



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas



**“SÍNTESIS DE LEPTOMERINA Y DISEÑO DE ANÁLOGOS COMO INHIBIDORES
DE ACETILCOLINESTERASA CON POTENCIAL APLICACIÓN EN ENFERMEDAD
DE ALZHEIMER”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

DIANA LAURA LAGUNES ORDOÑEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. VICTOR GÓMEZ CALVARIO

CO-DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARTHA V. SOSA RIVADENEYRA

PUEBLA, PUEBLA

FEBRERO 2026

El presente trabajo se realizó en el Centro de Química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección del Dr. Víctor Gómez Calvario y la Dra. Martha V. Sosa Rivadeneyra.

Los insumos requeridos para esta investigación provienen del Proyecto CONACyT A1-S-308049 del fondo FOSEC SEP Investigación Básica, BUAP-CA-157-Química Orgánica Básica. Así también, con el otorgado por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado proyectos 100525136-VIEP2025 y 100148077-VIEP2025.

Dedicatorias

A Dios, porque Él me ha permitido cumplir mis sueños, mi principal fortaleza y mi confianza, por darme títulos que no merezco, pero por su gracia y amor he obtenido.

A mi esposo Fernando, por su gran amor y confianza en mí. Por mirarme como muchas veces, yo no puedo verme.

A mis padres, que han orado siempre por mí.

A mi hermano por su gran esfuerzo, el siempre será parte de todos mis logros.

A mis abuelitos, que siempre envían su amor y bendiciones para mí.

A mis amigos del laboratorio por su apoyo, sus enseñanzas y por hacer el tiempo muy ameno en el laboratorio.

Agradecimientos

A mis directores de tesis Dr. Víctor Gómez Calvario por todo lo que me enseñó a lo largo de este proyecto, por su disposición, su comprensión y por darme su confianza en todo momento. A la Dra. Martha V. Sosa Rivadeneyra, gracias por la dirección en la elaboración de este trabajo, por su tiempo, y por su guía.

A los miembros de la comisión revisora: Dr. Jorge R. Juárez Posadas, Dra. Jacqueline Jiménez Hernández, Dra. Olivia Hernández Cruz, por la revisión y sugerencias sobre este trabajo.

También, quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca por haber compartido generosamente sus conocimientos y por brindarme el acceso a su laboratorio para la realización de los ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa. Su apoyo, orientación y disposición fueron fundamentales para el desarrollo de esta parte experimental del trabajo.

Asimismo, agradezco enormemente al Dr. Rodrigo Said Razo Hernández por su valiosa enseñanza y acompañamiento en el aprendizaje y aplicación de las técnicas de acoplamiento molecular. Su experiencia, paciencia y dedicación fueron esenciales para fortalecer mis habilidades en el área computacional y complementar los resultados de esta investigación.

Índice

Índice	5
Abreviaturas	7
Introducción	10
Antecedentes	12
Alzheimer	12
Hipótesis colinérgica y papel de la acetilcolina en la enfermedad de Alzheimer	12
Inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChEIs) como estrategia terapéutica	13
El valor de IC ₅₀ en la evaluación de inhibidores de la acetilcolinesterasa	14
Importancia de leptomerina como agente inhibidor de acetilcolinesterasa	16
Aislamiento de leptomerina a partir de fuentes naturales	17
Síntesis total de leptomerina	17
Síntesis de análogos de leptomerina	19
Objetivos.....	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
Discusión de resultados	25
Estrategia sintética para la obtención de quinolin-4-onas diversamente funcionalizadas.....	25
Síntesis total de Leptomerina.....	26
Reasignación estructural de leptomerina mediante RMN 1D y 2D	29
Análisis <i>in vitro</i> de inhibición de acetilcolinesterasa	36
Discusión comparativa de la actividad inhibitoria con base en valores de IC ₅₀	38
Análisis de la relación estructura-actividad de análogos de leptomerina mediante acoplamiento molecular (<i>docking</i>).....	40
Desarrollo Experimental.....	53
Preparación Amortiguador de fosfatos (Na ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ , 0.1 M, pH 7.4, J.T Baker)	66
Calibración del potenciómetro	66
Preparación del reactivo de Ellman (DTNB).....	66

Preparación de Yoduro de acetilcolina (sustrato)	67
Preparación de la muestra sanguínea	67
Preparación de controles positivos	67
Preparación de los compuestos a evaluar	67
Acoplamiento ciego	73
Conclusiones.....	83
Perspectivas	85
ANEXOS	86

Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterasa
AChEIs	Inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
AcOEt	Acetato de etilo
Anh	Anhidro
TEA	Trietilamina
CC	Cromatografía en columna
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₃ I	Yoduro de metilo
s	Simple
d	Doble
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de dobles
tq	Triple de cuádruples
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>

DCM	Diclorometano
DCE	1,2-Dicloroetano
h	Horas
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
IR	Infrarrojo
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio
MeOH	Metanol
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DTNB	<i>5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)</i>
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mmol	Milimoles
N ₂	Nitrógeno molecular
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
°C	Grados Celsius
ppm	Partes por millón
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SNC	Sistema Nervioso Central
t.a.	Temperatura ambiente

THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina
TMSOTf	Trimetilsilil Trifluorometansulfonato
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico en RMN
CL	Cadena lateral
7XN1	Estructura cristalina de la acetilcolinesterasa humana en complejo con tacrina
4EY7	Estructura cristalina de la acetilcolinesterasa humana en complejo con donepezilo
CAS	<i>Catalytic Active Site</i>
PAS	<i>Peripheral Anionic Site</i>

Introducción

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima clave en el sistema nervioso central, responsable de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en colina y acetato, proceso mediante el cual se termina la transmisión sináptica colinérgica¹. La inhibición de esta enzima provoca un aumento en la concentración de acetilcolina en el espacio sináptico, lo que conduce a una mejora en la transmisión colinérgica. Debido a este efecto, los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEIs) han sido ampliamente empleados en el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo progresivo que se caracteriza por el deterioro de la memoria, las funciones cognitivas y el comportamiento. Actualmente, los inhibidores de la acetilcolinesterasa fueron los primeros fármacos aprobados para el tratamiento sintomático de esta enfermedad y, hasta la fecha, el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina continúan en uso clínico a nivel mundial². Sin embargo, a pesar de su eficacia, estos fármacos presentan diversas limitaciones, incluyendo efectos adversos a mediano y largo plazo, lo que hace necesaria la búsqueda continua de nuevas moléculas con mejores perfiles terapéuticos.

En este contexto, los productos naturales han representado una fuente relevante de compuestos bioactivos con potencial aplicación farmacológica. De manera particular, numerosos inhibidores de la acetilcolinesterasa aislados de fuentes naturales poseen esqueletos heterocíclicos nitrogenados, especialmente alcaloides, los cuales han demostrado una amplia diversidad estructural y funcional. Entre estos compuestos destaca la leptomerina, un alcaloide de tipo quinolin-4-ona que ha sido reportado como inhibidor de la acetilcolinesterasa con un valor de IC₅₀ comparable al de algunos fármacos actualmente utilizados en la terapéutica del Alzheimer.

La leptomerina ha sido aislada de diversas fuentes naturales y, debido a su relativa simplicidad estructural y actividad biológica relevante, se ha propuesto como un esqueleto molecular idóneo para el diseño y desarrollo de nuevos inhibidores de la acetilcolinesterasa.

¹ Q. Huang, C. Liao, F. Ge et al. *J. Neurorestoratol.* **2022**, *10* (2), 100002.

² Tan C.C., Yu J. T., Wang H.F., et al. *J. Alzheimers Dis.* **2014**, *41*(2), 615-631.

No obstante, estudios previos han mostrado inconsistencias en la asignación estructural de este alcaloide, particularmente en lo que respecta a sus datos espectroscópicos, lo que hace necesario un análisis más profundo que permita confirmar de manera inequívoca su estructura química.

Con base en lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo la síntesis total de leptomerina, la confirmación estructural mediante técnicas espectroscópicas avanzadas y el diseño de una serie de análogos estructurales de tipo quinolin-4-ona. Asimismo, se evalúa la actividad inhibitoria de estos compuestos frente a la acetilcolinesterasa mediante estudios *in vitro* y se analiza su relación estructura-actividad apoyándose en estudios de acoplamiento molecular (*docking*), con la finalidad de aportar información relevante para el desarrollo de nuevos agentes con potencial aplicación en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes

Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo progresivo que se caracteriza por el deterioro gradual de las funciones cognitivas, incluyendo memoria, lenguaje, orientación y capacidad de razonamiento, afectando de manera importante la calidad de vida de quienes la padecen³.

