1.5 \pm 0.2$ $K_{ib} = 5.0 \pm 2.0$ (Mixta)
35 n = 6 R ¹ , R ² = -O-CH ₂ -O	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} = 48 \mu M$ $K_{ia} = 56 \pm 10$ $K_{ib} = 43 \pm 14$ (Mixta)	$IC_{50} = 7.3 \mu M$ $K_{ia} = K_{ib} = 9.2 \pm 1.9$ (No-competitiva)
46 n = 5 R ¹ =R ² =H	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
47 n = 5 R ¹ =OMe, R ² =H	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
48 n = 5 R ¹ =R ² =OH	N.T.	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$
(1-DNJ)	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} > 100$	$IC_{50} = 10$ $K_{ia} = K_{ib} = 16 \pm 3$ (No-competitiva)
Galantamina	N.T.	$IC_{50} = 1.7$ $K_{ia} = 1.5 \pm 0.6$ (Competitiva)	$IC_{50} = 5.5$ $K_{ia} = 4.5 \pm 0.9$ (Competitiva)

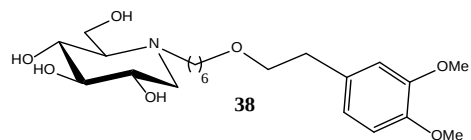
Sin embargo, todos los compuestos evaluados carecían de actividad significativa contra α -glucosidasa y α / β -galactosidasas. Con respecto a la β -glucosidasa, los compuestos **33-39** variaron entre buenos (**33, 39, 38**, IC₅₀: 12-15 μ M) a inhibidores competitivos fuertes (**36, 37, 34, 35**, IC₅₀: 4,6-8,4 μ M). Esto significa una inversión completa de la selectividad hacia la β -glucosidasa, con una actividad 15 veces mayor en comparación con el 1-DNJ natural, lo que sugiere que los sustituyentes más lipofílicos favorecen la interacción con la β -glucosidasa. Se encontró el mismo comportamiento tras la alquilación en la posición N-2 de la azafagomina.¹⁴⁶ Curiosamente, se descubrió que una disminución en la longitud de la cadena (compuestos **46-48**) era perjudicial para la inhibición de la β -glucosidasa (por ejemplo, 4–6 veces para **46, 47**), lo que muestra la gran influencia de tal motivo estructural.

Los derivados **33-39** y **46-48** también se probaron contra AChE (Electrophorus electricus) y BuChE (suero equino), como modelos reconocidos para las colinesterasas humanas debido a su estrecha semejanza estructural.

Para ello, se utilizó el ensayo colorimétrico de Ellman;¹⁴⁷ este es un ensayo indirecto en el que se utilizan yoduros de acetil y butiril tiocolina como modelos del sustrato natural de la enzima, que al interactuar con la enzima liberan tiocolina, que a su vez reacciona con el reactivo cromógeno 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) denominado reactivo de Ellman para dar 2-nitro-5-mercaptobenzoato (a pH 8.0). Este reactivo, al pH del ensayo (8.0), muestra una fuerte absorbancia a 405 nm (a pH 8.0); el registro de la variación de la absorbancia a esa longitud de onda con el tiempo se emplea para obtener los parámetros cinéticos, tanto en presencia, como en ausencia del inhibidor. También se pueden extraer interesantes relaciones estructura-actividad de los datos de actividad (Tabla 2b). Con respecto a la AChE, claramente la presencia de un resto dimetoxifenilo proporciona al compuesto más potencia (**38**, IC₅₀ y K_i en el rango micromolar bajo, inhibidor mixto), como se hipotetizó inicialmente. Sin embargo, lo más interesante de la actividad anticolinérgica de estos compuestos es que muestran una clara preferencia por la BuChE. Por tanto, la disustitución relativamente lipofílica (**34, 35, 38**) proporciona los compuestos más fuertes de la serie, dentro del rango micromolar bajo (IC₅₀ 1,8-7,3 μ M) (di-OMe $\approx$ OMe / OH> OCH₂O). Un tema que debe abordarse es que la BuChE tiene un papel más prominente que la AChE en las personas mayores y en las etapas más avanzadas de la enfermedad de Alzheimer. Además, también se ha informado que la BuChE participa en la formación de placas β -amiloides y en

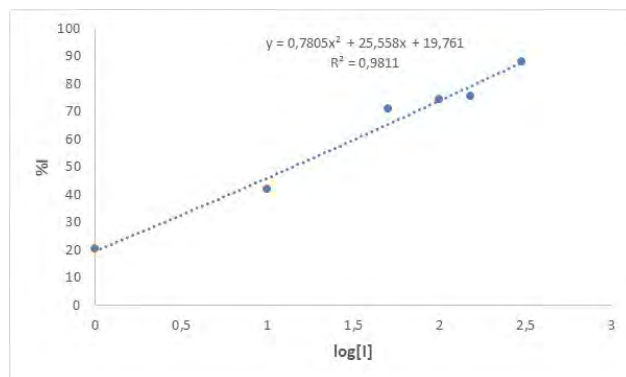
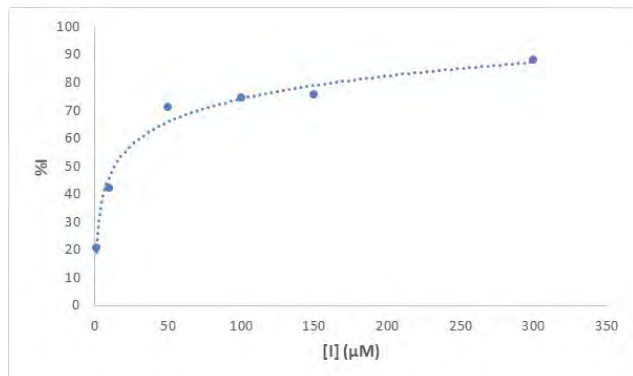
la neurodegeneración mediada por ovillos neurofibrilares. Esto significa que los compuestos **34**, **35** y **38** podrían ser útiles no solo para restablecer la funcionalidad cognitiva de los pacientes (aumentando los niveles de colinesterasa), sino también para retardar o mejorar la neurotoxicidad asociada a la amiloidogénesis en estadios avanzados de la enfermedad. La ausencia de sustitución en el armazón aromático, la monosustitución o la presencia de un resto de catecol polar anuló completamente la actividad. Los compuestos **34**, **35** y **38** resultaron ser inhibidores mixtos o no competitivos, como se evidencia en los gráficos de Cornish-Bowden. Lo que significa que los compuestos **34**, **35** y **38** puede unirse a la enzima libre (Kia) o al complejo enzima-sustrato (Kib).

A continuación, se muestran las gráficas de cálculo de los valores de IC_{50} , así como las representaciones de Cornish-Bowden ($1/V$ vs. $[I]$, $[S]/V$ vs. $[I]$), que permiten dilucidar el tipo de inhibición. Se incluyen además los parámetros cinéticos (V_{max} y K_M) obtenidos para cada una de las distintas concentraciones de inhibidor para las inhibiciones más representativas; dichos parámetros cinéticos fueron obtenidos mediante análisis de regresión no lineal (ajuste de mínimos cuadrados).

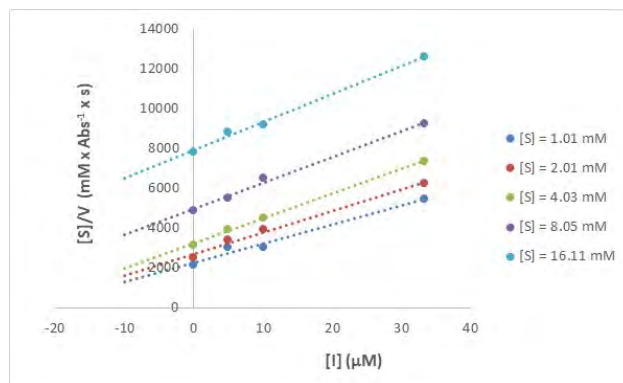
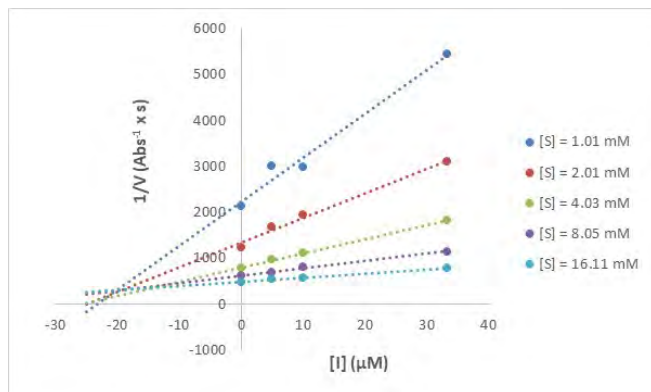


- β -glucosidasa (almendras)

- Cálculo de IC₅₀



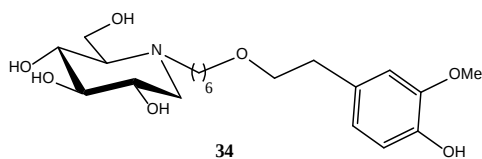
Representación de Cornish-Bowden



[I]/μM	V _{max}	K _m (mM)
0	0,002613	4,451
5	0,002555	6,243
10	0,002584	7,978
33,3	0,002253	12,47

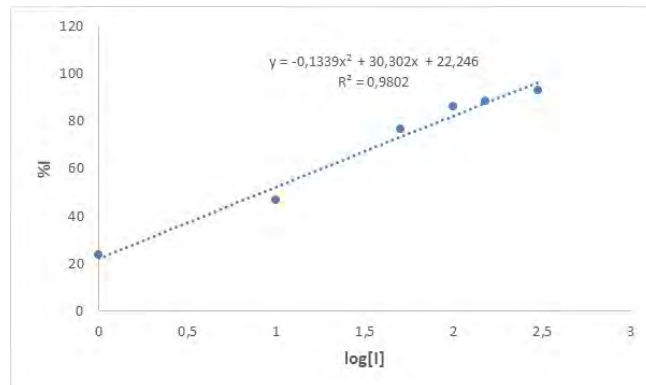
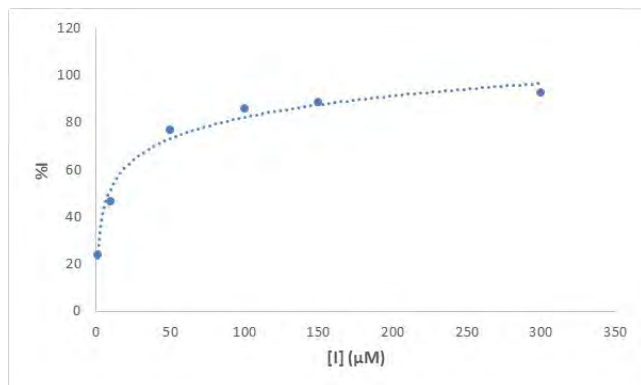
Inhibición competitiva

$K_{ia} = 15 \pm 3 \mu\text{M}$

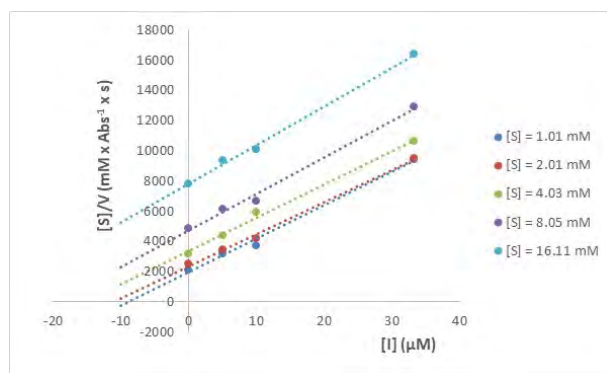
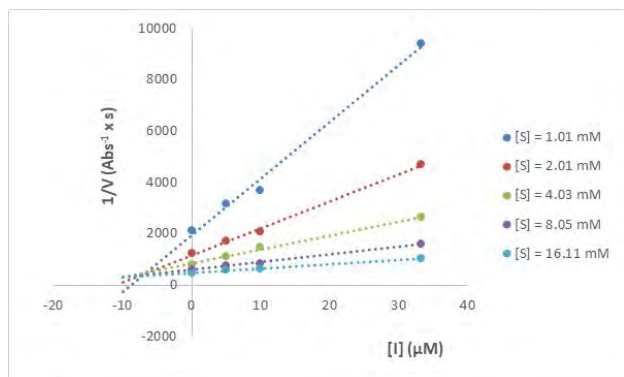


- β -glucosidasa (almendras)

- Cálculo de IC_{50}

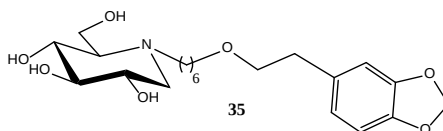


Representación de Cornish-Bowden



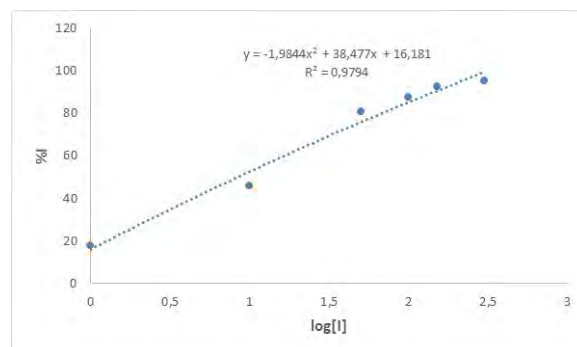
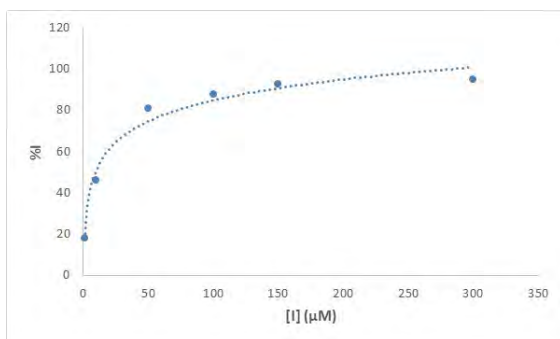
	$[I]/\mu M$	V_{max}	K_m
	0	0,002613	4,451
	5	0,002429	6,682
	10	0,002579	9,741
	33,3	0,002124	18,86

Inhibición competitiva
 $K_{ia} = 9.6 \pm 0.8 \mu M$

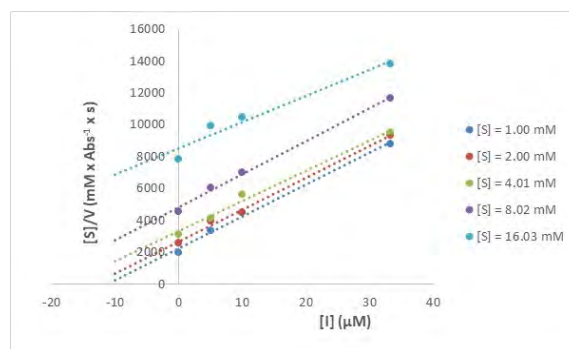
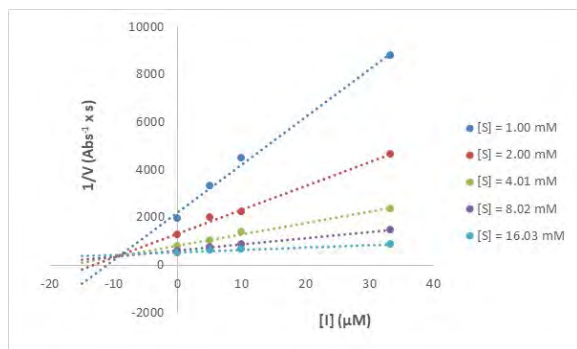


- β -glucosidasa (almendras)

- Cálculo de IC_{50}



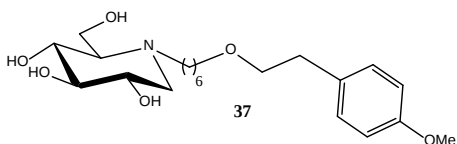
Representación de Cornish-Bowden



$[I]/\mu M$	V_{max}
0	0,002625
5	0,002244
10	0,002437
33,3	0,003111

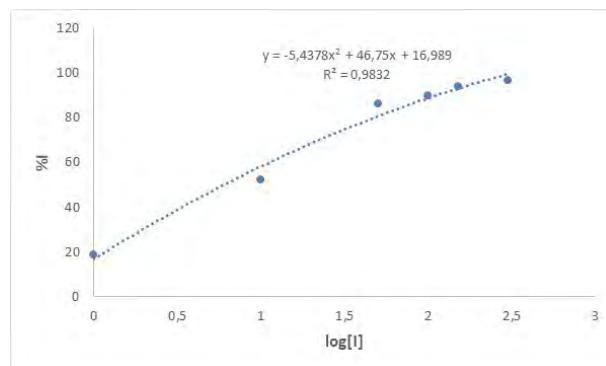
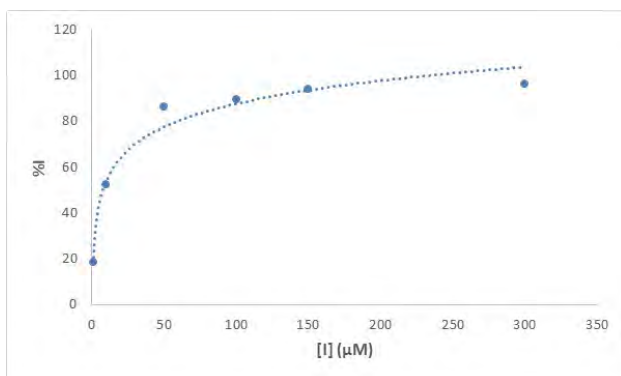
K_m (mM)
4,286
5,882
9,355
27,13

Inhibición competitiva
 $K_{ia} = 9.0 \pm 3.0 \mu M$

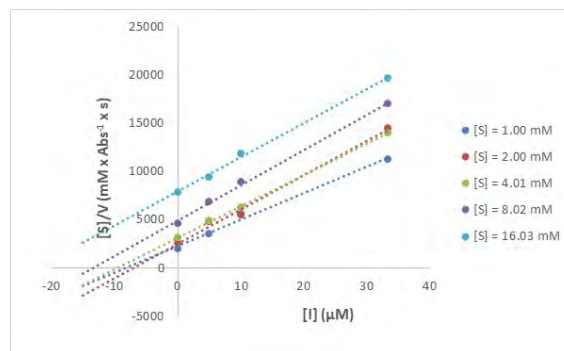
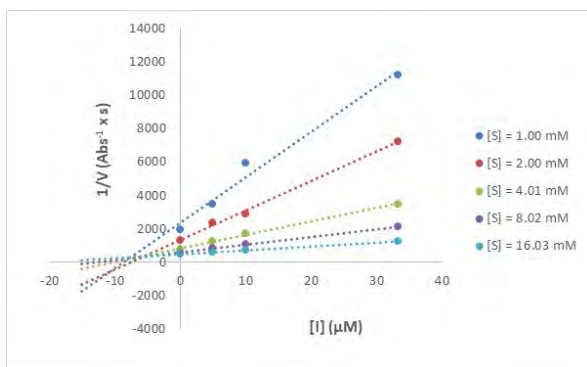


- β -glucosidasa (almendras)

- Cálculo de IC_{50}



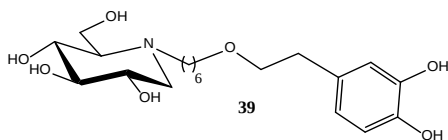
Representación de Cornish-Bowden



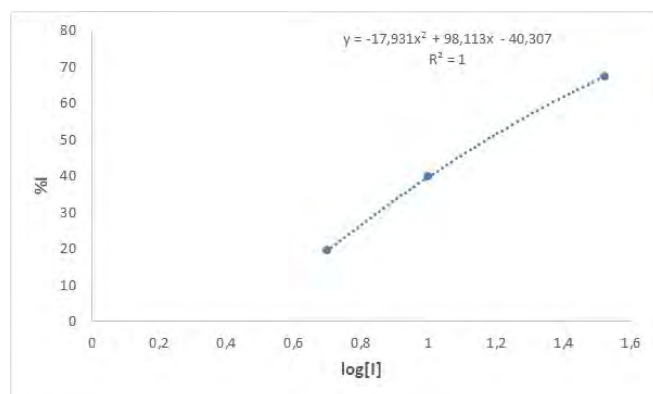
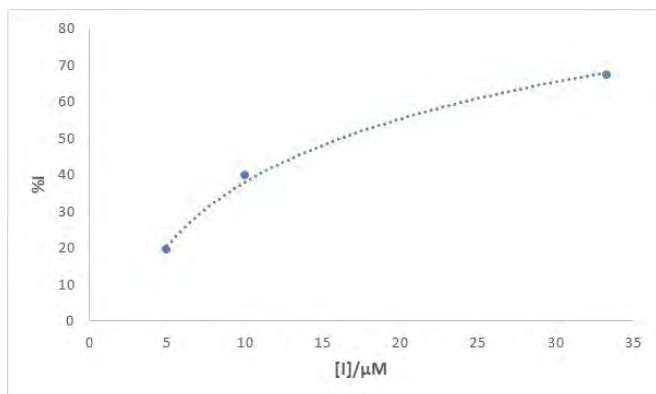
[I] (μ M)	Vmax	Km (mM)
0	0,002625	4,286
5	0,002768	10,24
10	0,002482	13,17
33,3	0,002437	31,99

Inhibición competitiva

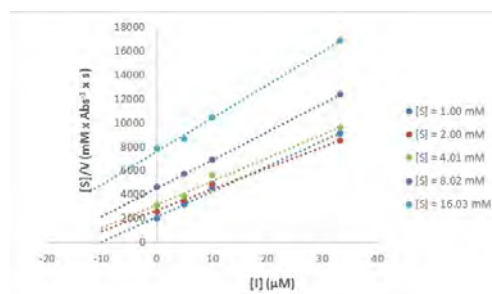
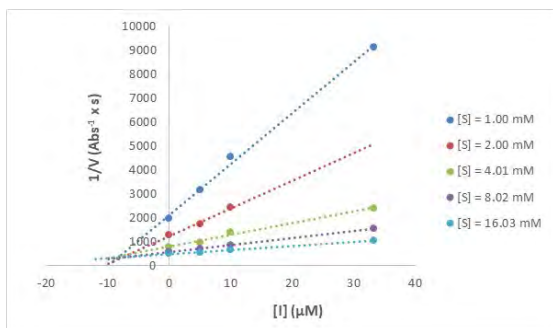
$K_{ia} = 4.5 \pm 0.7 \mu M$



- β -glucosidasa (almendras)
 - Cálculo de IC_{50}



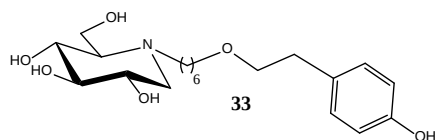
Representación de Cornish-Bowden



[I] (μM)	Vmax	Km (mM)
0	0,002625	4,286
5	0,002658	6,848
10	0,00248	9,657
33,3	0,001694	12,66

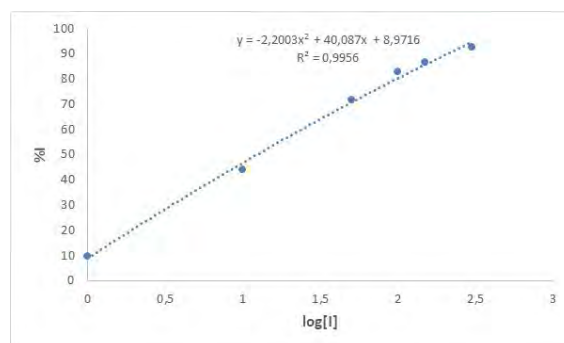
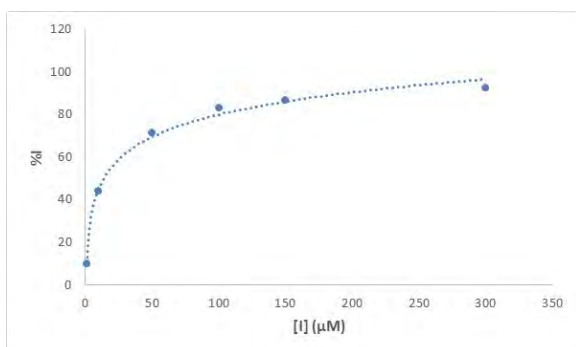
Inhibición competitiva

$K_{ia} = 11 \pm 4 \mu M$

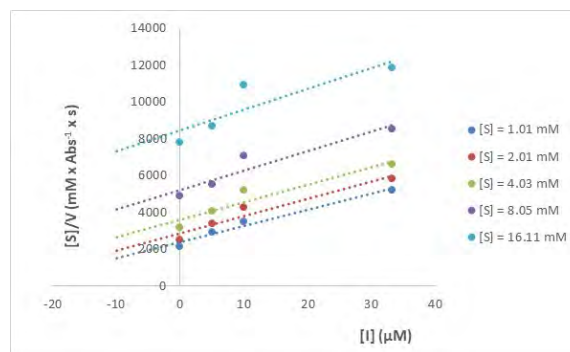
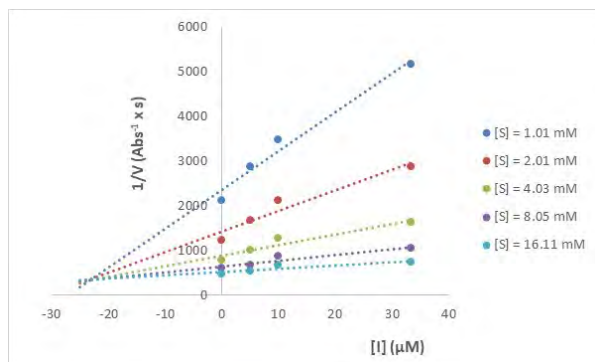


- β -glucosidasa (almendras)

- Cálculo de IC_{50}



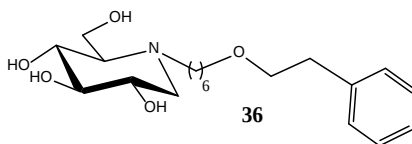
Representación de Cornish-Bowden



[I]/ μ M	Vmax	Km (mM)
0	0,002613	4,451
5	0,002632	6,659
10	0,002099	6,807
33,3	0,002315	11,43

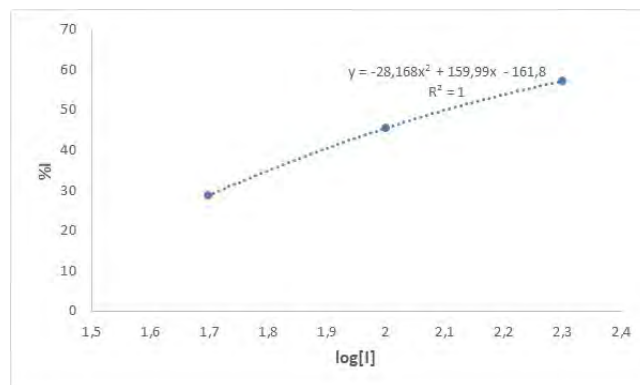
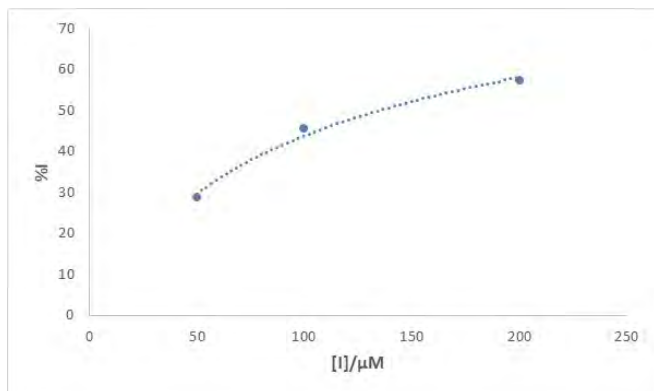
Inhibición competitiva

$K_{ia} = 17 \pm 5 \mu$ M

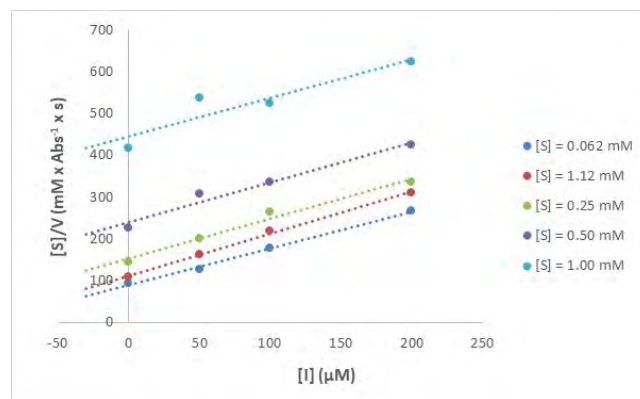
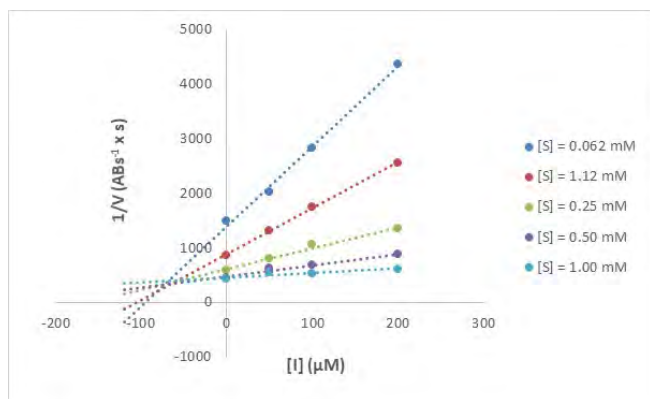


- α -glucosidasa (*Saccharomyces cerevisiae*)

- Cálculo de IC₅₀



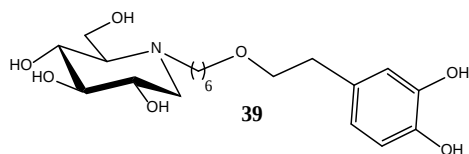
Representación de Cornish-Bowden



[I]/ μM	Vmax	Km (mM)
0	0,002906	0,1826
50	0,002405	0,2489
100	0,002829	0,4764
200	0,002644	0,6447

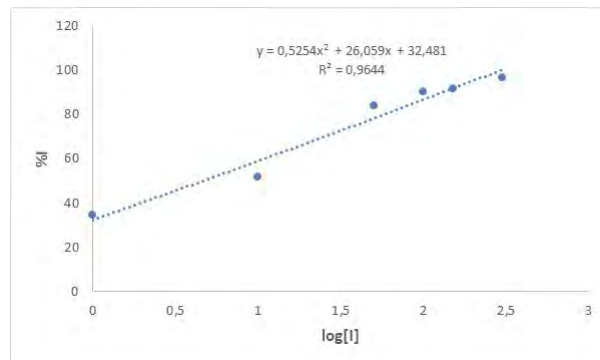
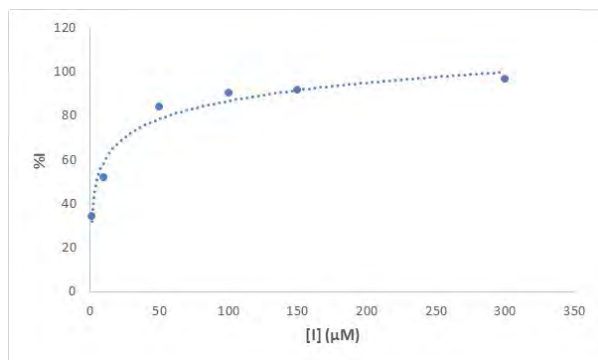
Inhibición competitiva

K_i = 93 ± 32 μM

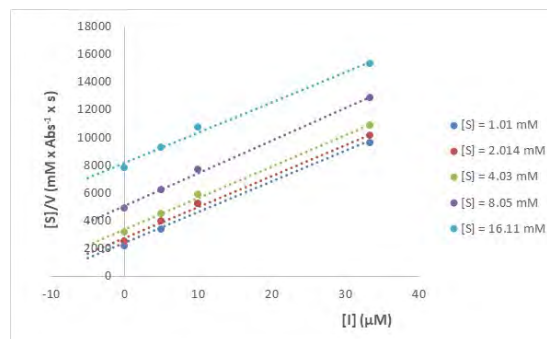
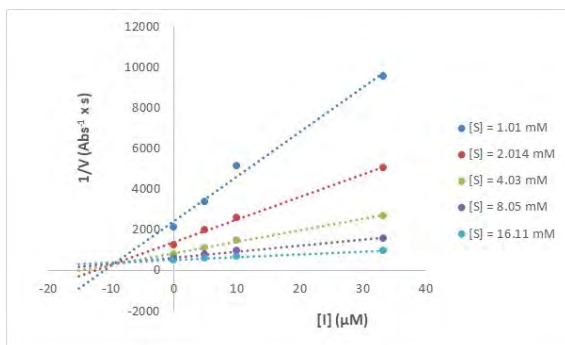


- β -glucosidasa (almendras)

- Cálculo de IC_{50}



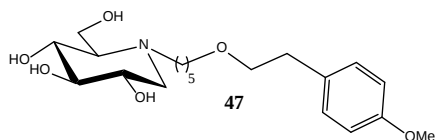
Representación de Cornish-Bowden



$[I]/\mu M$	V_{max}	K_m (mM)
0	0,002613	4,451
5	0,002571	7,818
10	0,002551	11,4
33,3	0,002852	27,72

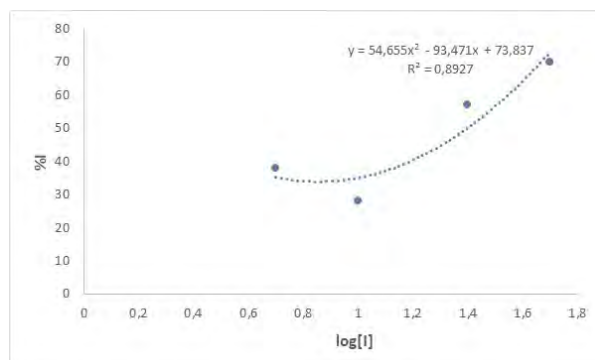
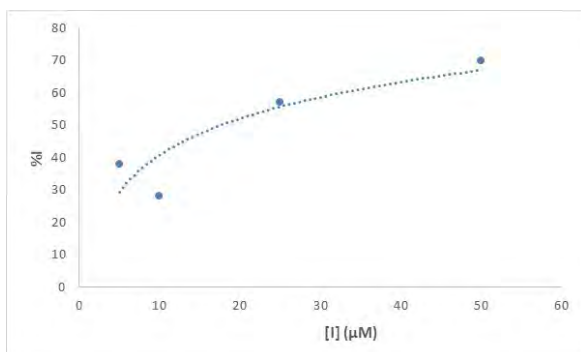
Inhibición competitiva

$K_{ia} = 6.5 \pm 0.1 \mu M$

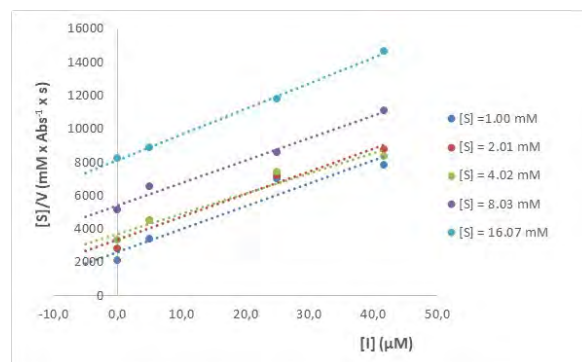
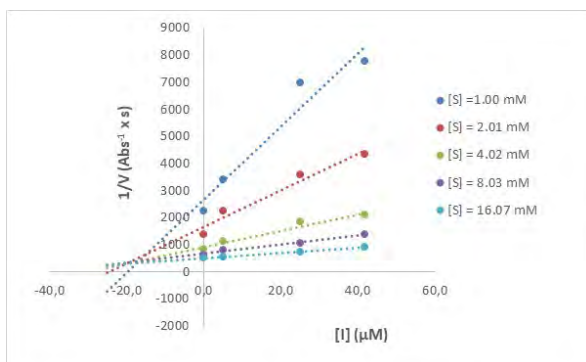


- β -glucosidasa (almendras)

- Cálculo de IC₅₀



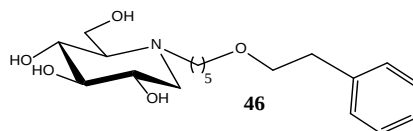
Representación de Cornish-Bowden



[I]/μM	Vmax	Km (mM)
0	0,00246	4,557
5	0,002939	9,005
25	0,001985	10,82
41,7	0,002092	14,72

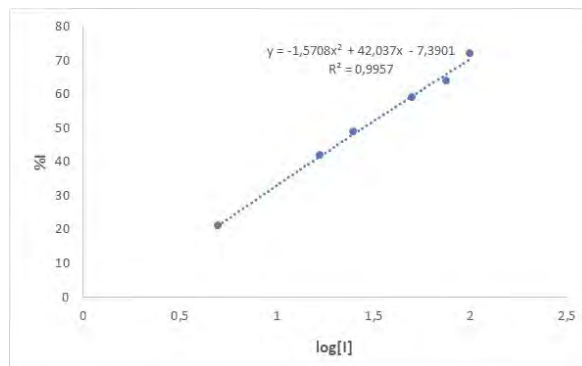
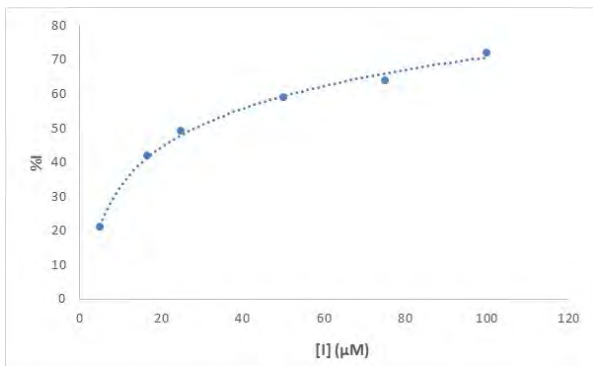
Inhibición competitiva

K_{ia} = 14 ± 6 μM

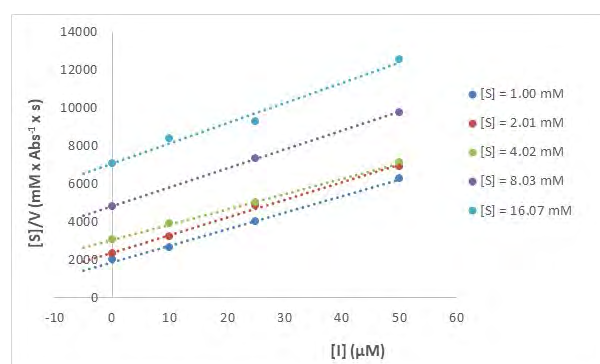
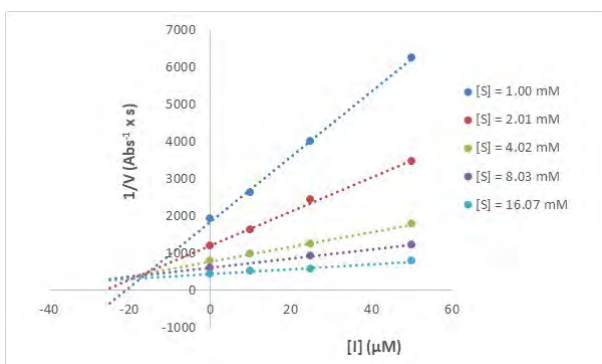


- **β -glucosidasa (almendras)**

- **Cálculo de IC₅₀**



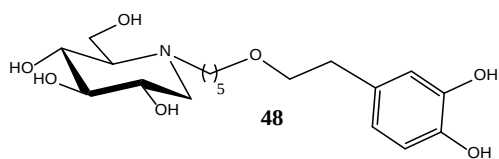
Representación de Cornish-Bowden



[I]/μM	Vmax	Km (mM)
0	0,002936	5,248
10	0,002845	7,708
25	0,003016	12,5
50,0	0,002407	14,4