Esta condición fue descrita por primera vez en 1906 por el médico alemán Alois Alzheimer⁴, quien observó en el tejido cerebral de una paciente fallecida la presencia de depósitos extracelulares anómalos, actualmente conocidos como placas de β -amiloide, así como una marcada pérdida neuronal. Previamente al deceso, la paciente había presentado alteraciones del lenguaje, trastornos del comportamiento, alucinaciones y delirios.

Posteriormente, en 1910, Emil Kraepelin introdujo el término “enfermedad de Alzheimer” para denominar formalmente a este padecimiento¹. Desde entonces, se ha reconocido que se trata de una enfermedad multifactorial, cuya etiología involucra diversos procesos patológicos interrelacionados.

Entre los principales rasgos neuropatológicos asociados a la enfermedad se encuentran: la acumulación de placas de β -amiloide, la formación de ovillos neurofibrilares constituidos por proteína tau hiperfosforilada (*neurofibrillary tangles*, NFTs) y una disminución significativa en los niveles del neurotransmisor acetilcolina (ACh)^{5,6}.

Hipótesis colinérgica y papel de la acetilcolina en la enfermedad de Alzheimer

Una de las primeras hipótesis propuestas para explicar el deterioro cognitivo observado en la enfermedad de Alzheimer es la denominada hipótesis colinérgica⁷. Esta plantea que una disminución en la neurotransmisión colinérgica en regiones cerebrales asociadas con la memoria y el aprendizaje es un factor clave en la progresión de la enfermedad⁸.

³ Jellinger, K. A. *J. Neural. Transm.* **2006**, *113*, 1603–1623.

⁴ Ciurea V.A., Covache-Busuioc R.A., Mohan A.G., Costin H.P., Voicu V. *J Med Life.* **2023**, *16*(2), 173-177.

⁵ Alzheimer's Association. **2018**, *Alzheimer's & Dementia*, *14*, 367-429.

⁶ Eanes E. D., Glenner G.G. *J Histochem Cytochem.* **1968**, *16*(11), 673-677.

⁷ Knopman D.S., Amieva H., Petersen, R.C. et al. *Nat Rev Dis Primers.* **2021**, *7*, 33.

⁸ Grothe M., Heinsen H., Teipel S. *Biol Psychiatry.* **2012**, *71*, 805-813.

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor muy importante en procesos como la memoria, la atención y el aprendizaje. En el cerebro de pacientes con Alzheimer se ha observado una reducción significativa en la actividad de las neuronas colinérgicas, así como en la concentración de ACh, particularmente en áreas como el hipocampo y la corteza cerebral⁹.

La disminución de los niveles de ACh se asocia, en gran medida, con una mayor actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), responsable de la hidrólisis de la acetilcolina en colina y acetato, lo que conduce a una terminación rápida de la señal neurotransmisora. Este desequilibrio contribuye al deterioro de la comunicación sináptica y, en consecuencia, al déficit cognitivo característico de la enfermedad¹⁰.

Con base en esta evidencia, la inhibición de la acetilcolinesterasa se ha consolidado como una de las principales estrategias terapéuticas para el tratamiento sintomático del Alzheimer, ya que permite incrementar los niveles sinápticos de acetilcolina y mejorar, de manera temporal, la función cognitiva en los pacientes.

Inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChEIs) como estrategia terapéutica

De acuerdo con la hipótesis colinérgica de la enfermedad de Alzheimer, una de las principales causas del deterioro cognitivo se asocia con la disminución en los niveles del neurotransmisor acetilcolina. Esta disminución afecta directamente las funciones fisiológicas en el aprendizaje, la memoria, la regulación motora y la regulación del ciclo del sueño¹¹. En este contexto, una estrategia terapéutica ampliamente utilizada ha sido el empleo de inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChEIs), cuyo objetivo es prolongar la disponibilidad de acetilcolina en el espacio sináptico y, con ello, mejorar la neurotransmisión colinérgica.

Los AChEIs ejercen su efecto al disminuir la velocidad de hidrólisis de la acetilcolina, lo que conduce a un aumento transitorio de su concentración sináptica y a una mejora sintomática

⁹ Olovi, M. B.; Krsti, D. Z.; Lazarevi-Pati, T. D.; Bondi, A. M.; Vasi. *Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *1*, 315–335

¹⁰ Majdi A., Sadigh-Eteghad S., Rahigh Aghsan S., Farajdokht F., Vatandoust S.M., Namvaran A., Mahmoudi J. *Rev. Neurosci.* **2020**, *31*, 391-413.

¹¹ Zhang, J., Zhang, Y., Wang, J. *et al. Sig Transduct Target Ther.* **2024**, *9*, 211.

en funciones como memoria, atención y aprendizaje, particularmente en pacientes con enfermedad de Alzheimer en etapas leve a moderada.

Actualmente, los fármacos más prescritos que actúan como inhibidores de la acetilcolinesterasa son donepezilo (Aricept®), galantamina (Reminyl®) y rivastigmina (Exelon®), los cuales se emplean de manera rutinaria en la práctica clínica (Figura 1).

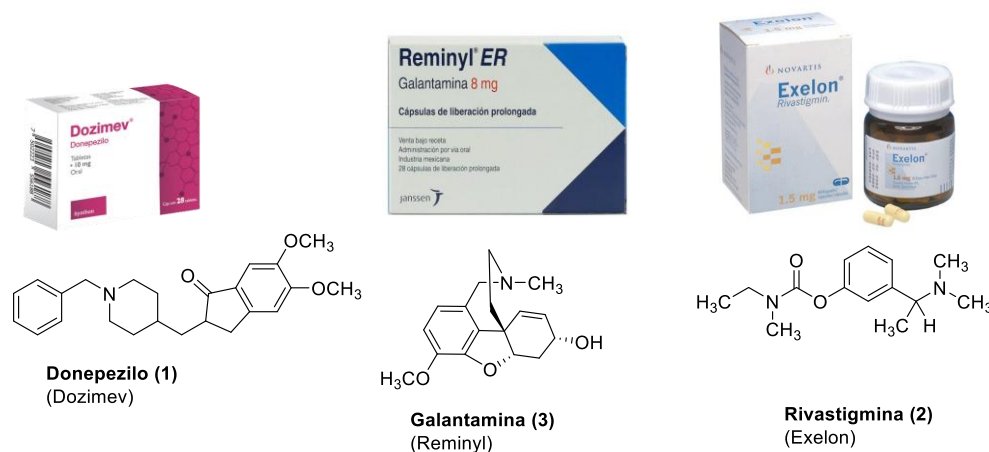


Figura 1. Inhibidores de la acetilcolinesterasa aprobados para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer: donepezilo, galantamina y rivastigmina

El valor de IC_{50} en la evaluación de inhibidores de la acetilcolinesterasa

Para evaluar la capacidad de un compuesto de inhibir la enzima acetilcolinesterasa, se realiza la determinación in vitro de la inhibición enzimática y se calcula el valor de IC_{50} (*half-maximal inhibitory concentration*), definido como la concentración necesaria para inhibir el 50 % de la actividad de la enzima. De manera general, valores menores de IC_{50} se asocian con una mayor potencia inhibitoria del compuesto.

Este parámetro constituye una herramienta ampliamente empleada para la comparación de la actividad biológica entre diferentes moléculas dentro de una misma serie química, así como frente a inhibidores de referencia. En este sentido, fármacos empleados clínicamente como donepezilo, galantamina y rivastigmina presentan valores de IC_{50} en el rango micromolar a submicromolar, lo que respalda su utilidad terapéutica como inhibidores de la acetilcolinesterasa (Figura 2).

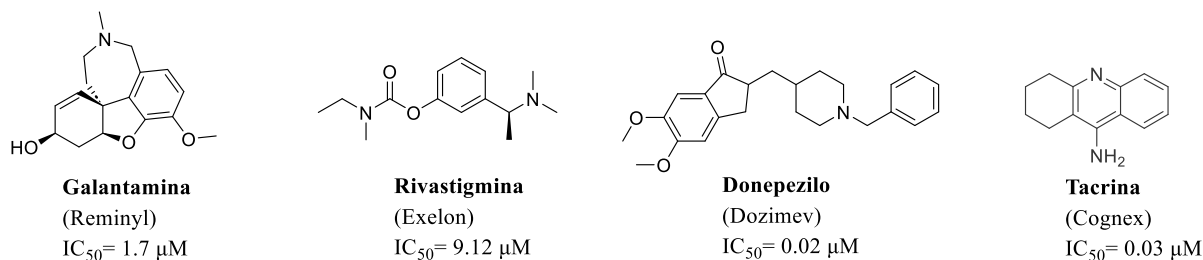


Figura 2. Inhibidores de la acetilcolinesterasa de uso clínico y compuestos de referencia empleados en estudios de actividad inhibitoria

No obstante, también se ha reportado que compuestos altamente potentes, como tacrina, pueden presentar efectos adversos importantes, particularmente hepatotoxicidad¹², lo que evidencia que una elevada actividad inhibitoria no es el único criterio relevante en el desarrollo de nuevos AChEIs.

Por lo anterior, resulta necesario continuar con la búsqueda de nuevas entidades químicas que combinen una adecuada potencia inhibitoria con perfiles de seguridad mejorados, independientemente de su grado de complejidad estructural.

Alcaloides y otros heterociclos nitrogenados de origen natural como inhibidores de acetilcolinesterasa

Diversos compuestos de origen natural han sido identificados como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, lo que ha despertado interés en su estudio como posibles agentes para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer. En particular, los productos naturales continúan representando una fuente importante de estructuras químicas con alta diversidad y complejidad, muchas de las cuales presentan actividad biológica significativa. Dentro de este grupo, los compuestos heterocíclicos nitrogenados, especialmente los alcaloides, han mostrado una participación destacada como inhibidores de AChE^{13,14}. Estas moléculas presentan una amplia variedad de esqueletos estructurales, lo que ha permitido identificar diferentes patrones de interacción con el sitio activo de la enzima y con regiones periféricas del bolsillo catalítico.

¹² P. B. Watkins, H. J. Zimmerman, M. J. Knapp, S. I. Gracon and K. W. Lewis, *J. Am. Med. Assoc.*, **1994**, 271, 992- 998.

¹³ Houghton, P. J.; Ren, Y.; Howes, M. J. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 181–199.

¹⁴ Hostettmann, K.; Borloz, A. U.; Urbain, A.; Marston, A. *Curr. Org. Chem.* **2006**, 10, 825–847.

Entre los ejemplos más representativos se encuentran la fisostigmina, aislada de *Physostigma venenosum* ($IC_{50} = 0.25 \mu M$)¹⁵, la huperzina A, aislada de *Huperzia serrata* ($IC_{50} = 0.023 \mu M$)¹⁶, y la leptomerina, aislada de *Esenbeckia leiocarpa* ($IC_{50} = 2.5 \mu M$)¹⁷ (Figura 3). Estos compuestos ilustran cómo estructuras relativamente distintas pueden exhibir actividad inhibitoria frente a la acetilcolinesterasa.

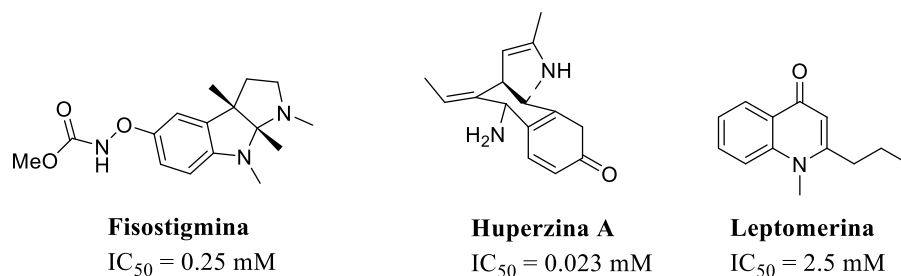


Figura 3. Alcaloides de origen natural con actividad inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa

Es de particular interés la leptomerina, ya que presenta una actividad inhibitoria del mismo orden de magnitud que algunos fármacos utilizados clínicamente, como galantamina y rivastigmina. Además, su estructura no excesivamente compleja sugiere una factibilidad sintética adecuada, lo que la convierte en un punto de partida atractivo para el diseño y la obtención de análogos estructurales con potencial mejora en su perfil biológico.

En conjunto, estos antecedentes respaldan la exploración de alcaloides y otros heterociclos nitrogenados de origen natural como andamios moleculares para el desarrollo de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa.

Importancia de leptomerina como agente inhibidor de acetilcolinesterasa

La leptomerina ha despertado interés como posible agente inhibidor de la acetilcolinesterasa debido a que presenta una actividad inhibitoria del mismo orden de magnitud que algunos fármacos empleados clínicamente, como galantamina y rivastigmina. Este comportamiento resulta relevante si se considera que se trata de un alcaloide de origen natural con una estructura relativamente sencilla.

¹⁵ Luo, W.; Yu, Q.; Kulkarni, S. S.; Parrish, D. A.; Holloway, H. W.; Tweedie, D.; Shafferman, A.; Lahiri, D. K.; Brossi, A.; Greig, N. H. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2174-2185.

¹⁶ Bai, D. L.; Tang, X. C.; He, X. C. *Curr. Org. Chem.* **2000**, *7*, 355-374.

¹⁷ Cardoso-Lopes, E.; Maier, J.; Silva, M.; Regasini, L.; Simote, S.; Lopes, N.; Pirani, J. R.; Bolzani, V.; Marx Young, M. C. *Molecules* **2010**, *15*, 9205-9213.

A diferencia de otros inhibidores altamente potentes que han mostrado problemas de toxicidad, la leptomerina representa un punto de partida atractivo para el diseño de nuevos derivados, en los cuales sea posible optimizar la potencia inhibitoria y, al mismo tiempo, mejorar perfiles de seguridad.

En este contexto, la leptomerina puede considerarse un punto de partida adecuado para el desarrollo de nuevas entidades químicas con potencial aplicación en el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer.

Aislamiento de leptomerina a partir de fuentes naturales

El primer aislamiento de leptomerina se reportó en 1963 a partir de la planta *Boronia ternata*¹⁸. Posteriormente, este alcaloide fue identificado en *Haplophyllum leptomerum* en 1986¹⁹ y, más recientemente, en *Esenbeckia leiocarpa* en 2010¹³.

De manera notable, únicamente el aislamiento realizado a partir de *E. leiocarpa* fue asociado con una actividad inhibidora significativa sobre la acetilcolinesterasa, lo que permitió reconocer a la leptomerina como un compuesto con interés farmacológico.

Estos antecedentes evidencian que, aunque la leptomerina ha sido identificada en diferentes fuentes naturales, su potencial biológico comenzó a ser valorado de manera más clara a partir de estudios relativamente recientes.

Síntesis total de leptomerina

Hasta la fecha, solo se han reportado dos síntesis totales de leptomerina, una en 1969²⁰ y otra en 1993²¹, lo cual resulta notable considerando su potencial como inhibidor de acetilcolinesterasa y su relativa baja complejidad estructural.

En 1969, Werner y colaboradores llevaron a cabo la primera síntesis total de leptomerina (Esquema 1), mediante una condensación entre anilina y un β -cetoéster, a través de una reacción de tipo Conrad-Limpach, que permitió la formación de un intermediario dihidroquinolínico. En la etapa final, se realizó la ciclación en presencia de calor, seguida de

¹³ Cardoso-Lopes, E.; Maier, J.; Silva, M.; Regasini, L.; Simote, S.; Lopes, N.; Pirani, J. R.; Bolzani, V.; Marx Young, M. C. *Molecules* **2010**, *15*, 9205–9213.

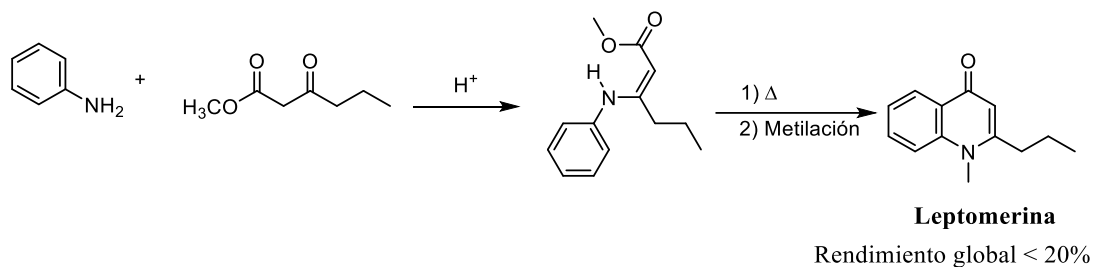
¹⁸ Duffield, A. M.; Jefferies, P. R. *Aust. J. Chem.*, **1963**, *16*, 292–294.

¹⁹ Akhmedzhanova, V. I.; Bessonova, I. A.; Yunusov, S. Yu. *Chem. Nat. Compd.* **1986**, *22*, 78–79.