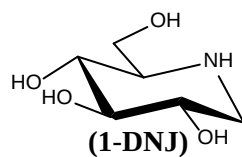
Inhibición competitiva

$K_{ia} = 23 \pm 4 \mu\text{M}$



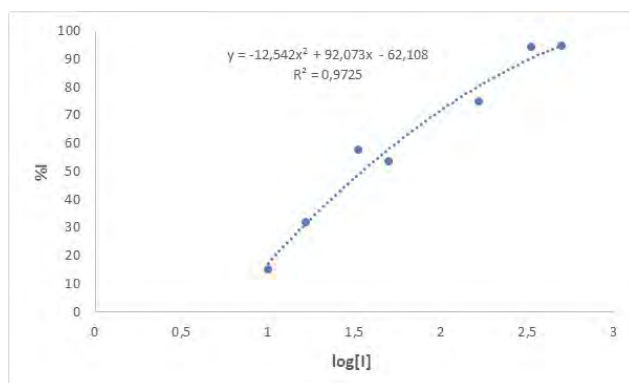
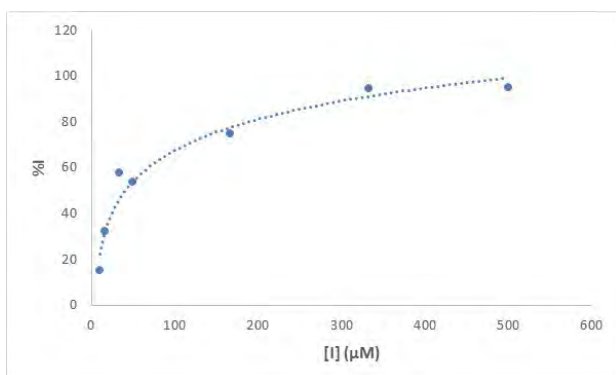
- β -glucosidasa (almendras)

$IC_{50} > 100 \mu M$



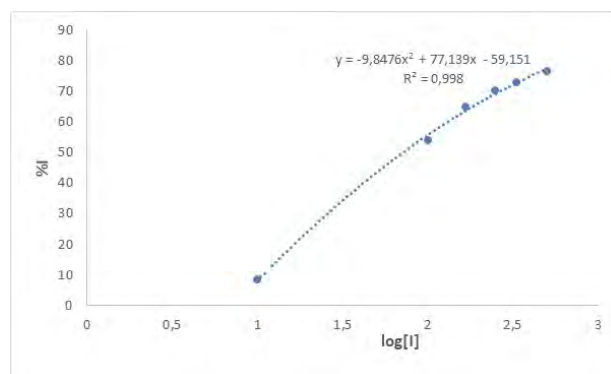
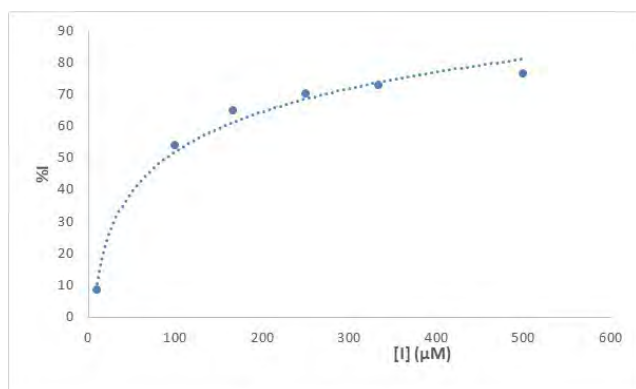
- α -glucosidasa (*Saccharomyces cerevisiae*)

- Cálculo de IC₅₀



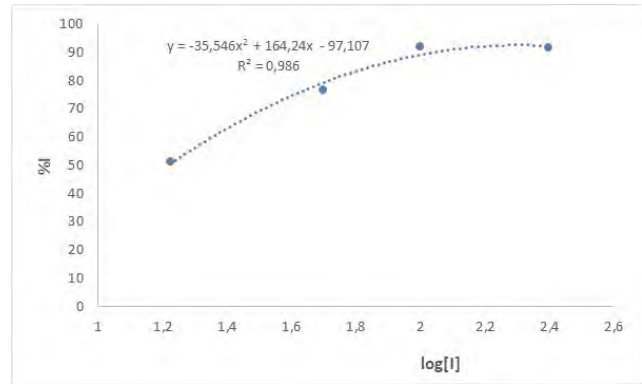
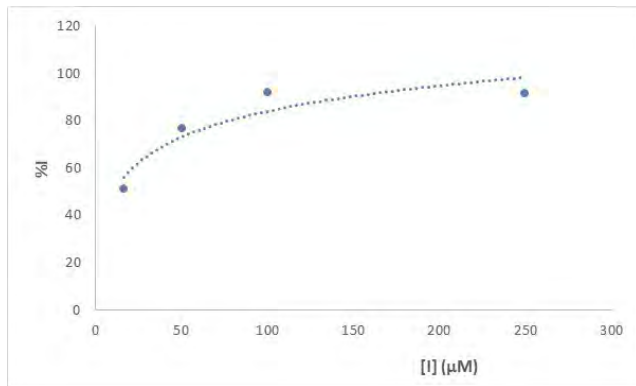
- β -glucosidasa (almendras)

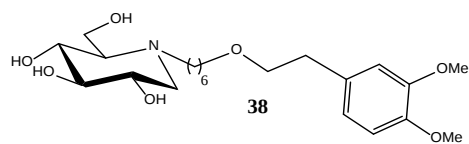
- Cálculo de IC₅₀



- α -Galactosidasa (granos de café verde)

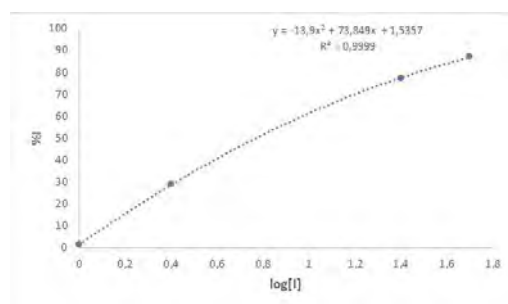
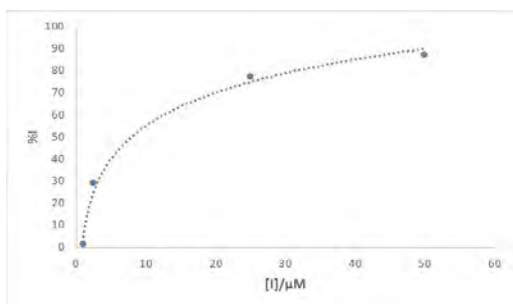
- Cálculo de IC₅₀



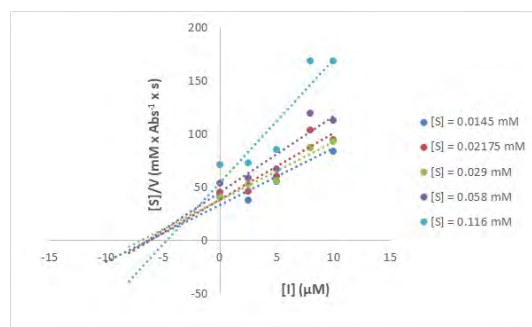
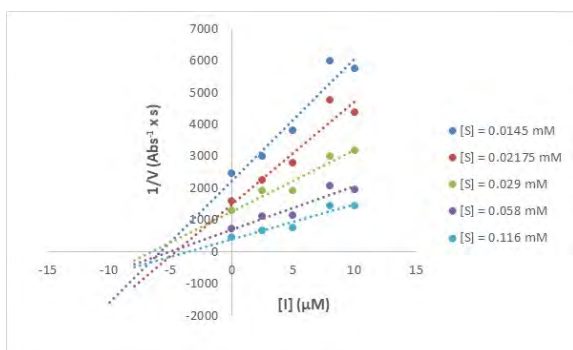


- Acetilcolinesterasa (*electrophorus electricus*)

- Cálculo de IC₅₀



Representación de Cornish-Bowden



[I]/μM	V _{max} (Abs/s)	K _m (mM)
0	0,003273	0,1156
8	0,001215	0,08796
10	0,001196	0,08262

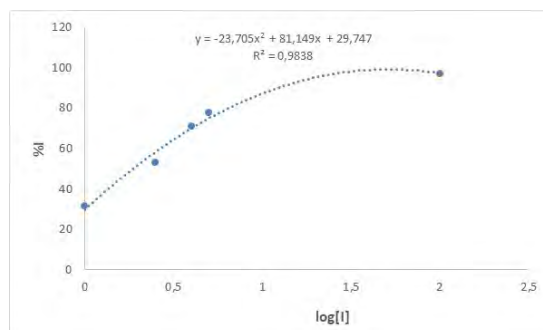
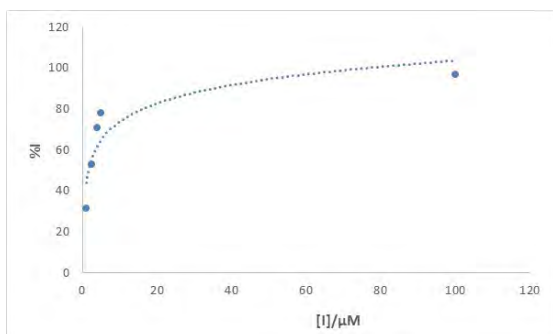
Inhibición mixta

K_{ia} = 9.3 ± 1.2 μM

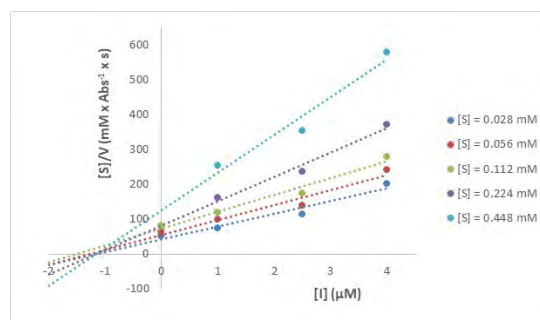
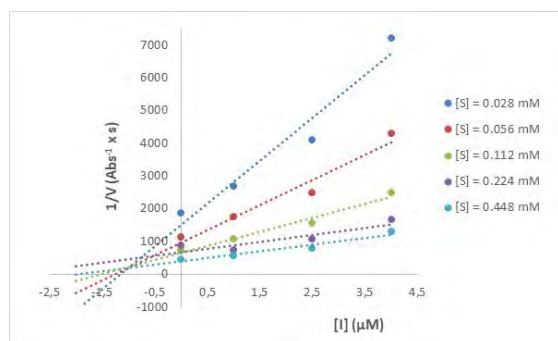
K_{ib} = 5.2 ± 0.5 μM

- **Compuesto 38**
- **Butirilcolinesterasa (equine serum)**

- **Cálculo de IC₅₀**



Representación de Cornish-Bowden

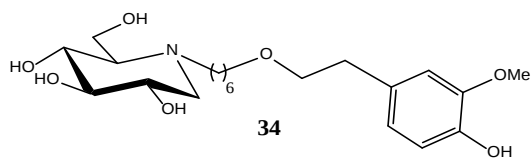


[I]/μM	Vmax (Abs/s)	Km (mM)
0	0,0028475	0,123
1	0,002476	0,1771
2,5	0,001811	0,1985
4	0,001139	0,2059
5	0,0013415	0,271

Inhibición mixta

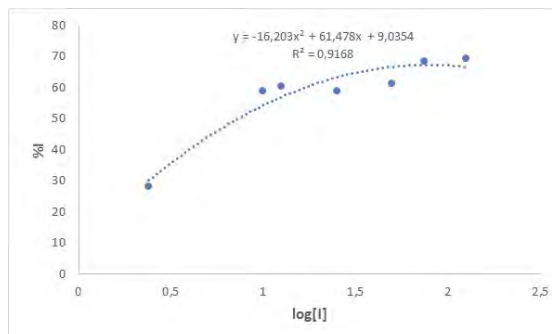
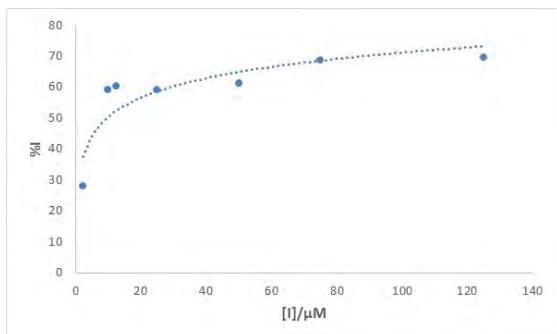
$K_{ia} = 1.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$

$K_{ib} = 4.5 \pm 1.4 \mu\text{M}$

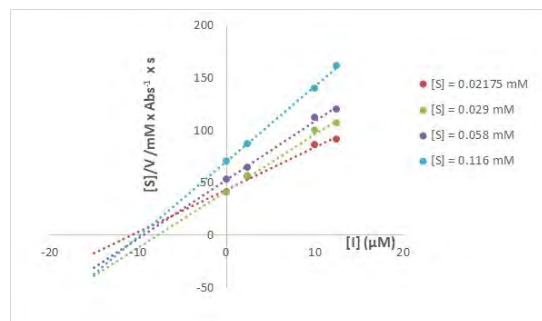
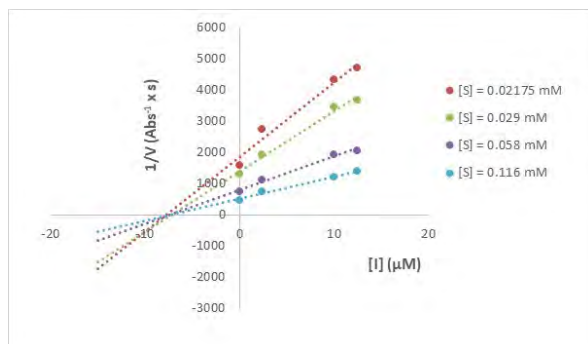


- **Acetilcolinesterasa (*electrophorus electricus*)**

- **Cálculo de IC₅₀**



Representación de Cornish-Bowden

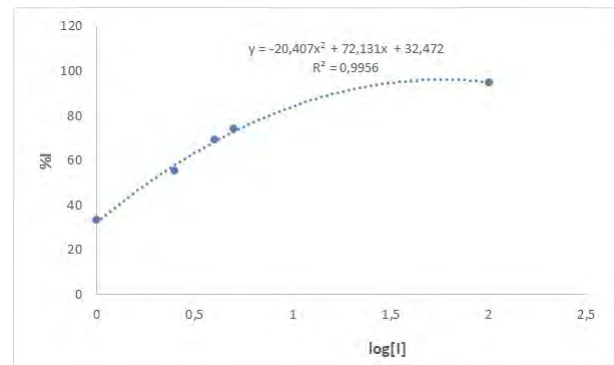
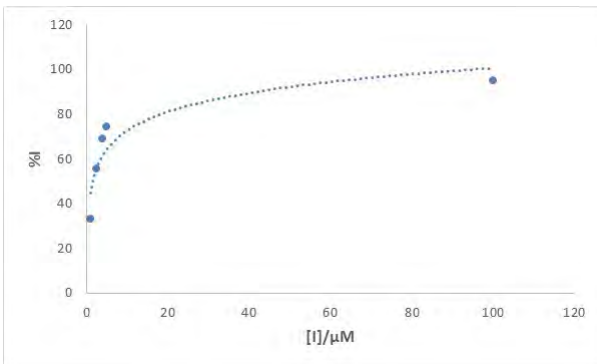


[I] (μM)	Vmax	Km
0	0,003273	0,1156
2,4	0,002973	0,1416
10	0,00205	0,1725
12,5	0,001531	0,1299

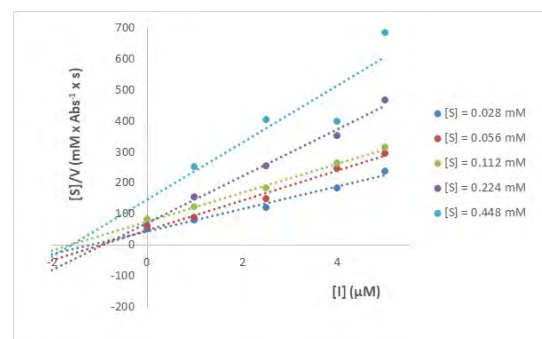
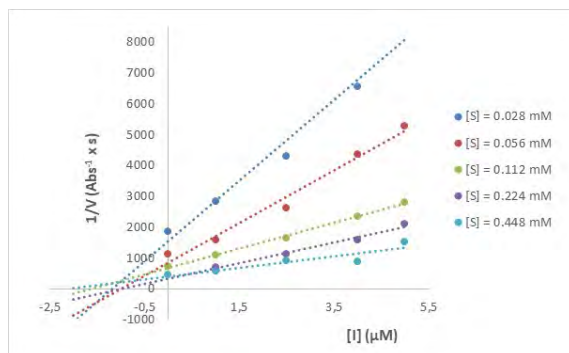
Inhibición no competitiva

K_{ia} = K_{ib} = 17 ± 5 μM

- **Compuesto 34**
- **Butirilcolinesterasa (equine serum)**
- **Cálculo de IC₅₀**



Representación de Cornish-Bowden

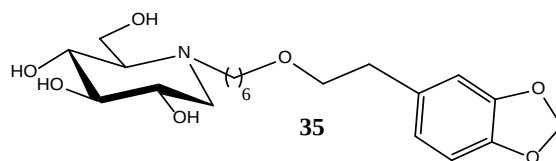


[I]/μM	Vmax (Abs/s)	Km (mM)
0	0,0028475	0,123
1	0,002493	0,1736
2,5	0,001523	0,1644
5	0,0009442	0,2033

Inhibición mixta

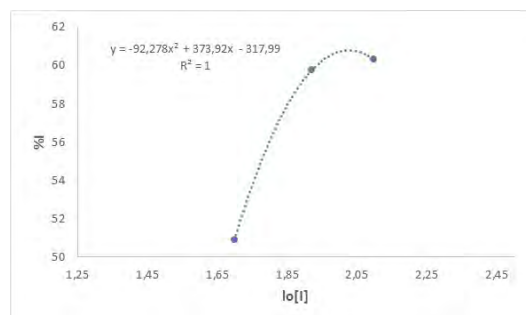
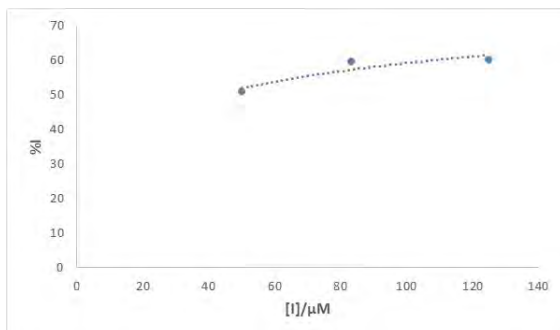
K_{ia} = 1.5 ± 0.2 μM

K_{ib} = 5.0 ± 2.0 μM

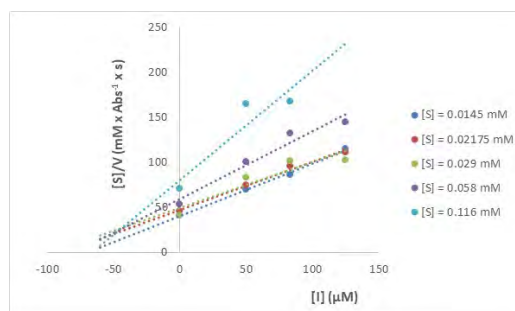
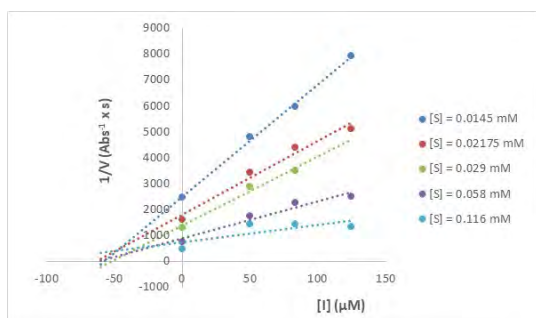


- **Acetilcolinesterasa (*electrophorus electricus*)**

- **Cálculo de IC₅₀**



Representación de Cornish-Bowden



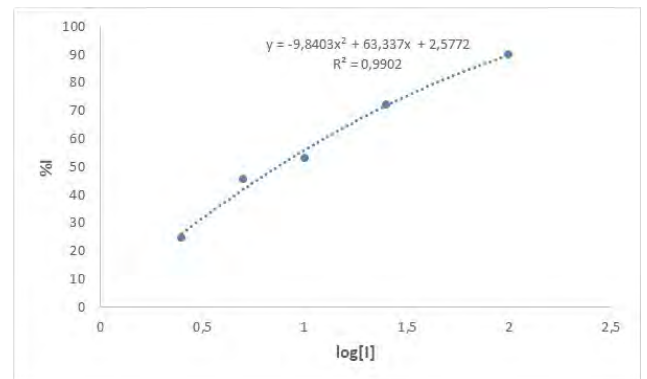
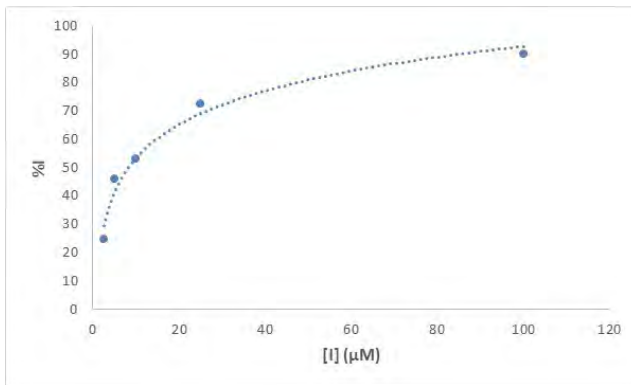
[I]/μM	V _{max} (Abs/s)	K _m (mM)
0	0,003273	0,1156
50	0,001196	0,09241
83,3	0,001329	0,1086

Inhibición mixta

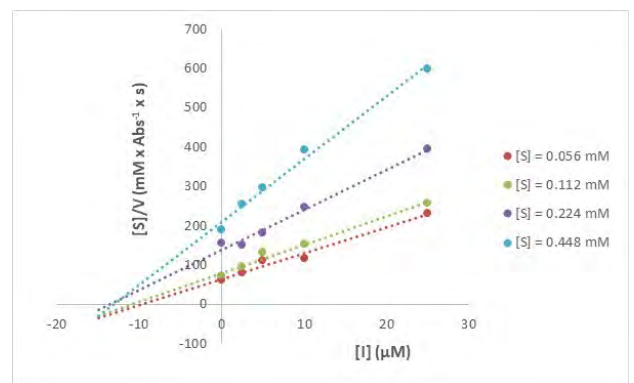
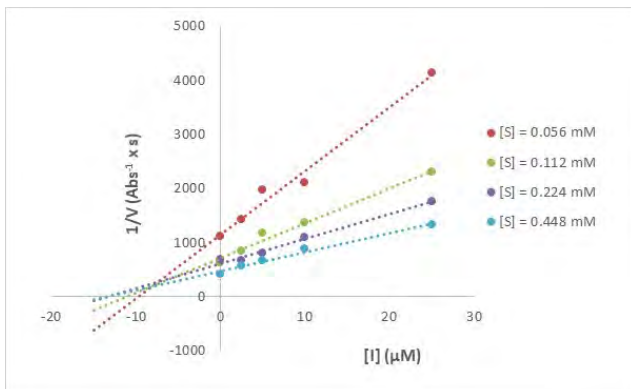
K_{ia} = 56 ± 10 μM

K_{ib} = 43 ± 14 μM

- **Compuesto 35**
- **Butirilcolinesterasa (equine serum)**
- **Cálculo de IC₅₀**



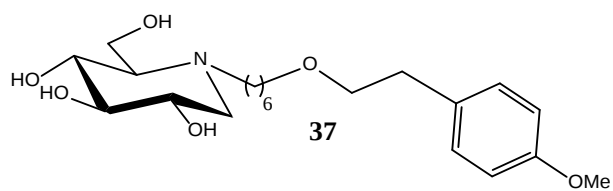
Representación de Cornish-Bowden



[I]/μM	K _m	V _{max}
0	0,114	0,003024
2,5	0,11	0,002215
5	0,147	0,0020125
10	0,094	0,0013495
25	0,148	0,0009785

Inhibición no competitiva

K_{ia} = K_{ib} = 9.2 ± 1.9 μM

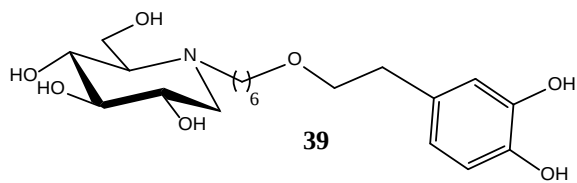


- **Acetilcolinesterasa (*electrophorus electricus*)**

$IC_{50} > 100 \mu M$ ($[S] = 112 \mu M$)

- **Butirilcolinesterasa (equine serum)**

$IC_{50} > 100 \mu M$ ($[S] = 112 \mu M$)



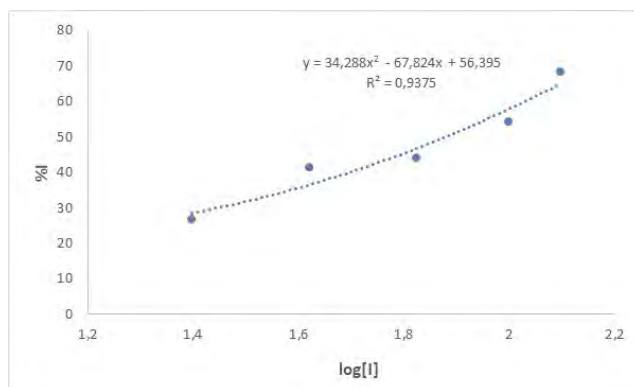
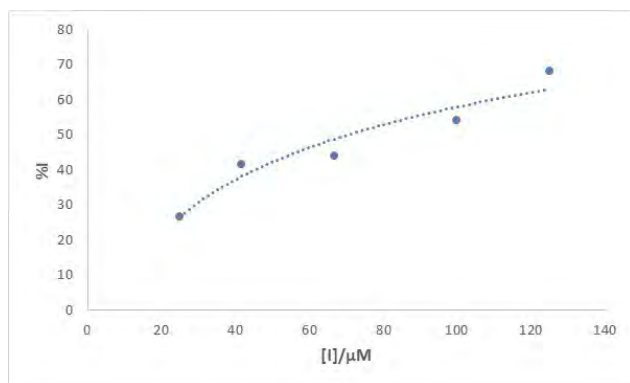
- **Acetilcolinesterasa (*electrophorus electricus*)**

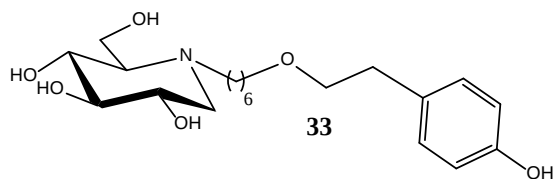
IC₅₀ > 100 μM ([S] = 112 μM)

- **Butirilcolinesterasa (equine serum)**

- **Cálculo de IC₅₀**

IC₅₀ = 76 μM ([S] = 112 μM)



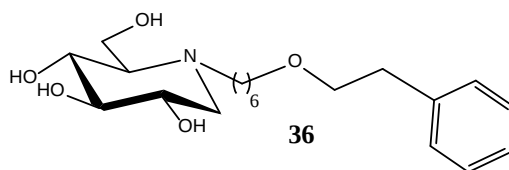


- Acetilcolinesterasa (*electrophorus electricus*)

$IC_{50} > 100 \mu M$ ($[S] = 112 \mu M$)

- Butirilcolinesterasa (equine serum)

$IC_{50} > 100 \mu M$ ($[S] = 112 \mu M$)

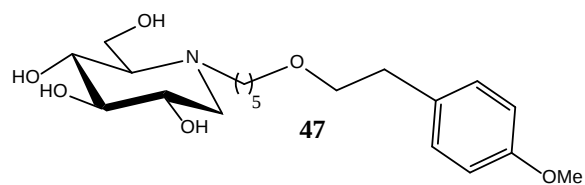


- Acetilcolinesterasa (*electrophorus electricus*)

$IC_{50} > 100 \mu M$ ($[S] = 112 \mu M$)

- Butirilcolinesterasa (equine serum)

$IC_{50} > 100 \mu M$ ($[S] = 112 \mu M$)

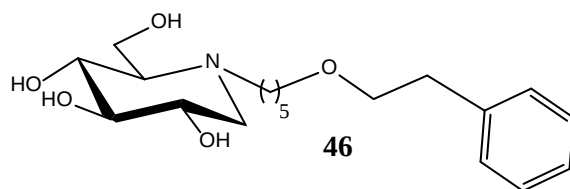


- Acetilcolinesterasa (*electrophorus electricus*)

$IC_{50} > 100 \mu M$ ($[S] = 112 \mu M$)

- Butirilcolinesterasa (equine serum)

$IC_{50} > 100 \mu M$ ($[S] = 112 \mu M$)

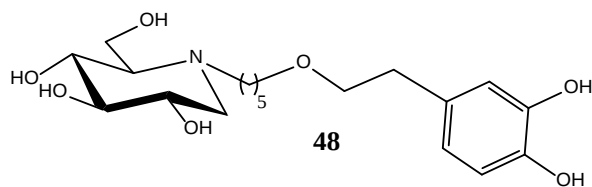


- Acetilcolinesterasa (*electrophorus electricus*)

$IC_{50} > 100 \mu M$ ($[S] = 112 \mu M$)

- Butirilcolinesterasa (equine serum)

$IC_{50} > 100 \mu M$ ($[S] = 112 \mu M$)

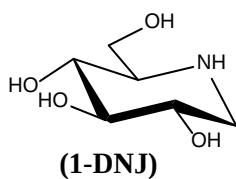


- **Acetilcolinesterasa (*electrophorus electricus*)**

$IC_{50} > 100 \mu M$ ($[S] = 112 \mu M$)

- **Butirilcolinesterasa (equine serum)**

$IC_{50} > 100 \mu M$ ($[S] = 112 \mu M$)



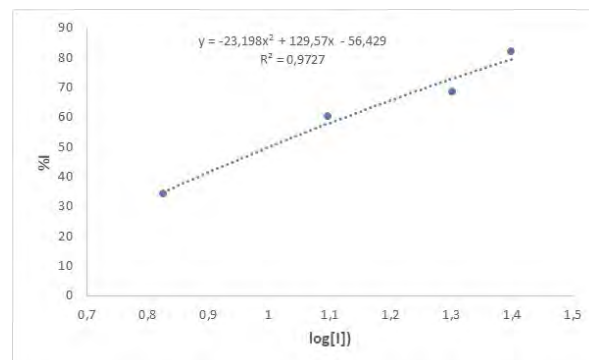
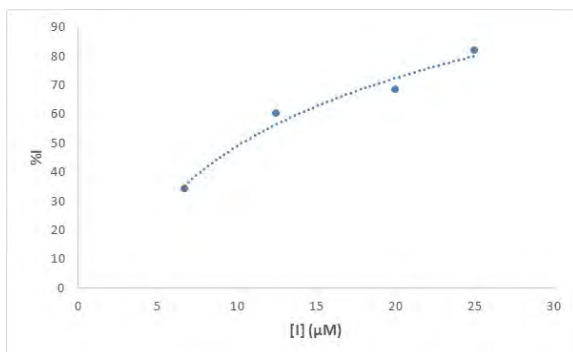
- **Acetilcolinesterasa (*electrophorus electricus*)**

$IC_{50} > 100 \mu M$ ($[S] = 112 \mu M$)

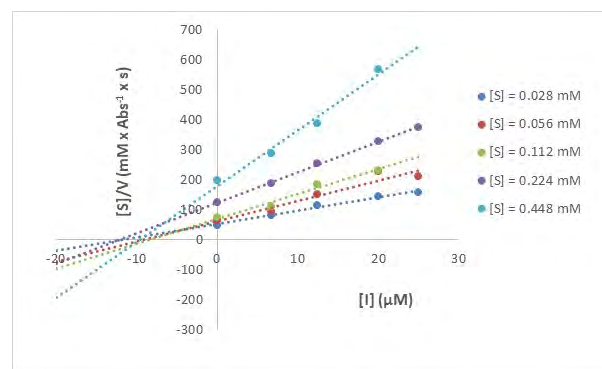
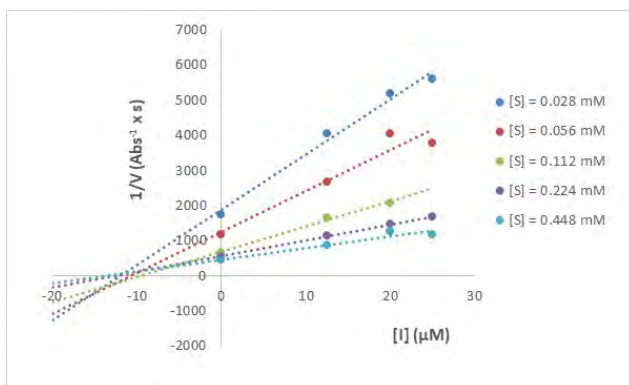
(1-DNJ)

- Butirilcolinesterasa (equine serum)

- Cálculo de IC₅₀



Representación de Cornish-Bowden



[I]/μM	Vmax	Km (mM)
0	0,002836	0,1133
6,7	0,001952	0,1217
12,5	0,001616	0,1832
20	0,001067	0,1437
25	0,001297	0,1796

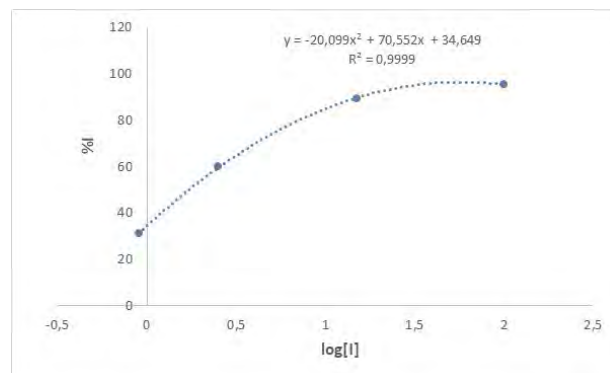
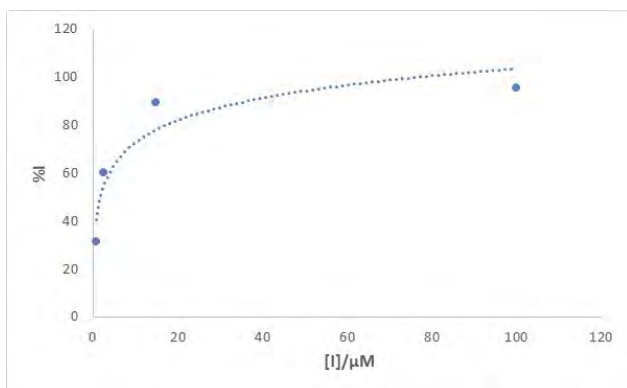
Inhibición no competitiva

$$K_{ia} = K_{ib} = 16 \pm 3 \mu\text{M}$$

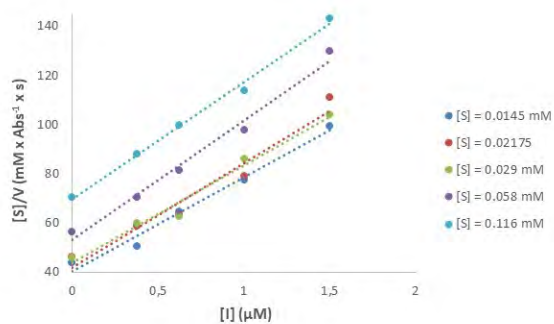
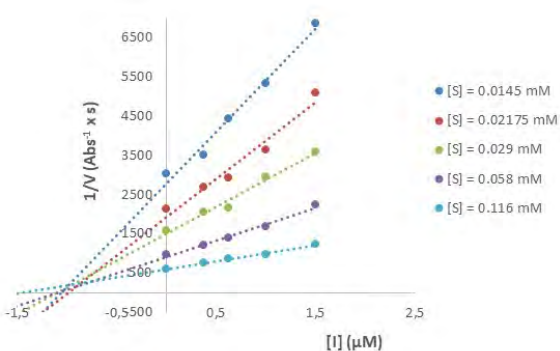
Galantamina

- Acetilcolinesterasa (*electrophorus electricus*)

- Cálculo de IC₅₀



Representación de Cornish-Bowden



[I]/μM	Vmax	Km (mM)
0	0,003501	0,1349
0,375	0,003078	0,1556
0,625	0,002777	0,2245
1	0,003042	0,2315
1,5	0,002759	0,2817

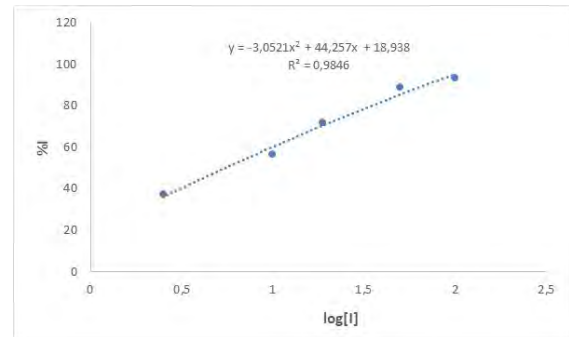
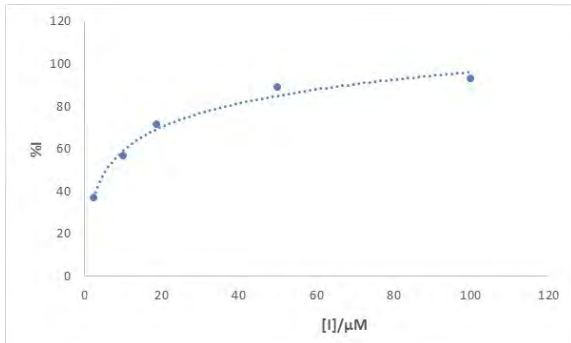
Inhibición competitiva

K_{ia} = 1.5 ± 0.6 μM

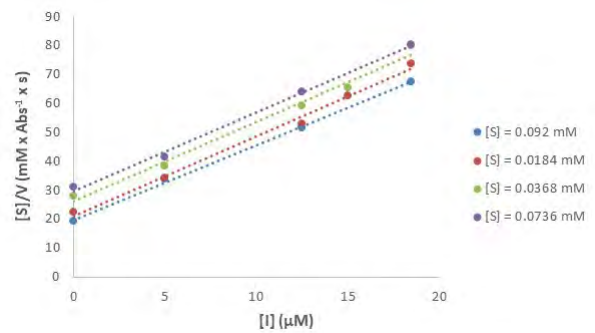
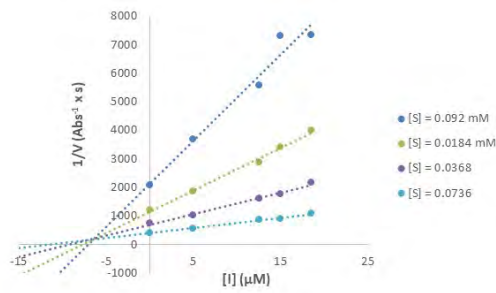
Galantamina

- Butirilcolinesterasa (equine serum)

- Cálculo de IC₅₀



Representación de Cornish-Bowden



[I]/μM	Vmax	Km (mM)
0	0,006969	0,1457
5	0,01092	0,362
12,5	0,008256	0,4631
15	0,01132	0,6955
18,5	0,009605	0,701

Inhibición competitiva

$K_{ia} = 4.5 \pm 0.9 \mu\text{M}$

A manera de simplificar los resultados se presentan las figuras **28** y **29**; en las que los compuestos señalados en colores fueron los que presentaron una mejor actividad frente a β -glucosidasa (**figura II.28**), y acetil y butirilcolinesterasa (**figura II.29**).

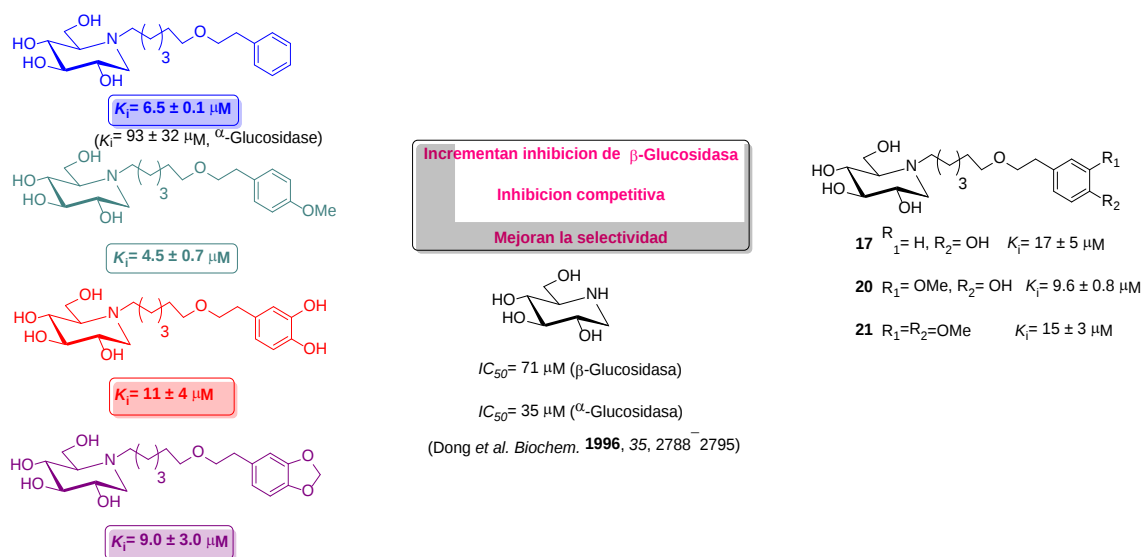


Figura II.28. Datos de inhibición enzimática para β -glucosidasas

En la **figura II.29** se pueden ver los valores de inhibición sobre acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, donde se observa que el derivado más activo, con una inhibición mixta es el derivado dimetoxilado **38**, sin despreciar al derivado del alcohol homovanílico **35**, el cual presenta valores de inhibición nada despreciables.

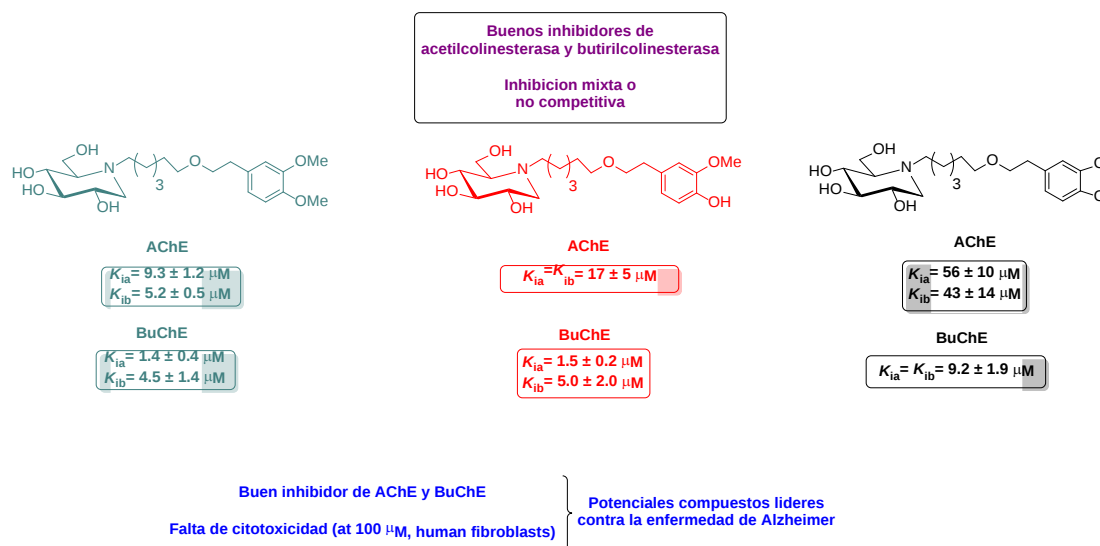


Figura II.29. Evaluación biológica de derivados fenólicos sobre acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

Se decidió probar los derivados del iminoazúcar como inhibidores de las colinesterasas para observar su comportamiento en ambas enzimas. La acetilcolinesterasa presenta dos sitios clave para llevar a cabo su acción, estos son la región aniónica catalítica (CAS), y la región aniónica periférica (PAS), CAS permite interacciones catión- π , con la porción de amonio cuaternario de la acetilcolina, la cual es el sustrato natural de la enzima, por otro lado la región aniónica periférica (PAS), posee múltiples residuos de aminoácidos aromáticos y se encuentra ubicado a 15 Å del sitio catalítico, a través de un estrecho canal, esta región es capaz de establecer interacciones con residuos planos y aromáticos. Por otro lado, PAS está involucrado en el inicio de la formación de placas β -amiloides.¹⁴⁸ Debido a esto es posible que aquellos inhibidores que presenten buenas interacciones con CAS y PAS pueden actuar tanto como potentes inhibidores de la enzima, como ayudar a reducir la formación de placas β -amiloides, las cuales provocan neurotoxicidad. En la **figura II.30** se muestra la comparación entre la estructura del donepezilo y los derivados de 1-DNJ preparados en esta Tesis Doctoral. De esta forma, el iminoazúcar se asemejaría a la piperidina en cuanto a que es un residuo protonable; se ha sustituido el anillo de indanona por un fragmento hidrocarbonado con una conexión de tipo éter con objeto de incrementar la flexibilidad conformacional. Dicho espaciador conecta al anillo del iminoazúcar con un anillo aromático con diversos sustituyentes.

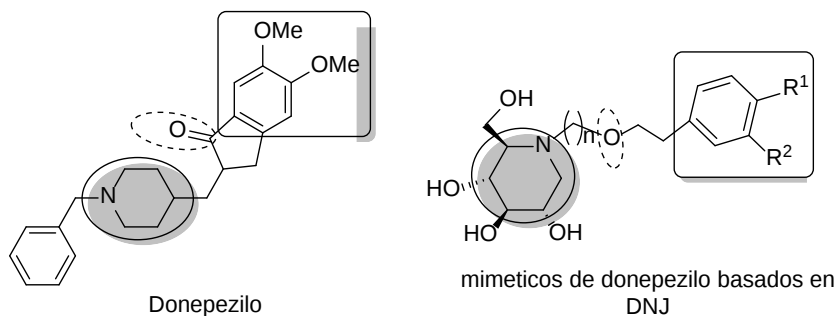


Figura II. 30. Estructura del donepezilo y derivados fenólicos sintetizados

El donepezilo presenta dos fragmentos fundamentales que interactúan con la acetilcolinesterasa (**figura II.30**); por un lado, está la *N*-bencil piperidina, que forma interacciones de tipo catión- π con Phe330, a través del átomo de nitrógeno protonado, a su vez genera interacciones de apilamiento de tipo π - π con el Trp84 mediante el residuo de bencilo.¹⁴⁹ También se ha comprobado que la indanona interactúa eficientemente con el

Trp279 mediante interacciones π - π en la entrada de la región aniónica periférica (PAS), y forma enlaces mediante puentes de hidrogeno a través de las moléculas de agua,¹⁵⁰ con la AChE a través de los grupos metoxilo.

Lo que se sugiere en esta Tesis Doctoral es que los derivados de DNJ podrían protonarse a un pH fisiológico, imitando de esta forma la actividad del catión amonio de la acetilcolina, lo que permite la formación de interacciones favorables con el sitio catalítico de la enzima (CAS). Por otro lado, existen reportes en la literatura de que la desoxinojirimicina reduce las respuestas inflamatorias y aumenta la maquinaria antioxidante en pacientes con angina de pecho;¹⁵¹ considerando que en la enfermedad de Alzheimer existe un gran estrés oxidativo y se presenta neuroinflamación,¹⁵² los cuales son eventos interconectados, el uso del iminoazúcar como núcleo base, podría ayudar en otras cuestiones involucradas en esta enfermedad, que como se ha mencionado con anterioridad, es de naturaleza multifactorial.

Con todo y que los valores de inhibición del derivado dimetoxilado sobre la acetilcolinesterasa, son bastante buenos, los valores presentados por el donepezilo siguen siendo mejores (**figura II.31**), sin embargo, para la butirilcolinesterasa la cual está presente en estados avanzados de la enfermedad, presenta mejores valores de inhibición que el fármaco comercial, lo que hace al compuesto **38** un interesante candidato para el tratamiento de dicha enfermedad, en un estadio avanzado.

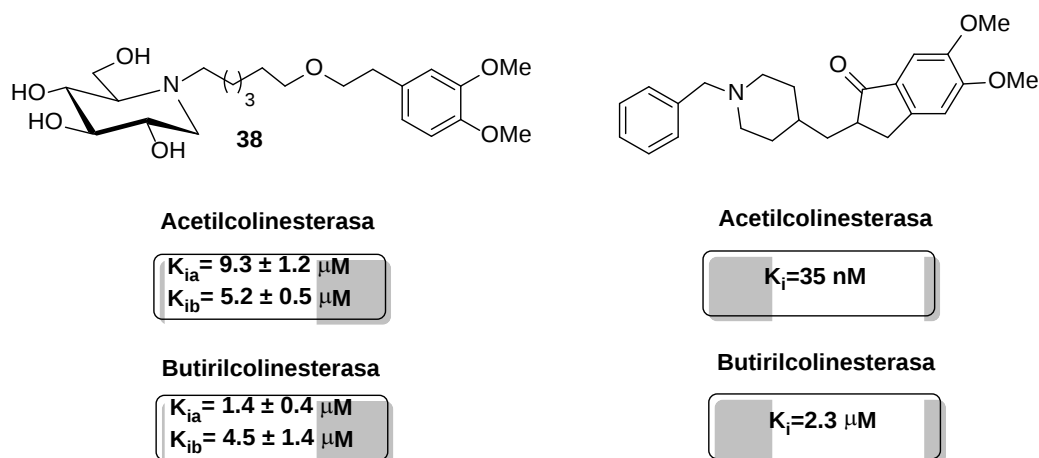


Figura II.31. Comparación de las constantes de inhibición del derivado **38** y donepezilo frente a AChE y BuChE

El donepezilo es el fármaco más utilizado actualmente contra la enfermedad de Alzheimer ya que presenta un mejor perfil farmacodinámico que otros fármacos utilizados

en la actualidad. Funciona como un potente inhibidor de acetilcolinesterasa en un rango nanomolar, ya que presenta múltiples interacciones con la enzima.

Analizando los datos obtenidos podemos sacar información muy interesante sobre la relación estructura actividad de los compuestos, se puede observar que en el caso de la acetilcolinesterasa es evidente que la presencia de un patrón dimetoxilado como sustitución del anillo aromático da al compuesto mayor potencia, observando en este caso una inhibición mixta con una IC_{50} y constantes de inhibición en el rango micromolar bajo, como se había planteado en un principio, sin embargo este compuesto no alcanza el nivel de inhibición del donepezilo pero si actúa en el mismo nivel que la galantamina. Uno de los datos más interesantes es que el derivado dimetoxilado tiene una marcada preferencia hacia BuChE, caso contrario al donepezilo. Un tema importante que debe tratarse es el hecho de que la BuChE participa en una etapa más avanzada de la enfermedad de Alzheimer,¹⁵³ también se ha visto que participa en la formación de las placas β -amiloides y en la neurodegeneración mediada por la hiperfosforilación de la proteína tau.¹⁵⁴ Lo que indica que estos compuestos podrían funcionar tanto para restablecer la funcionalidad cognitiva de los pacientes al aumentar los niveles de la acetilcolinesterasa, como al retrasar o mejorar la neurotoxicidad, la cual está relacionada con la amiloidogenesis en etapas avanzadas de la enfermedad.

II.5.2. Estudios de Docking

Se realizó un estudio de Docking (acoplamiento molecular) del derivado dimetoxilado **38** con la AChE y la BuChE para analizar qué tipo de interacciones, permiten explicar la inhibición de AChE y BuChE. Analizando los compuestos se observó que el derivado dimetoxilado de cadena de 6 (**38**) es el que presenta la mejor interacción, tanto con PAS como con CAS. Se obtuvo el cálculo para el derivado dimetoxilado con espaciador de 3, 5 y 6 átomos de carbono (**figura II.32**), con esto pudimos observar que el espaciador que da lugar al mayor número de interacciones con los aminoácidos de los sitios activos de la enzima es la cadena de 6, esto lo podemos comparar con los datos de la **figura II.33**. Concluyendo con esto que el tamaño de la cadena espaciadora está altamente relacionado con la actividad del compuesto.

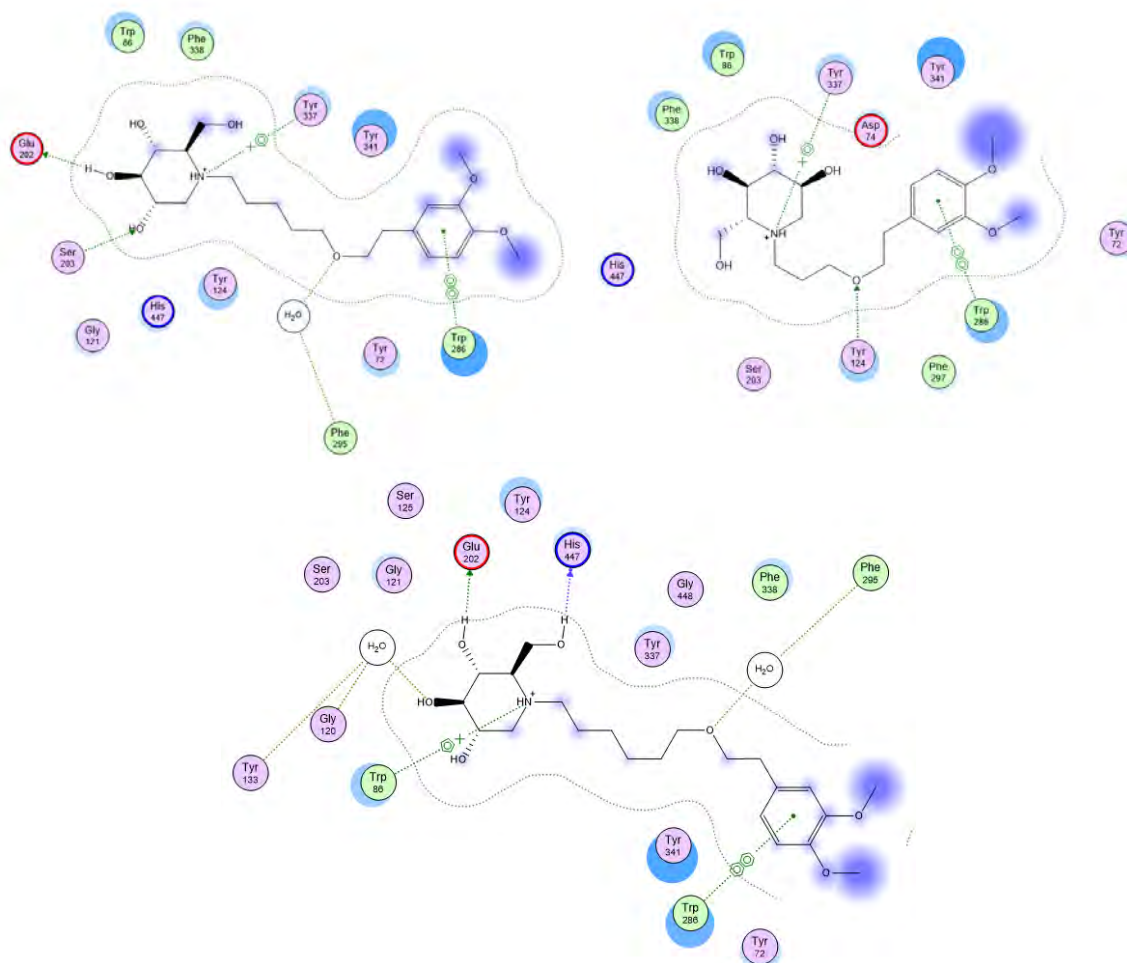


Figura II.32. Docking de compuesto dimetoxilado de cadena de 3, 5 y 6

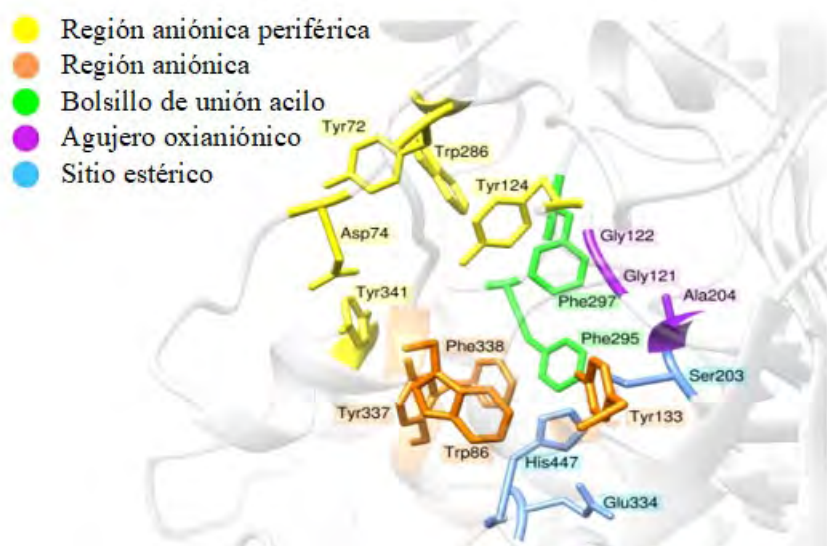


Figura II.33. Aminoácidos presentes en los sitios activos de la acetilcolinesterasa¹⁵⁵

Los cálculos de acoplamiento predicen que el compuesto **38** forma un complejo con AChE (**figura II.34**). El resto iminoazúcar establece interacciones de enlace de puentes de H con Trp86 y Glu202 en el subsitio aniónico catiónico (CAS). Además, el resto del anillo aromático participa en interacciones de apilamiento π - π con Trp286 en el subsitio aniónico periférico (PAS). El anillo aromático también participa en interacciones de van der Waals con varios residuos en el subsitio aniónico periférico.

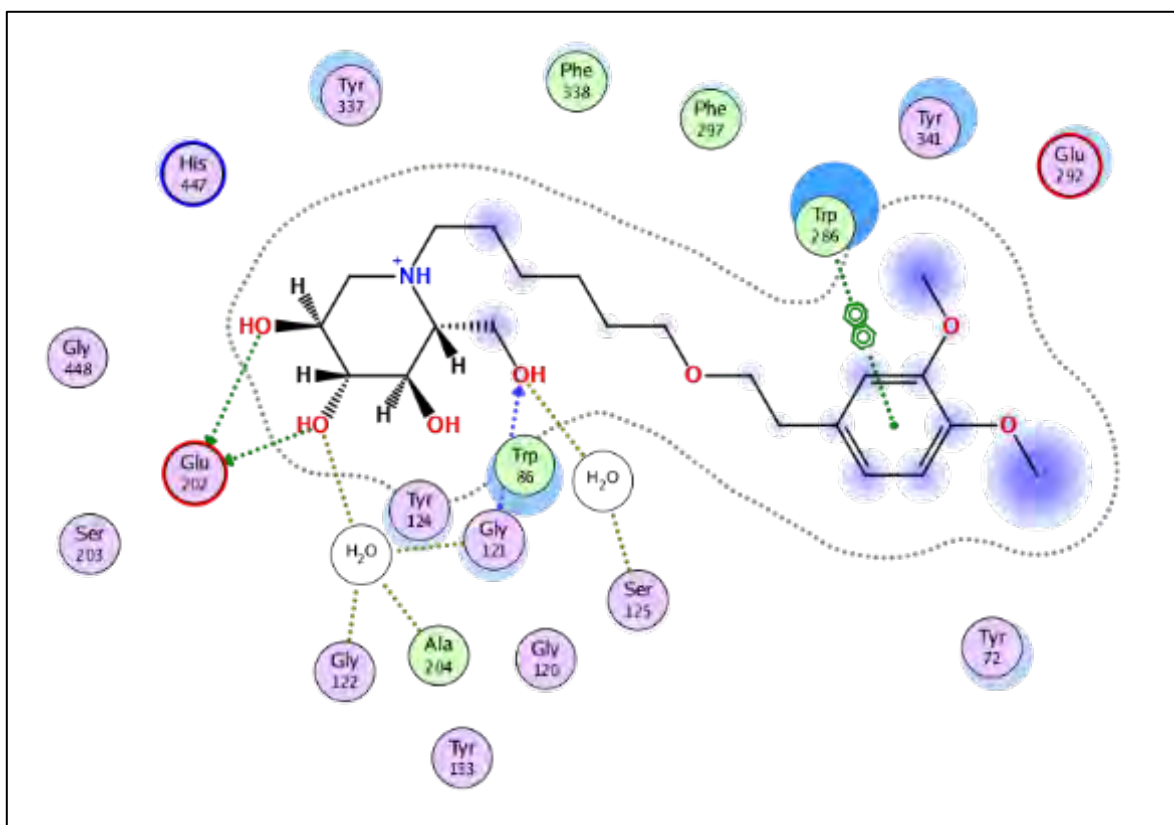


Figura II.34. Simulación de Docking de la interacción entre derivado dimetoxilado y AChE

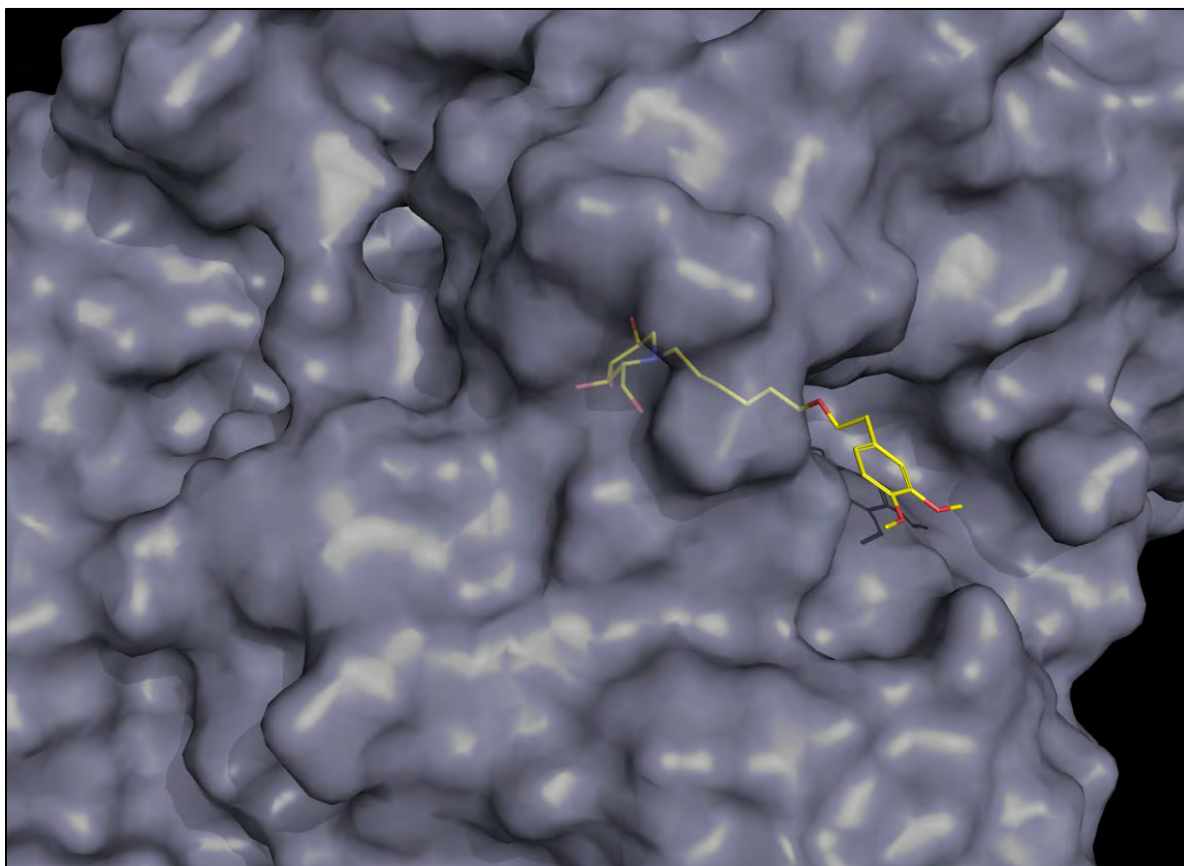


Figura II.34. Simulación de Docking de la interacción entre derivado dimetoxilado y AChE

Los cálculos de acoplamiento molecular también predicen que el compuesto **38** forma un complejo con BuChE (**figura II.35**). El resto iminoazúcar establece interacciones de enlace de puentes de H con Trp82 y Glu197 en el subsitio activo catiónico (CAS) y con His438 en el subsitio catalítico. Además, el resto del anillo aromático está involucrado en las interacciones de van der Waals con los residuos Thr284, Pro285, Asn289 en el subsitio aniónico periférico (PAS). Tomados en conjunto, estos cálculos predicen que **38** interactúa en modos similares con ambas enzimas (como se ve en las figuras 3D) excepto por la interacción con His438 en BuChE que falta en AChE. Las interacciones de apilamiento π - π con Trp286 observadas en AChE no están presentes en BuChE porque no hay un residuo equivalente en el subsitio aniónico periférico de BuChE.

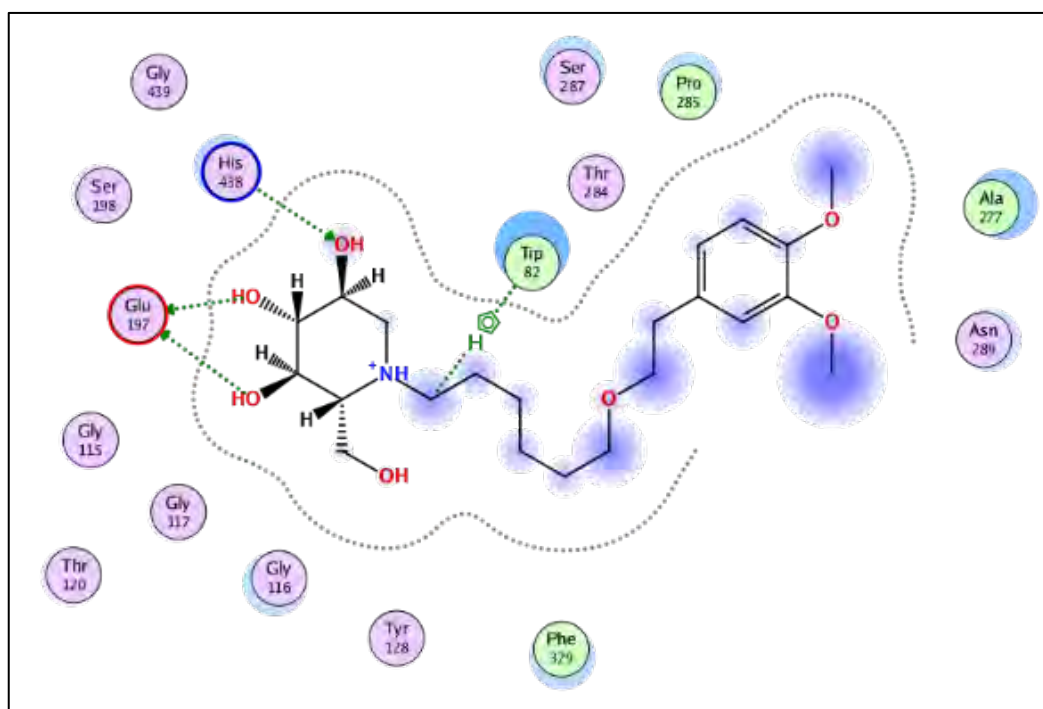


Figura II.35. Simulación de Docking de la interacción del derivado dimetoxilado con BuChE

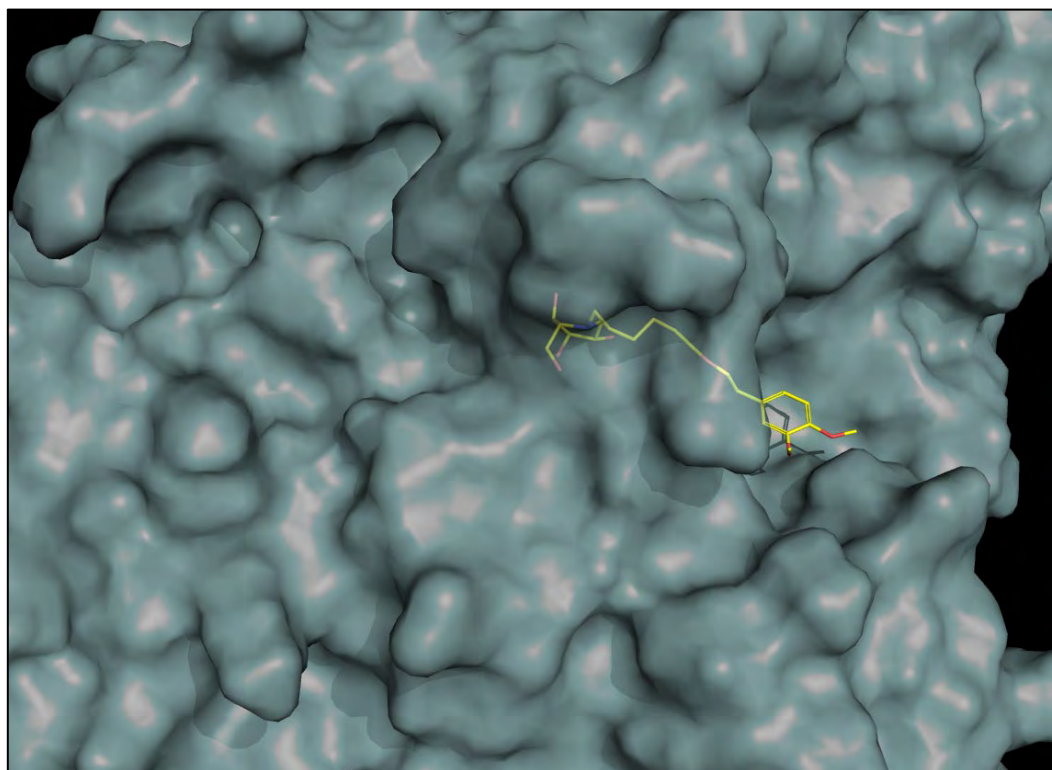


Figura II.35. Simulación de Docking de la interacción del derivado dimetoxilado con BuChE

II.5.3. Datos de antiproliferación

Se ha medido también la actividad antiproliferativa de los compuestos preparados en este capítulo (**tabla II.2**), mediante modificaciones menores del protocolo del Instituto nacional del Cáncer de EE. UU. (NCI).^{156, 157} Los derivados desprotegidos con espaciador de cadena de 6 (**33-39**) fueron evaluados sobre 6 líneas celulares cancerosas, sobre fibroblastos no cancerosos (BJ-hTERT), y en una línea celular tumoral sólida (SH-SY5Y, glioblastoma), como modelo de células cerebrales. En casi todos los casos se observó ausencia de inhibición de crecimiento celular sobre las líneas celulares a 100 micromolar, indicando que no produce daño celular, lo que los hace buenos candidatos, para el tratamiento de otro tipo de enfermedades, como la enfermedad de Gaucher o el Alzheimer. Solo se observó que el derivado que presenta la porción de tipo catecol **39**, presenta un efecto inhibitorio sobre la línea celular no cancerosa ($GI_{50} = 39 \pm 5 \mu M$). Por otro lado, también fue evaluada la selenourea **90**, la cual a diferencia de los derivados fenólicos presenta valores bastante buenos de inhibición de la proliferación, en el rango micromolar bajo en 5 de las 6 líneas celulares evaluadas, al comparar estos valores con los del 5-fluorouracilo y el cisplatino, agentes antiproliferativos utilizados actualmente, presenta valores similares de inhibición sobre SW1573, y mejores valores en T-47D y WiDr.

Tabla II.3. Valores de antiproliferación celular

Compuestos	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr	SH-SY5Y	BJ-hTert
33	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
34	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
35	73±29	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
36	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
37	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
38	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
39	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	39±5.4
90	6.8±0.26	12±0.87	7.7±1.4	4.2±0.44	4.5±1.3	7.1±2.6	-----	-----
5-FU	-----	5.5±2.3	15±4.7	4.3±1.6	47±18	49±6.7	-----	-----
Cisplatino	4.9±0.2	1.9±0.2	2.0±0.3	3.4±0.7	15±2.3	26±5.6	-----	-----

II.6. Conclusiones

En este capítulo se ha abordado la preparación de nuevos derivados de iminoazúcar (1-DNJ) como posibles inhibidores de glicosidasas o colinesterasas.

Por un lado, se llevó a cabo la síntesis de ureas, tioureas y selenoureas con fragmentos de tipo *N*-arilo, con objeto de analizar la influencia del átomo de calcógeno (oxígeno, azufre, selenio), el tamaño del espaciador y los sustituyentes en el anillo aromático sobre sus propiedades biológicas. Aunque la actividad inhibitoria fue moderada, la selenourea derivada de 1-DNJ se comportó como un buen agente antiproliferativo, con valores de GI_{50} inferiores a 10 μ M para 5 de las 6 líneas de tumores sólidos humanos evaluadas.

Se intentó así mismo la preparación de híbridos entre 1-DNJ y benzoselenazolona por un lado, e indanona por otro, con objeto de acceder a análogos del ebselen y donepezilo; no obstante, no se pudieron solventar debido a algunos problemas en la ruta sintética, lo cual imposibilitó que se pudieran obtener los productos deseados.

Con la finalidad de evaluar la influencia de un segundo átomo de nitrógeno dentro del iminoazúcar fue sintetizada la azafagomina benzoilada, sobre la cual se ensayaron diversas condiciones de alquilación, sin embargo, todos los intentos resultaron infructuosos.

También se preparó una novedosa familia (10 compuestos) de miméticos del fármaco donepezilo, usado en la actualidad en el tratamiento del Alzheimer, con tres unidades estructurales fundamentales: la 1-DNJ, que puede ser protonada en condiciones fisiológicas e interaccionar con la región CAS de la enzima; un anillo aromático con distintos sustituyentes en su estructura, que puede establecer interacciones hidrofóbicas con la región PAS de la enzima; y un espaciador hidrocarbonado con grupo éter como conector. La actividad inhibitoria fue muy sensible a las variaciones estructurales mencionadas.

Se observó que aquellos derivados que presentan un patrón disustituido relativamente lipofílico (3,4-di-OMe, 3-OH / 4-OMe, 3,4-OCH₂O), resultaron ser fuertes inhibidores de AChE, pero sobre todo de BuChE, con valores de inhibición en el rango micromolar bajo; destacan especialmente los compuestos **38** y **34**. Con relación a la BuChE los compuestos presentaron una actividad análoga a la del donepezilo, y un aumento de aproximante 3 veces con respecto a la galantamina.

Estudios de *docking* confirmaron las hipótesis establecidas en cuanto a la interacción con las regiones clave de las colinesterasas. Además, la actividad antiproliferativa

despreciable observada frente a líneas celulares de tumores sólidos humanos sugiere una baja citotoxicidad de estos compuestos.

Es por todo ello que la nueva familia de derivados de iminoazúcares presentada en este capítulo puede constituir un punto de partida interesante en el desarrollo de nuevos agentes anti-Alzheimer en el marco de la *hipótesis colinérgica*.

II.7. Sección experimental

Iminoazúcares

Métodos generales

La rotación óptica fue medida en un polarímetro Perkin-Elmer 241 MC, utilizando la línea de emisión del Na (λ 589 nm).

Los espectros de RMN y masas fueron realizados en el Centro de investigación Tecnológica e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C fueron adquiridos en un equipo Bruker Avance III a 300 MHz con sonda de banda ancha BBFO Plus de 5mm, y Bruker Avance III a 500 MHz con criosonda de TCI de 5 mm. Como disolvente se empleó cloroformo deuterado (CDCl_3) y metanol deuterado (CD_3OD). Los desplazamientos químicos fueron reportados en ppm (δ) y el espectro fue referenciado con el solvente protonado residual: CDCl_3 (7.26 y 77.16 ppm), CD_3OD (3.31 ppm y 49.0 ppm) para ^1H , y ^{13}C RMN respectivamente. Las constantes de acoplamiento (J) fueron expresadas en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales de los espectros de ^1H se describe como: *s* para una simple, *d* para una señal doble, *dd* para una señal doble de doble, *ddd* para una señal doble de doble de doble, *dc* para una señal doble de cuádruple, *t* para una señal triple y *m* para una señal múltiple. Las señales de ^1H y ^{13}C , fueron asignadas usando experimentos de RMN de 1D y 2D (HSQC, y HMBC).

Los espectros de masas de alta resolución fueron obtenidos por EI, ESI y FAB usando un espectrómetro Thermo Fisher Scientific Orbitrap ELITE.

Las columnas cromatográficas para purificación tipo flash fueron empacadas utilizando sílica gel Merc 60 (malla 230-400).

La CCF fue corrida usando placas de aluminio pre-recubiertas con sílica gel de 60 platos F₂₅₄; dichas placas fueron observadas por luz UV (254 nm), lámpara de UV-G-54 y reveladas con vainillina al 10 % en etanol con 1% de H_2SO_4 .

Todos los disolventes utilizados fueron de grado reactivo. Los reactivos utilizados se adquirieron de Aldrich y se utilizaron sin ninguna purificación.

Ensayos enzimáticos

Para el análisis de las enzimas evaluadas en este trabajo (glicosidasas y colinesterasas), fueron preparadas soluciones madre de los inhibidores en DMSO; el contenido de DMSO se mantuvo al 5% (V/V) para las glicosidasas y al 1,25% (V/V) para las colinesterasas. Las enzimas se disolvieron adecuadamente en agua en una concentración en la cual cuando se usa $[S] = 4 \times K_M$, la velocidad de la reacción está en el rango de 0.12-0.15 Abs / min.

En todas las enzimas, se realizó un cribado inicial a una concentración de inhibidor de 100 μ M, utilizando las siguientes concentraciones de sustrato: $[S] = 0.25$ mM para α -glucosidasa (*Saccharomyces cerevisiae*), 4.0 mM para β -glucosidasa (almendras), 0.60 mM para α -galactosidasa (granos de café verde), 0,51 mM para β -galactosidasa (*E. coli*), 1,5 mM para β -galactosidasa (*Asp. Oryzae*), 0,12 mM para AChE (*Electrophorus electricus*), y 0,11 mM para BuChE (suero equino).

Las tasas iniciales (pendientes de los gráficos Abs vs. t) se usaron para calcular el %I, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{V_o - V}{V_o} \times 100$$

V_o : velocidad de reacción para la solución enzimática.

V : velocidad de reacción en presencia del inhibidor.

Los valores de CI_{50} se calcularon trazando %I frente a $\log [I]$, y ajustando la curva a una función polinómica de segundo orden.

Cuando el porcentaje de inhibición fue superior al 70%, los parámetros cinéticos y las constantes de inhibición se calcularon usando cinco concentraciones de sustrato diferentes que van desde $\frac{1}{4} K_M$ a $4 \times K_M$, y 2-4 concentraciones de inhibidor diferentes (que proporcionan 20-70% de inhibición). Cada ensayo se realizó por duplicado.

Los ensayos de glicosidasas se realizaron utilizando la metodología descrita por Bols y colaboradores.¹⁴⁵ Cada conjunto de experimentos se preparó en cubetas PS (1,2 mL de volumen final) que contiene: tampón fosfato 0,1 M (pH 6,8), los correspondientes *o*- o *p*-

nitrofenil glucopiranosidos, solución inhibidora o DMSO (para la cubeta de control), más agua hasta a un volumen de 1.14 mL

Las reacciones se iniciaron agregando 60 μ L de solución enzimática adecuadamente diluida a 25 ± 0.1 °C y la formación de los nitrofenolatos correspondientes, se monitoreó a 400 nm (glucosidasas y α -galactosidasas) o 420 nm (β -galactosidasas) durante un tiempo de 125 s.

Para las colinesterasas, se realizaron modificaciones menores en el ensayo de Ellman.¹⁴⁷ La actividad se midió en cubetas PS (volumen final de 1,2 mL) que contenían tampón fosfato 0,1 mM (pH 8,0), DTNB 0,88 mM, sustrato (yoduros de acetil y butiriltiocolina para AChE y BuChE, respectivamente), inhibidor (o disolvente para la reacción de control) más agua hasta un volumen constante de 1,14 mL. La reacción se inició agregando 60 μ L de la solución enzimática acuosa a 25 °C. La formación del cromóforo se controló a 405 nm durante un tiempo de 125 s.

Para inhibidores fuertes, el modo de inhibición se determinó usando el método de Cornish-Bowden, que implica el uso de dos gráficos diferentes: $1/v$ vs. $[I]$ (diagrama de Dixon) y $[S]/v$ vs. $[I]$. Para el cálculo de los parámetros cinéticos (K_M , V_{max}) se utilizó un análisis de regresión no lineal (ajuste de mínimos cuadrados).

Las constantes de inhibición se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

Inhibición competitiva:

$$K_{ia} = \frac{[I]}{\frac{K_{M\ app}}{K_M} - 1}$$

Inhibición mixta:

$$K_{M\ app} = K_M \frac{1 + \frac{[I]}{K_{ia}}}{1 + \frac{[I]}{K_{ib}}} \quad V_{max\ app} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_{ib}}}$$

Inhibición no competitiva:

$$K_{M\ app} = K_M \quad V_{max\ app} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Estudios de *docking*

Se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. José Manuel Padrón (Universidad de la Laguna, España). Las interacciones de las enzimas con los compuestos se analizaron por acoplamiento computacional utilizando el software MOE (Chemical Computing Group). Las estructuras cristalográficas de AChE humano y BuChE humano se obtuvieron del Protein Data Bank (código PDB 4EY6 y 4AQD, respectivamente). Las estructuras de proteínas se redujeron energicamente al mínimo, utilizando el campo de fuerza Amber10 con parámetros EHT para moléculas pequeñas, modelo de solvatación de campo R, constante dieléctrica de 1 para el interior de la proteína y 80 para el exterior. La estructura del ligando se dibujó en el software MOE, y su energía se minimizó utilizando los parámetros anteriores utilizando como criterio de detención un gradiente RMS inferior a 0,01 kcal / mol / Å. Para los cálculos de acoplamiento: en la etapa de colocación utilizamos el algoritmo “Triangle Matcher” con el esquema de score “London dG”. En la etapa de refinamiento se mantuvo el receptor rígido y utilizamos el esquema de score GBVI / WSA dG. Se obtuvieron diagramas 2D del software MOE y se obtuvieron ilustraciones 3D utilizando el software Pymol.