²⁰ Werner, W. *Tetrahedron* **1969**, *25*, 255–261.

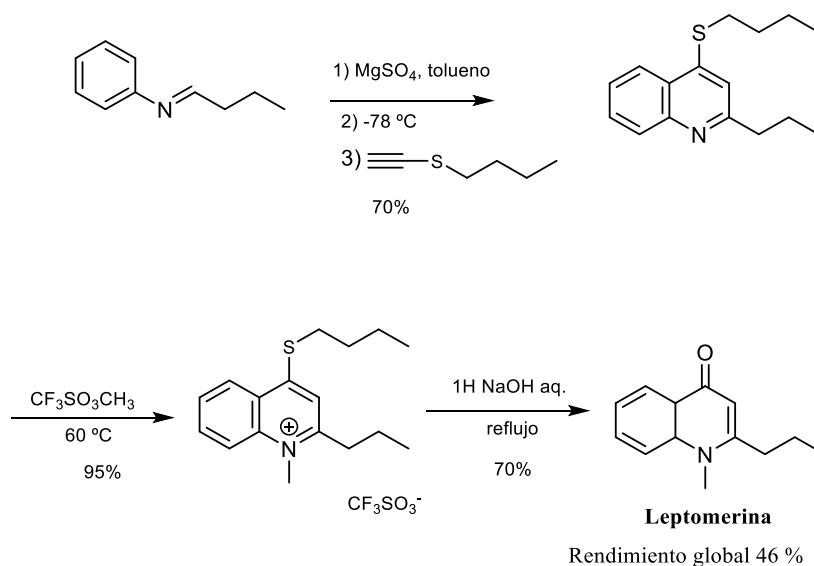
²¹ Narasaka, K.; Shibata, T. *Heterocycles*, **1993**, *35*, 1032–1053.

una metilación, conduciendo a la obtención de leptomerina. Sin embargo, esta ruta presentó un rendimiento global bajo (menor al 20%).



Esquema 1. Síntesis de leptomerina a partir de un β -cetoéster y anilina mediante reacción de Conrad-Limpach

Posteriormente, en 1993 se reportó una segunda síntesis total de leptomerina a través de una metodología de tres etapas (Esquema 2), la cual permitió incrementar el rendimiento global en aproximadamente 46% en comparación con la ruta original. Esta estrategia inició con una cicloadición [4+2] empleando una base de Schiff de N-arilo, preparada a partir de anilina y butanal, seguida de un tratamiento con butil etinil sulfuro para generar el aducto correspondiente. Posteriormente, el intermediario fue sometido a metilación con trifluorometanosulfonato de metilo y, finalmente, a una hidrólisis básica para conducir a leptomerina.

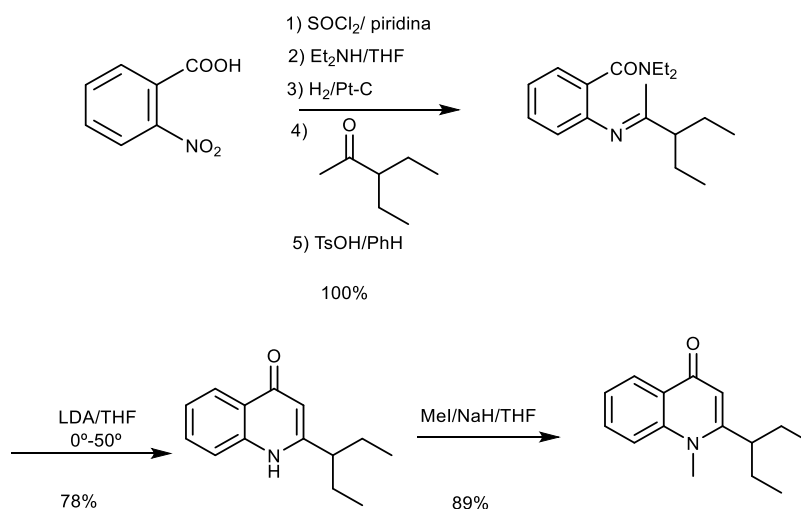


Esquema 2. Síntesis de leptomerina mediante una estrategia de ciclación en tres etapas

Síntesis de análogos de leptomerina

Además de las síntesis totales reportadas para leptomerina, se han descrito diversas metodologías orientadas a la obtención de análogos estructurales, particularmente compuestos heterocíclicos nitrogenados que conservan el esqueleto quinolin-4-ona.

Por ejemplo, Kubo y colaboradores reportaron en 1990²² una ruta sintética para la obtención de un análogo de leptomerina empleando como paso clave una ciclación de Niementowski (Esquema 3). La estrategia inicia con la preparación de un intermediario amídico a partir de ácido nitrobenzóico, el cual posteriormente es sometido a tratamiento con LDA para inducir la ciclación intramolecular y generar el núcleo quinolin-4-ona con un rendimiento del 78%. Finalmente, la metilación del heterociclo conduce al análogo correspondiente, alcanzando un rendimiento global del 69%.

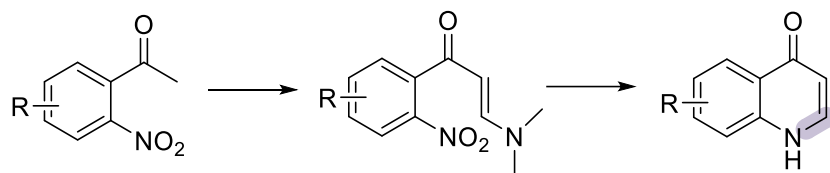


Esquema 3. Síntesis de un análogo de leptomerina mediante ciclación de Niementowski.

En 2005, *Tois et al.* describieron la síntesis de 4-oxo-quinolinas 2,3-no sustituidas a partir de una enamina (Esquema 4), en condiciones reductoras, en ciclohexeno, utilizando Pd al 10% sobre carbono como catalizador. La enamina puede sintetizarse mediante la condensación de o-nitroacetofenona I con N,N-dimetilformamida dimetilacetal (CH₃)₂NCH(OCH₃)₂, en N,N-dimetilformamida (DMF)²³.

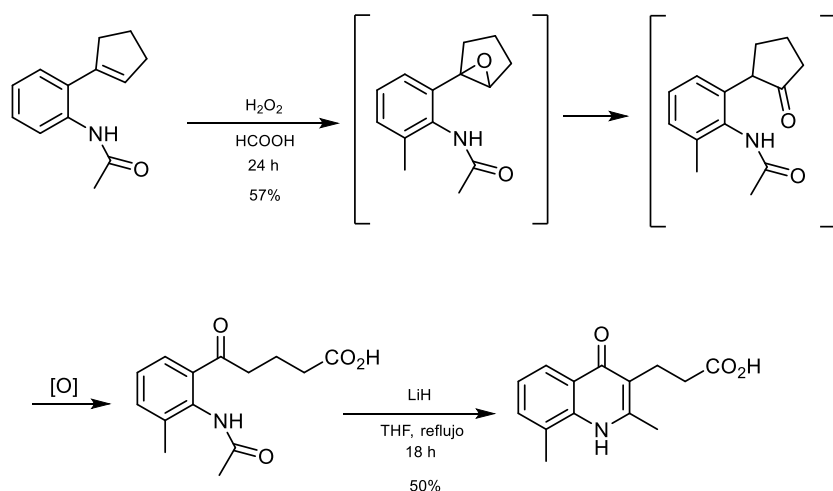
²² Nakatsu, T.; Johns, T.; Kubo, I. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 1508–1513.

²³ Tois J., Vahermo M., Koskinen A., *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46(5), 735-737.



Esquema 4. Síntesis de 4-oxo-quinolinas.

En 2007, Gataullin²⁴ y colaboradores desarrollaron una ruta para la obtención de un análogo de leptomerina a partir de la oxidación de una anilida utilizando peróxido de hidrógeno en ácido fórmico, lo que condujo a la formación de un ácido cetocarboxílico como intermediario, generado a través de la apertura de un epóxido. Posteriormente, el tratamiento de este ácido con hidruro de litio en THF bajo condiciones de reflujo permitió la formación del núcleo quinolin-4-ona correspondiente (Esquema 5).

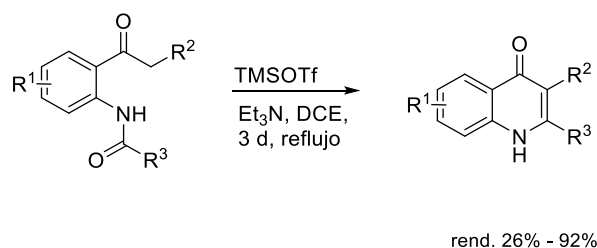


Esquema 5. Síntesis de un análogo de leptomerina mediante oxidación de anilidas y ciclación reductiva.