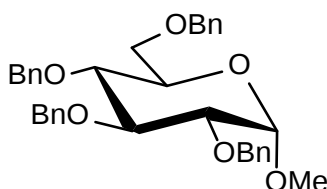
Ensayos antiproliferativos

La actividad antiproliferativa in vitro se evaluó utilizando el método de sulforodamina B (SRB), con algunas modificaciones,¹⁵⁷ en colaboración con el grupo del Dr. José Manuel Padrón (Universidad de la Laguna, España). Los compuestos puros se disolvieron en DMSO para obtener la concentración deseada. Las células se inocularon en una placa de 96 pocillos en un volumen de 100 µM cada placa a una densidad de 2500 (A549, HBL-100, HeLa y SW1573), o 5000 (T-47D y WiDr) por pocillo, en base en su momento de crecimiento. Aunado a estas células también fueron evaluadas, la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y y la línea celular de fibroblastos humanos BJ-hTERT. Las densidades de siembra celular fueron de 5,000 células / pozo para SH-SY5Y y 7,000 células / pozo para BJ-hTERT. Las células de control se expusieron a una concentración equivalente de DMSO (0,25% v / v, control negativo). Cada compuesto se evaluó por triplicado a diferentes concentraciones en un rango de 0.01 a 100 µM. Los tiempos de incubación del fármaco fueron de 48 h. La densidad óptica de cada pocillo se midió a 530 nm (primario) y 620

nm (secundario). La actividad antiproliferativa, expresada como 50% de inhibición del crecimiento (GI₅₀), se calculó de acuerdo con las fórmulas de NCI.¹⁵⁸

Síntesis de desoxinojirimicina

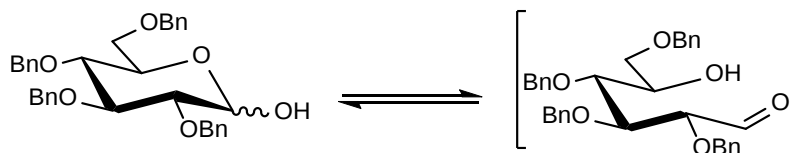
Metil 2,3,4,6-tetra-*O*-bencil- α -D-glucopiranosido (2)



A una solución enfriada a 0 °C de metil- α -D-glucopiranosido (**1**) (2.0 g, 10.3 mmol, 1.0 eq.) en DMF (20 mL) agitada durante 20 min se añade lentamente NaH (1.98 g, 82.4 mmol, 8.0 eq.), manteniéndose con agitación durante 15 min. A continuación, se adiciona lentamente bromuro de bencilo (9.8 mL, 82.4 mmol, 8.0 eq.), manteniéndose a 0 °C durante 20 min, y a t.a. durante toda la noche. La reacción se detuvo posteriormente mediante la adición de agua; el crudo se lavó con salmuera y se extrajo con AcOEt (3x50 mL); las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad a presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (ciclohexano → ciclohexano-AcOEt 9:1), obteniéndose **2** como un aceite incoloro (4.71 g, 81%).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.31-7.20 (m, 18H, H-Ph), 7.11-7.05 (m, 2H, H-Ph), 4.93 (d, $J_{1,2}$ =3.8 Hz, 1H, H-1), 4.80-4.72 (m, 3H, H-O-CH₂-Ph), 4.63-4.53 (m, 3H, H-O-CH₂-Ph), 4.43 (d, J_{gem} = 12.1 Hz, 2H, H-O-CH₂-Ph), 3.93 (t, 1H, H-3), 3.72-3.64 (m, 2H, H-6), 3.61-3.54 (m, 2H, H-4, H-5), 3.51 (dd, $J_{2,3}$ = 9.6, $J_{2,1}$ =3.6, 1H, H-2), 3.33 (s, 3H, H-7) ppm.

2,3,4,6-tetra-*O*-bencil-D-glucopiranososa (3)

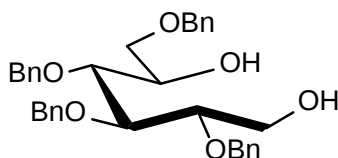


Una solución del derivado **2** (4.7 g), a 0 °C en ácido acético (16 mL) y ácido sulfúrico 1M (12 mL), se llevó a 125 °C y fue mantenida así durante 15 horas. La reacción se detuvo filtrando al vacío con agua fría la cual se dejó secar al aire, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (ciclohexano: acetato de etilo 9:1 → ciclohexano: acetato de etilo 7:3), obteniéndose **3** como un sólido blanco (3.2 g, 70%).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.23-7.15 (m, 18H, H-Ph), 7.07-7.01 (m, 2H, H-Ph), 5.14 (d, $J_{1,2}$ = 3.3 Hz, 1H, H-1), 4.89-4.36 (m, 8H, H-O-CH₂-Ph), 3.93 (dd, $J_{3,4}$ = $J_{3,2}$ = 11.3 Hz, 1H, H-3), 3.63-3.35 (m, 5H, H-2, H-4, H-6, H-5), 3.04 (s, 1H, OH) ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, CDCl₃) δ 138.8 (C-Ph), 138.3 (C-Ph), 137.9 (C-Ph), 138.0 (C-Ph), 128.6 (C-CH-Ph), 128.5 (C-CH-Ph), 128.2 (C-CH-Ph), 128.1 (C-CH-Ph), 128.1 (C-CH-Ph), 128.1 (C-CH-Ph), 128.0 (C-CH-Ph), 127.8 (C-CH-Ph), 127.8 (C-CH-Ph), 127.7 (C-CH-Ph), 91.3 (C-1), 81.8 (C-2), 80.1 (C-3), 77.9 (C-4), 62.8 (C-6), 65.6 (C-7), 75.8 (C-O-CH₂-Ph), 75.1 (C-O-CH₂-Ph), 73.5 (C-O-CH₂-Ph), 73.3 (C-O-CH₂-Ph), 70.31 (C-5), 68.7 (C-6) ppm.

2,3,4,6-tetra-*O*-bencil-D-glucitol (**4**)



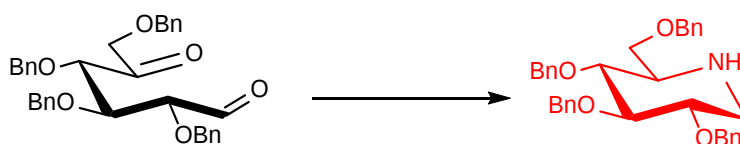
A una solución del hemiacetal **3** (1 g, 1.85 mmol) en DCM: MeOH (20:6 mL) agitada durante 20 minutos, se adicionó borohidruro de sodio (0.279 g, 7.39 mmol, 4 eq.), manteniéndose en agitación a 45 °C durante 6 horas. La reacción se detuvo mediante la adición de agua, el crudo se lavó con salmuera y agua y se extrajo con DCM (3x50 mL), las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad a presión reducida, la reacción procede de forma cuantitativa obteniendo **4** como un aceite amarillento (cuantitativo, 1 g).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.30-7.11 (m, 20H, H-Ph), 4.64 (d, J_{gem} = 11.3 Hz, 1H, H-O-CH₂-Ph), 4.89-4.36 (m, 7H, H-O-CH₂-Ph), 3.96 (s, 1H, OH), 3.82 (d, $J_{1a,2}$ = 6.3, J_{gem} = 11.7

Hz, 1H, H-1a). 3.74-3.63 (m, 3H, H-3, H-2, H-1b), 3.55 (dd, $J_{6a,5} = 5.7$, $J_{6b,5} = 4.3$ Hz, 2H, H-6), 3.52-3.45 (m, 1H, H-3), 2.90 (d, $J_{4,5} = 4.5$ Hz, 1H, H-4), 2.09 (s, 1H, OH) ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3) δ : 138.3 (C-Ph), 138.1 (C-Ph), 138.0 (C-Ph), 138.0 (C-Ph), 128.6 (C-CH-Ph), 128.5 (C-CH-Ph), 128.5 (C-CH-Ph), 128.2 (C-CH-Ph), 128.1 (C-CH-Ph), 128.0 (C-CH-Ph), 127.9 (C-CH-Ph), 127.9 (C-CH-Ph), 79.6 (C-2), 79.2 (C-3), 77.5 (C-4), 74.6 (C-O-CH₂-Ph), 73.6 (C-O-CH₂-Ph), 73.4 (C-O-CH₂-Ph), 73.2 (C-O-CH₂-Ph), 77.2 (C-5), 76.8 (C-6) ppm.

2,3,4,6-tetra-O-bencil-1-desoxinojirimicina (6)



A una solución de cloruro de oxalilo (0.34 mL, 3.93 mmol, 4.27 eq.) en DCM anhidro (2 mL), a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, se adiciono muy lentamente una disolución de DMSO (0.35 mL, 9.95 mmol, 10.8 eq.) en DCM (2 mL), la mezcla se mantuvo en agitación durante 40 minutos, posteriormente fue adicionado glucitol **4** (0.5 g, 0.92 mmol, 5.3 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación durante 2 horas a la misma temperatura, transcurrido el tiempo, se adiciono Et_3N (1.39 mL, 9.95 mmol, 10.8 eq.), se mantuvo en agitación durante 4 horas, *in situ* se realizó la aminación reductiva, para ello, una disolución de formiato de amonio (581 mg, 9.2 mmol, 10.004 eq.) sulfato de sodio anhidro, (392 mg, 2.76 mmol, 3 eq.) y cianborohidruro de sodio (2.316 g, 3.68 mmol, 4 eq.) en MeOH (9 mL), se mantuvo en agitación en baño de hielo durante media hora, y esta se adicionó al crudo de reacción de la oxidación de Swern, se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante toda la noche. La reacción fue detenida con agua, se midió el pH, observando entre 9 y 10, se llevó a sequedad y fue extraída con DCM y lavada con salmuera 3x50 mL, la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad en el rotavapor. Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 85:15), obteniendo **6** como un aceite amarillo (313 mg, 65%).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.28-7.08 (m, 20H, H-Ph), 4.89 (d, $J_{\text{gem}} = 10.9$ Hz, 1H, H-O-CH₂-Ph), 4.78 (d, $J_{\text{gem}} = 7.9$ Hz, 1H, H-O-CH₂-Ph), 4.75 (d, $J_{\text{gem}} = 7.9$ Hz, 1H, H-O-CH₂-

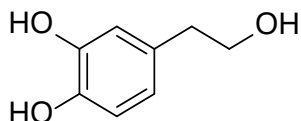
Ph) 4.63-4.53 (m, 2H, H-O-CH₂-Ph) 4.42-4.31 (m, 3H, H-O-CH₂-Ph) 3.58 (dd, $J_{\text{gem}} = 9.0, J_{6a,5} = 2.6$ Hz, 1H, H-6a). 3.50-3.36 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 3.27 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.2, J_{1e,2} = 6.2$ Hz, 1H, H_e-1), 3.15 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.3, J_{6b,5} = 4.7$ Hz, 1H, H-6b), 2.63 (ddd, $J_{5,4} = 9.6, J_{5,6a} = 6.9, J_{5,6b} = 2.6$ Hz, 1H, H-5), 2.41 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.2, J_{1a,2} = 10.1$ Hz, 1H, H_a-1), 1.91 (simple y ancha, 1H, N-H) ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, CDCl₃) δ 139.0 (C-Ph), 138.6 (C-Ph), 138.5 (C-Ph), 138.1 (C-Ph), 128.5 (C-CH-Ph), 128.5 (C-CH-Ph), 128.4 (C-CH-Ph), 128.4 (C-CH-Ph), 128.1 (C-CH-Ph), 128.0 (C-CH-Ph), 127.9 (C-CH-Ph), 127.8 (C-CH-Ph), 127.8 (C-CH-Ph), 127.6 (C-CH-Ph), 87.4 (C-3), 80.7 (C-4), 80.1 (C-2), 75.7 (C-O-CH₂-Ph), 75.3 (C-O-CH₂-Ph), 73.5 (C-O-CH₂-Ph), 72.8 (C-O-CH₂-Ph), 70.3 (C-6), 59.8 (C-5), 48.2 (C-1) ppm.

Derivados fenólicos

Formación de materias primas iniciales

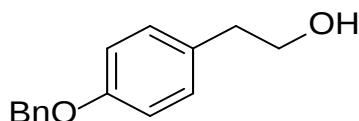
Hidroxitirosol (8)



A una solución de polvo de extracto de hoja de olivo (14 g), en agua (25 mL), se adiciono NaOH (1.28 g, 10 eq. con relación a 40% de contenido de oleuropeina), manteniendo dos horas a temperatura ambiente, la reacción fue detenida con HCl, y concentrada a sequedad a presión reducida, el crudo resultante fue disuelto en MeOH y filtrado, se concentró nuevamente, y fue purificado en columna cromatográfica (DCM: MeOH 20:1 → DCM: MeOH 10:1.5), (1.6 g, cuantitativa).

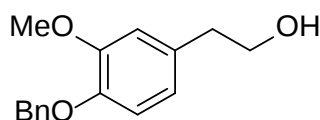
Metodología general para la bencilación de los hidroxilos fenólicos libres

2-(4'-Benciloxifenil)etanol (**11**)



A una disolución de tirosol (1.5 g, 10.86 mmol) en DMF (6 mL) fue adicionado K_2CO_3 (4.5 g, 10.85 mmol, 3 eq.), la mezcla fue agitada durante 30 minutos, a continuación, se añade lentamente BnBr (1.55 mL, 13.03 mmol, 1.2 eq.), a temperatura ambiente durante 4 horas. La reacción se paró a continuación mediante la adición de agua; el crudo se lavó con salmuera y se extrajo con AcOEt (3x50 mL); las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtró y el filtrado se concentró a sequedad a presión reducida. Columna cromatográfica (ciclohexano: AcOEt 9:1 $\rightarrow$ 8:2), obteniendo **11** como un aceite incoloro (2.1636 g, 87 %).

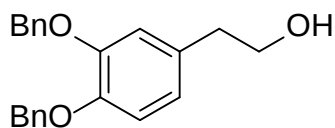
2-(4'-Benciloxi-3'-metoxifenil)etanol (**12**)



Se utilizó alcohol homovanílico (0.100 g, 0.59 mmol), en DMF (2 mL). Columna cromatográfica (ciclohexano $\rightarrow$ ciclohexano: acetato de etilo 9:1), obteniendo **12** (145.7 mg, 95%).

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) δ 7.25 (m, 5H, H-Bn), 6.66 (m, 3H, H-Ar), 5.04 (s, 2H, H- CH_2 -Bn), 3.78 (s, 3H, H-O-Me), 3.71 (t, J_{8-7} =6.5 Hz, 2H, H-8), 2.69 (t, J_{7-8} =6.5 Hz, 2H, H-7) ppm.

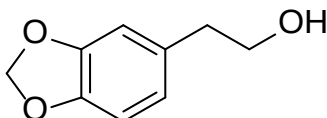
2-(3',4'-Dibenciloxifenil)etanol (**13**)



Se utilizó hidroxitirosol (1.5 g, 9.73 mmol), en DMF (8 mL). Columna cromatográfica (ciclohexano $\rightarrow$ ciclohexano: acetato de etilo 8:2), obteniendo **13** (2.41 g, 74%).

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 7.40-7.12 (m, 10H, H-Bn), 6.80-6.60 (m, 3H, H-Ar), 5.05 (s, 2H, H- $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 5.03 (s, 2H, H- $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 3.65 (t, $J_{8-7}=6.5$ Hz, 2H, H-8), 2.64 (t, $J_{7-8}=6.5$ Hz, 2H, H-7) ppm.

2-(3',4'-Metilendioxfenil)etanol (15)

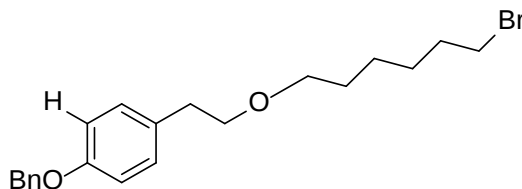


A una disolución enfriada de ácido 2-(3',4'-metilendioxfenil)etanoico, (0.5 g, 5.6 mmol) en THF (15 mL), fue adicionado cianborohidruro de sodio (0.25 g, 6.6 mmol, 2.36 eq.). A continuación, se añadió muy lentamente (1 hora) una disolución de yodo (0.7 g, 2.8 mmol, 1 eq.) en THF (5mL), manteniéndose a reflujo durante 24 horas. La reacción se paró mediante la adición de metanol a la reacción y se llevó a sequedad mediante presión reducida, al crudo se le adicionaron 7 mL de NaOH al 5% y se extrajo con diclorometano (3 x 50 mL), la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y el filtrado fue concentrado a presión reducida, columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 8:2 $\rightarrow$ 7:3). Se obtuvo **15** en forma de aceite. (cuantitativa, 450 mg).

Alquilación de la cadena sobre compuestos fenólicos

Procedimiento general para la síntesis de los compuestos fenólicos alquilados con cadena de 6

1-Benciloxi-4-{2'-[(6''-bromohexil)oxi]etil}benceno (19)



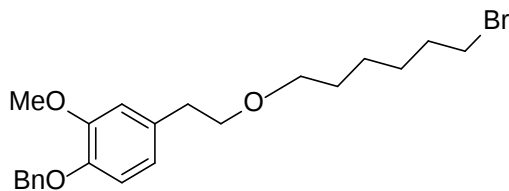
A una solución de 2-(4-Benciloxifenil)etanol (0.5 g, 2.19 mmol) (o análogos del tirosol) en DMF (5 mL), a la que fue adicionado NaH (0.525 g, 13.14 mmol, 6 eq.) agitada durante media hora en atmosfera inerte, se adiciono 1,6-dibromohexano (2.68 mL, 17.52 mmol, 8 eq.) manteniéndose en agitación durante 5 horas, la reacción fue detenida mediante la adición de agua, el crudo se lavó con salmuera y se extrajo con acetato de etilo (3x50 mL), la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se concentró a sequedad, a presión reducida, cromatografía en columna (ciclohexano: acetato de etilo) (728 mg, 85 %). *R_f*=0.69 (7:3 ciclohexano: acetate de etilo).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 7.39 (m, 5H, Ar-H Bn), 7.15 (m, 2H, Ar-H), 6.94 (m, 2H, Ar-H), 5.06 (s, 2H, CH₂Ph), 3.61 (t, 2H, *J*_{1',2'}=7.2 Hz, H-2'), 3.45 (t, 2H, *J*_{1'',2''}=6.5 Hz, H-1''), 3.41 (t, 2H, *J*_{6'',5''}=6.8 Hz, H-6''), 2.85 (t, 2H, H-1'), 1.87 (m, 2H, H-5'), 1.60 (m, 2H, H-2''), 1.42 (m, 4H, H-3'', H-4'') ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, CDCl₃) δ 157.3 (C-1), 137.2 (C-1'''), 131.4 (C-4), 129.8 (C-3, C-5), 128.5 (Ar-C Bn), 127.8 (Ar-C Bn), 127.4 (Ar-C Bn), 114.7 (C-2, C-6), 72.0 (C-1'), 70.7 (CH₂Ph), 70.0 (C-2'), 35.5 (C-1'), 33.8 (C-6''), 32.7 (C-5''), 29.5 (C-4''), 27.9 (C-2''), 25.4 (C-3'') ppm.

HRESI-MS: Calc. para C₂₁H₂₇BrNaO₂ ([M+Na]⁺) 413.1087, observada: 413.1083.

2-Benciloxi-4-{2'-[(6''-bromohexil)oxi]etil}-1-metoxibenceno (20)



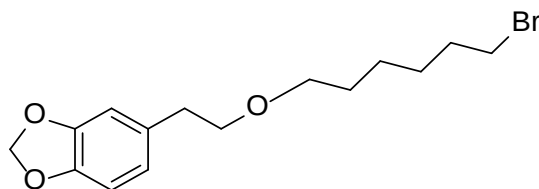
2-(4-Benciloxil-3-metoxifenil)etanol (0.566 g, 2.19 mmol) fue utilizado. El compuesto fue purificado mediante columna cromatográfica (ciclohexano → ciclohexano: acetato de etilo 95:5), obteniendo **20** (692 mg, 75%). *R_f*=0.67 (7:3 cyclohexane: acetate de etilo).

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 7.22 (m, 5H, Ar-H Bn), 6.62 (m, 3H, H-3, H-5, H-6), 5.00 (s, 2H, CH_2Ph), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.49 (t, 2H, $J_{1',2'}=7.1$ Hz, H-2'), 3.32 (t, 2H, $J_{1'',2''}=6.5$ Hz, H-1''), 3.27 (t, 2H, $J_{5',6''}=6.8$ Hz, H-6''), 2.71 (t, 2H, H-1'), 1.73 (m, 2H, H-5'), 1.47 (m, 2H, H-2''), 1.28 (m, 4H, H-3'', H-4'') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3) δ 149.6 (C-2), 146.7 (C-1), 137.5 (Ar- C_{ipso} Bn), 132.5 (C-4), 128.6 (Ar- C_m Bn), 127.8 (Ar- C_p Bn), 127.3 (Ar- C_o Bn), 120.9 (C-5), 114.3, 113.0 (C-3, C-6), 72.0 (C-2'), 71.2 (C-1''), 70.9 (CH_2Ph), 56.1 (OMe), 36.0 (C-1'), 34.0 (C-6''), 32.8 (C-5''), 29.6, 28.0, 25.5 (C-2'', C-3'', C-4'') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{BrNaO}_3$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 443.1192, observada: 443.1188.

4-{2'-[(6''-Bromohexil)oxi]etil}-1,2-(metilendioxi)benceno (21)



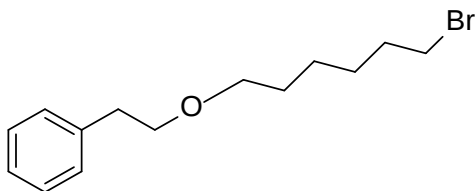
2-(3',4'-metilendioxi)fenil)etanol (0.264 g, 2.19 mmol) fue utilizado. El compuesto fue purificado mediante columna cromatográfica (ciclohexano $\rightarrow$ ciclohexano: acetato de etilo 98:2), obteniendo **21** (721 mg, cuantitativo). R_f = 0.64 (7:3 ciclohexano: acetate de etilo).

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 6.62 (m, 3H, H-3, H-5, H-6), 5.84 (s, 2H, OCH_2O), 3.49 (t, 2H, $J_{1',2'}=7.1$ Hz, H-2'), 3.37–3.29 (m, 4H, H-1'', H-6''), 2.71 (t, 2H, H-1'), 1.77 (m, 2H, H-5'), 1.50 (m, 2H, H-2''), 1.30 (m, 4H, H-3'', H-4'') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3) δ 147.6 (C-2), 146.0 (C-1), 133.0 (C-4), 121.8 (C-5), 109.5 (C-3), 108.2 (C-6), 100.9 (OCH_2O), 72.0 (C-1''), 70.8 (C-2'), 36.1 (C-1'), 33.9 (C-6''), 32.8 (C-5''), 29.6 (C-4''), 28.1 (C-2''), 25.5 (C-3'') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{BrNaO}_3$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 351.0566, observada: 351.0563.

4-(2-((6-Bromohexil)oxi)etil)-benceno (22)



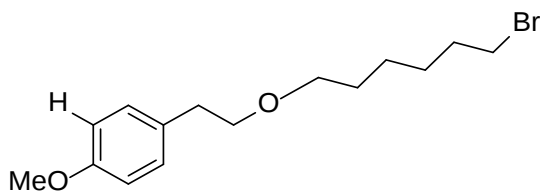
2-fenil-etanol (0.268 g, 2.19 mmol) fue utilizado. El compuesto fue purificado mediante columna cromatográfica (ciclohexano → ciclohexano: acetato de etilo 98:2), obteniendo **22** (625 mg, cuantitativo). R_f = 0.71 (7:3 ciclohexano: acetato de etilo).

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 7.19 (m, 5H, Ar-H), 3.57 (t, 2H, $J_{1',2'}=7.2$ Hz, H-2'), 3.38 (t, 2H, $J_{1'',2''}=6.5$ Hz, H-1''), 3.32 (t, 2H, $J_{5'',6''}=6.8$ Hz, H-6''), 2.84 (t, 2H, H-1'), 1.79 (m, 2H, H-5'), 1.53 (m, 2H, H-2''), 1.34 (m, 4H, H-3'', H-4'') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3) δ 139.1 (Ar-Cipso), 128.9 (Ar-Cm), 128.3 (Ar-Co), 126.1 (Ar-Cp), 71.8 (C-1'), 70.7 (C-2'), 36.4 (C-1'), 33.8 (C-6''), 32.7 (C-5''), 29.5 (C-4''), 27.9 (C-2''), 25.4 (C-3'') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{BrNaO}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 307.0668, observada: 307.0668.

4-{2'-[(6''-Bromohexil)oxi]etil}-1-metoxibenceno (23)



(4-metoxifenil)etanol (0.333 g, 2.19 mmol) fue utilizado. El compuesto fue purificado mediante columna cromatográfica (hexano → ciclohexano: acetato de etilo 98:2), obteniendo **23** (653 mg, 94%); R_f = 0.65 (7:3 cyclohexane: acetate de etilo).

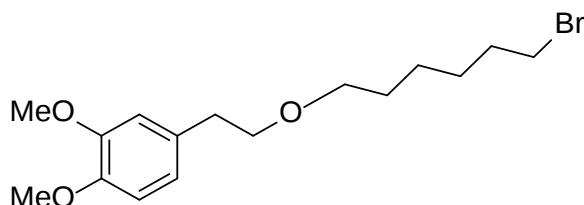
RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 7.14 (m, 2H, Ar-Ho), 6.84 (m, 2H, Ar-Hm), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.59 (t, 2H $J_{1',2'}=7.2$ Hz, H-2'), 3.43 (t, 2H, $J_{1'',2''}=6.5$ Hz, H-1''), 3.40 (t 2H,

$J_{5'',6''}=6.8\text{Hz}$, H-6''), 2.83 (t, 2H, H-1'), 1.85 (m, 2H, H-5''), 1.59 (m, 2H, H-2''), 1.41 (m, 4H, H-3'', H-4'') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3) δ 158.1 (C-4), 131.2 (C-1), 129.8 (C-2, C-6), 113.8 (C-3, C-5), 72.1 (C-1'), 70.8 (C-2'), 55.3 (OMe), 35.5 (C-1'), 33.9 (C-6''), 32.8 (C-5''), 29.6 (C-4''), 28.0 (C-2''), 25.4 (C-3'') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{BrNaO}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 337.0774, observada: 337.0773.

5-{2'-[(6''-Bromohexil)oxi]etil}-1,2-dimetoxibenceno (24)



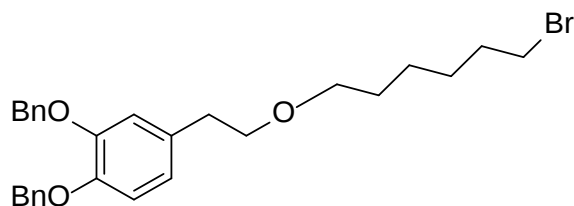
2-(3,4-dimetoxifenil)etanol (0.4 g, 2.19 mmol) fue utilizado. El compuesto fue purificado mediante columna cromatográfica (ciclohexano $\rightarrow$ ciclohexano: acetato de etilo 95:5), obteniendo **24** (552 mg, 73%); $R_f=0.59$ (7:3 ciclohexano: acetato de etilo).

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 6.75 (m, 3H, H-3, H-5, H-6), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.84 (s, 3H, OMe), 3.59 (t, 2H, $J_{1',2'}=7.2$ Hz, H-2'), 3.42 (t, 2H, $J_{1'',2''}=6.5$ Hz, H-1''), 3.38 (t, 2H, $J_{5'',6''}=6.8$ Hz, H-6''), 2.81 (t, 2H, $J_{1',2'}=7.2$ Hz, H-1'), 1.84 (m, 2H, H-5''), 1.57 (m, 2H, H-2''), 1.39 (m, 4H, H-3'', H-4'') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3) δ 148.8, 147.5 (C-1, C-2), 131.8 (C-4), 120.8 (C-5), 112.4 (C-3), 111.2 (C-6), 72.0 (C-1'), 70.8 (C-2'), 56.0 (OMe), 55.9 (OMe), 36.0 (C-1'), 33.9 (C-6''), 32.8 (C-5''), 29.6 (C-4''), 28.0 (C-2''), 25.4 (C-3'') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{BrNaO}_3$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 367.0879, observada: 367.0876.

1,2-Dibenciloxi-4-{2'-[(6''-bromohexil)oxi]etil}benceno (25)



2-(3',4'-Dibenciloxi)etanol (732 mg, 2.19 mmol) fue utilizado. El compuesto fue purificado mediante columna cromatográfica (ciclohexano → ciclohexano: acetato de etilo 98:2, 95:5, 9:1, 8:2), obteniendo **25** (135 mg, 12%). R_f =0.68 (7:3 ciclohexano: acetate de etilo).

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 7.36–7.09 (m, 10H, Ar-H Bn), 6.77-6.74 (m, 2H, H-5, H-6), 6.62 (m, 1H, H-3), 5.03 (s, 2H, CH_2Ph), 5.01 (s, 2H, CH_2Ph), 3.45 (t, 2H, $J_{1',2'}=7.2$ Hz, H-2'), 3.32–3.24 (m, 4H, H-1'', H-6''), 2.67 (t, 2H, H-1'), 1.72 (m, 2H, H-5''), 1.45 (m, 2H, H-2''), 1.38–1.15 (m, 4H, H-3', H-4'') ppm.

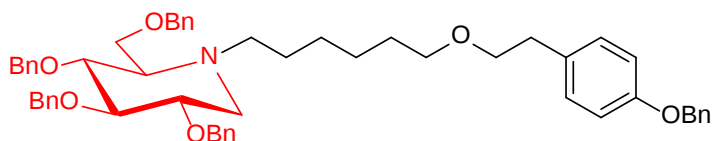
RMN ^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3) δ 148.9 (C-2), 147.5 (C-1), 137.6 (C-1'''), 137.4 (C-1'''), 132.7 (C-4), 128.5 (Ar-C Bn), 127.8 (Ar-C Bn), 127.7 (Ar-C Bn), 127.4 (Ar-C Bn), 127.3 (Ar-C Bn), 121.8 (C-5), 116.2 (C-3), 115.3 (C-6), 71.9 (C-2'), 71.5 (CH_2Ph), 71.4 (CH_2Ph), 70.8 (C-2'), 35.9 (C-1'), 33.9 (C-6''), 32.8 (C-5''), 29.5 (C-4''), 28.0 (C-2''), 25.4 (C-3'') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{BrNaO}_3$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 519.1505, observada: 519.1501.

Alquilación del iminoazúcar bencilado

Procedimiento general para la obtención de derivados fenólicos de desoxinojirimicina bencilada

2,3,4,6-Tetra-O-bencil-N-{6'-[(2''-p-benciloxifenil)etoxi]hexil}-1-desoxinojirimicina (**26**)



A una disolución de per-O-bencil-1-desoxinojirimicina (**6**) (0.250 g, 0.48 mmol) en DMF (5 mL) fue adicionado K_2CO_3 (0.199 g, 1.44 mmol, 3 eq.), y 1-(benciloxi)-4-{2-[(6-bromohehexil)oxi]etil}benceno (**19**) (0.466 g, 1.19 mmol, 2.5 eq.) o derivados O-alkilados, agitada durante 15 horas a 85°C, la reacción fue detenida mediante la adición de agua, el crudo fue lavado con salmuera y extraído con acetato de etilo (3x50 mL), la fase orgánica fue secada con Na_2SO_4 y evaporada a presión reducida, el residuo fue purificado en columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 85:15). Se obtuvo **26** (180 mg, 45%). $R_f=0.47$ (7:3 ciclohexano: acetato de etilo); $[\alpha]_D^{25} +5$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

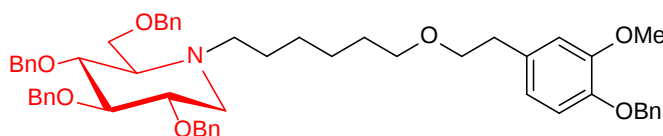
RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) δ 7.27 (m, 23H, Ar-H Bn), 7.08 (m, 4H, Ar-H), 6.84 (m, 2H, Ar-H), 4.97 (s, 2H, CH_2Ph), 4.82 (m, 3H, CH_2Ph), 4.61 (m, 2H, CH_2Ph), 4.39 (m, 3H, CH_2Ph), 3.65–3.56 (m, 2H, H-2, H-4), 3.56 (m, 1H, H-6b), 3.55–3.48 (m, 4H, H-6', H-1''), 3.45 (m, 1H, H-6a), 3.38-3.31 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.03 (dd, 1H, $J_{1a,1b}=11.1$ Hz, $J_{1a,2}=4.8$ Hz, H-1a), 2.77 (t, 2H, $J_{1'',2''}=7.3$ Hz, H-2''), 2.56 (m, 2H, H-1'), 2.26 (t, 1H, $J_{4,5}=J_{5,6}=10.8$ Hz, H-5), 2.16 (brd, 1H, $J_{1a,1b}=9.4$ Hz, H-1b), 1.47 (m, 2H, H-5'), 1.20 (m, 6H, H-2', H-3', H-4') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ 157.4 (C-4'''), 139.2 (Ar- C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar- C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar- C_{ipso} Bn), 137.9 (Ar- C_{ipso} Bn), 137.3 (Ar- C_{ipso} Bn), 131.5 (C-1'''), 129.9 (C-2''', C-6'''), 128.7 (Ar-C Bn), 128.5 (Ar-C Bn), 128.5 (Ar-C Bn), 128.4 (Ar-C Bn), 128.4 (Ar-C Bn), 128.0 (Ar-C Bn), 128.0 (Ar-C Bn), 128.0 (Ar-C Bn), 127.7 (Ar-C Bn), 127.6 (Ar-C Bn), 127.5 (Ar-C Bn), 127.5 (Ar-C Bn), 114.9 (C-3''', C-5'''), 87.5 (C-3), 78.7 (C-4), 78.7 (C-

2), 75.4 (CH₂Ph), 75.3 (CH₂Ph), 73.5 (CH₂Ph), 72.8 (CH₂Ph), 72.2 (C-6'), 71.0 (C-1'), 70.1 (CH₂Ph), 65.4 (C-6), 63.8 (C-5), 54.6 (C-1), 52.5 (C-1'), 35.6 (C-2'), 29.8 (C-5'), 27.5 (C-2'), 26.2 (C-3'), 23.7 (C-4') ppm.

HRESI-MS: Calc. para C₅₅H₆₄NO₆ ([M+H]⁺) 834.4728, observada: 834.4720.

2,3,4,6-Tetra-O-bencil- N-{6'-[(2''-(4'''-benciloxi-3'''-metoxi)fenil)etoxi]hexil}-1-desoxinojirimicina (27)



Se usó 1-(benciloxi)-4-{2-[(6-bromohexil)oxi]etil}-2-metoxibenceno (**20**) (503 mg, 1.19 mmol). Columna cromatográfica (hexano: acetato de etilo 9:1), obteniendo **27** (278 mg, 67%). R_f =0.51 (7:3 ciclohexano: acetato de etilo); $[\alpha]_D^{25}$ -2 (c 0.77, CH₂Cl₂).

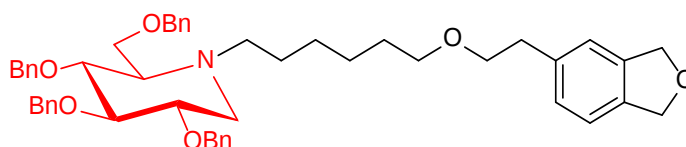
RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 7.23 (m, 25H, Ar-H Bn), 6.69 (m, 3H, H-2''', H-5''', H-6'''), 5.05 (s, 2H, CH₂Ph), 4.83 (m, 3H, CH₂Ph), 4.61 (m, 2H, CH₂Ph), 4.40 (m, 3H, CH₂Ph), 3.81 (s, 3H, OMe), 3.65–3.57 (m, 2H, H-2, H-4), 3.56–3.46 (m, 4H, H-6', H-1'), 3.42 (m, 1H, H-6a), 3.39–3.31 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.04 (dd, 1H, $J_{1a,1b}$ =11.1 Hz, $J_{1a,2}$ =4.8 Hz, H-1a), 2.77 (t, 2H, $J_{1'',2''}$ =7.2 Hz, H-2'), 2.55 (m, 2H, H-1'), 2.23 (brd, 1H, $J_{1a,1b}$ = 9.6 Hz, H-1b), 2.17 (t, 1H, $J_{4,5}$ =10.7 Hz, H-5), 1.48 (m, 2H, H-5'), 1.33–1.02 (m, 6H, H-2', H-3', H-4') ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, CDCl₃) δ 149.6 (C-3'''), 146.7 (C-4'''), 139.1 (Ar-C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar-C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar-C_{ipso} Bn), 137.9 (Ar-C_{ipso} Bn), 137.5 (Ar-C_{ipso} Bn), 132.4 (C-1'''), 128.6 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.8 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 127.3 (Ar-C), 120.8 (C-6'''), 114.3 (C-5'''), 113.0 (C-2'''), 87.5 (C-3), 78.7 (C-4), 78.6 (C-2), 75.4 (CH₂Ph), 75.2 (CH₂Ph), 73.5 (CH₂Ph), 72.8 (CH₂Ph), 72.1 (C-6'), 71.3 (C-1'), 71.1 (CH₂Ph), 65.4 (C-6),

63.8 (C-5), 56.1 (OMe), 54.6 (C-1), 52.4 (C-1'), 36.1 (C-2''), 29.8 (C-5'), 27.5 (C-2'), 26.2 (C-3'), 23.7 (C-4') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $C_{56}H_{66}NO_7$ ($[M+H]^+$) 864.4834, observada: 864.4826.

2,3,4,6-Tetra-O-bencil-N-{6'-[(2''-(3''',4'''-metilendioxi)fenil)etoxi]hexil}-1-desoxinojirimicina (28)



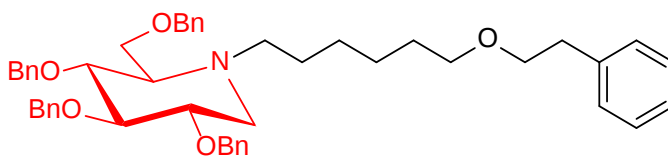
Se usó 5-{2-[(6-bromohexil)oxi]etil}benzo[d][1,3]dioxol (**21**) (390 mg, 1.19 mmol). Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 9:1 → 85:15), obteniendo **28** (184 mg, 50%). R_f =0.54 (7:3 ciclohexano: acetato de etilo); $[\alpha]_D^{25} +3$ (c 1.36, CH_2Cl_2).

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) δ 7.16 (m, 18H, Ar-H Bn), 6.61 (m, 5H, Ar-H Bn, H-2''', H-5''', H-6'''), 5.80 (s, 2H, OCH_2O), 4.82 (m, 3H, CH_2Ph), 4.59 (m, 2H, CH_2Ph), 4.37 (m, 3H, CH_2Ph), 3.63–3.53 (m, 2H, H-2, H-4), 3.53–3.41 (m, 4H, H-6', H-1''), 3.38 (m, 1H, H-6a), 3.35–3.28 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.03 (dd, 1H, $J_{1a,1b}=11.1$ Hz, $J_{1a,2}=4.8$ Hz, H-1a), 2.71 (t, 2H, $J_{1'',2''}=7.1$ Hz, H-2''), 2.52 (m, 2H, H-1'), 2.22 (brd, 1H, $J_{1a,1b}=9.3$ Hz, H-1b), 2.14 (t, 1H, $J_{4,5}=10.8$ Hz, H-5), 1.44 (m, 2H, H-5'), 1.34–1.00 (m, 6H, H-2', H-3', H-4') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ 147.6 (C-4'''), 146.0 (C-3'''), 139.1 (Ar- C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar- C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar- C_{ipso} Bn), 137.9 (Ar- C_{ipso} Bn), 133.0 (C-1'''), 128.5 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 121.7 (C-6'''), 109.4 (C-5'''), 108.2 (C-2'''), 100.8 (OCH_2O), 87.5 (C-3), 78.7 (C-4), 78.6 (C-2), 75.4 (CH_2Ph), 75.2 (CH_2Ph), 73.5 (CH_2Ph), 72.8 (CH_2Ph), 72.0 (C-6'), 71.0 (C-1''), 65.4 (C-6), 63.8 (C-5), 54.5 (C-1), 52.4 (C-1'), 36.1 (C-2''), 29.8 (C-5'), 27.4 (C-2'), 26.2 (C-3'), 23.7 (C-4') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $C_{49}H_{58}NO_7$ ($[M+H]^+$) 772.4208, observada: 772.4199.

2,3,4,6-Tetra-O-bencil-N-{6'-[(2''-fenil)etoxi]hexil}-1-desoxinojirimicina (29)



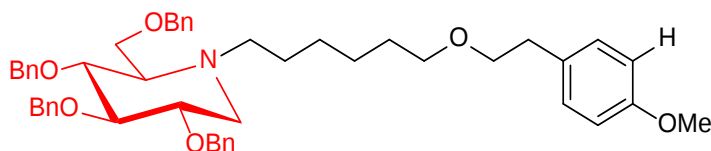
Se usó {2-[(6-bromohexil)oxi]etil}benceno (**22**) (339 mg, 1.19 mmol). Columna cromatográfica (hexano: acetato de etilo 9:1 → 85:15), obteniendo **29** (195 mg, 56%). R_f = 0.60 (7:3 ciclohexano: acetato de etilo); $[\alpha]_D^{25} +5$ (c 1.16, CH_2Cl_2).

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) δ 7.33–7.09 (m, 25H, Ar-H), 4.86 (m, 3H, CH_2Ph), 4.65 (m, 2H, CH_2Ph), 4.43 (m, 3H, CH_2Ph), 3.69–3.61 (m, 2H, H-2, H-4), 3.61–3.47 (m, 4H, H-6', H-1''), 3.44 (m, 1H, H-6a), 3.41–3.35 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.06 (dd, 1H, $J_{1a,1b}=11.1$ Hz, $J_{1a,2}=4.9$ Hz, H-1a), 2.87 (t, 2H, $J_{1'',2''}=7.3$ Hz, H-2''), 2.59 (m, 2H, H-1'), 2.26 (brd, 1H, $J_{1a,1b}=9.5$ Hz, H-1b), 2.20 (t, 1H, $J_{4,5}=J_{5,6}=10.8$ Hz, H-5), 1.52 (m, 2H, H-5'), 1.36–1.05 (m, 6H, H-2', H-3', H-4') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ 139.2 (C-1'''), 138.7 (Ar- C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar- C_{ipso} Bn), 137.9 (Ar- C_{ipso} Bn), 129.0 (x5) (Ar-C), 128.5 (Ar-C Bn), 128.5 (Ar-C Bn), 128.4 (Ar-C Bn), 128.4 (Ar-C Bn), 128.0 (Ar-C Bn), 128.0 (Ar-C Bn), 127.7 (Ar-C Bn), 127.6 (Ar-C Bn), 127.5 (Ar-C Bn), 126.2 (Ar-C Bn), 87.5 (C-3), 78.7 (C-4), 78.7 (C-2), 75.4 (CH_2Ph), 75.3 (CH_2Ph), 73.5 (CH_2Ph), 72.8 (CH_2Ph), 71.9 (C-6'), 71.0 (C-1'), 65.4 (C-6), 63.8 (C-5), 54.6 (C-1), 52.4 (C-1'), 36.5 (C-2'), 29.8 (C-5'), 27.5 (C-2'), 26.2 (C-3'), 23.7 (C-4') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $C_{48}H_{58}NO_5$ ($[M+H]^+$) 728.4310, observada: 728.4299.

2,3,4,6-Tetra-O-bencil-N-{6'-[(2''-p-metoxifenil)etoxi]hexil}-1-desoxinojirimicina (30)



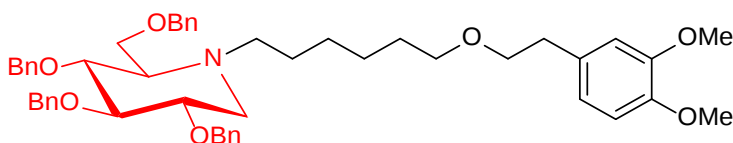
Se usó 1-{2-[(6-bromohexil)oxi]etil}-4-metoxibenceno (**23**) (394 mg, 1.19 mmol). Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 9:1 → 95:15), obteniendo **30** (167 mg, 46%). $R_f=0.53$ (7:3 ciclohexano: acetato de etilo); $[\alpha]_D^{25} +8$ (c 1.07, CH₂Cl₂).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 7.22 (m, 18H, Ar-H Bn), 7.08 (m, 4H, Ar-H), 6.77 (m, 2H, Ar-H), 4.85 (m, 3H, CH₂Ph), 4.61 (m, 2H, CH₂Ph), 4.39 (m, 3H, CH₂Ph), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.65–3.57 (m, 2H, H-2, H-3), 3.56–3.48 (m, 4H, H-6', H-1''), 3.43 (m, 1H, H-6a), 3.38–3.30 (m, 2H, H-4, H-6b), 3.03 (dd, 1H, $J_{1a,1b}=11.1$ Hz, $J_{1a,2}=4.8$ Hz, H-1a), 2.70 (t, 2H, $J_{1'',2''}=7.3$ Hz, H-2''), 2.56 (m, 2H, H-1'), 2.24 (brd, 1H, $J_{1a,1b}=9.5$ Hz, H-1b), 2.17 (t, 1H, $J_{4,5}=J_{5,6}=10.8$ Hz, H-5), 1.48 (m, 2H, H-5'), 1.41–1.03 (m, 6H, H-2', H-3', H-4') ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, CDCl₃) δ 158.1 (C-4'''), 139.1 (Ar-C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar-C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar-C_{ipso} Bn), 137.9 (Ar-C_{ipso} Bn), 131.2 (C-1'''), 129.9 (C-2''', C-6'''), 128.5 (Ar-C Bn), 128.4 (Ar-C Bn), 128.4 (Ar-C Bn), 128.4 (Ar-C Bn), 127.9 (Ar-C Bn), 127.9 (Ar-C Bn), 127.7 (Ar-C Bn), 127.6 (Ar-C Bn), 127.5 (Ar-C Bn), 113.8 (C-3''', C-5'''), 87.5 (C-3), 78.7 (C-4), 78.6 (C-2), 75.4 (CH₂Ph), 75.2 (CH₂Ph), 73.5 (CH₂Ph), 72.8 (CH₂Ph), 72.2 (C-6'), 71.0 (C-1'), 65.4 (C-6), 63.8 (C-5), 55.3 (OMe), 54.5 (C-1), 52.4 (C-1'), 35.5 (C-2'), 29.8 (C-5'), 27.4 (C-2'), 26.2 (C-3'), 23.7 (C-4') ppm.

HRESI-MS: Calc. para C₄₉H₆₀NO₆ ([M+H]⁺) 758.4415, observada: 758.4406.

2,3,4,6-Tetra-O-bencil-N-{6'-[(2''-(3''',4'''-dimetoxi)fenil)etoxi]hexil}-1-desoxinojirimicina (31)



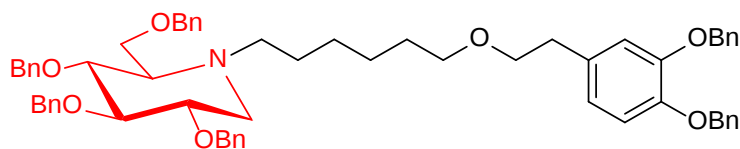
Se usó 4-{2-[(6-bromohexil)oxi]etil}-1,2-dimetoxibenceno (**24**) (0.411 g, 1.19 mmol). Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 9:1 → 95:15), obteniendo **31** (257 mg, 68%). $R_f=0.31$ (7:3 ciclohexano: acetato de etilo); $[\alpha]_D^{25} +5$ (c 1.04, CH₂Cl₂).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 7.18 (m, 21H, Ar-H), 6.71 (m, 2H, Ar-H), 4.83 (m, 3H, H-CH₂Ph), 4.61 (m, 2H, H-CH₂Ph), 4.39 (m, 3H, H-CH₂Ph), 3.80 (s, 3H, H-OMe), 3.78 (s, 3H, H-OMe), 3.66–3.58 (m, 2H, H-2, H-4), 3.58–3.45 (m, 4H, H-6', H-1''), 3.40 (m, 1H, H-6a), 3.38–3.32 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.03 (dd, 1H, $J_{1a,1b}=11.1$ Hz, $J_{1a,2}=4.8$ Hz, H-1a), 2.78 (t, 2H, $J_{1'',2''}=7.3$ Hz, H-2''), 2.55 (m, 2H, H-1'), 2.23 (brd, 1H, $J_{1a,1b}=9.3$ Hz, H-1b), 2.17 (t, 1H, $J_{4,5}=10.8$ Hz, H-5), 1.50 (m, 2H, H-5'), 1.22 (m, 6H, H-2', H-3', H-4') ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, CDCl₃) δ 148.8 (C-4'''), 147.5 (C-3'''), 139.1 (Ar-C_{ipso} Bn), 138.6 (Ar-C_{ipso} Bn), 138.6 (Ar-C_{ipso} Bn), 137.9 (Ar-C_{ipso} Bn), 131.8 (C-1'''), 128.5 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 120.8 (C-6'''), 112.3 (C-2'''), 111.3 (C-5'''), 87.4 (C-3), 78.7 (C-4), 78.6 (C-2), 75.3 (CH₂Ph), 75.2 (CH₂Ph), 73.5 (CH₂Ph), 72.8 (C-6'), 72.1 (C-1''), 71.0 (CH₂Ph), 65.4 (C-6), 63.8 (C-5), 56.0 (C-O-Me), 55.9 (C-O-Me), 54.5 (C-1), 52.4 (C-1'), 36.0 (C-2'), 29.8 (C-5'), 27.4 (C-2'), 26.2 (C-3'), 23.7 (C-4') ppm.

HRESI-MS: Calc. para C₅₀H₆₂NO₇ ([M+H]⁺) 788.4521, observada: 788.4514.

2,3,4,6-Tetra-O-bencil-N-{6'-[(2''-(3''',4'''-dibenciloxi)fenil)etoxi]hexil}-1-desoxinojirimicina (32)



Se usó **25** (592 mg, 1.19 mmol). Columna cromatográfica (hexano: acetato de etilo 9:1 → 85:15), obteniendo **32** (226 mg, 50%). $R_f=0.50$ (7:3 ciclohexano: acetato de etilo); $[\alpha]_D^{25} +4$ (c 0.96, CH₂Cl₂).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 7.23 (m, 30H, Ar-H Bn), 6.76 (m, 2H, H-5''', H-6'''), 6.66 (m, 1H, H-2'''), 5.05 (s, 2H, CH₂Ph), 5.03 (s, 2H, CH₂Ph) 4.81 (m, 3H, CH₂Ph), 4.57 (m, 2H, CH₂Ph), 4.35 (m, 3H, CH₂Ph), 3.61–3.53 (m, 2H, H-2, H-4), 3.51–3.42 (m, 4H, H-6', H-1'), 3.37 (m, 1H, H-6a), 3.34–3.28 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.00 (dd, 1H, $J_{1a,1b}=11.1$ Hz, $J_{1a,2}=4.8$ Hz, H-1a), 2.70 (t, 2H, $J_{1'',2''}=7.3$ Hz, H-2'), 2.53 (m, 2H, H-1'), 2.20 (brd, 1H, $J_{1a,1b}=9.5$ Hz, H-1b), 2.12 (t, 1H, $J_{4,5}=10.8$ Hz, H-5), 1.45 (m, 2H, H-5'), 1.17 (m, 6H, H-2', H-3', H-4') ppm.

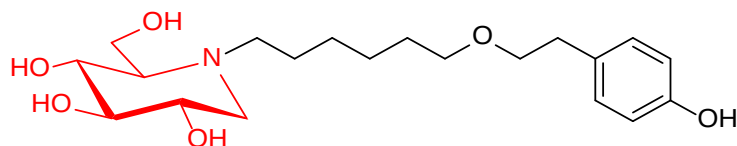
RMN ¹³C (75.5 MHz, CDCl₃) δ 149.0 (C-4'''), 147.6 (C-3'''), 139.1 (Ar-C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar-C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar-C_{ipso} Bn), 137.9 (Ar-C_{ipso} Bn), 137.6 (Ar-C_{ipso} Bn), 137.5 (Ar-C_{ipso} Bn), 132.7 (C-1'''), 128.5 (Ar-C Bn), 128.5 (Ar-C Bn), 128.4 (Ar-C Bn), 128.4 (Ar-C Bn), 128.0 (Ar-C Bn), 127.9 (Ar-C Bn), 127.9 (Ar-C Bn), 127.8 (Ar-C Bn), 127.7 (Ar-C Bn), 127.6 (Ar-C Bn), 127.5 (Ar-C Bn), 127.5 (Ar-C Bn), 127.4 (Ar-C Bn), 121.8 (C-6'''), 116.2 (C-2'''), 115.4 (C-5'''), 87.5 (C-3), 78.7 (C-4), 78.7 (C-2), 75.4 (CH₂Ph), 75.3 (CH₂Ph), 73.5 (CH₂Ph), 72.8 (CH₂Ph), 72.0 (C-6'), 71.6 (CH₂Ph), 71.5 (CH₂Ph), 71.1 (C-1'), 65.4 (C-6), 63.8 (C-5), 54.6 (C-1), 52.4 (C-1'), 36.0 (C-2'), 29.8 (C-5'), 27.5 (C-2'), 26.2 (C-3'), 23.7 (C-4') ppm.

HRSESI-MS: Calc. para C₆₂H₇₀NO₇ [M+H]⁺ 940.5147, observada: 940.5138.

Desprotección de grupos hidroxilo

Metodología general para la desprotección de los hidroxilos bencilados

N-{6'-[(2''-*p*-Hidroxifenil)etoxi]hexil}-1-desoxinojirimicina (**33**)



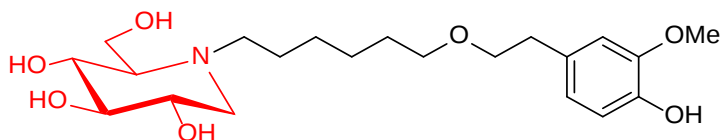
A una disolución del producto bencilado (**26**) (167 mg, 0.20 mmol) en una mezcla DCM: MeOH 1:1 (6 mL), fue adicionado ácido acético (0.4 mL) bajo atmosfera de nitrógeno, posteriormente se adiciono Pd(OH)₂/C, (150 mg, 0.859 mmol, 4.36 eq.) purgando nuevamente con nitrógeno, a continuación, se purgo con H₂ dejando la reacción con un flujo de H₂ durante 24 horas. La reacción fue detenida mediante filtración sobre celita con MeOH y evaporada a presión reducida. Columna cromatográfica (CH₂Cl₂: MeOH: Et₃N, 190:10:1→140:60:1), obteniendo **33** como un aceite incoloro. (cuantitativo, 77 mg). *R*_f=0.42 (5:2 CH₂Cl₂–MeOH); [α]_D²⁵ –6 (c 1.27, MeOH).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 7.03 (m, 2H, Ar-Ho), 6.70 (m, 1H, Ar-Hm), 3.90 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.57 (t, 1H, *J*_{1'',2''}= 7.0 Hz, H-1''), 3.59–3.51 (m, 1H, H-2), 3.43 (t 1H, *J*_{5',6'}= 6.3 Hz, H-6'), 3.46–3.41 (m, 1H, H-4), 3.21 (t, 1H, *J*_{2,3}= *J*_{3,4}= 9.1 Hz, H-3), 3.12 (dd, 1H, *J*_{1a,2}= 5.0 Hz, *J*_{1a,1b}= 11.3 Hz, H-1a), 2.99–2.89 (m, 1H, H-1'a), 2.74 (t, 1H, H-2''), 2.82–2.69 (m, 1H, H-1'b), 2.45–2.37 (m, 2H, H-1b, H-5), 1.60–1.43 (m, 4H, H-4', H-5'), 1.41–1.27 (m, 4H, H-2', H-3') ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, CD₃OD) δ 156.9 (C-4'''), 131.3 (C-1'''), 131.0 (C-2''', C-6'''), 116.2 (C-3''', C-5'''), 80.3 (C-3), 73.4 (C-6'), 71.9 (C-1'), 71.6 (C-4), 70.4 (C-2), 67.5 (C-5), 58.9 (C-6), 57.3 (C-1), 53.8 (C-1'), 36.5 (C-2'), 30.7 (C-5'), 28.4 (C-2'), 27.2 (C-4'), 25.2 (C-3') ppm.

HRESI-MS: Calc. para C₂₀H₃₄NO₆ ([M+H]⁺) 384.2381, observada: 384.2386.

N-{6'-[2''-(4'''-Hidroxi-3'''-metoxi)fenil]etoxi]hexil}-1-desoxinojirimicina (34)



Compuesto bencilado (**27**) (173 mg, 0.20 mmol) fue hidrogenado. Obteniendo **34** (75 mg, 91%). $R_f=0.56$ (5:2 CH_2Cl_2 -MeOH); $[\alpha]_D^{25}-9$ (c 0.87, MeOH).

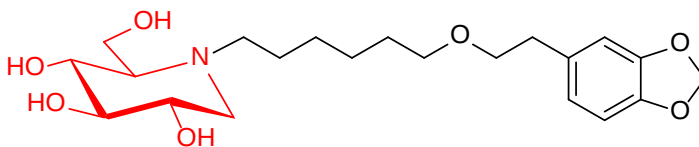
RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ 6.80 (d, 1H, $J_{2''',6'''}=1.6$ Hz, H-2'''), 6.71 (d, 1H, $J_{5''',6'''}=8.0$ Hz, H-5'''), 6.64 (dd, 1H, H-6'''), 3.86 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.83 (s, 3H, H-OMe), 3.60 (t, 2H, $J_{1'',2''}=6.9$ Hz, H-1''), 3.50 (m, 1H, H-2), 3.44 (t, 2H, $J_{5',6'}=6.4$ Hz, H-6'), 3.38 (m, 1H, H-4), 3.16 (t, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}=9.2$ Hz, H-3), 3.03 (dd, 1H, $J_{1a,2}=4.8$ Hz, $J_{1a,1b}=11.2$ Hz, H-1a), 2.84 (m, 1H, H-1'a), 2.76 (t, 2H, H-2''), 2.61 (m, 1H, H-1'b), 2.25 (t, 1H, $J_{1b,2}=10.9$ Hz, H-1b), 2.20 (dt, 1H, $J_{4,5}=8.4$ Hz, $J_{5,6a}=J_{5,6b}=2.6$ Hz, H-5), 1.60–1.44 (m, 4H, H-4', H-5'), 1.40–1.31 (m, 4H, H-2', H-3') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CD_3OD) δ 148.7 (C-3'''), 145.8 (C-4'''), 132.0 (C-1'''), 122.3 (C-6'''), 116.1 (C-5'''), 113.7 (C-2'''), 80.4 (C-3), 73.2 (C-6'), 71.8 (C-1''), 70.5 (C-4), 67.3 (C-2), 60.1 (C-5), 59.1 (C-6), 57.5 (C-1), 56.4 (C-OMe), 53.7 (C-1'), 36.8 (C-2'), 30.6 (C-5'), 28.3 (C-2'), 27.2 (C-4'), 25.1 (C-3') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{NO}_7$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 414.2486, observada: 414.2491.

N-{6'-[2''-(3''',4'''-Metilendioxi)fenil]etoxi]hexil}-1-desoxinojirimicina

(35)



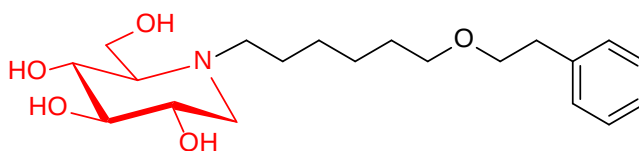
Compuesto bencilado **28** (154 mg, 0.20 mmol) fue hidrogenado. Obteniendo **35** (38 mg, 46%). $R_f=0.70$ (5:2 CH₂Cl₂-MeOH); $[\alpha]_D^{25}-8$ (c 1.74, MeOH).

RMN ¹H (300 MHz, (CD₃)₂CO) δ 6.78 (d, 1H, $J_{2''',3'''}=1.2$ Hz, H-2'''), 6.72 (d, 1H, $J_{5''',6'''}=7.8$ Hz, H-5'''), 6.69 (dd, 1H, H-6'''), 5.93 (s, 2H, OCH₂O), 3.91 (m, 6H, 4OH, H-6a, H-6b), 3.54 (t, 2H, $J_{1'',2''}=6.9$ Hz, H-1''), 3.40 (t, 2H, $J_{5',6'}=6.4$ Hz, H-6'), 3.56–3.37 (m, 2H, H-2, H-4), 3.19 (m, 1H, H-3), 3.02 (m, 1H, H-1a), 2.85–2.73 (m, 1H, H-1'a), 2.75 (m, 2H, H-2'), 2.48 (m, 1H, H-1'b), 2.19–2.13 (m, 2H, H-1b, H-5), 1.58–1.40 (m, 4H, H-3', H-5'), 1.40–1.12 (m, 4H, H-2', H-4') ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, (CD₃)₂CO) δ 148.4 (C-4'''), 146.7 (C-3'''), 134.2 (C-1'''), 122.6 (C-6'''), 110.1 (C-2'''), 108.7 (C-5'''), 101.6 (OCH₂O), 80.4 (C-3), 72.4 (C-6'), 71.9 (C-1'), 71.2 (C-4), 70.4 (C-2), 67.0 (C-5), 59.3 (C-6), 57.4 (C-1), 53.2 (C-1'), 36.6 (C-2'), 30.5 (C-5'), 28.0 (C-2'), 26.9 (C-4'), 25.6 (C-3') ppm.

HRESI-MS: Calc. para C₂₁H₃₄NO₇ ([M+H]⁺) 412.2330, observada: 412.2336.

***N*-{6'-[2''-feniletoksi]hexil}-1-desoxinojirimicina (**36**)**



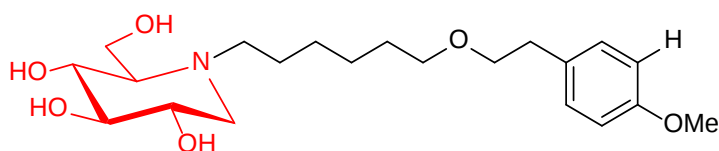
Compuesto bencilado **29** (146 mg, 0.20 mmol) fue hidrogenado. Obteniendo **36** (46 mg, 62%). $R_f=0.43$ (5:2 CH₂Cl₂-MeOH); $[\alpha]_D^{25}-7$ (c 0.98, MeOH).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 7.29–7.15 (m, 5H, Ar-H), 3.87 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.63 (t, 2H, $J_{1'',2''}=6.9$ Hz, H-1''), 3.50 (m, 1H, H-2), 3.44 (t, 2H, $J_{5',6'}=6.4$ Hz, H-6'), 3.36 (t, 1H, $J_{3,4}=J_{4,5}=9.2$ Hz, H-4), 3.17 (t, 1H, $J_{2,3}=9.0$ Hz, H-3), 3.04 (dd, 1H, $J_{1a,2}=4.7$ Hz, $J_{1a,1b}=11.3$ Hz, H-1a), 2.82 (t, 1H, H-2'), 2.89–2.79 (m, 1H, H-1'a), 2.63 (m, 1H, H-1'b), 2.26 (t, $J_{1b,2}=10.7$ Hz, H-1b), 2.22 (td, 1H, $J_{5,6a}=J_{5,6b}=2.5$ Hz, H-5), 1.60–1.26 (m, 8H, H-2'–H-5') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CD_3OD) δ 139.1 (C-1'''), 128.5 (C-2''', C-6'''), 127.9 (C-3''', C-5'''), 125.8 (C-4'''), 78.8 (C-3), 71.4 (C-6'), 70.4 (C-1'), 70.1 (C-4), 68.8 (C-2), 66.0 (C-5), 58.7 (C-6), 57.4 (C-1), 52.4 (C-1'), 35.8 (C-2'), 29.2 (C-5'), 26.8 (C-2'), 25.7 (C-4'), 23.6 (C-3') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{NO}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 368.2431, observada: 368.2436.

***N*-{6'-[2''-*p*-Metoxifeniletoxi]hexil}-1-desoxinojirimicina (37)**



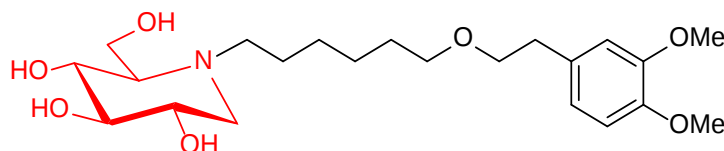
Compuesto bencilado **30** (152 mg, 0.20 mmol) fue hidrogenado. Obteniendo **37** (50 mg, 63%). $R_f=0.59$ (5:2 CH_2Cl_2 -MeOH); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -8$ (c 1.07, CH_2Cl_2).

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.15 (m, 2H, Ar-Ho), 6.83 (m, 2H, Ar-Hm), 4.18 (m, 6H, 5OH, H-6a), 3.87 (m, 1H, H-6b), 3.74 (2, 3H, H-O-Me), 3.67–3.58 (m, 1H, H-2), 3.53 (t, 1H, $J_{1'',2''}=7.1$ Hz, H-1''), 3.40 (t, 1H, $J_{5',6'}=6.4$ Hz, H-6'), 3.56–3.52 (m, 1H, H-4), 3.27–3.22 (m, 1H, H-3), 3.06 (m, 1H, H-1a), 2.87–2.83 (m, 1H, H-1'a), 2.76 (t, 2H, H-2'), 2.58 (m, 1H, H-1'b), 2.25 (m, 2H, H-1b, H-5), 1.58–1.44 (m, 4H, H-4', H-5'), 1.42–1.23 (m, 4H, H-2', H-3') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 158.2 (C-4'''), 131.3 (C-1'''), 129.8 (C-2''', C-6'''), 113.6 (C-3''', C-5'''), 79.4 (C-3), 71.7 (C-6'), 70.8 (C-1'), 70.4 (C-4), 69.4 (C-2), 66.1 (C-5), 58.5 (C-6), 56.4 (C-1), 54.6 (C-O-Me), 52.4 (C-1'), 35.2 (C-2'), 29.6 (C-5'), 27.2 (C-2'), 26.0 (C-4'), 24.5 (C-3') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{NO}_6$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 398.2537, observada: 398.2529.

N-{6'-[2''-(3''',4'''-Dimetoxifenil)etoxi]hexil}-1-desoxinojirimicina (38)



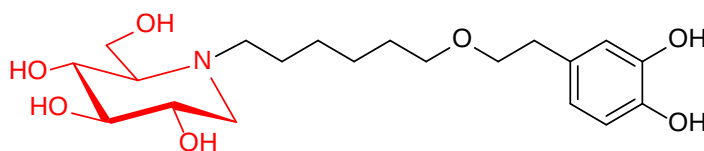
Compuesto bencilado **31** (158 mg, 0.20 mmol) fue hidrogenado. Obteniendo **38** (72 mg, 84%). $R_f=0.59$ (5:2 CH_2Cl_2 -MeOH); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}-5$ (c 1.10, MeOH).

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 6.87 (d, 1H, $J_{2''',6'''}=1.6$ Hz, H-2'''), 6.83 (d, 1H, $J_{5''',6'''}=8.2$ Hz, H-5'''), 6.75 (dd, 1H, H-6'''), 3.85 (m, 6H, 5OH, H-6a, H-6b), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.56 (t, 1H, $J_{1'',2''}=7.0$ Hz, H-1''), 3.58–3.52 (m, 2H, H-2, H-4), 3.40 (m, 2H, $J_{5',6'}=6.2$ Hz, H-6'), 3.24 (m, 1H, H-3), 3.08 (m, 1H, H-1a), 2.87 (m, 1H, H-1'a), 2.76 (t, 2H, H-2'), 2.55 (m, 1H, H-1'b), 2.25 (m, 2H, H-1b, H-5), 1.58–1.47 (m, 4H, H-4', H-5'), 1.42–1.28 (m, 4H, H-2', H-3') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 149.3 (C-4'''), 147.9 (C-3'''), 132.1 (C-1'''), 120.8 (C-6'''), 113.1 (C-2'''), 112.0 (C-5'''), 79.3 (C-3), 71.7 (C-6'), 70.8 (C-1'), 70.4 (C-4), 69.3 (C-2), 66.2 (C-5), 58.5 (C-6), 58.1 (C-1), 55.3 (OMe), 55.2 (OMe), 52.4 (C-1'), 35.7 (C-2'), 29.7 (C-5'), 27.1 (C-2'), 26.0 (C-4'), 24.6 (C-3') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{NO}_7$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 428.2643, observada: 428.2649.

N-{6'-[2''-(3''',4'''-Dihidroxifenil)etoxi]hexil}-1-desoxinojirimicina (39)



Compuesto bencilado **32** (180 mg, 0.20 mmol) fue hidrogenado. Obteniendo **39** (41 mg, 51%). $R_f=0.30$ (3:2 Et_2O -MeOH); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}-5$ (c 0.94, CH_2Cl_2).

RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ 6.68 (brd, 1H, H-5'''), 6.67 (brd, H-2'''), 6.53 (dd, 1H, $J_{5,6}=8.0$ Hz, $J_{2,6}=2.1$ Hz, H-6'''), 3.94 (dd, 1H, $J_{5,6a}=2.6$ Hz, $J_{6a,6b}=12.3$ Hz, H-6a), 3.87 (dd, 1H, $J_{5,6b}=2.7$ Hz, H-6b), 3.57 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=7.0$ Hz, H-1''), 3.63–3.52 (m, 1H, H-2), 3.45 (t, 1H, $J_{3,4}=J_{4,5}=9.3$ Hz, H-4), 3.43 (t, 2H, $J_{5',6'}=6.3$ Hz, H-6'), 3.25–3.13 (m, 2H, H-3, H-1a), 3.04–2.91 (m, 1H, H-1'a), 2.81–2.73 (m, 1H, H-1'b), 2.69 (t, 2H, H-2'), 2.45 (t, 1H, $J_{1b,2}=J_{1a,1b}=11.1$ Hz, H-1b), 2.45 (dt, 1H, H-5), 1.58–1.51 (m, 4H, H-4', H-5'), 1.38–1.28 (m, 4H, H-2', H-3') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CD_3OD) δ 146.2 (C-3'''), 144.6 (C-4'''), 132.2 (C-1'''), 121.3 (C-6'''), 117.3 (C-2'''), 116.4 (C-5'''), 78.9 (C-3), 73.2 (C-6'), 71.7 (C-1'), 69.9 (C-4), 68.7 (C-2), 67.5 (C-5), 56.5 (C-6), 55.7 (C-1), 54.1 (C-1'), 36.7 (C-2'), 30.5 (C-5'), 27.7 (C-2'), 27.0 (C-4'), 24.6 (C-3') ppm.

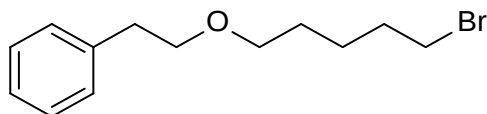
HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{NO}_7$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 400.2330, observada: 400.2335.

Síntesis de derivados fenólicos con espaciador de 5 átomos de carbono

Alquilación de la cadena con derivados fenólicos

Metodología general para la formación de derivados fenólicos alquilados con cadena de 5

2-[(5-bromopentil)oxi]etilbenceno (**40**)



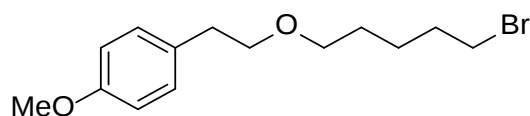
2-feniletanol (270 mg, 2.19 mmol) fue utilizado. Columna cromatográfica (ciclohexano $\rightarrow$ ciclohexano: acetato de etilo 98:2), obteniendo **40** (482 mg, 81%). $R_f=0.78$ (7:3 ciclohexano: acetato de etilo).

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 7.28-7.01 (m, 5H, H-Ar), 3.55 (t, $J_{2'-1'}=7.2$ Hz, 2H, H-2'), 3.36 (t, $J_{1''-2''}=6.3$ Hz, 2H, H-1''), 3.31 (t, $J_{6''-5''}=6.8$ Hz, 2H, H-6''), 2.80 (t, $J_{1'-2'}=7.2$ Hz, 2H, H-1'), 1.78 (m, 2H, H-5''), 1.52 (m, 2H, H-2''), 1.45-1.33 (m, 4H, H-3'', H-4'') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3) δ 139.2 (C-1), 129.0 (C-2, C-6), 128.4 (C-3, C-5), 126.3 (C-4), 71.9 (C-1''), 70.7 (C-2'), 36.5 (C-1), 33.9 (C-5''), 32.7 (C-4''), 28.9 (C-2''), 25.0 (C-3'') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{BrNaO}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 293.0511, observada: 293.0514.

1-{2-[5-bromopentiloxi]etil}-4-metoxibenceno (41)

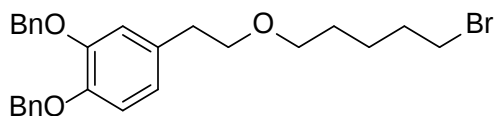


A una solución de 2-metoxi-feniletanol (333 mg, 2.19 mmol) en DMF (5 mL), fue adicionado, hidruro de sodio al 60% (525 mg, 13.14 mmol, 6 eq.), en agitación constante bajo argón, durante 30 minutos, a la mezcla fue adicionado 1,5-dibromopentano (2.38 mL, 17.52 mmol, 8 eq.) y se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 4 horas, fue detenida con agua, la fase orgánica se lavó con salmuera, y la fase acuosa fue extraída con acetato de etilo (3x50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad, columna cromatográfica (hexano: acetato de etilo 98:2). Dando el producto **41** (544 mg, 82.5 %). $R_f=0.80$ (7:3 ciclohexano: acetato de etilo).

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 7.05 (m, 2H, H-Ar), 6.74 (m, 2H, H-Ar), 3.70 (s, 3H, H- $\text{CH}_3\text{-O}$), 3.51 (t, $J_{2'-1'}=7.2$ Hz, 2H, H-2'), 3.39-3.28 (m, 4H, H-1'', H-5''), 2.74 (t, $J_{1'-2'}=7.2$ Hz, 2H, H-1'), 1.78 (m, 2H, H-2''), 1.45 (m, 4H, H-3'', H-4'') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{BrNaO}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 323.0617, observada: 323.0618.

1,2-dibenciloxi-4-[2'-(5''-bromopentiloxi)etil]benceno (42)



Hidroxitirosol bencilado (**13**) (740 mg, 2.19 mmol) fue utilizado. Columna cromatográfica (ciclohexano → ciclohexano: acetato de etilo 98:2), obteniendo **42** (970 mg, 91%); $R_f=0.69$ (7:3 ciclohexano: acetato de etilo).

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 7.41-7.13 (m, 10H, H-Bn), 6.77 (m, 2H, H-Ar), 6.65 (m, 1H, H-Ar), 5.06 (s, 2H, H- $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 5.04 (s, 2H, H- $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 3.47 (t, $J_{2'-1'}=7.1$ Hz, 2H, H-2'), 3.34-3.28 (m, 4H, H-1'', H-5''), 2.70 (t, $J_{1'-2'}=7.1$ Hz, 2H, H-1'), 1.77 (m, 2H, H-2''), 1.55-1.32 (m, 4H, H-3'', H-4'') ppm.

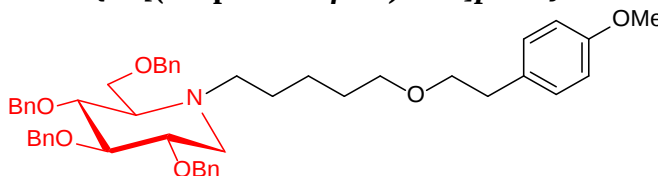
RMN ^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3) δ 149.0 (C-4), 147.6 (C-3), 137.6 (C-6'''), 137.5 (C-6'''), 132.7 (C-1), 128.5 (C-Bn), 127.8 (C-Bn), 127.8 (C-Bn), 127.5 (C-Bn), 127.4 (C-Bn), 121.9 (C-6), 116.2 (C-2), 115.4 (C-5), 72.0 (C-1''), 71.6 (C- $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 71.5 (C- $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 70.7 (C-2'), 36.0 (C-1'), 33.9 (C-5''), 32.7 (C-4''), 28.9 (C-2''), 25.0 (C-3'') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{BrNa O}_3$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 505.1349, observada: 505.1345.

Alquilación de iminoazúcar por cadenas alquiladas

Metodología general para la obtención de desoxinojirimicina bencilada alquilada con derivados fenólicos en cadena de 5 carbonos

2,3,4,6-Tetra-O-bencil-N-{5'-[(2''-p-metoxifenil)etoxi]pentil}-1-desoxinojirimicina (44)



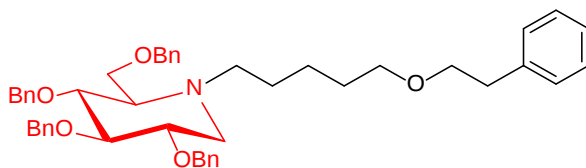
A una solución de 1-desoxinojirimicina per-*O*-bencilada (**6**) (250 mg, 0.48 mmol) y 1-{2-[(5-bromopentil)oxi]etil}-4-metoxibenceno **41** (359 mg, 1.19 mmol, 2.5 eq.) o cualquier otro derivado fenólico alquilado con cadena de 5 carbonos en DMF (5 mL), fue adicionado carbonato de potasio (199 mg, 1.44 mmol, 3 eq.), la mezcla fue purgada bajo argón y colocada a 85 °C durante 15 h, la reacción fue detenida con agua y lavada con salmuera y extraída con acetato de etilo (3x50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 95:5 → 85:15). Obteniendo **44** como un aceite incoloro (137 mg, 38%). R_f = 0.57 (7:3 ciclohexano: acetato de etilo); $[\alpha]_D^{25}$ +3 (c 0.75, CH₂Cl₂).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 7.25–7.14 (m, 18H, Ar-H Bn), 7.09–7.02 (m, 4H, Ar-H), 6.78–6.71 (m, 2H, Ar-H), 4.85 (m, 3H, CH₂Ph), 4.59 (m, 2H, CH₂Ph), 4.35 (m, 3H, CH₂Ph), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.61–3.54 (m, 2H, H-2, H-4), 3.53–3.43 (m, 4H, H-5', H-1''), 3.40–3.36 (m, 1H, H-6a), 3.34–3.29 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.01 (dd, $J_{1a,1b}$ = 11.1 Hz, $J_{1a,2}$ = 4.8 Hz, 1H, H-1a), 2.75 (t, $J_{1'',2''}$ = 7.3 Hz, 2H, H-2''), 2.54 (m, 2H, H-1'), 2.22 (brd, 1H, $J_{1a,1b}$ = 9.5 Hz, H-1b), 2.14 (t, 1H, $J_{4,5}$ = 10.8 Hz, H-5), 1.45 (m, 2H, H-2'), 1.33–1.02 (m, 4H, H-3', H-4') ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, CDCl₃) δ 158.2 (C-4'''), 139.2 (Ar-C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar-C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar-C_{ipso} Bn), 137.9 (Ar-C_{ipso} Bn), 131.2 (C-1'''), 129.9 (C-2''', C-6'''), 128.6 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 128.2 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 113.9 (C-3''', C-5'''), 87.5 (C-3), 78.7 (C-4), 78.7 (C-2), 75.4 (CH₂Ph), 75.3 (CH₂Ph), 73.6 (CH₂Ph), 72.9 (CH₂Ph), 72.2 (C-5'), 71.0 (C-1'), 65.4 (C-6), 63.8 (C-5), 55.3 (OMe), 54.6 (C-1), 52.4 (C-1'), 35.6 (C-2'), 29.7 (C-4'), 24.2 (C-2'), 23.6 (C-3') ppm.

HRESI-MS: Calc. para C₄₈H₅₈NO₆ ([M+H]⁺) 744.4259, observada: 744.4250.