Más adelante, en 2011, Reissig²⁵ y colaboradores reportaron la síntesis de una serie de derivados de quinolin-4-ona empleando una versión modificada de la ciclación de Camps. Esta metodología utiliza orto-amidoacetofenonas como sustratos y emplea trifluorometanosulfonato de trimetilsililo y trietilamina en 1,2-dicloroetano (DCE) bajo reflujo durante tres días. Mediante este procedimiento se obtuvieron los derivados deseados con rendimientos que oscilaron entre el 26% y el 92% (Esquema 6).

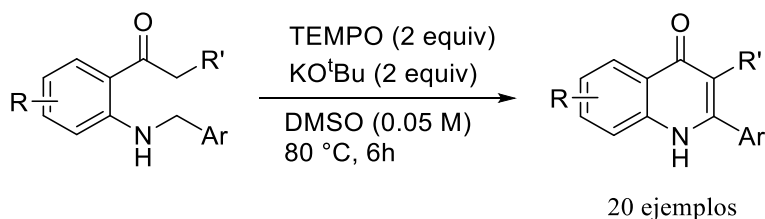
²⁴ Gataullin, R. R.; Abdrakhmanov, I. B. *Russ. J. Org. Chem.* **2007**, 43, 723–728.

²⁵ Eidamshaus, C.; Triemer, T.; Reissig, H.-U *Synthesis*, **2011**, 20, 3261–3266.



Esquema 6. Obtención de derivados de quinolin-4-ona mediante ciclación modificada de Camps

En 2015, Hu *et al.* reportaron un nuevo método que permite acceder a una amplia gama de 2-arylquinolina-4(1 H)-onas mediante una reacción de Mannich intermolecular oxidativa sin el uso de metales entre aminas secundarias y cetonas sin modificar (Esquema 7). Obteniendo diversos análogos con un rendimiento muy alto²⁶.



Esquema 7. Reacción de Mannich intermolecular oxidativa libre de metales para la síntesis de 2-arylquinona-4(1 H)-onas a partir de aminas secundarias y cetonas.

En este contexto, se han reportado diversas metodologías orientadas a la obtención de alcaloides y compuestos heterocíclicos que contienen el sistema quinolin-4-ona, con sustituyentes alquilo o arilo en las posiciones C-2 y/o C-3. Estas estrategias sintéticas comprenden distintos enfoques, entre los que destacan la síntesis de Conrad-Limpach²⁷, basada en la condensación de anilinas con β-cetoésteres; la reacción de Camps²⁸, que involucra la ciclización de *orto*-acilaminoacetofenonas; y el método de Niementowski²⁹, a

²⁶ W. Hu, J. P. Lin, L. R. Song, Y. Q. Long, *Org. Lett.*, **2015**, 17 (5), 1268-1271.

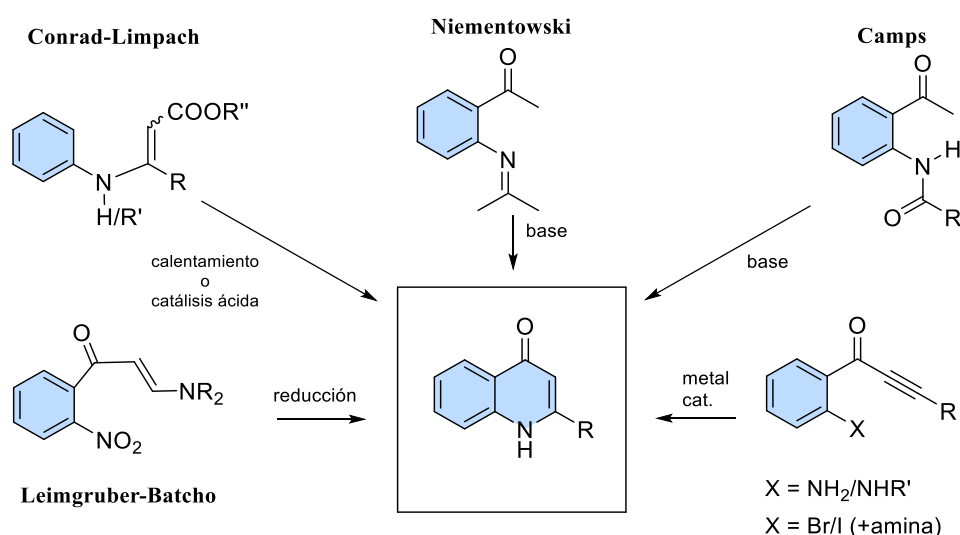
²⁷ Conrad, M.; Limpach, L. *Ber. dtsch. Chem. Ges*, **1887**, 20, 944-948.

²⁸ Camps, R. *Ber. dtsch. Chem. Ges*, **1899**, 32, 3228-3234.

²⁹ Niementowski, S. *Ber. dtsch. Chem. Ges*, **1894**, 27, 2, 1394-1403.

partir de ácidos antranílicos y derivados de iminas, entre otros procedimientos ampliamente descritos en la literatura.

De manera adicional, se han desarrollado metodologías más recientes que emplean intermediarios de tipo enaminocetona, como la estrategia de Leimgruber-Batcho, las cuales han demostrado ser alternativas eficientes para la construcción del núcleo quinolin-4-ona. Estos antecedentes ponen de manifiesto la versatilidad sintética disponible para el acceso a este tipo de estructuras, así como el interés sostenido en su exploración como andamios moleculares con potencial aplicación en el desarrollo de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa (Esquema 8).



Esquema 8. Métodos establecidos para la construcción del sistema de anillo quinolin-4-ona.

En este sentido, los antecedentes presentados evidencian que el núcleo quinolin-4-ona constituye un andamio químico de gran interés en el desarrollo de inhibidores de acetilcolinesterasa, tanto por su presencia en productos naturales bioactivos como por la diversidad de estrategias sintéticas disponibles para su construcción y modificación estructural. En particular, la leptomerina destaca como un compuesto de origen natural con actividad inhibitoria relevante y una arquitectura molecular que permite su acceso por síntesis total, así como la obtención de análogos. Estos elementos sustentan el interés en explorar rutas sintéticas hacia leptomerina y sus derivados, así como en evaluar su potencial como inhibidores de acetilcolinesterasa.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar y aplicar una estrategia sintética reproducible para la obtención de leptomerina y de análogos estructurales de tipo quinolin-4-ona, confirmar su estructura mediante técnicas espectroscópicas avanzadas, y evaluar su actividad inhibitoria frente a la acetilcolinesterasa mediante estudios *in vitro* y de acoplamiento molecular, con el propósito de analizar la relación estructura-actividad dentro de esta familia de compuestos.

Objetivos específicos

- Establecer las condiciones de reacción adecuadas para la síntesis de leptomerina y de una serie de análogos de tipo quinolin-4-ona diversamente sustituidos en la posición C-2.
- Optimizar las etapas de ciclación intramolecular y *N*-alquilación para mejorar la selectividad y reproducibilidad en la obtención de los compuestos objetivo.
- Realizar la caracterización estructural completa de leptomerina y de los compuestos sintetizados mediante técnicas espectroscópicas, incluyendo RMN 1D y 2D.
- Revisar y confirmar la asignación estructural de leptomerina a partir del análisis comparativo de datos espectroscópicos y correlaciones bidimensionales.
- Evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos solubles frente a la enzima acetilcolinesterasa mediante ensayos *in vitro* basados en el método de Ellman.

- Aplicar estudios de acoplamiento molecular (*docking*) para analizar posibles modos de interacción de leptomerina y sus análogos con la acetilcolinesterasa y apoyar la interpretación cualitativa de la relación estructura-actividad.

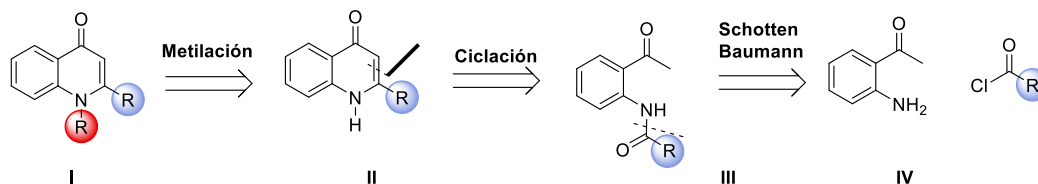
Discusión de resultados

En esta sección se discuten los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo del trabajo, comenzando por el diseño de la estrategia sintética para la construcción del núcleo quinolin-4-ona y la síntesis total de la leptomerina, seguida de su caracterización espectroscópica, confirmación estructural y, finalmente, la evaluación de su actividad biológica y el análisis de relación estructura-actividad de los análogos preparados.