2,3,4,6-Tetra-O-bencil-N-{5'-[(2''-fenil)etoxi]pentil}-1-desoxinojirimicina (43)



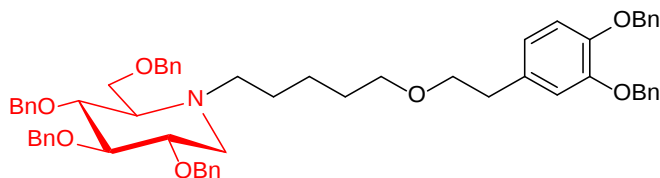
Se usó {2-[(5-bromopentil)oxi]etil}benceno **40** (324 mg, 1.19 mmol, 2.5 eq.). Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 95:5 → 85:15), obteniendo **43** (133 mg, 39%). $R_f=0.54$ (7:3 ciclohexano: acetato de etilo); $[\alpha]_D^{25} +7$ (c 0.61, CH₂Cl₂).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 7.34–6.97 (m, 25H, Ar-H), 4.80 (m, 3H, CH₂Ph), 4.59 (m, 2H, CH₂Ph), 4.35 (m, 3H, CH₂Ph), 3.63–3.55 (m, 2H, H-2, H-4), 3.54–3.42 (m, 4H, H-5', H-1''), 3.37 (m, 1H, H-6a), 3.33–3.29 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.00 (dd, 1H, $J_{1a,1b}=11.1$ Hz, $J_{1a,2}=4.8$ Hz, H-1a), 2.81 (t, 2H, $J_{1'',2''}=7.3$ Hz, H-2''), 2.54 (m, 2H, H-1'), 2.22 (brd, 1H, $J_{1a,1b}=9.5$ Hz, H-1b), 2.15 (t, 1H, $J_{4,5}=10.8$ Hz, H-5), 1.46 (m, 2H, H-2'), 1.32–1.05 (m, 4H, H-3', H-4') ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, CDCl₃) δ 139.1 (C-1'''), 138.7 (Ar-C_{ipso} Bn), 137.9 (Ar-C_{ipso} Bn), 129.0 (x5) (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 126.3 (Ar-C), 87.5 (C-3), 78.7 (C-4), 78.7 (C-2), 75.4 (CH₂Ph), 75.3 (CH₂Ph), 73.6 (CH₂Ph), 72.9 (CH₂Ph), 72.0 (C-5'), 71.0 (C-1''), 65.4 (C-6), 63.8 (C-5), 54.6 (C-1), 52.4 (C-1'), 36.5 (C-2''), 29.7 (C-4'), 24.2 (C-2'), 23.5 (C-3') ppm.

HRESI-MS: Calc. para C₄₇H₅₆NO₅ ([M+H]⁺) 714.4153, observada: 714.4147.

2,3,4,6-Tetra-O-bencil-N-{5'-[(2''-(3''',4'''-dibenciloxi)fenil)etoxi]pentil}-1-desoxinojirimicina (45)



Se usó {[4-(2-((5-bromopentil)oxi)etil)-1,2-fenilen)bis(oxi)]bis(metilen)}dibenceno **42** (577 mg, 1.19 mmol, 2.5 eq.). Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 95:5 → 85:15), obteniendo **45** (165 mg, 37%). $[\alpha]_D^{25} +4$ (c 0.9, CH₂Cl₂); $R_f = 0.50$ (7:3 ciclohexano: acetato de etilo).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 7.42–7.00 (m, 30H, Ar-H Bn), 6.84–6.59 (m, 3H, H-2''', H-5''', H-6'''), 5.05 (s, 2H, CH₂Ph), 5.03 (s, 2H, CH₂Ph) 4.81 (m, 3H, CH₂Ph), 4.58 (m, 2H, CH₂Ph), 4.35 (m, 3H, CH₂Ph), 3.63–3.53 (m, 2H, H-2, H-4), 3.52–3.42 (m, 4H, H-5', H-1'), 3.37 (m, 1H, H-6a), 3.30–3.26 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.00 (dd, $J_{1a-1b} = 11.1$ Hz, $J_{1a-2} = 4.8$ Hz, 1H, H-1a), 2.70 (t, $J_{2'-1''} = 7.3$ Hz, 2H, H-2'), 2.51 (m, 2H, H-1'), 2.21 (brd, 1H, $J_{1a,1b} = 11.0$ Hz, H-1b), 2.14 (t, 1H, $J_{4,5} = 10.8$ Hz, H-5), 1.43 (m, 2H, H-2'), 1.30–1.03 (m, 4H, H-3', H-4') ppm.

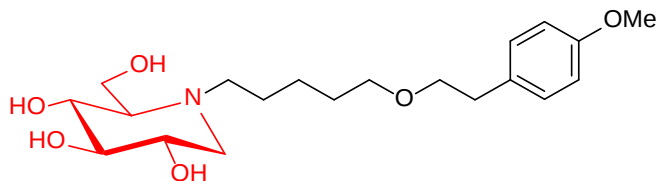
RMN ¹³C (75.5 MHz, CDCl₃) δ 149.0 (C-4'''), 147.6 (C-3'''), 139.1 (Ar-C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar-C_{ipso} Bn), 138.7 (Ar-C_{ipso} Bn), 137.9 (Ar-C_{ipso} Bn), 137.6 (Ar-C_{ipso} Bn), 137.5 (Ar-C_{ipso} Bn), 132.6 (C-1'''), 128.5 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.8 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 127.4 (Ar-C), 121.9 (C-6'''), 116.3 (C-2'''), 115.4 (C-5'''), 87.5 (C-3), 78.7 (C-4), 78.6 (C-2), 75.4 (CH₂Ph), 75.3 (CH₂Ph), 73.5 (CH₂Ph), 72.9 (CH₂Ph), 72.0 (C-5'), 71.6 (CH₂Ph), 71.5 (CH₂Ph), 71.0 (C-1'), 65.4 (C-6), 63.9 (C-5), 54.6 (C-1), 52.4 (C-1'), 35.9 (C-2'), 29.7 (C-4'), 24.2 (C-2'), 23.6 (C-3') ppm.

HRESI-MS: Calc. para C₆₁H₆₈NO₇ ([M+H]⁺) 926.4990, observada: 926.4986.

Desprotección de grupos bencilo

Metodología general para la desprotección de grupos hidroxilo

N-{5'-[(2''-*p*-Metoxifenil)etoxi]pentil}-1-desoxinojirimicina (**44**)



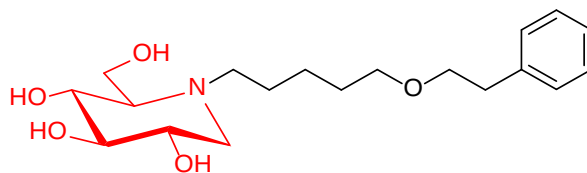
A una solución del compuesto bencilado **41** (141 mg, 0.20 mmol) en una mezcla DCM:MeOH (6 mL), fue adicionado ácido acético (0.4 mL), bajo atmosfera de nitrógeno, a esto fue adicionado hidróxido de paladio (141 mg, 0.81 mmol, 4.1 eq.), y fue introducida una atmosfera de hidrogeno y se mantuvo en agitación durante 24 horas, la mezcla fue filtrada sobre Celita con metanol (250 mL) y llevada a sequedad. Obteniendo **44** de forma cuantitativa (77 mg). $R_f=0.43$ (5:2 CH₂Cl₂-MeOH); $[\alpha]_D^{25}-1$ (c 1.13, CH₂Cl₂).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 7.13 (m, 2H, Ar-H), 6.83 (m, 2H, Ar-H), 4.07 (brd, 1H, $J_{6a,6b}=12.3$ Hz, H-6a), 3.90 (brd, 1H, H-6b), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.70 (m, 1H, H-2), 3.60 (t, 2H, $J_{1'',2''}=3.9$ Hz, H-1''), 3.62–3.58 (m, 1H, H-4), 3.46 (t, 2H, $J_{4',5'}=6.0$ Hz, H-5'), 3.37–3.11 (m, 4H, H-3, H-1a, H-1'a, H-1'b), 2.96–2.84 (m, 2H, H-1b, H-5), 2.78 (t, 2H, H-2''), 1.71–1.57 (m, 4H, H-2', H-4'), 1.45–1.36 (m, 2H, H-3') ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, CD₃OD) δ 159.5 (C-4'''), 132.4 (C-1'''), 130.9 (C-2''', C-6'''), 114.8 (C-3''', C-5'''), 78.4 (C-3), 73.1 (C-1'), 71.4 (C-5'), 69.2 (C-4), 68.1 (C-2), 67.4 (C-5), 55.8 (C-6), 55.7 (OMe), 55.1 (C-1), 54.0 (C-1'), 36.3 (C-2'), 30.1 (C-4'), 24.5 (C-2'), 24.0 (C-3') ppm.

HRESI-MS: Calc. para C₂₀H₃₄NO₆ ([M+H]⁺) 384.2381, observada: 384.2376.

N-{5'-[(2''-fenil)etoxi]pentil}-1-desoxinojirimicina (46)



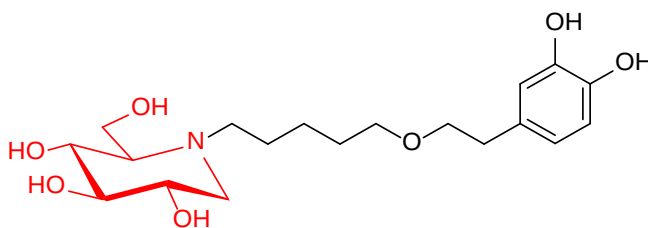
El compuesto bencilado **43** (143 mg, 0.20 mmol) fue hidrogenado. Obteniendo **46** (71 mg, cuantitativa). $R_f=0.48$ (5:2 CH₂Cl₂-MeOH); $[\alpha]_D^{25}-3$ (c 0.92, CH₂Cl₂).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 7.29–7.15 (m, 5H, Ar-H), 4.10 (m, 1H, H-6a), 3.94 (m, 1H, H-6b), 3.78 (m, 1H, H-2), 3.67–3.61 (m, 4H, H-1'', H-5'), 3.52–3.42 (m, 3H, H-3, H-4, H-1a), 3.21–2.99 (m, 4H, H-1'a, H-1'b, H-2''), 2.89–2.82 (m, 2H, H-1b, H-5), 1.87–1.36 (m, 6H, H-2', H-3', H-4') ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, CD₃OD) δ 140.4 (C-1'''), 129.9 (C-2''', C-6'''), 129.3 (C-3''', 5'''), 127.1 (C-4'''), 77.9 (C-3), 72.8 (C-1'), 71.3 (C-5'), 68.8 (C-4), 67.8 (C-2), 67.4 (C-5), 55.3 (C-6), 54.7 (C-1), 54.1 (C-1'), 37.2 (C-2''), 29.9 (C-4'), 24.3 (C-2'), 24.0 (C-3') ppm.

HRESI-MS: Calc. para C₁₉H₃₂NO₅ ([M+H]⁺) 354.2275, observada: 354.227.

N-{5'-[(2''-m,p-Dihidroxi-fenil)etoxi]pentil}-1-desoxinojirimicina (48)

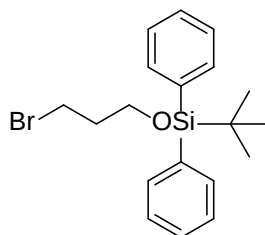


Compuesto bencilado **45** (185 mg, 0.20 mmol) fue hidrogenado. Obteniendo **48** (25 mg, 32%). $R_f=0.29$ (5:2 CH₂Cl₂-MeOH); $[\alpha]_D^{25}-7$ (c 0.53, CH₂Cl₂).

RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ 6.71 (brd, 1H, $J_{5''',6'''}=8.0$ Hz, H-5'''), 6.69 (brs, 1H, H-2'''), 6.55 (dd, $J_{2''',6'''}=1.9$ Hz, H-6'''), 3.96–3.85 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.80–3.66 (m, 1H, H-2), 3.60 (t, 2H, $J_{1'',2''}=7.1$ Hz, H-1''), 3.64–3.53 (m, 1H, H-4), 3.46 (t, 2H, $J_{4',5'}=6.4$ Hz, H-5'), 3.24 (t, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}=9.1$ Hz, H-3), 3.18–3.09 (m, 2H, H-1a, H-1'a), 2.92 (m, 1H, H-1'b), 2.71 (t, 2H, H-2''), 2.39 (t, 1H, $J_{1b,2}=J_{1a,1b}=11.3$ Hz, H-1b), 2.37 (m, 1H, H-5), 1.64–1.50 (m, 4H, H-2', H-4'), 1.30–1.30 (m, 2H, H-3') ppm.

HRESI-MS: Calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{NO}_7$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 386.2173, observada: 386.2169.

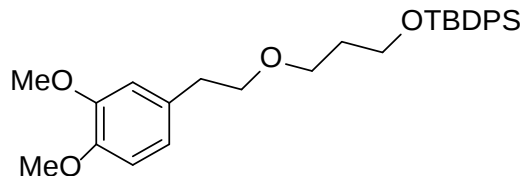
Formación de derivado fenólico dimetoxilado en cadena de 3 (3-Bromopropoxi)(*terc*-butil)difenilsilano (56)



Una solución de 3-bromopropanol **55** (0.629 mL, 1 g, 7.19 mmol) en DCM (7.2 mL) en baño de hielo, se dejó en agitación durante 20 minutos, posteriormente se adiciono imidazol (538 mg, 7.91 mmol, 1.1 eq.) y se mantuvo en agitación, fue adicionado lentamente TBDFSCI (1.870 mL, 1.977 g., 1 eq.), en agitación constante, bajo atmosfera de argón, a temperatura ambiente toda la noche, la reacción fue lavada con una solución saturada de cloruro amónico y extraída con diclorometano, la fase acuosa fue extraída con una mezcla de hexano: acetato de etilo y posteriormente la mezcla de fases orgánicas fue lavada con salmuera y extraída con DCM, la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y evaporada en rotavapor, Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 98:2), obteniendo **56**, como un aceite amarillo (1.49 g, 55%).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.61–7.43 (m, 4H, H-Ar), 7.33–7.13 (m, 6H, H-Ar), 3.64 (t, $J_{3-2}=5.6$ Hz, 2H, H-3), 3.43 (t, $J_{1-2}=6.5$ Hz, 2H, H-1), 1.96 – 1.86 (m, 2H, H-2), 0.92 (s, 9H, H- CH_3) ppm.

terc-Butil(3-(3,4-dimetoxifenetossi)propoksi)difenilsilano (57)

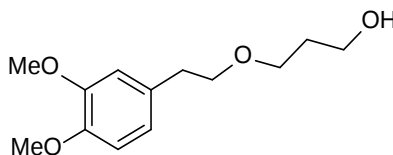


A una solución de dimetoxifeniletanol **26** (200 mg, 1.10 mmol), en DMF (3 mL), fue adicionado, NaH al 60% (131.7 mg, 3.29 mmol, 3 eq.) y se mantuvo en agitación durante 20 minutos bajo atmosfera de argón, transcurrido este tiempo fue adicionado 3-bromopropanol-sililado **56** (1.66 g, 4.39 mmol, 4 eq.) manteniendo a temperatura ambiente durante 4 horas en agitación constante, la reacción fue detenida con agua, lavada con salmuera y extraída con acetato de etilo 3x50 ml, la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad. Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 98:2). Obteniendo **57** (101 mg, 19%).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.63-7.54 (m, 4H-H-Ar), 7.36-7.22 (m, 6H, H-Ar), 6.73-6.58 (m, 3H, H-2, H-5, H-6), 3.75 (s, 3H, H-MeO), 3.75 (s, 3H, H-MeO), 3.68 (t, $J_{3''-2''} = 6.1$ Hz, 2H, H-3''), 3.51 (t, $J_{2''-1''} = 2''-3'' = 7.2$ Hz, 2H, H-2''), 3.49 (t, $J_{1'-2'} = 6.4$ Hz, 2H, H-1'), 2.73 (t, $J_{1''-2''} = 7.2$ Hz, 2H, H-1''), 1.75 (q, $J_{2'-1'} = 6.3$ Hz, 2H, H-2'), 0.97 (s, 9H, H-Me) ppm.

HRESI-MS: Calc. para $C_{29}H_{38}NaSiO_4$ ($[M+Na]^+$) 501.2432, observada: 501.2425.

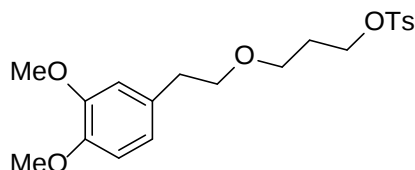
3-(3,4-Dimetoxifenetoxi)propanol (58)



Una solución de tert-butil(3-(3,4-dimetoxifenetoxi)propoxi)difenilsilano **57** (394 mg, 0.82 mmol) en THF (6 mL) fue adicionado TBAF (200 μ L, 1.97 mmol, 2.4 eq.), la reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 48 horas, se llevó a

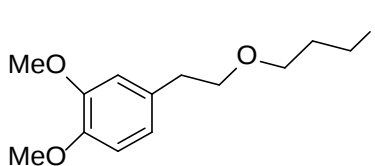
sequedad. Columna cromatográfica (ciclohexano:acetato de etilo 9:1 → 5:5) Se obtuvo **58** (197 mg, cuantitativo).

Metilbencenosulfonato de 3-(3,4-dimetoxifenetoxi)propilo (59)



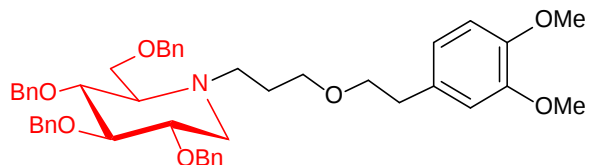
A una solución de 3-(3,4-dimetoxifenetoxi)propanol **58** (145 mg, 0.60 mmol) en DCM (5 mL), se adiciono, Et₃N (109 µl, 0.78 mmol, 1.3 eq.) y TsCl (172 mg, 0.90 mmol, 1.5 eq.) la mezcla se dejó en agitación constante durante toda la noche a temperatura ambiente bajo atmosfera de argón, transcurrido este tiempo se lavó con agua y se extrajo con DCM (3x50 mL), la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad. Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 9:1 → 5:5). Obteniendo **59** (95.2 mg, 40%).

4-(2-(3-Yodopropoxi)etil)-1,2-dimetoxibenceno (60)



Una solución de 3-(3,4-dimetoxifenetoxi)propil 4-metilbencenosulfonato **59** (136 mg, 0.34 mmol) en acetona (5 mL), se adiciono yoduro de sodio (258 mg, 1.72 mmol, 5 eq.), la mezcla se mantuvo dos horas a reflujo y se llevó a sequedad, posteriormente se lavó con agua y se extrajo con DCM (3 x 50 mL), la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó en el rotavapor, el compuesto fue utilizado sin ninguna purificación para la siguiente reacción (cuantitativa).

2,3,4,6-Tetra-O-bencil-N-{3'-[(2''-(3''',4'''-dimetoxi)fenil)etoxi]propil}-1-desoxinojirimicina (61)



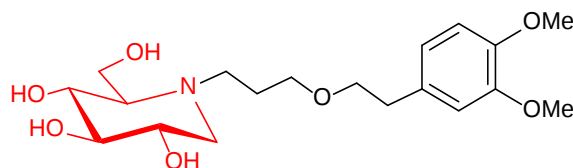
Una solución de desoxinojirimicina bencilada **6** (60 mg, 0.11 mmol) en DMF (4 mL), se adiciono carbonato de potasio, (47.5 mg, 0.34 mol, 3 eq.) y 4-(2-(3-yodopropoxi)etil)-1,2-dimetoxibenceno **60** (100 mg, 0.29 mol, 2.5 eq.), la mezcla fue puesta en agitación a 85 °C durante 15 horas bajo atmosfera de argón, la reacción fue lavada con salmuera y extraída con acetato de etilo (3x50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. Columna cromatografía (ciclohexano: acetato de etilo 9:1 → 8:2). Se obtiene **61** (15 mg, 17%). $[\alpha]_D^{25}$ 10 (c 1.51, CH₂Cl₂).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.40-6.93 (m, 20H, H-Bn), 6.75-6.59 (m, 3H, H-Ar), 4.78 (m, 3H, H-CH₂-Bn), 4.56 (m, 3H, H-CH₂-Bn), 4.35 (m, 2H, H-CH₂-Bn), 3.78 (s, 3H, H-MeO), 3.77 (s, 3H, H-MeO), 3.63-3.34 (m, 5H, H-2, H-4, H-1'', H-6a), 3.29 (m, 2H, H-4, H-6b), 2.99 (dd, $J_{1a-1b}=11.1$ Hz, $J_{1a-2}=4.8$ Hz, 1H, 1a), 2.72 (t, $J_{3'-2'}=6.8$ Hz, 2H, H-3'), 2.59 (m, 2H, H-1'), 2.24 (m, 2H, H-1b, H-5), 1.20 (m, 2H, H-2') ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, CDCl₃) δ 148.8 (C-4'''), 147.5 (C-3'''), 139.0 (C-ipso-Bn), 138.5 (C-ipso-Bn), 137.8 (C-ipso-Bn), 131.6 (C-1''') 129.7 (C-Bn), 128.4 (C-Bn), 128.3 (C-Bn), 127.9 (C-Bn), 127.8 (C-Bn), 127.7 (C-Bn), 127.5 (C-Bn), 120.7 (C-3'''), 112.3 (C-2'''), 111.2 (C-5'''), 87.3 (C-3), 78.6 (C-4), 77.2 (C-2), 76.6 (C-CH₂-Bn), 75.3 (C-CH₂-Bn), 73.4 (C-CH₂-Bn), 72.1 (C-CH₂-Bn), 65.6 (C-6), 62.8 (C-5), 55.9 (C-OMe), 55.8 (C-OMe), 54.5 (C-1), 49.3 (C-1'), 35.9 (C-2''), 29.7 (C-2') ppm.

HRESI-MS: Calc. para C₄₇H₅₆NO₇ ([M+H]⁺) 746.4051.

N-{3'-[(2''-(3''',4'''-Dimetoxi)fenil)etoxi]propil}-1-desoxinojirimicina (62)

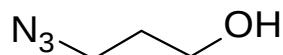


A una solución del compuesto bencilado **61** (15 mg, 0.02 mmol) en una mezcla DCM:MeOH (3 mL) , fue adicionado ácido acético (0.2 mL), bajo atmosfera de nitrógeno, a esto fue adicionado hidróxido de paladio (15 mg, 0.81 mmol, 4.1 eq.), y fue introducida una atmosfera de hidrogeno y se mantuvo en agitación durante 24 horas, la mezcla fue filtrada sobre Celita con metanol (250 mL) y llevada a sequedad. Obteniendo **62** de forma cuantitativa (7.7 mg).

Ureas tioureas y selenoureas

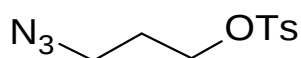
Formación de azidas yodadas

3-Azidopropan-1-ol (65)



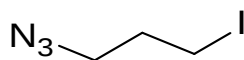
Una solución de 3-bromo-1-propanol (1 g, 7.2 mmol) y azida de sodio (2.38 g, 36.69 mmol, 5.1 eq.) en DMSO (20 mL), se dejó en agitación a temperatura ambiente, bajo atmosfera de argón durante 24 horas, la reacción fue detenida con agua, fue lavada y extraída con éter etílico (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. La reacción procede de manera cuantitativa (728 mg) y se utilizó en la siguiente reacción sin ninguna purificación.

4-Metilbencenosulfonato de 3-azidopropilo (68)



A una solución de 3-azida-1-propanol (0.728 g, 7.2 mmol) en DCM (25 mL), fue adicionada trietilamina (2.1 mL, 15.043 mmol, 2.08 eq.) la mezcla se mantuvo en agitación durante 20 minutos, posteriormente fue adicionado cloruro de tosilo (2.868 g, 15.04 mmol, 2.08 eq.), la reacción se mantuvo en agitación durante toda la noche bajo atmosfera de argón. La reacción fue detenida con agua, se lavó y se extrajo con DCM (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 9:1). Obteniendo **68** (1.25 g, 68%).

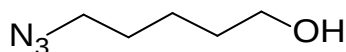
1-azido-3-yodopropano (71)



Una solución de azida tosilada **68** (1.25 g, 4.89 mmol), en acetona (10 mL), se mantuvo en agitación durante 20 minutos, posteriormente se adiciono yoduro de sodio (3.67 g, 24.48 mmol, 5 eq.), la mezcla se colocó a reflujo bajo atmosfera de argón durante 2 horas, se

eliminó el disolvente y la mezcla de reacción fue lavada con agua y extraída con DCM (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad. La reacción procede de forma cuantitativa (1 g), por lo que se utilizó sin ninguna purificación para la siguiente reacción.

5-Azidopentan-1-ol (66)

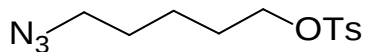


Una solución de 5-bromopentan-1-ol (0.5 g, 0.34 mL, 2.99 mmol) y azida de sodio (0.992 g, 15.26 mmol, 5.1 eq.) en DMSO (20 mL), se dejó en agitación a temperatura ambiente, bajo atmosfera de argón durante 24 horas, la reacción fue detenida con agua, fue lavada y extraída con éter etílico (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. La reacción procede de manera cuantitativa (386 mg) y se utilizó en la siguiente reacción sin ninguna purificación.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 3.66 (t, J_{1-2} = 6.5 Hz, 2H, H-1), 3.29 (t, J_{5-4} = 6.8 Hz, 2H, H-5), 1.67-1.55 (m, 4H, H-2, H-4), 1.45 (m, 2H, H-3) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CDCl₃) δ 62.5 (C-1), 51.4 (C-5), 32.1 (C-2), 28.6 (C-4), 23.0 (C-3) ppm.

4-Metilbencenosulfonato de 5-azidopentilo (69)

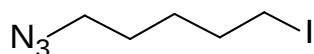


A una solución de 5-azida-1-pentanol (386 mg, 2.99 mmol) en DCM (15 mL), fue adicionada trietilamina (0.285 mL, 3.89 mmol, 1.3 eq.) la mezcla se mantuvo en agitación durante 20 minutos, posteriormente fue adicionado cloruro de tosilo (0.684 g, 13.89 mmol, 1.3 eq.), la reacción se mantuvo en agitación durante toda la noche bajo atmosfera de argón. La reacción fue detenida con agua, se lavó y se extrajo con DCM (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 9:1). Obteniendo **69** (313 mg, 37%).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (m, 2H, H-Ts), 7.36 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-Ts), 4.03 (t, $J_{1-2} = 6.3$ Hz, 2H, H-1), 3.23 (t, $J_{5-4} = 6.8$ Hz, 2H, H-5), 2.45 (s, 3H, H-CH₃), 1.67 (m, 2H, H-2), 1.54 (m, 2H, H-4), 1.40 (m, 2H, H-3) ppm.

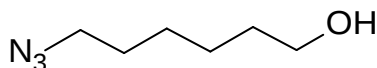
RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 144.9 (C-Ts), 133.0 (C-Ts), 129.9 (C-Ts), 127.9 (C-Ts), 70.2 (C-1), 51.2 (C-5), 28.1 (C-2), 22.5 (C-4), 21.5 (C-3) ppm.

1-Azido-5-yodopentano (72)



Una solución de azida tosilada (0.150 g, 0.53 mmol), en acetona (5 mL), se mantuvo en agitación durante 20 minutos, posteriormente se adiciono yoduro de sodio (0.396 g, 2.64 mmol, 5 eq.), la mezcla se colocó a reflujo bajo atmosfera de argón durante 2 horas, se eliminó el disolvente y la mezcla de reacción fue lavada con agua y extraída con DCM (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad. La reacción procede de forma cuantitativa (126 mg), por lo que se utilizó sin ninguna purificación para la siguiente reacción.

6-Azidohexan-1-ol (67)

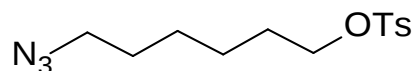


Una solución de 6-bromo-1-hexanol (1 g, 0.75 mL, 5.52 mmol) y azida de sodio (1.83 g (28.16 mmol, 5.1 eq.) en DMSO (30mL), se dejó en agitación a temperatura ambiente, bajo atmosfera de argón durante 24 horas, la reacción fue detenida con agua, fue lavada y extraída con éter etílico (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. La reacción procede de manera cuantitativa (780 mg) y se utilizó en la siguiente reacción sin ninguna purificación.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 3.64 (t, $J_{1-2} = 6.6$ Hz, 2H, H-1), 3.28 (t, $J_{6-5} = 6.9$ Hz, 2H, H-6), 1.65-1.55 (m, 4H, H-2, H-5), 1.46-1.34 (m, 4H, H-3, H-4) ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 62.7 (C-1), 51.4 (C-6), 32.5 (C-2), 28.8 (C-5), 26.5 (C-4), 25.3 (C-3) ppm.

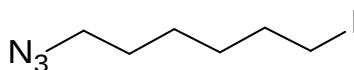
4-Metilbencenosulfonato de 6-azidohexilo (70)



A una solución de 6-azida-1-hexanol (**67**) (780 mg, 5.44 mmol), en DCM (20 mL), fue adicionada trietilamina (0.053 mL, 7.07 mmol, 1.3 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación durante 20 minutos, posteriormente fue adicionado cloruro de tosilo (1.347 g, 7.07 mmol, 1.3 eq.), la reacción se mantuvo en agitación durante toda la noche bajo atmosfera de argón. La reacción fue detenida con agua, se lavó y se extrajo con DCM (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 9:1). Obteniendo **70** (1 g, 62%).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.20 (m, 6H, H-Ts), 3.56 (t, $J_{1-2}=6.6$ Hz, 2H, H-1), 3.36 (s, 1H, H-CH₃), 3.22 (t, $J_{6-5}=6.9$ Hz, 2H, H-6), 3.14 (s, 3H, H-CH₃), 1.68-1.44 (m, 4H, H-2, H-5), 1.42-1.22 (m, 4H, H-3, H-4) ppm.

1-azido-6-yodohexane (73)

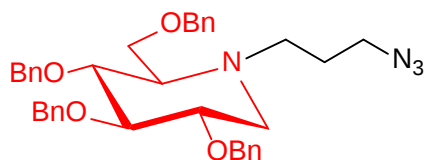


Una solución de azida tosilada **70** (0.506 g, 1.76 mmol), en acetona (10 mL), se mantuvo en agitación durante 20 minutos, posteriormente se adiciono yoduro de sodio (1.32 g (8.82 mmol, 5 eq.)), la mezcla se colocó a reflujo bajo atmosfera de argón durante 2 horas, se eliminó el disolvente y la mezcla de reacción fue lavada con agua y extraída con DCM (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad. La reacción procede de forma cuantitativa (440 mg), por lo que se utilizó sin ninguna purificación para la siguiente reacción.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 3.28 (t, $J_{6-5}=6.9$ Hz, 2H, H-6), 3.20 (t, $J_{1-2}=6.9$ Hz, 2H, H-1), 1.84 (m, 2H, H-2), 1.61 (m, 2H, H-5), 1.50-1.33 (m, 4H, H-3, H-4) ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 51.4 (C-6), 33.2 (C-2), 29.9 (C-5), 28.6 (C-3), 25.6 (C-4), 6.7 (C-1) ppm.

Obtención de N-(3-azidopropil)-2,3,4,6-tetra-O-bencil-1-desoxinojirimicina (74)

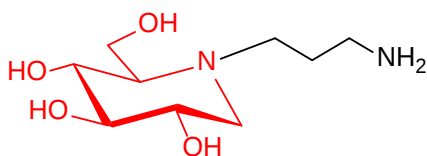


Una solución de desoxinojirimicina bencilada **6** (0.400 g, 0.76 mmol), 1-azida-3-yodopropano (0.425 g, 1.68 mmol, 2.2 eq.) y carbonato de sodio (0.317 g, 2.29 mmol, 3 eq.), en DMF (6 mL), se colocaron en agitación a 120 °C, durante 5 horas, bajo atmosfera de argón. La reacción fue detenida con salmuera, y extraída con acetato de etilo (3x50 mL), la fase orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 y llevado a sequedad, la mezcla fue purificado en columna cromatográfica, usando como eluyente ciclohexano: acetato de etilo 85:15. Obtenido **74** como un aceite marrón, en un rendimiento del 39% (180 mg). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 10 (c 0.85, CH_2Cl_2).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.32-7.13 (m, 18H, H-Bn), 7.09-7.01 (m, 2H, H-Bn), 4.81 (m, 3H, H- CH_2 -Bn), 4.59 (q, $J = 11.6$ Hz, 2H, H- CH_2 -Bn), 4.38 (q, $J = 12.2$ Hz, 3H, H- CH_2 -Bn), 3.62-3.49 (m, 3H, H-2, H-4, H-6), 3.49-3.35 (m, 3H, H-6, H-3), 3.11 (m, 2H, H-3'), 2.96 (dd, $J_{1a-1b} = 11.2$, $J_{1a-2} = 4.8$ Hz, 1H, H-1ax), 2.71 (dd, $J_{1a-1b} = 13.6$ Hz, $J_{1a'-2'} = 9.4$ Hz, 1H, H-1a'), 2.51 (m, 1H, H-1b'), 2.24 (d, $J_{5-4} = 9.2$ Hz, 1H, H-5), 2.12 (dd, $J_{1eq-1ax} = 10.8$ Hz, 1H, H-1eq), 1.58 (m, 2H, H-2') ppm.

HRESI-MS: m/z Calc para $\text{C}_{37}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 607.3279, encontrado: 607.3278.

N-(3-Aminopropil)-1-desoxinojirimicina (77)

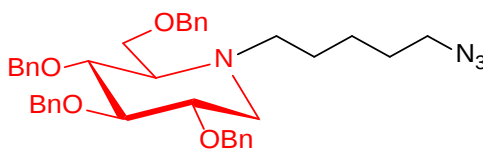


A una solución de *N*-(3-azidopropil)-2,3,4,6-tetra-*O*-bencil-1-desoxinojirimicina **74** (200 mg, 0.33 mmol) en DCM: MeOH (6 mL), fue adicionado Pd(OH)₂/C 20% (210 mg), la mezcla de reacción fue acidificada con HCl 1M. La mezcla de reacción se coloca en agitación a temperatura ambiente en atmosfera de hidrogeno por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, el crudo fue filtrado sobre Celita y concentrado a sequedad, obteniéndose como un aceite incoloro con un rendimiento del 98% (73 mg).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 4.14-3.82 (m, 2H, H-4, H-2), 3.71 (m, 1H, H-6a), 3.62-3.29 (m, 4H, H-6b, H-3, H-1eq, H3', H-6a), 3.29-3.15 (m, 2H, H-6a H-1'a), 3.13-2.87 (m, 3H, H-1'b, H-1ax, H-6b), 2.13 (m, 1H, H-5), 1.21 (m, 2H, H-3') ppm.

HRESI-MS: m/z Calc para C₉H₂₁N₂O₄ ([M+H]⁺): 221.1496, encontrado: 221.1496.

***N*-(5-azidopentil)-2,3,4,6-tetra-*O*-bencil-1-desoxinojirimicina (75)**



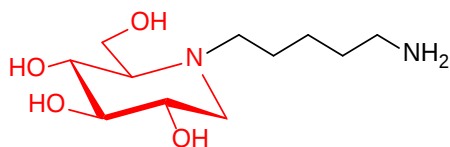
Una solución de 1-desoxinojirimicina **6**, (2 g, 3.8 mmol), y K₂CO₃ (1.5 g, 11.43 mmol, 3 eq.), en DMF (15 mL), se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos, a la mezcla se le adiciono el 6-azido-yodo-pentano **72** (2 g, 8.4 mmol, 2.2 eq.), y esta se mantuvo en agitación a 120 °C durante 5 horas, Se agregó agua destilada (10 mL) y se mantuvo en agitación por 20 minutos. La fase orgánica es extraída con AcOEt y fue lavada con salmuera (4x30 mL) y agua destilada (3x30 mL), secada sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrada y concentrada a sequedad. Columna cromatográfica con un sistema ciclohexano: acetato de etilo 95:5, se obtuvo **75** como un aceite incoloro con un rendimiento del 65% (1.57 g).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.33-7.12 (m, 18H- H-Bn), 7.07 (m, 2H, H-Bn), 4.80 (m, 3H, H-CH₂-Bn), 4.59 (m, 2H, H-CH₂-Bn), 4.36 (m, 3H, H-CH₂-Bn), 3.61 (m, 1H, H-4), 3.56 (m, 1H, H-6), 3.44-3.52 (m, 2H, H-6, H-2), 3.36 (dd, J₃₋₄= 17.5, J₃₋₅=8.5 Hz, 1H, H-3), 3.01 (m,

$J_{\text{gem}} = 11.1$ Hz, $J_{1-2} = 4.9$ Hz, 1H, H-1ax), 2.57 (dd, $J_{\text{gem}} = 16.5$ Hz, $J_{1'-2'} = 9.3$ Hz, 2H, H-1'), 2.44 (m, 2H, H-5'), 2.22 (d, $J_{5-6} = 9.4$ Hz, 1H, H-5), 2.12 (dd, $J_{\text{gem}} = 18.6$ Hz, $J_{1-2} = 7.9$ Hz, 1H, H-1eq), 1.44-1.18 (m, 4H, H-3', H-4'), 1.10 (m, 2H, H-2') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3) δ 138.0 (C-Ph), 137.5 (C-Ph), 136.7 (C-Ph), 127.4 (CH-Ph), 127.3 (CH-Ph), 127.3 (CH-Ph), 127.3 (CH-Ph), 126.8 (CH-Ph), 128.8 (CH-Ph), 126.6 (CH-Ph), 126.5 (CH-Ph), 126.4 (CH-Ph), 86.2 (C-3), 77.6 (C-4), 77.3 (C-2), 74.3 (C-O-CH₂-Ph), 74.1 (C-O-CH₂-Ph), 72.4 (C-O-CH₂-Ph), 71.7 (C-O-CH₂-Ph), 64.4 (C-6), 62.8 (C-5), 53.4 (C-1'), 51.1 (C-5'), 50.3 (C-1), 27.7 (C-4'), 23.5 (C-2'), 22.4 (C-3') ppm.

N-(5-aminopentil)-1-desoxinojirimicina (78)



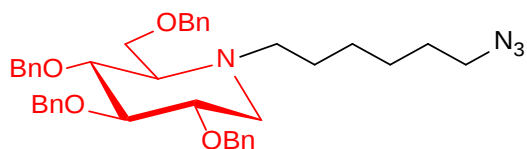
A una solución de 75 (0.9 g, 14 mmol) en MeOH (40 mL), fue adicionado $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 20% (400 mg), la mezcla de reacción fue acidificada con HCl 1M. La mezcla de reacción se coloca en agitación a temperatura ambiente en atmosfera de hidrogeno por 15 horas. Una vez trascurrido el tiempo de reacción, el crudo fue filtrado sobre Celite y concentrado a sequedad, obteniéndose como un aceite incoloro con un rendimiento del 98% (340 mg).

RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ 4.12 (m, 1H, H-6a) 3.90 (m, 1H, H-2), 3.65-3.47 (m, 3H, H-3, H-4, H_e-1), 3.27-3.09 (m, 2H, H-5, H_a-1), 1.83-1.34 (m, 6H, H-2', H-3', H-4') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CD_3OD) 76.7 (C-3), 67.5 (C-4), 66.4 (C-2), 66.3 (C-5), 54.1 (C-6), 53.9 (C-1), 53.4 (C-1'), 39.6 (C-5'), 29.2 (C-4'), 25.9 (C-2'), 22.7 (C-3') ppm.

HRESI-MS: m/z Calc para $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 249.1770, encontrado: 249.1810.

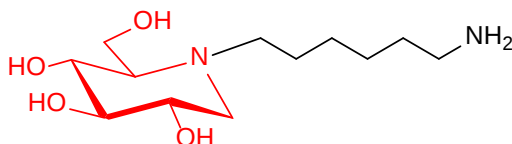
N-(6-azidohexil)-2,3,4,6-tetra-O-bencil-1-desoxinojirimicina (76)



Una solución de 1-desoxinojirimicina per-O-bencilada (**6**) (0.640 g, 1.22 mmol), 1-azida-6-yodo-hexano (0.679 g, 2.68 mmol, 2.2 eq.) y carbonato de potasio (0.505 g, 3.66 mmol, 3 eq.), en DMF (8 mL), se colocaron en agitación a 120 °C, durante 5 horas, bajo atmosfera de argón. La reacción fue detenida con salmuera, y extraída con acetato de etilo (3x50 mL), la fase orgánica fue secada sobre Na₂SO₄, y llevado a sequedad. Columna cromatográfica, usando como eluyente ciclohexano: acetato de etilo 85:15. Obteniendo **76** como un aceite marrón, en un rendimiento del 27% (210 mg). $[\alpha]_D^{25}$ 5 (c 1.32, CH₂Cl₂).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.32-7.11 (m, 20H, H-Bn), 7.11-7.00 (m, 2H, H-Bn), 4.80 (m, 3H, H-CH₂-Bn), 4.59 (m, 2H, H-CH₂-Bn), 4.38 (m, 3H, H-CH₂-Bn), 3.58 (m, 2H, H-4, H-6a), 3.48 (m, 2H, H-2, H-6), 3.38 (dd, J_{2-3} = 9.0 Hz, 1H, H-3), 3.14 (t, $J_{6'-5'}$ = 6.9 Hz, 2H, H-6'), 3.00 (dd, $J_{1ax-1eq}$ = 11.1 Hz, J_{1-2} = 4.8 Hz, 1H, H-1ax), 2.59 (ddd, J_{gem} = 13.5 Hz, J_{1a-2} = 10.4 Hz, J_{1-3} = 5.8 Hz, 1H, H-1a'), 2.46 (m, 1H, H-1b'), 2.22 (d, J_{5-4} = 9.4 Hz, 1H, H-5), 2.13 (dd, $J_{1eq-1ax}$ = 10.8 Hz, 1H, H-1eq), 1.47 (m, 2H, H-5'), 1.39-1.14 (m, 4H, H-3', H-2'), 1.06 (m, 2H, H-4') ppm.