Estrategia sintética para la obtención de quinolin-4-onas diversamente funcionalizadas.

La estrategia sintética empleada para la obtención de leptomerina y sus análogos de tipo quinolin-4-ona se diseñó con base en rutas modulares y reproducibles que permitieran introducir variaciones estructurales sistemáticas en la posición C-2. Este enfoque facilita tanto la preparación del alcaloide objetivo como la generación de una serie de derivados estructuralmente relacionados, útiles para el análisis de relación estructura-actividad.

Con la finalidad de acceder a este tipo de compuestos, se visualizó una estrategia sintética sustentada en el análisis retrosintético mostrado en el Esquema 9. De acuerdo con este planteamiento, el esqueleto quinolin-4-ona (**I**) puede obtenerse a partir de la metilación del precursor (**II**), el cual a su vez se genera mediante una ciclocondensación de la amidoacetofenona **III**. La amidoacetofenona **III** puede prepararse por medio de una reacción de tipo *Schotten-Baumann* a partir de la *orto*-aminoacetofenona **IV** empleando diversos cloruros de acilo, lo que permite introducir desde etapas tempranas la diversidad estructural en la cadena lateral.

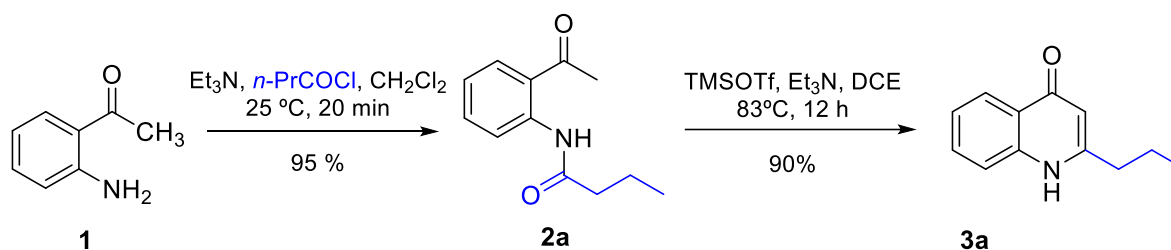


Esquema 9 Análisis retrosintético para la obtención de quinolin-4-onas diversamente funcionalizadas.

Esta aproximación proporciona una ruta convergente y flexible para la construcción del núcleo quinolin-4-ona, y resultó adecuada tanto para la síntesis total de leptomerina como para la preparación de análogos diversamente sustituidos en la posición C-2.

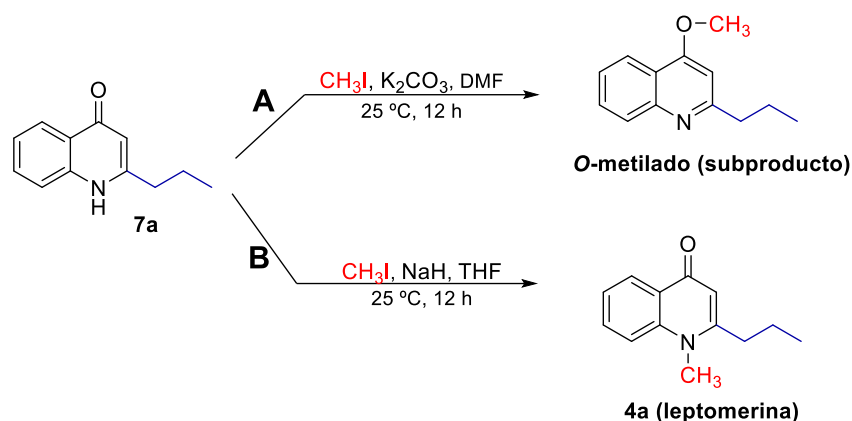
Síntesis total de Leptomerina.

La síntesis total de leptomerina se abordó inicialmente con el objetivo de validar la viabilidad de la ruta propuesta para la construcción del núcleo quinolin-4-ona y de generar material suficiente para su caracterización espectroscópica detallada. Para ello, se seleccionó como punto de partida la *orto*-aminoacetofenona (**1**), la cual se sometió a una reacción de acilación tipo *Schotten-Baumann* empleando cloruro de butirilo, dando lugar a la amidoacetofenona correspondiente (**2a**) en buen rendimiento (Esquema 8). Este intermediario fue posteriormente sometido a una ciclación bajo activación con TMSOTf en presencia de trietilamina, permitiendo la formación eficiente de la quinolin-4-ona sustituida en C-2 (**3a**), que constituye el precursor directo del producto natural (Esquema 10). La obtención de este compuesto confirmó que la secuencia amida-ciclación es adecuada para la construcción del núcleo heterocíclico de interés.



Esquema 10. Síntesis de la quinolin-4-ona **7a** a partir de la ortoaminoacetofenona **5**.

Una vez establecido el esqueleto quinolin-4-ona, se evaluó la etapa de metilación del sistema heterocíclico, paso clave para acceder a la leptomerina. Durante esta transformación se observó competencia entre *N*-alquilación y *O*-alquilación, dependiendo de las condiciones empleadas (Esquema 11). En particular, el uso de K_2CO_3 en DMF favoreció predominantemente la formación del derivado *O*-metilado (subproducto), mientras que el empleo de NaH en THF permitió dirigir la reacción de manera selectiva hacia el producto *N*-metilado, correspondiente a la leptomerina (**4a**).



Esquema 11. Influencia de las condiciones de reacción en la competencia entre *N*- y *O*-metilación del sistema quinolin-4-ona: formación del derivado *O*-metilado (subproducto) y del derivado *N*-metilado correspondiente a leptomerina (**4a**)

Este comportamiento diferencial resultó especialmente útil para asegurar el acceso selectivo al producto natural y puso de manifiesto la sensibilidad del sistema quinolin-4-ona frente a las condiciones de alquilación, lo cual fue considerado posteriormente en el análisis estructural y espectroscópico del compuesto obtenido.

De manera adicional, la diferenciación entre los derivados *N*-metilado (**4a**) y *O*-metilado (subproducto) fue respaldada por el análisis comparativo de sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (Figura 4). En el caso del compuesto *N*-metilado, se observa una señal simple característica correspondiente al grupo *N*-CH₃ a δ_{H} 3.74 ppm, mientras que en el derivado *O*-metilado la señal asociada al grupo *O*-CH₃ aparece desplazada a campo bajo, a δ_{H} 4.02 ppm, consistente con el mayor efecto desprotector ejercido por el átomo de oxígeno.

Adicionalmente, en el espectro de ^1H -RMN del compuesto *N*-metilado se aprecia una señal a δ_{H} 8.45 ppm (dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, 1H), atribuible a un protón aromático localizado en proximidad al grupo carbonilo del sistema quinolin-4-ona, cuyo desplazamiento a campo bajo refleja la influencia anisotrópica del C=O. En contraste, el derivado *O*-metilado presenta dicho protón desplazado ligeramente a campo alto (δ_{H} 8.14 ppm), lo que concuerda con la ausencia del carbonilo en posición lactámica y con la naturaleza quinoliníca del sistema.