Obtención de N-(6-aminohexil)-1-desoxinojirimicina (79)



A una solución de N-(6-azidohexil)-2,3,4,6-tetra-O-bencil-1-desoxinojirimicina (**76**) (0.210 g, 0.32 mmol) en DCM: MeOH (6 mL), fue adicionado Pd(OH)₂/C 20% (210 mg), la mezcla de reacción fue acidificada con HCl 1M. La mezcla de reacción se coloca en agitación a temperatura ambiente en atmosfera de hidrogeno por 24 horas. Una vez trascurrido el tiempo

de reacción, el crudo fue filtrado sobre Celita y concentrado a sequedad, obteniendo **79** como un aceite incoloro con un rendimiento del 98% (85 mg).

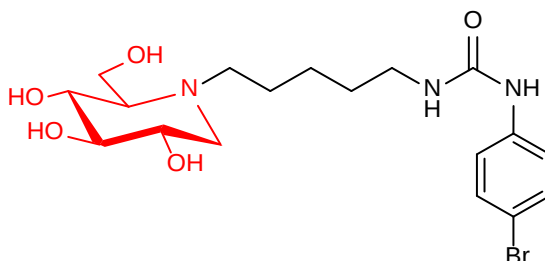
RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ 4.14 (d, J_{4-5} = 12.4 Hz, 1H, H-4), 3.94 (dd, J_{2-1} = 12.9 Hz, J_{2-1} = 2.9 Hz, 1H, H-2), 3.74 (m, 1H, H-6a), 3.62 (t, J_{gem} = 9.7 Hz, 1H, H-6b), 3.49 (dd, J_{3-2} = 12.0 Hz, J_{3-4} = 5.0 Hz, 1H, H-3), 3.41 (dd, J_{gem} = 9.2 Hz, 1H, H-1eq), 3.23 (m, 1H, H-6a), 3.08 (m, 2H, H-1'), 3.01-2.90 (m, 3H, H-1a, H-5, H-6b), 1.90-1.66 (m, 4H, H-3', H-5'), 1.56-1.44 (m, 4H, H-2', H-4') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CD_3OD) δ 76.7 (C-3), 67.5 (C-4), 66.4 (C-2), 66.3 (C-5), 54.1 (C-6), 53.9 (C-1), 53.3 (C-1'), 39.6 (C-6'), 27.0 (C-1'), 25.9 (C-5', C-4'), 25.7 (C-2'), 22.8 (C-3') ppm.

HRESI-MS: m/z calc para $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 263.1965, encontrado: 263.1966.

Formación de ureas, tioureas y selenoureas

N-{5-[N'-p-bromofenilureido]pentil}-1-desoxinojirimicina (81)



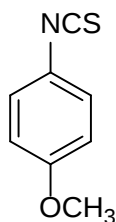
A una solución de la *p*-bromoanilina (99 mg, 0.57 mmol) en DMF (6 mL), previamente enfriada durante 15 minutos, fue adicionado trifosgeno (63 mg, 0.21 mmol, 0.37 eq.) y fueron agitados durante 10 minutos a 0 °C, posteriormente fue adicionada la desoxinojirimicina N-alquilada (120 mg, 0.5 mmol), la mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 0 °C durante 20 minutos y llevada a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de reacción se extrae la fase orgánica con AcOEt (3 x 30 mL) y se realizan lavados con salmuera (3 x 30 mL) y agua destilada (3 x 30 mL) a continuación se secó con Na₂SO₄ anhidro se filtró y se evaporó a presión reducida. Columna cromatográfica con resina acida IR-120, con metanol e hidróxido de amonio 1M. Obteniendo **81** como un aceite incoloro con un rendimiento del 42% (90.6 mg).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 7.53-7.44 (m, 4H, H-2'', H-3'), 3.90-3.79 (m, 2H, H-6a, H-3), 3.72-3.35 (m, 3H, H-4, H-2, H_e-1), 3.01 (m, 1H, H-6_b), 2.80 (m, 2H, H-5'), 2.55 (m, 1H, H_a-1), 2.12 (m, 2H, H-5) 1.67-1.29 (m, 6H, H-2', H-3', H-4') ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, CD₃OD) δ 154.9 (C=O urea), 137.9 (C-1'), 133.8 (C-3'), 122.7 (C-2'), 118.6 (C-4'), 77.7 (C-3), 67.7 (C-4), 67.5 (C-5), 55.5 (C-6), 54.80 (C-1), 38.2 (C-5'), 32.3 (C-1'), 27.80 (C-4'), 24.5 (C-2'), 23.7 (C-3') ppm.

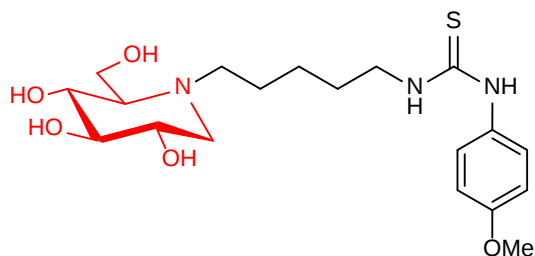
HRESI-MS: m/z Calc para C₁₉BrH₄₉N₃O₆ ([M+H]⁺): 446.1246, encontrada: 446.1281.

Isotiocianato de 4-metoxifenilo (83)



Una solución de *p*-anisidina (0.5 g, 4.05 mmol), en una mezcla DCM:H₂O (50 mL), a la mezcla fue adicionado CaCO₃ (0.812 g, 8.11 mmol, 2 eq.), y trifosgeno (0.7 g, 6.08 mmol, 1.5 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, la reacción fue filtrada separando la fase orgánica, la fase acuosa fue extraída con DCM (3x50 mL), la fase orgánica fue secada sobre Na₂SO₃ anhidro, fue llevada a sequedad y el compuesto fue utilizado sin purificar en la siguiente reacción.

N-{5-[N'-*p*-metoxifeniltioureido]pentil}-1-desoxinojirimicina (85)



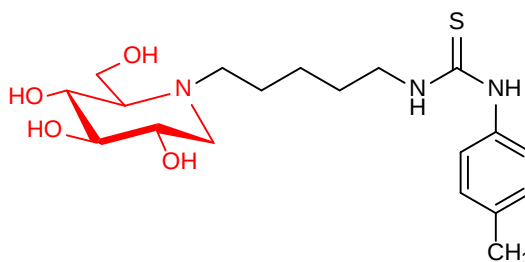
A una solución de desoxinojirimicina N-alkilada **78** (95 mg, 0.4 mmol) en piridina (5mL), la mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se adiciono 4-metoxifenilisotiocianato (110 mg, 0.67 mmol, 1.5 eq.), y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Se evaporo el disolvente hasta sequedad, se purifico mediante lavados con acetato de etilo. Se obtuvo **85** como un sólido color crema en un rendimiento del 67% (91 mg); $[\alpha]_D^{25}$ -4 (c 1.01, CH₃OH).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 7.20 (m, 2H, H-2''), 6.90 (m, 2H, H-3''), 3.88 (m, 1H, H-6_a), 3.80 (s, 3H, H-O-CH₃), 3.63-3.37 (m, 3H, H-2, H-4, H-3), 3.19 (m, 1H, H-6_b), 3.06 (m, 1H, H_a-1) 2.23 (m, 2H, H-5) 1.75-1.35 (m, 6H, H-2', H-3', H-4') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CD_3OD) δ 182.6 (C=S tiourea), 158.6 (C-4''), 130.0 (C-1''), 128.2 (C-2''), 115.7 (C-3''), 78.5 (C-3), 69.4 (C-4), 68.34 (C-2), 67.6 (C-5), 56.3 (C-O-CH₃), 55.3 (C-6), 54.4 (C-1), 45.5 (C-5'), 29.4 (C-4'). 25.0 (C-2'), 24.1 (C-3') ppm.

HRESI-MS: m/z Calc para $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{SO}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 414.2018, encontrado: 414.2053.

N-{5-[N'-p-metilfeniltioureido]pentil}-1-desoxinojirimicina (86)



A una solución de desoxinojirimicina N-alkilada **78** (100 mg, 0.4 mmol) en piridina (5mL), la mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se adiciono 4-metoxifenilisotiocianato (110 mg, 0.7 mmol, 1.5 eq.), y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Se evaporó el disolvente hasta sequedad, se purificó mediante lavados con acetato de etilo. Y posteriormente se purificó en columna cromatográfica con resina ácida IR-120, con metanol y posteriormente con una solución de hidróxido de amonio 1 M. Se obtuvo **86** (81 %, 86 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -1 (c 1.22, CH_3OH).

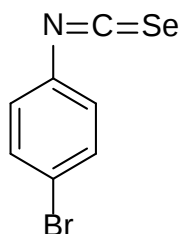
RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ 7.30 (m, 2H, H-2''), 7.16 (m, 2H, H-3''), 3.93 (m, 1H, H-6_a), 3.83-3.57 (m, 3H, H-2, H-4, H-3), 3.25-3.15 (m, 2H, H-6_b, H_a-1), 2.79 (m, 2H, H-5), 2.33 (s, 3H, H-Ph-CH₃), 1.77-1.37 (m, 6H, H-2', H-3', H-4') ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CD_3OD) δ 181.9 (C=S tiourea), 134.7 (C-1''), 132.4 (C-4''), 129.5 (C-2''), 121.2 (C-3''), 80.4 (C-3), 71.8 (C-4), 70.5 (C-2), 67.1 (C-5), 57.2 (C-6), 55.6 (C-1), 53.4 (C-1'), 43.70 (C-5'), 29.7 (C-4'). 27.8 (C-2'), 25.5 (C-3'), 24.7 (C-Ph-CH₃) ppm.

HRESI-MS: m/z Calc para $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{SO}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 398.2069, encontrado: 398.2110.

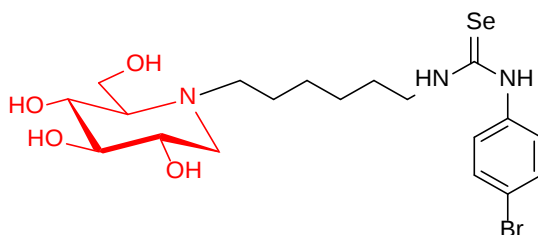
Metodología general para la síntesis de selenoureas

Isoselenocianato de 4-bromofenilo (88)



A una solución de formamida de *p*-bromoanilina, (300 mg, 1.5 mmol), y Et₃N anhidra (0.898 ml, 6.45 mmol, 4.3 eq.), en DCM (5 mL), a la mezcla fue adicionado trifosgeno (0.8 g, 2.7 mmol, 0.54 eq.) en DCM (2 mL), lentamente, bajo atmosfera de argón, se mantuvo a reflujo durante 2.5 horas, posteriormente fue adicionado selenio negro (237 mg, 3 mmol, 2 eq.), y se mantuvo a reflujo durante 7 horas y media, la mezcla fue filtrada sobre Celita con DCM, se llevó a sequedad y fue purificada en columna cromatográfica con hexano, obteniendo **88** en un 45% (261 mg). El compuesto fue utilizado sin caracterización para la siguiente reacción.

N-{6-[N''-(p-Bromofenil)selenoureido]hexil}-1-desoxinojirimicina (90)

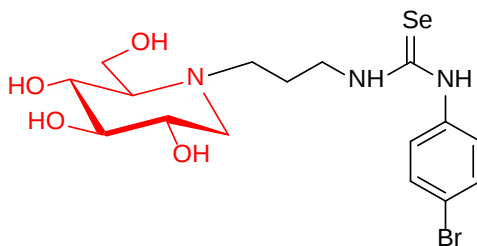


A una solución de la desoxinojirimicina N-alkilada en cadena de 6 con amina terminal **79** (125 mg, 0.476 mmol), en piridina anhidra (3 mL) fue adicionado el isoselenocianato de *p*-bromoanilina **88** (125 mg, 0.48 mmol, 1 eq.), y la mezcla fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente bajo atmosfera de Ar, en obscuridad. La mezcla fue concentrada a sequedad, co-evaporando con tolueno, y purificada mediante lavados con hexano frio. Obteniendo **90** en un rendimiento cuantitativo (249 mg). [α]_D²⁵ -3 (c 0.43, DMSO).

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.46 (m, 4H, H-Ar), 3.87 (m, 1H, H-2), 3.76-3.48 (m, 6H, H-6b, H-4, H-6', H-6a, H-1a), 3.21-2.62 (m, 4H, H-3, H-1b, H-1'), 2.22 (m, 1H, H-5), 1.61 (m, 4H, H-2- H-5) 1.30 (m, 4H, H-3, H-4) ppm.

HRESI-MS: m/z Calc para $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{BrSeO}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 524.0645, encontrada: 524.0646.

N-{3-[N''-(p-Bromofenil)selenoureido]propil}-1-desoxinojirimicina (89)



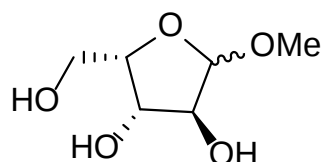
Desoxinojirimicina N-alquilada con cadena de 3 **74** (65 mg, 0.295 mmol) y *p*-bromofenil isoselenocianato (77 mg, 0.295 mmol, 1 eq.) fueron utilizados, purificación mediante lavados con hexano en frío. Obteniendo **89** en un rendimiento cuantitativo (141 mg). $[\alpha]_D^{25}$ -6 (c 0.34, DMSO).

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.48 (m, 4H, H-Ar), 5.57 (s, 1H- OH), 3.85 (m, 1H, H-2), 3.75-3.46 (m, 4H, H-6b, H-4, H-3'), 3.26-3.13 (m, 2H, H-6a, H-1a), 3.13-2.94 (m, 2H, H-3, H-1b), 2.88 (m, 3H, H-1'), 2.03 (m, 1H, H-5), 1.28 (m, 2H, H-2') ppm.

HRESI-MS: m/z Calc para $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{BrSeO}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 482.0188, encontrado: 482.0183.

Derivados de azafagomina

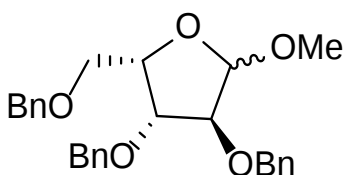
Metil L-xilofuranósido (93)



Una solución de metil-L-xilopiranosido (**92**) (1.57 g, 10.45 mmol), en metanol anhidro (16 mL), se colocó en baño de hielo, bajo agitación constante, durante 30 minutos, posteriormente fue adicionado cloruro de acetilo (0.41 g, 0.373 mL, 5.23 mmol, 0.5 eq.), bajo atmósfera de argón, la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 6 horas, transcurrido este tiempo fue adicionado carbonato de sodio (1.7 g, 16 mmol, 1.53 eq.), y se dejó en agitación durante 30 minutos, transcurrido este tiempo la reacción se filtró sobre celita, con metanol (200 mL), y se llevó a sequedad en el rotavapor; obteniendo **93** de forma cuantitativa (1.50 g).

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CD_3OD) δ 109.4 (C-1), 102.0 (C-1), 82.7 (C-4), 80.6 (C-4), 78.4 (C-2), 77.8 (C-2), 75.9 (C-3), 75.6 (C-3), 61.1 (C-5), 60.9 (C-5), 54.4 (C-OMe) ppm.

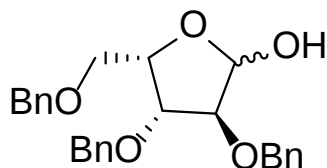
Metil 2,3,5-tri-O-bencil-L-xilofuranósido (94)



Una solución de metil-L-xilosa en su forma furano (1.57 g, 10.46 mmol), en una mezcla DMF: tolueno 1:2 (15 mL/ 30 mL), e hidruro de sodio al 60 % (2.3 g, 57.51 mmol, 5.5 eq.), la mezcla se dejó en agitación bajo atmósfera de argón durante 30 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo fue adicionado bromuro de bencilo (6.61 mL, 57.51 mmol, 5.5 eq.), y se dejó en agitación a 80 °C, durante 7 horas. La reacción fue detenida con agua y lavada con salmuera y extraída con acetato de etilo (3 x 50 mL), la fase orgánica fue

secada con sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. Columna cromatográfica (ciclohexano → ciclohexano: éter etílico 6:1). Obteniendo **94** (81%, 3.70 g).

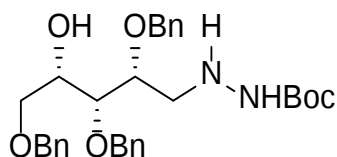
2,3,5-Tri-O-bencil-L-xilofuranosa (95)



Una solución de metil-L-xilosa bencilada (**94**) (3.71 g, 8.53 mmol) en TFA al 80% (40 mL), se mantuvo en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con DCM y se lavó con bicarbonato de sodio y agua, se extrajo con DCM (4 x 50 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y fue llevada a sequedad. Columna cromatográfica (ciclohexano: éter 6:2 → 6:4), obteniendo **95** (2.813 g, 78%).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.46-6.94 (m, 15H, H-Bn), 4.52 (m, 4H, H-CH₂-Bn), 4.45 (s, 1H, H-CH₂-Bn), 4.41 (m, 1H, H-CH₂-Bn), 4.32 (m, 1H, H-1), 3.99 (ddd, *J*₄₋₆= 6.7 Hz, *J*₄₋₅=4.9 Hz, *J*₄₋₆=2.7 Hz, 1H, H-4), 3.92 (dt, *J*₃₋₄= 5.2, *J*₃₋₅=2.6 Hz, 1H, H-3), 3.86 (dd, *J*₂₋₁= 4.2 Hz, *J*₂₋₃=2.3 Hz, 1H, H-2), 3.65 (m, 2H, H-5) ppm.

1-(terc-Butiloxicarbonil)hidrazino-1-desoxi-2,3,5-tri-O-bencil-L-xilitol (96)

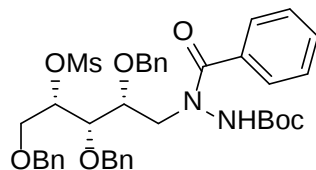


Una solución del anillo de xilosa bencilada hidrolizado **95**, (2.81 g, 6.68 mmol), en metanol (20 mL), se le adiciono tert-butil-carbazato (1.766 g, 13.36 mmol, 2 eq.), ácido acético (0.67 mL), y cianborohidruro de sodio (1.6 g, 25.46 mmol, 3.81 eq.), la mezcla se dejó en agitación durante 18 horas a 60 °C, la reacción fue detenida con bicarbonato de sodio y puesta en agitación durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se lavó con agua y se extrajo con

DCM (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. Columna cromatográfica (DCM: AcOEt 8:1). Obteniendo **96** (2.785 g, 78 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.31-7.04 (m, 15H, H-Bn), 5.13 (s, 1H, NH), 4.53 (d, *J*= 11.5 Hz, 2H, H-CH₂-Bn), 4.44 (d, *J*=5.4 Hz, 1H, H-CH₂-Bn), 4.41 (m, 1H, H-CH₂-Bn), 4.34 (m, 2H, H-CH₂-Bn), 3.93 (m, 1H, H-4), 3.63 (m, 2H, H-5), 3.49-3.29 (m, 2H, H-3, H-2), 2.92 (m, 2H, H-1), 1.35 (s, 9H, H-CH₃) ppm.

1-(1-Benzoil-2-terc-Butiloxicarbonil)hidrazino-1-desoxi-2,3,5-tri-O-bencil-4-O-mesil-L-xilitol (97)

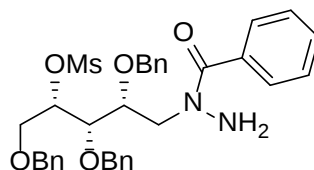


Una solución de *1-(terc-Butiloxicarbonil)hidrazino-1-desoxi-2,3,5-tri-O-bencil-L-xilitol (96)* (1.5 gramos, 2.80 mmol), en DCM anhidro (20 mL), se colocó en agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos, bajo atmosfera de argón, a la mezcla se adiciono cloruro de benzoilo (0.324 mL, 2.80 mmol, 1 eq.), y trietilamina anhidra (2.3 mL, 16.78 mmol, 6 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación durante 10 minutos y se adiciono cloruro de mesilo (0.323 mL, 4.19 mmol, 1.5 eq.), y se dejó en agitación durante 5 minutos, transcurrido el tiempo la reacción fue detenida con agua y diluida con DCM, se lavó con bicarbonato de sodio y se extrajo con DCM (3 x 50 mL), la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad, el compuesto fue utilizado sin ninguna purificación para la siguiente reacción, (cuantitativa, 2.0 g).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.40-7.10 (m, 20H, H-Bn), 5.22 (s, 2H, NH), 4.90 (m, 1H, H-4), 4.47 (m, 6H, H-CH₂-Bn), 4.35-4.15 (m, 2H, H-2, H-1a), 3.93 (m, 1H, H-5a), 3.76 (m, 1H, H-3), 3.57 (m, 2H, H-1), 2.91 (s, 3H, H-CH₃-Ms), 1.24 (s, 9H, H-CH₃-Boc) ppm.

HRESI-MS: (m/z) Calc. para C₃₉H₄₆N₂O₉ [M+H]⁺ 741.2816, observada: 741.2808.

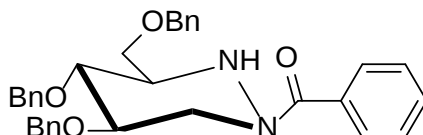
1-(1-Benzoil)hidrazino-1-desoxi-2,3,5-tri-O-bencil-4-O-mesil-L-xilitol (98)



Una solución de **97** (270 mg, 0.37 mmol) en TFA (5 mL), se colocó en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, la reacción fue llevada a sequedad. El compuesto se utilizó sin ninguna purificación para la siguiente reacción. (cuantitativa, 230 mg).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.96 (m, 1H, H-Ar), 7.43-7.05 (m, 19H, H-Ar, H-Bn), 4.92 (m, 1H, H-4), 4.58 (m, 4H, H-CH₂-Bn), 4.35 (m, 2H, H-CH₂-Bn), 4.13-3.95 (m, 3H, H-2, H-5), 3.82 (m, 1H, H-1a), 3.72-3.46 (m, 2H, H-3, H-1b), 2.88 (s, 3H, H-CH₃-Ms) ppm.

(3R,4R,5R)-1-N-benzoil-4,5-dibencil-3-benciloxihexahidropiridazina (99)



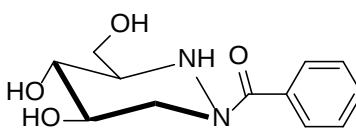
Una solución de **98** (150 mg, 0.24 mmol) en nitrometano (3 mL), se le adiciono etildiisopropilamina (0.124 mL, 0.71 mmol, 3 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación durante toda la noche a 60 °C. Columna cromatográfica (ciclohexano: acetato de etilo 8:2), Obteniendo **99** de forma cuantitativa (120 mg).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.60 (m, 1H, H-Ar), 7.40-7.08 (m, 19H, H-Bn, H-Ar), 4.81 (d, $J_{2-1}=11.1$ Hz, 1H, H-2), 4.61 (m, 3H, H-CH₂-Bn), 4.42 (m, 2H, H-CH₂-Bn), 4.35-4.15 (m, 2H, H-CH₂-Bn, H-1b), 3.99-3.77 (m, 2H, H-3, H-5), 3.76-3.52 (m, 2H, H-5a, H-4), 3.47 (dd, $J_{1a-1b}=14.0$ Hz, $J_{1-2}=2.1$ Hz, 1H, H-1a), 2.87 (s, 1H, NH) ppm.

RMN ^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3) δ 171.0 (C=O), 138.4 (C-ipso), 137.8 (C-ipso), 137.5 (C-ipso), 134.6 (C-1'), 130.5 (C-4'), 130.1 (C-1'), 130.0 (C-4'), 128.6 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.2 (C-Bn), 128.1 (C-Bn), 128.0 (C-Bn), 128.0 (C-Bn), 127.9 (C-Bn), 127.9 (C-Bn), 127.8 (C-Bn), 127.5 (C-Bn), 74.9 (C-2), 73.3 (C-CH₂-Bn), 71.9 (C-3), 70.8 (C-CH₂-Bn), 70.5 (C-CH₂-Bn), 69.1 (C-5), 67.6 (C-4), 39.3 (C-1) ppm.

HRESI-MS: (m/z) Calc. para $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 523.2591, observada: 523.2587.

(3R,4R,5R)-1-N-benzoil-4,5-dihidroxi-3-hidroximetilhexahidropiridazina (101)

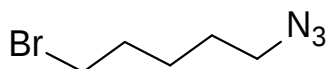


A una solución de la azafagomina bencilada benzoilada **99** (100 mg, 0.19 mmol), en una mezcla DCM: MeOH (6 mL), se le adicionaron 5 gotas de HCl, bajo atmosfera de nitrógeno, posteriormente fue adicionado $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (150 mg), y fue hidrogenado, manteniéndose en agitación durante toda la noche, transcurrido el tiempo la reacción fue purgada con nitrógeno y filtrada sobre Celita con metanol y llevada a sequedad. (Cuantitativa, 48 mg).

RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ 8.20-7.18 (m, 4H, H-Ar), 4.34-3.88 (m, 2H, H-5, H-2), 3.76 (m, 1H, H-1), 3.49 (m, 1H, H-5), 3.23 (m, 1H, H-1), 2.98 (m, 1H, H-3), 2.66 (m, 1H, H-4), 1.35 (s, 1H, NH) ppm.

Formación de derivados del ebselen

1-azido-5-bromopentano (112)



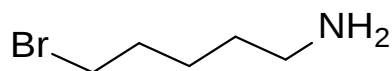
A una solución de 1,5-dibromo-pentano (0.5 g, 0.296 mL, 2.17 mmol) en DMSO (7.5 mL), se le adiciono azida de sodio (0.141 g, 2.17 mmol, 1 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación

durante 20 horas, transcurrido este tiempo la reacción fue lavada con agua y extraída con éter etílico (3 x 50 mL). La reacción procede de forma cuantitativa (410 mg) y fue utilizada para la siguiente reacción sin ninguna purificación.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 3.41 (t, J = 6.7 Hz, 2H, H-4), 3.29 (t, J = 6.8 Hz, 2H, H-3), 1.88 (m, 2H, H-2), 1.62 (m, 2H, H-5), 1.45 (m, 2H, H-1) ppm.

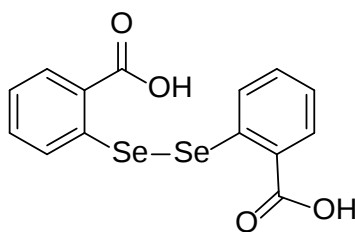
RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 51.2 (C-5), 33.4 (C-1), 32.5 (C-2), 32.2 (C-4), 31.8 (C-3) ppm.

5-bromopentan-1-amina (113)



A una solución de bromo-azido-pentano (0.100 g, 0.5 mmol), en una mezcla THF:H₂O 4.5 mL:3 mL, se le adiciono trifenilfosfina (0.5 g, 1.90 mmol, 3.8 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación durante 3 días, transcurrido este tiempo, la reacción se llevó a sequedad, y fue lavada con NaHCO₃ y extraída con AcOEt (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro, y llevada a sequedad, la reacción procede de forma cuantitativa (82 mg) y fue utilizada sin ninguna purificación para la siguiente reacción.

Ácido 2,2'-diselanodiildibenzoico (107)



A una solución de selenio negro (2 g, 0.25 mmol), e NaOH (1 g, 0.25 mmol) en agua (25 mL), a 0 °C, se adiciono gota a gota una disolución de NaBH₄ (120 mg, 0.03 mmol) e NaOH (166 mg, 0.04 mmol) en agua (10 mL), al terminar la adición se llevó a temperatura ambiente y se mantuvo en agitación contante durante 1 hora bajo atmosfera de argón, transcurrido el tiempo se llevó a reflujo durante 30 minutos.

Al mismo tiempo fue preparada la sal de diazonio, a una solución de ácido antranílico (1.71 g, 0.13 mmol) y HCl 37% (2.4 mL), en agua (14 mL), fue añadido gota a gota a 0 °C, una solución de NaNO₂ (912 mg, 0.13 mmol) en agua (12 mL), y se mantiene en agitación en baño de hielo 30 minutos.

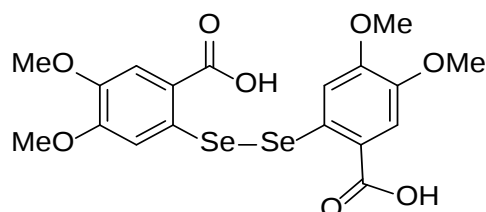
Transcurrido el tiempo de reflujo de la primera reacción, donde se ha formado el Na₂Se₂, la mezcla se deja enfriar, y se añade gota a gota la sal de diazonio a 0 °C, la mezcla de reacción se mantiene en agitación constante bajo atmosfera de argón y en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Por último, la reacción se llevó a ebullición, al alcanzar la temperatura la mezcla se deja enfriar y se filtra sobre Celita al filtrado se le adiciona HCl al 10 % hasta que alcance un pH ácido. El precipitado de color amarillo se filtra y posteriormente, se le añaden MeOH (20 mL), y se mantiene a ebullición durante 5 a 10 minutos; finalmente se filtra en caliente para eliminar el sólido en suspensión y el filtrado se concentra a sequedad, obteniéndose el diselenuro el cual se utilizó directamente en la siguiente reacción, sin ninguna purificación.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.03 (dd, *J*₂₋₃ = 7.7 Hz, *J*₂₋₄=1.4 Hz, 2H, H-2), 7.68 (dd, *J*₅₋₄ = 7.4 Hz, *J*₅₋₃=0.6 Hz, 2H, H-5), 7.49 (td, *J*₃₋₂=*J*₃₋₄=7.4 Hz, *J*₃₋₅=1.5 Hz, 2H, H-3), 7.35 (td, *J*₄₋₅=*J*₄₋₃ = 7.7 Hz, *J*₄₋₂=0.9 Hz, 2H, H-4) ppm.

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.0 (C=O), 134.0 (C-2), 133.9 (C-3), 132.0 (C-6), 130.0 (C-1), 129.2 (C-5), 127.0 (C-4) ppm.

Ácido 6,6'-Diselenanodiilbis(3,4-dimetoxibenzoico) (108)



A una solución de selenio negro (2 g, 0.25 mmol), e NaOH (1 g, 0.25 mmol) en agua (25 mL), a 0 °C, se adiciono gota a gota una disolución de NaBH₄ (120 mg, 0.03 mmol) e NaOH (166mg, 0.04 mmol) en agua (10 mL), al terminar la adición se llevó a temperatura ambiente

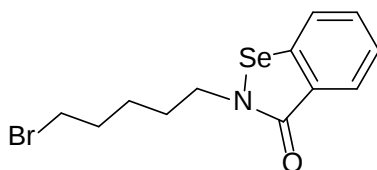
y se mantuvo en agitación constante durante 1 hora bajo atmosfera de argón, transcurrido el tiempo se llevó a reflujo durante 30 minutos.

Al mismo tiempo fue preparada la sal de diazonio, a una solución de ácido antranílico dimetoxilado (1.71 g, 0.13 mmol) y HCl 37% (2.4 mL), en agua (14 mL), fue añadido gota a gota a 0 °C, una solución de NaNO₂ (912 mg, 0.13 mmol) en agua (12 mL), y se mantiene en agitación en baño de hielo 30 minutos.

Transcurrido el tiempo de reflujo de la primera reacción, ya se ha formado el Na₂Se₂, la mezcla se deja enfriar, y se añade gota a gota la sal de diazonio a 0 °C, la mezcla de reacción se mantiene en agitación constante bajo atmosfera de argón y en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Por último, la reacción se llevó a ebullición, al alcanzar la temperatura la mezcla se deja enfriar y se filtra sobre Celita al filtrado se le adiciona HCl al 10 % hasta que alcance un pH ácido. El precipitado de color amarillo se filtra y posteriormente, se le añaden MeOH (20 mL), y se mantiene a ebullición durante 5 a 10 minutos; finalmente se filtra en caliente para eliminar el sólido en suspensión y el filtrado se concentra a sequedad, obteniéndose el diselenuro el cual se utilizó directamente en la siguiente reacción, sin ninguna purificación.

2-(5-bromopentil)benzo[d][1,2]selenazol-3(2H)-ona (114)

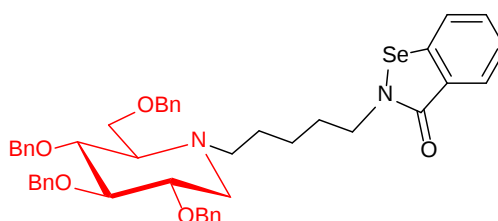


Una solución de diselenuro de ácido antranílico (0.228 g, 0.57 mmol), en DMF (0.120 mL) y SOCl₂ (3.34 mL, 80.9 eq.), se puso a reflujo durante 2 horas bajo atmosfera de argón, y se llevó a sequedad, se redisolvió en 2 mL de DMF a esta mezcla fue adicionado a 0 °C, bromo-amino-pentano (0.090 g, 0.54 mmol) en DMF (3 mL), Et₃N anhidra (0.218 g, 0.300 mL, 2.15 mmol, 4 eq.), y DMF anhidro (0.102 g, 0.108 mL, 1.39 mmol, 2.59 eq.), la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente, en oscuridad, bajo atmosfera de argón, durante 16 horas. Se eliminó el disolvente. Columna cromatográfica (DCM → DCM: Acetona 7:3), Obteniendo **114** (95 mg, 51%).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.89 (m, 1H, H-4'), 7.55 (m, 1H, H-5'), 7.44 (m, 1H, H-6'), 7.36 (m, 1H, H-7'), 2.83 (m, 2H, H-1), 2.74 (m, 2H, H-5), 1.90 (m, 2H, H-2), 1.30 (m, 2H, H-4), 0.78 (m, 2H, H-3) ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 162.9 (C=O), 132.1 (C-3a'), 132.1 (C-6'), 132.0 (C-7'), 131.9 (C-5'), 128.6 (C-4'), 128.5 (C-7a'), 53.5 (C-5), 45.4 (C-1), 36.5 (C-2), 31.4 (C-3), 21.1 (C-4) ppm.

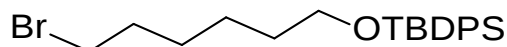
2,3,4,6-Tetra-O-Bencil-N-[5-(3-oxobenzo[d][1,2]selenazol-2(3H)-il)pentil] (115)



A una solución de desoxinojirimicina bencilada (0.1 g, 0.19 mmol), en DMF (3mL), fue adicionada la fracción del ebselen en cadena de 5 (0.095 g, 0.27 mmol, 1.43 eq.) y K_2CO_3 (0.052 g, 0.38 mmol, 2 eq.) como catalizador, la reacción se montó a 85 °C durante 7 horas. Se lavo con salmuera y se extrajo con acetato de etilo (5 x 50 mL). Columna cromatográfica (DCM $\rightarrow$ DCM: MeOH 1:1). No caracterizado.

Derivados de donepezilo

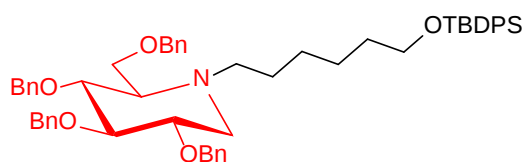
((6-bromohexil)oxi)(tert-butil)difenilsilano (117)



A una solución de 6-bromohexanol (1.5 g, 1.08 mL, 8.28 mmol), en DCM (13 mL), se le adiciono imidazol (0.620 g, 9.11 mmol, 1.1 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos y fue adicionado TBDPSCl (2.27 g, 2.15 mL, 8.28 mmol, 1 eq.), la reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 horas, la reacción fue lavada con una solución saturada de cloruro de amonio, y fue extraída con DCM (3 x 50 mL),

posteriormente la fase acuosa fue extraída con una mezcla Hx:AcOEt 1:1, las fases orgánicas fueron mezcladas y lavadas con salmuera 2 veces y una más con agua, finalmente la fase acuosa fue extraída con DCM (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. Columna cromatográfica (Hexano). Obteniendo **117** (2.395 g, 69%). El compuesto fue utilizado sin ninguna caracterización para la siguiente reacción.

Tetra-O-bencil-N-[5-(terc-butildifenilsilil)oxi]hexil (119)



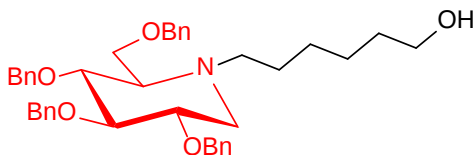
A una solución de desoxinojirimicina per-*O*-bencilada (**6**) (1 gr, 1.90 mmol) en DMF (10 mL), fue adicionado bromo-hexanol protegido **117**, (2.395 g, 5.75 mmol, 3 eq.), y K₂CO₃ (0.791 g, 5.72 mmol, 3 eq.), la mezcla se mantuvo a 120 °C, durante 13 horas, transcurrido este tiempo la reacción fue lavada con salmuera y extraída con acetato de etilo (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. Columna cromatográfica (hexano: acetato de etilo 98:2 → 7:3), obteniendo **119** (0.957 g, 58 %).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.35-7.22 (m, 26H, H-Bn, H-Ar), 7.20 (m, 2H, H-Ar), 7.13 (m, 2H, H-Ar), 4.95 (dd, *J* = 14.4, 8.8 Hz, 1H, H-CH₂-Bn), 4.87 (m, 1H, H-CH₂-Bn), 4.81 (m, 1H, H-CH₂-Bn), 4.67 (m, 3H, H-CH₂-Bn), 4.46 (m, 2H, H-CH₂-Bn), 3.70 (dd, *J* = 10.3, 5.6 Hz, 1H, H-4), 3.57 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-6a), 3.51 (m, 1H, H-6b), 3.46 (m, 2H, H-2, H-3), 3.08 (dd, *J* = 11.1, 4.8 Hz, 1H, H-1ax), 2.59 (m, 2H, H-1'), 2.30 (m, 2H, H-6'), 2.21 (m, 1H, H-1eq), 1.69-1.59 (m, 5H, H-4', H-3', H-5'), 1.30-1.24 (m, 3H, H-2', H-4'), 1.05 (s, 9H, H-CH₃) ppm.

RMN ¹³C (125.5 MHz, CDCl₃) δ 161.2 (C-Ph), 138.6 (C-Ph), 134.1 (C-Ph), 134.0 (C-Ph), 129.6 (CH-Ph), 128.6 (CH-Ph), 128.5 (CH-Ph), 128.4 (CH-Ph), 128.4 (CH-Ph), 128.3 (CH-Ph), 127.9 (CH-Ph), 127.9 (CH-Ph), 127.0 (CH-Ph), 87.4 (C-3), 78.6 (C-4), 75.3 (C-2), 75.2 (C-O-CH₂-Ph), 73.5 (C-O-CH₂-Ph), 72.8 (C-O-CH₂-Ph), 71.3 (C-O-CH₂-Ph), 64.1 (C-6),

63.6 (C-5), 54.5 (C-1'), 52.4 (C-6'), 50.8 (C-1), 28.5 (C-5'), 27.3 (C-2'), 25.8 (C-3'), 25.6 (C-CH₃), 25.5 (C-CH₃), 25.4 (C-4'), 21.0 (C-C-tertbutilo) ppm.

2,3,4,6-Tetra-O-bencil-N-(6-hidroxipentil) (121)

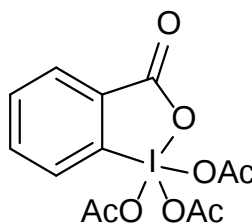


A una solución de **119** (0.957 g, 1.11 mmol) en THF (6 mL), se le adiciono TBAF (0.696 g, 2.66 mmol, 2.4 eq., 2.66 mL), la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 20 horas, la reacción fue lavada con salmuera 2 veces y una más con agua y fue extraída con DCM (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. Columna cromatográfica (hexano: acetato de etilo 9:1 → acetato de etilo), obteniendo **121** (222 mg, 32%).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.39 -7.19 (m, 23H, H-Bn), 7.13 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-Bn), 4.95 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H-CH₂-Bn), 4.87 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H-CH₂-Bn), 4.81 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, H-CH₂-Bn), 4.66 (m, 2H, H-CH₂-Bn), 4.51-4.38 (m, 3H, H-CH₂-Bn), 3.66 (m, 1H, H-4), 3.60 (s, 1H, H-6), 3.57 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-3, H-2), 3.53 (m, 1H, H-1'), 3.46 (m, 1H, H-1'), 3.08 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, H-1ax), 2.63 (m, 2H, H-6'), 2.30 (m, 1H, H-5), 2.23 (m, 1H, H-1eq), 1.63 (m, 2H, H-3'), 1.55 (m, 1H, H-4'), 1.29 (m, 3H, H-5', H-4'), 1.16 (m, 2H, H-2') ppm.

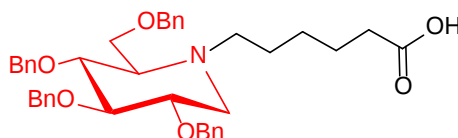
RMN ¹³C (125.5 MHz, CDCl₃) δ 139.0 (C-Ph), 138.6 (C-Ph), 137.8 (C-Ph), 128.5 (CH-Ph), 128.4 (CH-Ph), 128.4 (CH-Ph), 128.4 (CH-Ph), 127.9 (CH-Ph), 127.9 (CH-Ph), 127.7 (CH-Ph), 127.6 (CH-Ph), 127.5 (CH-Ph), 87.4 (C-3), 78.6 (C-4), 78.5 (C-2), 75.4 (C-O-CH₂-Ph), 75.2 (C-O-CH₂-Ph), 73.5 (C-O-CH₂-Ph), 72.8 (C-O-CH₂-Ph), 65.3 (C-6), 63.7 (C-5), 62.8 (C-1'), 54.5 (C-6'), 52.3 (C-1), 32.8 (C-5'), 27.3 (C-4'), 25.6 (C-2'), 23.6 (C-3') ppm.

Peryodinano de Dess-Martin (121)



Se preparo de acuerdo con una modificación del método descrito por Dess y Martin [x]. A una solución de KBrO_3 (10.1 g, 60.48 mmol), y H_2SO_4 2M (95.5 mL) a 60 °C bajo atmosfera de argón, fue adicionado poco a poco acido 2-yodobenzoico (10.2 g, 41.12 mmol), en un lapso de 10 minutos, la mezcla se mantuvo en agitación a 65 °C durante 2.5 horas, posteriormente la reacción fue enfriada a 2-3 °C formándose un precipitado el cual fue filtrado y posteriormente lavado con agua (60 mL), etanol absoluto (2 x 10 mL), y agua (60 mL). El sólido resultante se coloca en una solución de Ac_2O (40 mL) y AcOH (21 mL), esta se calienta a 80 °C, bajo atmosfera de argón hasta completa disolución. La mezcla fue enfriada lentamente hasta temperatura ambiente. El precipitado resultante fue filtrado y lavado con Et_2O anhidro bajo atmosfera de argón. (14.5 g, 83%).

2,3,4,6-Tetra-O-bencil-N-(5-Carboxipentil)1-desoxinojirimicina (123)



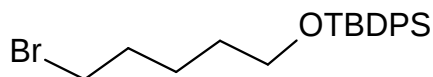
A una solución del iminoazúcar con hidroxilo terminal en cadena de 6 (**121**) (20 mg, 0.03 mmol), en DCM (5 mL), se le adiciono reactivo de Dess-martin (14 mg, 0.032 mmol, 1 eq.), y se mantuvo en agitación durante 40 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo la reacción fue lavada con una solución de NaOH 1 M y fue extraída con éter etílico (3 x 20 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. La reacción no requiere purificación (cuantitativa, 20 mg).

Dicha reacción se llevó a cabo también a 0 °C, -30 °C, -45 °C, en condiciones anhidras, y con medio equivalente de Dess-Martin, sin embargo, todas llevaron al mismo resultado, el ácido carboxílico **123**.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.59 (m, 1H, H-Bn), 7.37 – 7.19 (m, 23H, H-Bn), 7.13 (m, 2H, H-Bn), 4.96 (dd, $J = 10.7, 6.1$ Hz, 1H, H- $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.86 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, H- $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.80 (m, 1H, H- $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.67 (m, 2H, H- $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.48 (m, 2H, H- $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.41 (dd, $J = 11.4, 5.4$ Hz, 1H, H- $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 3.62-3.58 (m, 3H, H-6, H-4), 3.54 (dt, $J = 15.5, 13.0$ Hz, 1H, H-2), 3.45 (m, 1H, H-3), 3.08 (dd, $J = 11.1, 4.8$ Hz, 1H, H-1ax), 2.60 (m, 2H, H-1'), 2.32 (m, 1H, H-5), 2.21 (m, 1H, H-1eq), 1.66 (m, 2H, H-5'), 1.59-1.46 (m, 4H, H-3', H-4'), 1.45-1.29 (m, 6H, H-2', H-3', H-4'), 1.19 (m, 2H, H-2') ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 167.8 (C=O), 139.0 (C-Ph), 138.5 (C-Ph), 137.8 (C-Ph), 132.4 (CH-Ph), 130.9 (CH-Ph), 128.8 (CH-Ph), 128.5 (CH-Ph), 128.4 (CH-Ph), 128.4 (CH-Ph), 128.4 (CH-Ph), 128.3 (CH-Ph), 127.9 (CH-Ph), 127.9 (CH-Ph), 127.9 (CH-Ph), 127.7 (CH-Ph), 127.6 (CH-Ph), 127.5 (CH-Ph), 87.4 (C-3), 78.6 (C-4), 75.3 (C-2), 75.2 (C-O- $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 73.5 (C-O- $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 72.8 (C-O- $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 68.2 (C-O- $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 63.7 (C-6), 62.9 (C-5), 54.4 (C-1'), 52.3 (C-1), 38.7 (C-5'), 32.7 (C-5'), 30.4 (C-4'), 28.9 (C-4'), 27.2 (C-2'), 25.6 (C-2'), 23.7 (C-3'), 23.0 (C-3') ppm.

{[5-bromopentil]oxi}(terc-butil)difenilsilano (116)

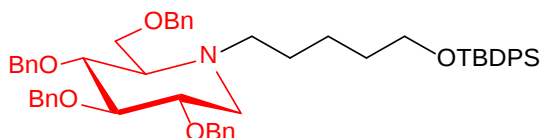


A una solución de 5-bromo-pentanol (0.5 g, 0.36 mL, 2.99 mmol), en DCM (5 mL), se le adiciono imidazol (0.224 g, 3.29 mmol, 1.1 eq.), la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos y fue adicionado TBDPSCl (0.822 g, 0.778 mL, 2.99 mmol, 1 eq.), la reacción se mantuvo en agitación contante a temperatura ambiente durante 24 horas, la reacción fue lavada con una solución saturada de cloruro de amonio, y fue extraída con DCM (3 x 50 mL), posteriormente la fase acuosa fue extraída con una mezcla Hx:AcOEt 1:1, las fases orgánicas fueron mezcladas y lavadas con salmuera 2 veces y una más con agua, finalmente la fase acuosa fue extraída con DCM (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. Columna cromatográfica (Hexano). Obteniendo **116** (1.081 g, 89%). El compuesto fue utilizado sin ninguna caracterización para la siguiente reacción.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.66 (d, $J = 7.6$ Hz, 4H, H-Ph), 7.50 – 7.33 (m, 6H, H-Ph), 3.66 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, H-5), 3.38 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-1), 1.84 (m, 2H, H-2), 1.58 (m, 2H, H-4), 1.51 (m, 2H, H-3), 1.05 (s, 9H, H- CH_3) ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 135.6 (C-Ph), 134.0 (C-Ph), 129.6 (C-Ph), 127.6 (C-Ph), 63.6 (C-5), 33.9 (C-1), 32.5 (C-2), 31.6 (C-3), 26.9 (C- CH_3), 24.5 (C-4), 19.2 (C-tertbutilo) ppm.

Tetra-O-bencil-N-[5-(terc-butildifenilsilil)oxi]pentil (118)



A una solución de desoxinojirimicina per-*O*-bencilada (**6**) (0.500 g, 0.95 mmol) en DMF (5 mL), fue adicionado bromo-pentanol protegido **116**, (1.157 g, 2.86 mmol, 3 eq.), y K_2CO_3 (0.395 g, 2.86 mmol, 3 eq.), la mezcla se mantuvo a 120 °C, durante 7 horas, transcurrido este tiempo la reacción fue lavada con salmuera y extraída con acetato de etilo (3 x 50 mL), la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y llevada a sequedad. Columna cromatográfica (hexano: acetato de etilo 98:2 $\rightarrow$ 7:3), obteniendo **118** (0.550 g, 68 %).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.79-7.59 (m, 10H, H-Ph), 7.21 (m, 20H, H-Bn), 5.16-4.37 (m, 8H, H- $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 3.63 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-4), 3.60 (m, 1H, H-6), 3.56 (m, 1H, H-6), 3.54-3.49 (m, 3H, H-1', H-2), 3.44 (m, 1H, H-3), 3.13 (m, 1H, H-1ax), 2.63 (m, 2H, H-5'), 2.27 (m, 1H, H-5), 2.01 (m, 1H, H-1eq), 1.62-1.53 (m, 3H, H-3'), 1.52-1.46 (m, 3H, H-4', H-3'), 1.39 (m, 3H, H-4', H-2'), 1.35-1.17 (m, 3H, H-2'), 1.07 (s, 9H, H- CH_3) ppm.

RMN ^{13}C (125.5 MHz, CDCl_3) δ 134.0 (C-Ph), 129.7 (C-Ph), 129.7 (C-Ph), 129.6 (C-Ph), 129.1 (C-Ph), 129.1 (C-Ph), 128.9 (CH-Ph), 128.9 (CH-Ph), 128.8 (CH-Ph), 128.7 (CH-Ph), 128.7 (CH-Ph), 128.6 (CH-Ph), 128.5 (CH-Ph), 128.4 (CH-Ph), 128.4 (CH-Ph), 128.3 (CH-Ph), 128.2 (CH-Ph), 128.2 (CH-Ph), 128.0 (CH-Ph), 128.0 (CH-Ph), 128.0 (CH-Ph), 127.9 (CH-Ph), 127.9 (CH-Ph), 127.7 (CH-Ph), 127.7 (CH-Ph), 127.5 (CH-Ph), 75.4 (C-3), 75.3

(C-4), 73.5 (C-2), 71.3 (C-O-CH₂-Ph), 70.7 (C-O-CH₂-Ph), 70.1 (C-O-CH₂-Ph), 69.2 (C-O-CH₂-Ph), 66.4 (C-6), 63.9 (C-5), 63.7 (C-1'), 62.8 (C-5'), 32.5 (C-4'), 32.4 (C-2'), 27.0 (C-CH₃), 22.1 (C-3'), 19.3 (C-Tertbutilo) ppm.

I.8. Referencias bibliográficas capítulo I

- 1 . Organización mundial de la salud (OMS), (2017) <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>. Actualizado en febrero del 2017. Consultado el 21 de septiembre de 2020, 2:29 pm.
2. Xu, T.P.; Shen, H.; Liu, L.X.; Shu, Y.Q. *Asian Pacific J Cancer Prev.* **2013**, 14 (4), 2325-2331.
3. Sagar, S.; Esau, L.; Moosa, B.; Khashab, N.M.; Bajic, V.B.; Kaur, M. *Anticancer Agents Med Chem.* **2014**, 14, 170-180.
4. Newman, D.J.; Cragg, G.M. *Nat. Prod. Chem. Drug Discov.* **2010**, 18, 3-27.
5. Saklani, A.; Kutty, S.K. *Drug Discov Today* **2008**, 13, 161-171.
6. Qiu, J.X.; He, Y.G.; Wang, Y.; Xu, R.L.; Qin, Y.; Shen, X.; Zhou, S.F.; Mao, Z.F. *Med Sci Monit Basic Res.* **2013**, 19, 228-236.
- 7 . American Cáncer Society, (2020), Tratamientos y efectos secundarios, <http://www.cancer.org/espanol/servicios/tratamientosyefectossecundarios/quimioterapia/fragmentado/principios-de-la-quimioterapia-analisis-exhaustivo-de-las-tecnicas-y-su-papel-en-el-tratamiento-contra-el-cancer-types-of-chemo-drugs>, Actualizado el 08 de marzo del 2020. Actualizado el 21 de septiembre de 2020, 10.30 am.
8. Minakata, S. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 1172-1182.
9. Rising, T. W. D. F.; Claridge, T. D. W.; Moir, J. W. B.; Fairbanks, A. *J. ChemBioChem* **2006**, 7, 1177-1180.
10. Laphookhieo, S.; Phungpanya, C.; Tantapakul, C.; Techa, S.; Tha-in, S.; Narmdorkmai, W. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, 22, 176-178.
11. Zhanel, G. G.; Walters, M.; Noreddin, A.; Vercaigne, L. M.; Wierzbowski, A.; Embil, J. M.; Gin, A. S.; Douthwaite, S.; Hoban, D. *J. Drugs* **2002**, 62, 1771-1804.
12. Guilford, W. J.; Shaw, K. J.; Dallas, J. L.; Koovakkat, S.; Lee, W.; Liang, A.; Light, D. R.; McCarrick, M. A.; Whitlow, M.; Ye, B.; Morrissey, M. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 5415-5425.
13. Vassilev, L. T.; Vu, B. T.; Graves, B.; Carvajal, D.; Podlaski, F.; Filipovic, Z.; Kong, N.; Kammlott, U.; Lukacs, C.; Klein, C.; Fotouhi, N.; Liu, E. A. *Science* **2004**, 303, 844-848.
14. Zavarin, I. V.; CHertkova, V. V.; Levina, I. S.; Chernoburova, E. I. *Russ. Chem. Rev.* **2011**, 80, 661-682.

-
15. Szécsi, M.; Ondré, D.; Tóth, I.; Magony, S.; Wölfling, J.; Schneider, G.; Julesz, J. *Acta Biol. Hung* **2010**, *61*, 274-281.
16. Zhang, Y.L.; Ya-Fei Li, Y.F.; Wang, J.W.; Yu, B.; Shi, Y.K.; Liu, H.M. *Steroids* **2016**, *109*, 22-28.
17. Jarman, M.; Barrie, S. E.; Llera, J. M. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5375-5381.
18. Boger, D. L.; Labroli, M. A.; Marsilje, T. H.; Jin, Q.; Hedrick, M. P.; Baker, S. J.; Shim, J. H.; Benkovic, S. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1075-1086.
19. Fitzmaurice, C.; Allen, C.; Barber, R.M.; Barregard, L.; Bhutta, Z.A.; Brenner, H.; Dicker, D.J.; Chimed-Orchir, O.; Dandona, R.; Dandona, L.; Fleming, T.; Forouzanfar, M.H.; Hancock, J.; Hay, R.J.; Hunter-Merrill, R.; Huynh, C.; Hosgood, H.D.; Johnson, C.O.; Jonas, J.B.; Khubchandani, J.; Kumar, G.A.; Kutz, M.; Lan, Q.; Larson, H.J.; Liang, X.; Lim, S.S.; Lopez, A.D.; MacIntyre, M.F.; Marczak, L.; Marquez, N.; Mokdad, A.H.; Pinho, C.; Pourmalek, F.; Salomon, J.A.; Sanabria, J.R.; Sandar, L.; Sartorius, B.; Schwartz, S.M.; Shackelford, K.A.; Shibuya, K.; Stanaway, J.; Steiner, C.; Sun, J.; Takahashi, K.; Vollset, S.E.; Vos, T.; Wagner, J.A.; Wang, H.; Westerman, R.; Zeeb, H.; Zoeckler, L.; Abd-Allah, F.; Ahmed, M.B.; Alabed, S.; Alam, N.K.; Aldhahri, S.F.; Alem, G.; Alemayohu, M.A.; Ali, R.; Al-Raddadi, R.; Amare, A.; Amoako, Y.; Artaman, A.; Asayesh, H.; Atnafu, N.; Awasthi, A.; Saleem, H.B.; Barac, A.; Bedi, N.; Bensenor, I.; Berhane, A.; Bernabé, E.; Betsu, B.; Binagwah, A.; Boneya, D.; Campos-Nonato, I.; Castañeda-Orjuela, C.; Catalá-López, F.; Chiang, P.; Chibueze, C.; Chitheer, A.; Choi, J.Y.; Cowie, B.; Damtew, S.; das Neves, J.; Dey, S.; Dharmaratne, S.; Dhillon, P.; Ding, E.; Driscoll, T.; Ekwueme, D.; Endries, A.Y.; Farvid, M.; Farzadfar, F.; Fernandes, J.; Fischer, F.; G/Hiwot, T.T.; Gebru, A.; Gopalani, S.; Hailu, A.; Horino, M.; Horita, N.; Hussein, A.; Huybrechts, I.; Inoue, M.; Islami, F.; Jakovljevic, M.; James, S.; Javanbakht, M.; Jee, S.H.; Kasaeian, A.; Kedir, M.S.; Khader, Y.S.; Khang, Y.H.; Kim, D.; Leigh, J.; Linn, S.; Lunevicius, R.; El Razek, H.M.A.; Malekzadeh, R.; Malta, D.C.; Marcenes, W.; Markos, D.; Melaku, Y.A.; Meles, K.G.; Mendoza, W.; Mengiste, D.T.; Meretoja, T.J.; Miller, T.R.; Mohammad, K.A.; Mohammadi, A.; Mohammed, S.; Moradi-Lakeh, M.; Nagel, G.; Nand, D.; Le Nguyen, Q.; Nolte, S.; Ogbo, F.A.; Oladimeji, K.E.; Oren, E.; Pa, M.; Park, E.K.; Pereira, D.M.; Plass, D.; Qorbani, M.; Radfar, A.; Rafay, A.; Rahman, M.; Rana, S.M.; Søreide, K.; Satpathy, M.; Sawhney, M.; Sepanlou, S.G.; Shaikh, M.A.; She, J.; Shiue, I.; Shore, H.R.; Shrive, M.G.; So, S.; Soneji,
-

S.; Stathopoulou, V.; Stroumpoulis, K.; Sufiyan, M.B.; Sykes, B.L.; Tabarés-Seisdedos, R.; Tadese, F.; Tedla, B.A.; Tessema, G.A.; Thakur, J.S.; Tran, B.X.; Ukwaja, K.N.; Uzochukwu, B.S.C.; Vlassov, V.V.; Weiderpass, E.; Wubshet Terefe, M.; Yebyo, H.G.; Yimam, H.H.; Yonemoto, N.; Younis, M.Z. Yu, C.; Zaidi, Z.; Zaki, M.E.S.; Zenebe, Z.M.; Murray, C.J.L.; Naghavi, M. *JAMA Oncol.* **2017**, 3, 524-548.

20. Jamal M.S.; Parveen S.; Beg M.A.; Suhail M.; Chaudhary A.G.A. *PLoS ONE* **2014**, 9, 1-12.

21. Secretaría de Salud [SSA], (2017), Cáncer, tercera causa de muerte en México. <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>.

Actualizado el 08 de agosto del 2017. Consultado el 30 de septiembre de 2020, 6:50 pm.

22. Organization Mundial de la Salud (OMS), (2007), The World Health Organization's Fight against cancer. Strategies that prevent, cure and care. Suiza: WHO. <http://www.who.int/cancer/publicat/WHOCancerBrochure2007.FINALweb.pdf>. Consultado el 22 de septiembre del 2020, 11:45 am.

23. García-Galaz, A.; Gutiérrez-Millán, L.E.; Acedo-Félix, E.; Burgos-Hernández, A.; López-Torres, M.; Valdés-Covarrubias, M.; Burboa-Zazueta, M.G. *Biotechnia* **2013**, 15, 25-32.

24. Cooper, G.; Hausman, R. (2009), The cell. 5th ed. American Society for Microbiology. Edit. ASM Press and Sinauer Associates, Inc. Washington, D.C.

25. Organización mundial de la salud (OMS); (2014) <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>. Actualizado en febrero del 2017. Consultado el 22 de agosto de 2020, 11:14 am.

26. Kumar, S.; Gautam, S.; Sharma, A. *Mutat Res.* **2013**, 755, 30-41.

27. Kawamura, M.; Kuriyama, I.; Maruo S.; Kuramochi K.; Tsubaki K.; Yoshida H.; Mizushima Y. *PLoS ONE* **2014**, 9, 1-14.

28. Xu, T.P.; Shen, H.; Liu, L.X.; Shu, Y.Q. *Asian Pacific J Cancer Prev.* **2013**, 14 (4), 2325-2331.

29. Gonzaga de Freitas Araújo, M.; Hilario, F.; Vilegas, W.; Campaner dos Santos, L.; Brunetti, I.L.; Sotomayor, C.E.; Bauab, T.M. *Int J Mol Sci.* **2012**, 13, 9260-9277.

30. American cancer society; Tipos de medicamentos de quimioterapia; (2020) <http://www.cancer.org/espanol/servicios/tratamientosyefectossecundarios/quimiotrapia/frag>

mentado/principios-de-la-quimioterapia-analisis-exhaustivo-de-lastecnicas-y-su-papel-en-el-tratamiento-contra-el-cancer-types-of-chemo-drugs_ Consultado el 30 de septiembre del 2020, 1:30 pm.

31. Kinghorn, A.D.; Pan, L.; Fletcher, J.N.; Chai, H. *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 1539–1555.
32. Costantino, L.; Barlocco, D. *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 65-85.
33. Pfisterer, P.H.; Wolber, G.; Efferth, T.; Rollinger, J.M.; Stuppner, H. *Curr. Pharm. Design* **2010**, 16, 1718- 1741.
34. Reyes, C.P.; Muñoz-Martínez, F.; Llanos, G.G.; Núñez, M.J.; Torrecillas, I.R.; Araujo, L.M.; Jiménez, I.A.; Castanys, S.; Moujir, L.; Campillo, M.; Gamarro, F.; Bazzocchi, I.L. *Biocáncer* **2011**, 5, 171-182.
35. Ahmad, A.; Banerjee, S.; Wang, Z.; Kong, D.; Sarkar, F.H. *J Cell Biochem.* **2008**, 105, 1461–1471.
36. Yan, W.; Wang, T.Y.; Fan, Q.M.; Du, L.; Xu, J.K.; Zhai, Z.J.; Li, H.W.; Tang, T.T. *Acta Pharmacol Sin.* **2014**, 35, 124–134.
37. Sagar, S.; Esau, L.; Moosa, B.; Khashab, N.M.; Bajic, V.B.; Kaur, M. *Anticancer Agents Med Chem.* **2014**, 14, 170-180.
38. Panico, R.; Powell, W.; Richer, J. C.; *A guide to IUPAC nomenclature of organic compounds*, Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1993.
39. Moss, J. P. *Pure Appl. Chem.* **1995**, 67, 1307-1375.
40. Dewick, P. M. *Medicinal natural products. A Biosynthetic Approach*; 2nd Ed. John Wiley & Sons: Chichester. **2002**, 232-233.
41. Gavaskar, D.; Suresh Babu, A.R.; Raghunathan, R.; Dharani, M.; Balasubramanian, S. *Steroids* **2016**, 109, 1–6.
42. Salvador, J. A.; Carvalho, J. F.; Neves, M. A.; Silvestre, S. M. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, 30, 324-374.
43. Perreault, M.; Maltais, R.; Dutour, R.; Poirier, D. *Steroids* **2016**, 115, 105–113.
44. Bózsitya, N.; Minoricsa, R.; Szabób, J.; Mernyákb, E.; Schneiderb, G.; Wölflingb, J.; Wangc, H.C.; Wuc, C.C.; Ocsovszki, IO.; Zupkóa, I.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2017**, 165, 247-257.
45. Yan-Ling, Z.; Ya-Fei, L.; Jun-Wei, W.; Bin, Y.; Yun-Kai, S.; Hong-Min, L. *Steroids* **2016**, 109, 22–28.

-
46. Al-Mohizeaa, A.M.; Al-Omarb, M.A.; Abdallac, M.M.; Amrd, A.G.E. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, 50, 171-179.
47. Zovko, K.M.; Ioannou, E.; Sawadogo, W.R.; Abdel-Razik, A.F.; Vagias, C.; Diederich, M.; Roussis, V. *Steroids* **2016**, 115, 130-135.
48. Zhang, Y.L.; Li, Y.F.; Wang, J.W.; Yu, B.; Shi, Y.K.; Liu, H.M. *Steroids* **2016**, 109, 22-28.
49. Sharifi, N.; Gulley, J.L.; Dahut, W.L. *Endocr. Relat. Cancer* **2010**, 17, R305–R315.
50. Gyovai, A.; Minorics, R.; Kiss, A.; Mernyák, E.; Schneider, G.; Szekeres, A.; Kerekes, E.; Ocsovszki, I.; Zupko, I. *Frontiers in Pharmacology* **2018**, 9, 1-11.
51. Cops, E.J.; Bianco-Miotto T.; Moore N.L.; Clarke C.L.; Birrell S.N.; Butler L.M.; Tilley W.D. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2008**, 110, 236–243.
52. Abdelhalima, M.M.; Kamelb, E.M.; Rabieb, S.T.; Mohamedc, N.R. *Steroids* **2011**, 76, 78–84.
53. Wua, T.H.; Yanga, R.L.; Xiea, L.P.; Wanga, H.Z.; Chena, L.; Zhang, S.; Zhaob, Y.; Zhang, R.Q. *Cancer Letters* **2006**, 232, 199–205.
54. Ghorbani-Choghamarani A.; Azadi, G. *Curr. Org. Chem.* **2016**, 20, 2881-2893.
55. Das, S.; Santra, S.; Jana, S.; Zyryanov, G. V.; Majee, A.; Hajra, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 33, 4955-4962.
56. Bagno, A.; Saielli, G.; Addressing the stereochemistry of complex organic molecules by density functional theory-NMR, Wiley *Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2015**, 5, 228-240.
57. Willoughby, P.; Jansma, M.; Hoye, T. A guide to small-molecule structure assignment through computation of (¹H and ¹³C) NMR chemical shifts. *Nat. Protoc.* **2014**, 9, 643-660.
58. Grimblat, N.; Zanardi, M.; Sarotti, A. Beyond DP4: an improved probability for the stereochemical assignment of isomeric compounds using quantum chemical calculations of NMR shifts. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 12526-12534.
59. Semenov, V.A.; Krivdin, L.B. DFT computational schemes for ¹H and ¹³C NMR chemical shifts of natural products, exemplified by strychnine. *Magn. Reson. Chem.* **2019**, 1-9.
60. Mohameda, S.A.; El-Kadyb, D.S.; Abd-Raboub, A.A.; Tantawyb, M.A.; Abdelhalimb, M. M.; Elazabawya, S. R.; Abdallaha, A. E. M.; Elmegeed, G. A.; *Steroids*, **2020**, 154, 1-16.
-

-
61. Protein Data Bank. <https://www.rcsb.org/structure/2O2F>, 2020, Consultado por última vez 04-01-21, a las 12:30.
62. Bruncko, M.; Oost, T. K.; Belli, B. A.; Ding, H.; Joseph, M. K.; Kunzer, A.; Martineau, D.; McClellan, W. J.; Mitten, M.; Ng, S-Ch.; Nimmer, P. M.; Oltersdorf, T.; Park, Ch-M.; Petros, A. M.; Shoemaker, A.R.; Song, X.; Wang, X.; Wendt, M. D.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W.; *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 641-662.
63. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* **2004** 23;116(2):205-19.
64. CHIMERA E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605–1612.
65. AutoDock Vina O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 455–461.
66. PYMOL <https://pymol.org/2/>
67. Discovery studio <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>
68. Protein.plus <https://proteins.plus/>
69. Becke, A. D, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact Exchange, *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 5648-5652.
70. Petersson, G. A.; Bennett, A.; Tensfeldt, T. G.; Al-Laham, M. A.; Shirley, W. A.; Mantzaris, J. *J. Chem. Phys.*, **1988**, 89, 2193-2218.
71. Wolinski, K.; Hinton, J.F.; Pulay, P. Efficient implementation of the gauge-independent atomic orbital method for NMR chemical shift calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 8251–8260.
72. Gaussian 16, Revision B.01, Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; *et al.* Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
73. Gauss View 6.016, Roy D. Dennington II, Todd A. Keith, John M. Millan. Semichem, Inc. 2000-2016.

II.8. Referencias bibliográficas capítulo II

74. McNaught, A. D. *Pure Appl. Chem.* 1996, 68, 1919–2008
75. Diot, J.D.; Garci-Moreno, I.; Twigg, G.; Ortiz-Mellet, C.; Haupt, K.; Butters, T.D.; Kovensky, J.; Gouin, S.G. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 7757-7768.
- lxxvi.** Ingemar-Olsen, J.; Plata, G.B.; Padrón, J.M.; López, O.; Bols, M.; Fernández-Bolaños, J.G. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 123, 155-160.
77. Hughes, A.B.; Rudge, A.J. *Nat. Prod. Rep.* **1994**, 11, 135-162.
78. López Ó.; Bols, M. *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications* (ed. Compain, P. & Martin, O.R.) John Wiley & Sons, West Sussex **2007**, 131-151.
79. Wennekes, T.; Lang, B.; Leeman, M.; Van Der Marel, G.A.; Smits, E.; Weber, M.; Van Wiltenburg, J.; Wolberg, M.; Aerts, J.M.F.G.; Overkleeft, H.S. *Organic Process Research & Development* **2008**, 12, 414-423.
80. Yagi, M.; Kouno, T.; Aoyagi, Y.; Muray, H. The structure of moranoline, a piperidine alkaloid from *Morus* species. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **1976**, 50, 571–572.
81. Cendret, V.; Legigan, T.; Mingot, A.; Thibaudeau, S.; Adachi, I.; Forcella, M.; Parenti, P.; Bertrand, J.; Becq, F.; Norez, C.; Désiré, J.; Kato, A.; Blériot, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 10734-10744.
82. Méndes, R.; Duarte, V.C.M.; Gil Fortes, A.; Alves, M.J. *Carbohydrate Research* **2014**, 395, 52-57.
83. López O.; Merino-Montiel, P.; Martos, S.; González-Benjumea A. *Carbohydr. Chem.* **2012**, 38, 215–262.
84. Kooij, R.; Branderhorst, H.M.; Bonte, S.; Wieclawska, S.; Martin N.I.; Pieters, R.J. *Med. Chem. Commun.* **2013**, 4, 387-393.
85. Luo, Z.; Sheng, J.; Sun, Y.; Lu, Ch.; Yan, J.; Liu, A.; Luo, H.B.; Huang, L.; Li, X. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 9089-9099.
86. Di Santo, SG.; Prinelli, F.; Adorni, F.; Caltagirone, C.; Musicco, M. *J Alzheimers Dis.* **2013**, 35, 349–361.
87. Wilson, S.R.; Zucker, P.A.; Huang, R.R.C.; Spector, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 5936-5939.
88. Xie, L.; Zheng, W.; Xin, N.; Xie, J.W.; Wang, T.; Wang, Z.Y. *Neurochem. Int.* **2012**, 61, 334-340.

-
89. Singh, N.; Halliday, A.C.; Thomas, J.M.; Kuznetsova, O.V.; Baldwin, R.; Woon, E.C.Y.; Aley, P.K.; Antoniadou, I.; Sharp, T.; Vasudevan S.R.; Churchill, G.C. *Nature Communications*, **2013**, volume 4, Article number: 1332.
90. Asano, N. *BioApply Co., Ltd.* **2015**, 11, 279-301.
91. Stütz, A.E.; Wrodnigg, T.M. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* **2011**, 66, 187-298.
92. Wu, X.; Zhang, F.Y.; Zhu, J.; Song, C.; Xiong, D.C.; Zhou, Y.; Cui, Y.; Ye, X.S. *Chem. Asian J.* **2014**, 9, 2260-2271.
93. Watson, A.A.; Fleet, G.W.J.; Asano, N.; Molyneux, R. J.; Nash, R. J. *Phytochemistry*, **2001**, 56, 265-295.
94. Ravinder, M.; Reddy, T.N.; Mahendar, B.; Rao, B.J.; *ARKIVOC* **2012**, 287-302.
95. Butters, T.D.; van den Broek, L.A.G.M.; Fleet, G.W.J.; Krulle, T.M.; Wormald, M. R.; Dwek, R.A.; Platt, F.M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 113-124.
96. Wang, R.W.; Qiu, X.L.; Bols, M.; Ortega-Caballero, F.; Quing, F.L.; *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2989-2997.
97. López, Ó.; Qing, F.L.; Pedersen, C.M.; Bols, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, 21, 4755-4761.
98. Matthews, B.W. *C. R. Biol.* **2005**, 328, 549-556.
99. Bols, M.; Lopez, O.; Caballero, F. Glycosidase inhibitors: structure, activity, synthesis, and medical relevance. Eds., *Elsevier, Oxford*, **2007**, 1, 815-884.
100. D'Arco, F.; Hanagandi, P.; Ganau, M.; Krishnan, P.; Taranath, A.; *Topics in Magnetic Resonance Imaging* **2018**, 27, 259-274.
101. Prada, C.E.; Grabowski, G.A.; *Dev Disabil Res Rev.* **2013**, 17, 226-246.
102. Buccoliero, R.; Bodennec, J.; Futerman, A.H. *Neurochem Res.* **2002**, 27, 565-574.
103. Viuff, A.H.; Jensen, H.H.; *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 8545-8556.
104. Parenti, G.; *EMBO Mol. Med.* **2009**, 1, 268-279.
105. Dandana, A.; Khelifa, S.B.; Chahed, H.; Miled, A.; Ferchichi, S.; *Pathobiology* **2016**, 83, 13-23.
106. Schueler, U.H.; Kolter, T.; Kaneski, C.R.; Blusztajn, J.K.; Herkenham, M.; Sandhoff, K.; *Neurobiol Dis.* **2003**, 14, 595-601.
107. Biela-Banas, A.; Oulaidi, F.; Front, S.; Gallienne, E.; Ikeda-Obateke, K.; Asano, N.; Wenger, D.A.; Martin, O.R. *ChemMedChem.* **2014**, 9, 2647-2652.
-

-
- 108.** Hill, C.H.; Viuff, A.H.; Spratley, S.J.; Salamone, S.; Christensen, S.H.; Read, R.J.; Moriarty, N.W.; Jensen, H.H.; Deane, J.E. *Chem. Sci.* **2015**, 6, 3075-3086.
- 109.** López, O.; Bols, M. *ChemBioChem.* **2007**, 8, 657-661.
- 110.** López, O.; Merino-Montiel, P.; Martos, S.; González-Benjumea, A. *Carbohydr. Chem.* **2012**, 38, 215-262.
- 111.** Kondo, K.; Adachi, H.; Shitara, E.; Kojima, F.; Nishimura, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 1091-1095.
- 112.** Lillelund, V.H.; Jensen, H.H.; Liang, X.; Bols, M. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 515-553.
- 113.** Zhu, X.; Sheth, K.A.; Li, S.; Chang, H.H.; Fan, J.Q. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 7450-7453.
- 114.** Jensen, H.H.; Lyngbye, L.; Jensen, A.; Bols, M. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 1218-1226.
- 115.** Chang, J.; Block, T.M.; Guo, J.T. *Antiviral Research* **2013**, 99, 251-260.
- 116.** Nishimura, Y. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3, 575-591.
- 117.** Lopez, Ó.; Merino-Montiel P, Martos S, González-Benjumea A, Glycosidase inhibitors: versatile tools in Glycobiology. In: Rauter AP, Lindhorst T, editors. Carbohydrate chemistry: chemical and biological approaches. Vol. 38. London (UK): RSC; 2012, 215-62
- 118.** Ferhati X, Matassini C, Fabbrini MG, et al. *Bioorg Chem* **2019**, 87, 534-549.
- 119.** Hottin A, Dubar F, Steenackers A, et al. *Org Biomol Chem* **2012**, 10, 5592-5597.
- 120.** Chavan SR, Gavale KS, Khan A, et al. *ACS Omega* **2017**, 2, 7203-7218.
- 121.** Sanchez-Fernández EM, Gomez-Pérez V, García-Hernández R, et al. *RSC Adv* **2015**, 5, 21812-21822.
- 122.** Warfield KL, Alonzi DS, Hill JC, et al. *J Med Chem.* **2020**, 63, 4205-4214.
- 123 .** Sirona Biochem [last updated 31st March 2020]. Available from: <https://www.sironabiochem.com/sirona-biochem-initiates-covid-19-and-infectious-diseases-development-program/> [last accessed 17 Sep 2020].
- 124.** Esposito A, D'Alonzo D, De Fenza M, et al. *Int J Mol Sci.* **2020**, 21, 3353.
- 125.** Jenkinson SF, Best D, Saville AW, et al. *J Org Chem.* **2013**, 78, 7380-7397.
- 126.** Compain P, Decroocq C, Joosten A, de Sousa J, et al. *ChemBioChem* **2013**, 14, 2050-2058.
- 127.** De Fenza M, D'Alonzo D, Esposito A, et al. *Eur J Med Chem.* **2019**, 175, 63-71.
- 128.** Pratesi D, Matassini C, Goti A, et al. *ACS Med Chem Lett.* **2020**, 11, 727-731.
-

-
129. Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. *Sci Transl Med.* **2011**, 3, 77sr1.
130. Bature F, Guinn B-a, Pang D, Pappas Y. *BMJ Open* **2017**, 7:e015746.
- 131 . World Alzheimer Report 2019 [September 2019]. Available from: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2019.pdf> [last accessed 17 Sep 2020].
132. Ghisaidoobe, A.T.; Van Den Berg, R.J.B.H.N.; Butt, S.S.; Strijland, A.; Donker-Koopman, W.E.; Scheij, S.; Van Den Nieuwendijk, A.M.C.H.; Koomen, G.J.; Loevezijn, A.V.; Leemhuis, M.; Wennekes, T.; Van Der Stelt, M.; Van Der Marel, G.A.; Van Boeckel, C.A.A.; Aerts, J. M.F.G.; Overkleeft, H.S. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 9096-9104.
133. Martin, P.; Jim, J. *World Alzheimer Report 2015; Alzheimer's Disease International: London*, **2015**, 1-87, <https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2015.pdf>. Consultado por ultima vez el 10-01-21 a las 2:12 pm.
134. Dembitsky VM, Dzhemileva L, Gloriovova T, D'yakonov V. *Biochem Biophys Res Commun* **2020**, 524, 772–83.
135. Kumar K, Kumar A, Keegan RM, Deshmukh R. *Biomed Pharmacother* **2018**, 98, 297–307.
136. Sengoku, R. *Neuropathology*, **2020**, 40, 22-29.
137. Cavalli, A.; Bolognesi, M.L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 347-372.
138. Youdim, M.B.; Buccafusco, J.J. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, 26, 27-35.
139. Braunwald, E. *Manual de Medicina Interna*, 17th ed. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V: Mexico **2008**, 354-356.
140. Noel A, Ingrand S, Barrier L. *Mol Cell Neurosci.* **2016**, 75, 63–70.
141. Decroocq C, Stauffert F, Pamard O, et al. Iminosugars as a new class of cholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2015**, 25, 830–833.
142. Grimm, C.; Lazzarotto, M.; Pompei, S.; Schichler, J.; Richter, N.; Farnberger, J.E.; Fuchs, M.; Kroutil, W. *ACS Catal.* **2020**, 10, 10375–10380.
143. Martini, F.; Bruning, C. A.; Soares, S. M.; Nogueira, C. W.; Zeni, G. *Current Pharmaceutical Design* **2015**, 21, 920-924.
144. Cornish-Bowden, A. *Biochem. J.* **1974**, 137, 143-144.
145. Bols, M.; Hazell, R.G.; Thomsen, I.B. *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 940–947.
-

-
146. López, O.; Bols, M. *ChemBioChem*. **2007**, 8 ,657–661.
147. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V. Jr.; Featherstone, R.M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88-95.
148. Carvajal, F.J.; Inestrosa, N.C. *Front. Mol. Neurosci.* **2011**, 4, 1-10.
149. Caliandro, R.; Pesaresi, A.; Cariati, L.; Procopio, A.; Oliverio, M.; Lamba, D. J. *Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2018**, 33, 794–803.
150. Hiremathad, A.; Chand, K.; Tolayan, L.; Rajeshwari, K.R.S.; Esteves, A.R.; Cardoso, S.M.; Chaves, S.; Santos, M.A. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, 179, 82–96.
151. Ma, Y.; Lv, W.; Gu, Y.; Yu, S. *Front Pharmacol.* **2019**, 10, 1-9.
152. Solleiro-Villavicencio, H.; Rivas-Arancibia, S. *Front. Cell Neurosci.* **2018**, 12, 1-13.
153. Greig, N.H.; Lahiri, D.; Sambamurti, K. *Int. Psychogeriatr.* **2002**, 14, 77–91.
154. Macdonalda, I.R.; Maxwella, S.P.; Reida, G.A.; Casha, M.K.; DeBaya, D.R.; Darvesh, S. *J. Alzheimers Dis.* **2017**, 58, 491–505.
155. Ochoa, R.; Rodríguez, C.A.; Zuluaga, A.F. *J. Mol. Graph. Model.* **2016**, 68, 176-183.
156. Orellana, E.A.; Kasinski, A.L. *Bio. Protoc.* **2016**, 6, 1-9.
157. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd M. *J. Nat. Cancer Inst.* **1991**, 83, 757-766.
158. Puerta, A.; Galán, A.R.; Abdilla, R.; Demanuele, K.; Fernandes, M.X.; Bosica, G.; Padrón, J.M. *J. Mol. Clin. Med.* **2019**, 2, 35-40.