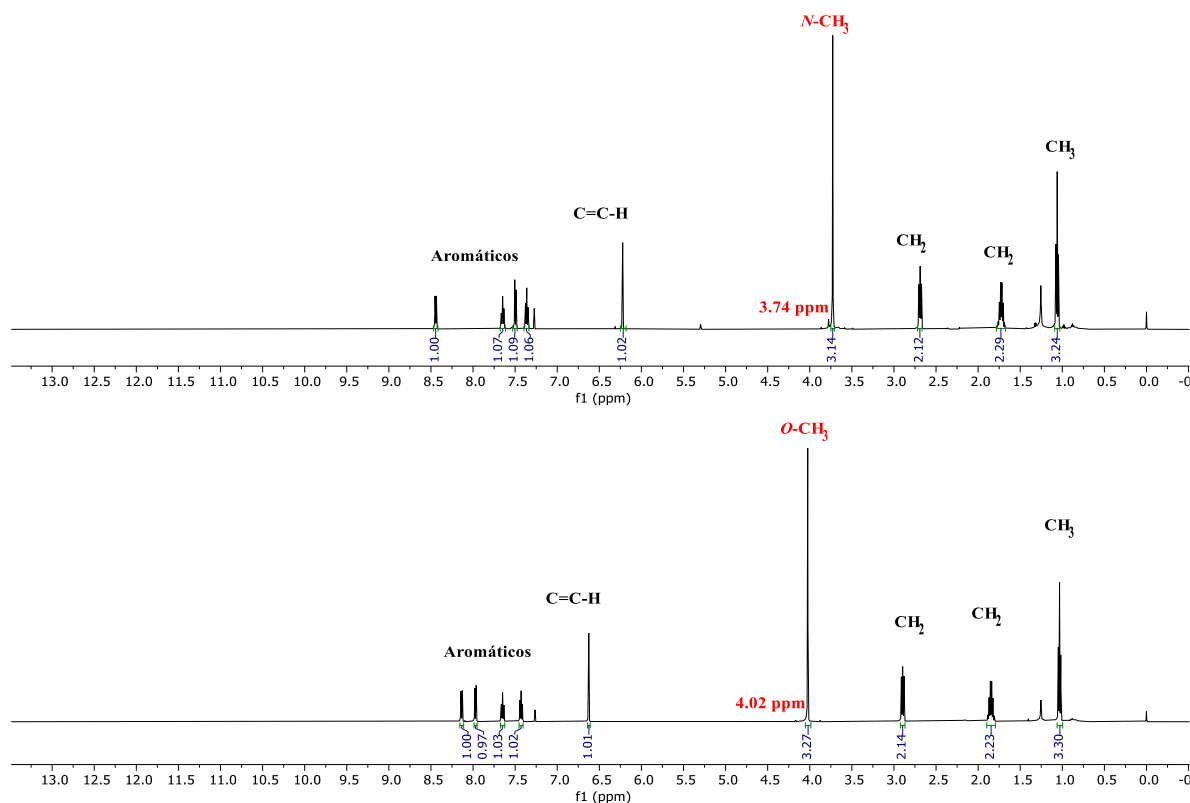


Figura 4. Comparación de los espectros de ^1H -RMN de los derivados *N*-metilado (**4a**) y *O*-metilado (subproducto).

Las diferencias entre ambos compuestos se vuelven aún más evidentes al analizar los espectros de ^{13}C -RMN. Para el *N*-metilado, se observa una señal característica del carbonilo de lactama a δ_{C} 177.8 ppm, junto con un carbono C-2 desprotegido a δ_{C} 154.3 ppm, consistentes con la presencia del sistema quinolin-4-ona. Por el contrario, en el derivado *O*-metilado desaparece la señal de carbonilo y se detectan resonancias a δ_{C} 164.1 y 162.3 ppm, asociadas a carbonos heteroaromáticos conjugados, así como la señal del carbono del grupo O-CH_3 a ^{13}C -RMN 55.5 ppm (Figura 5).

En conjunto, estas diferencias espectroscópicas proporcionan una evidencia clara y complementaria de la regioselectividad observada durante la etapa de metilación, y respaldan de manera inequívoca la asignación estructural del producto *N*-metilado como leptomerina, así como del derivado *O*-metilado obtenido bajo condiciones alternativas.

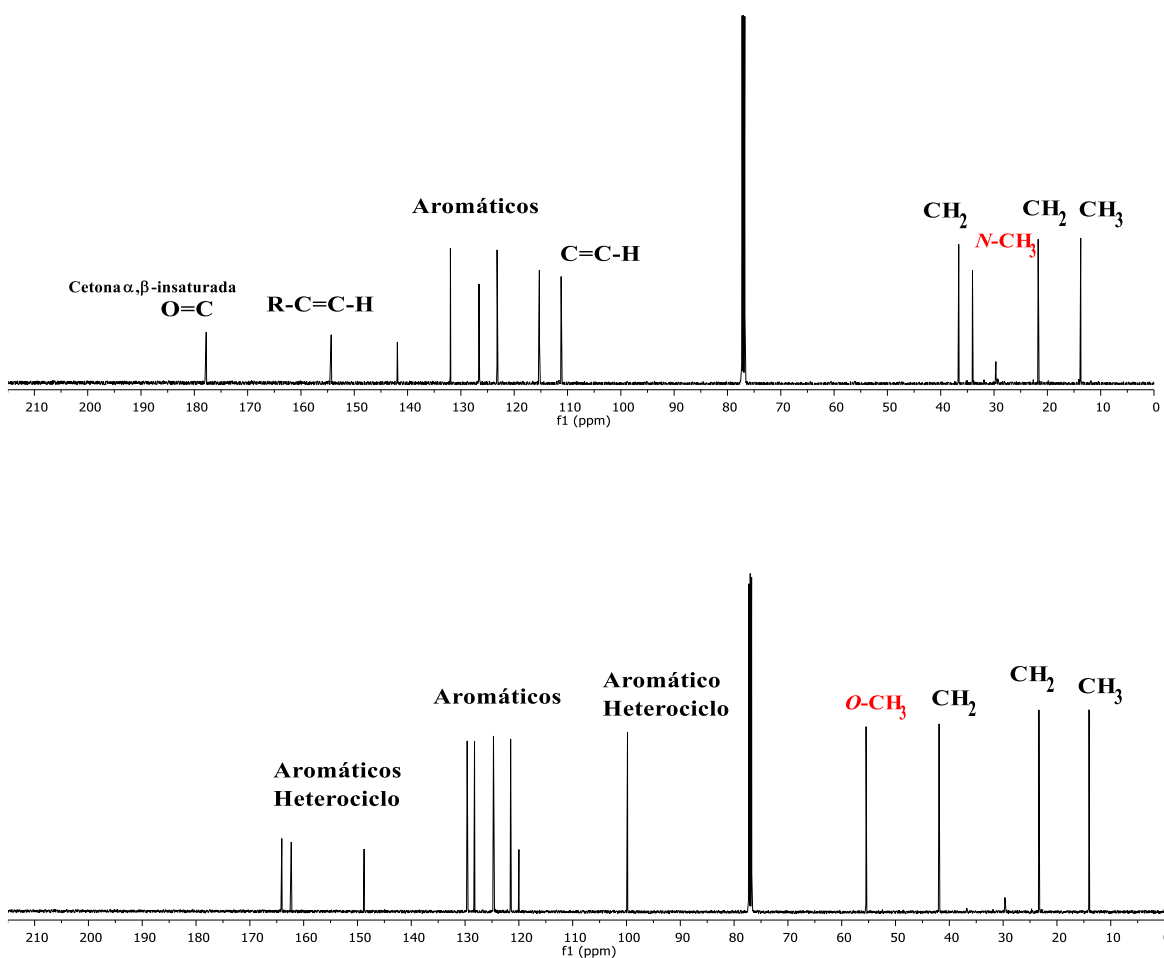


Figura 5. Comparación de los espectros de ^{13}C -RMN de los derivados N-metilado (4a) y O-metilado (subproducto).

Reasignación estructural de leptomerina mediante RMN 1D y 2D

Una vez obtenida la leptomerina por síntesis total, se realizó una revisión detallada de los datos de elucidación estructural disponibles en la literatura. Este análisis comparativo puso en evidencia diversas inconsistencias entre los reportes previos, particularmente con respecto a la asignación de señales de RMN.

La revisión bibliográfica muestra que la leptomerina ha sido aislada a partir de tres fuentes naturales: *Boronia ternata* en 1963, *Haplophyllum leptomerum* en 1986 y *Esenbeckia leiocarpa* en 2010. Paralelamente a estos estudios de aislamiento, se han reportado dos

síntesis totales de leptomerina hasta la fecha: la primera realizada por Werner en 1969 y una segunda por Narasaka en 1993.

De manera interesante, únicamente el aislamiento a partir de *E. leiocarpa* fue asociado con una excelente actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa, lo que posicionó a la leptomerina como un compuesto con potencial para el desarrollo de agentes dirigidos al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Con base en lo anterior, se encontró que solo tres trabajos reportan datos de RMN de ^1H : el aislamiento de *Esenbeckia leiocarpa* (2010), el reporte de *Haplophyllum leptomerum* (1986) y una síntesis publicada en 1993. Las principales discrepancias se localizaron en la región de la cadena alifática, especialmente en las señales correspondientes a H-1' y H-2'. Aunque los desplazamientos reportados en la síntesis de 1993 muestran buena concordancia con los obtenidos en este trabajo, dicho estudio no incluyó asignaciones individuales de señales.

En el caso de RMN de ^{13}C , únicamente se dispone de datos en la literatura para el reporte sintético de 1993 y el aislamiento de 2010. Al comparar estos valores con los obtenidos para la muestra sintetizada en este trabajo, se observaron diferencias notables en varias señales. Estas variaciones son comprensibles si se considera que los estudios más antiguos se realizaron con instrumentación de menor campo (100 MHz) y sin apoyo de experimentos bidimensionales, lo que limitaba la precisión de las asignaciones.

Con el fin de resolver estas discrepancias, se llevó a cabo una confirmación estructural completa de leptomerina mediante RMN de ^1H y ^{13}C , apoyada por experimentos DEPT-135, COSY, HSQC y HMBC. El análisis conjunto de estos experimentos permitió asignar de manera directa y consistente todas las señales del compuesto.

En el espectro de RMN de ^1H , la señal observada a δ_{H} 6.24 ppm como simple fue asignada al protón H-3 del sistema quinolin-4-ona. A manera de ejemplo, se muestra la expansión correspondiente en el espectro HSQC, donde dicha señal presenta correlación directa con el carbono a δ_{C} 111.3 ppm, confirmando su naturaleza CH (Figura 6).

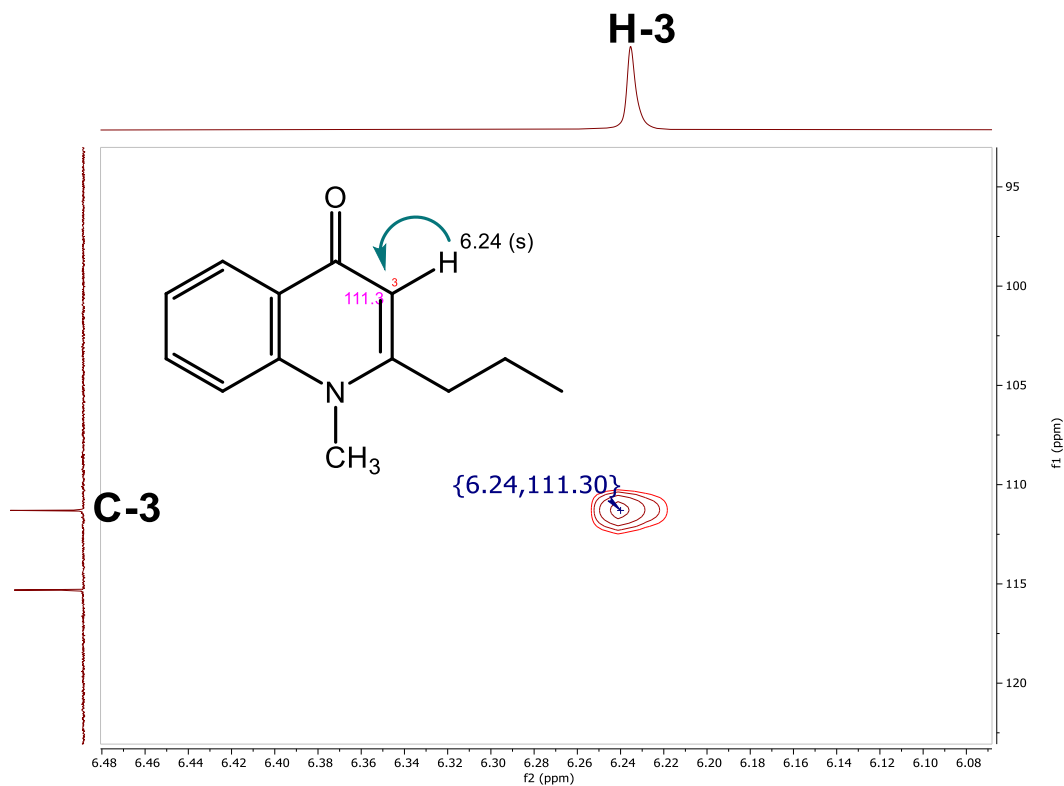


Figura 6. Expansión del espectro de HSQC (CDCl_3 , 500 MHz) de leptomerina **4a**.

Es importante resaltar las correlaciones HMBC que mostró el protón H-3 con los carbonos C-4 (δ_{C} 177.8 ppm), C-2 (δ_{C} 154.3 ppm), C-4a (δ_{C} 126.6 ppm) y C-1' (δ_{C} 36.7 ppm), ya que estas permiten establecer de manera inequívoca la asignación del carbono cuaternario C-4a, evitando posibles ambigüedades entre C4a y C-8a. Asimismo, la correlación observada con C-2 y C-1' confirma la sustitución en C-2 por la cadena lateral alquílica (Figura 7).

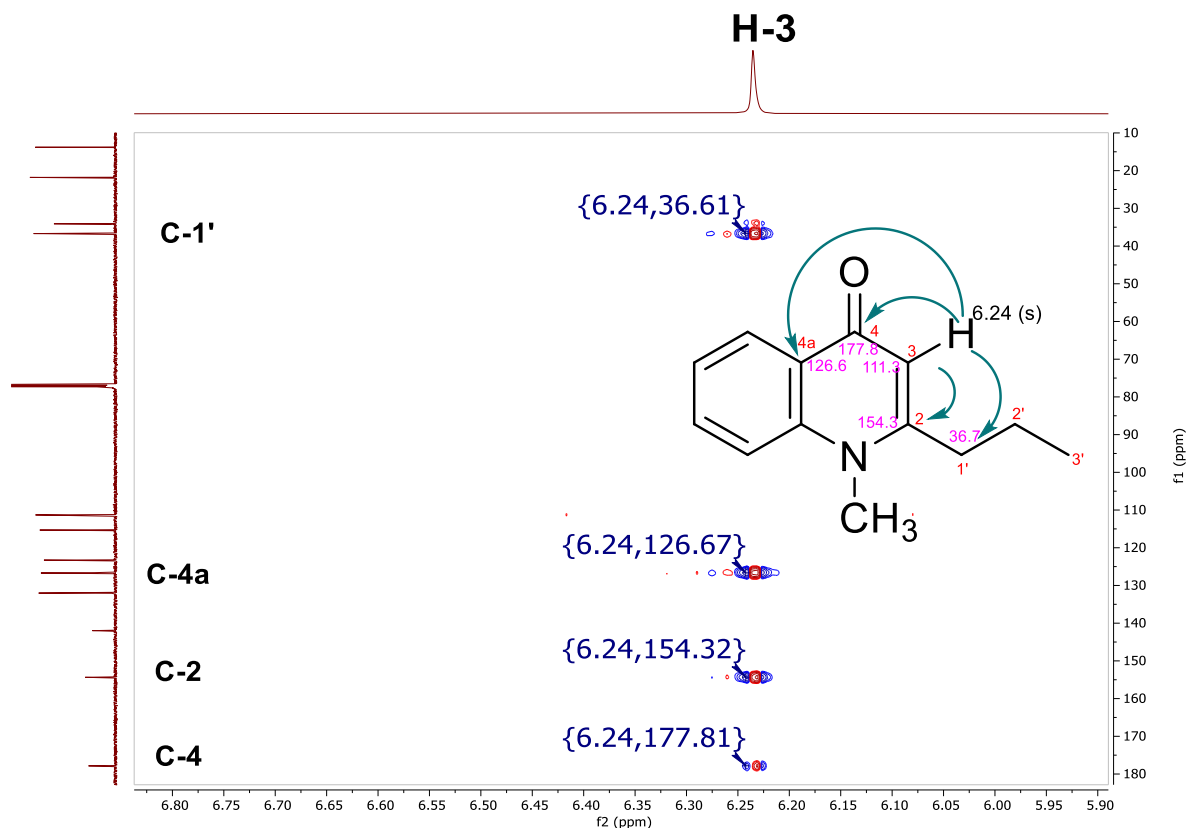


Figura 7. Expansión del espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 MHz) de leptomerina **4a**.

En la región aromática se observó el patrón característico de un anillo aromático 1,2-disustituido. La señal de H-5 (δ_{H} 8.45 ppm, dd) presentó correlaciones COSY con H-6 y correlaciones HMBC con C-7, C-8a y el carbono carbonílico C-4. A su vez, H-6 mostró correlaciones COSY con H-5 y H-7, confirmando la continuidad del sistema aromático. Las señales de H-7 y H-8 presentaron los acoplamientos esperados y correlaciones HMBC consistentes con la topología del núcleo quinolin-4-ona.

La cadena lateral fue definida con claridad mediante los experimentos COSY y HMBC. Los protones del metileno H-1' (δ_{H} 2.70 ppm) mostraron correlación COSY con H-2' (δ_{H} 1.73 ppm), y este a su vez con el metilo terminal H-3' (δ_{H} 1.07 ppm), estableciendo la secuencia metileno–metileno–metilo. Las correlaciones HMBC desde H-1' hacia C-2, C-3 y C-4 confirmaron su unión en la posición C-2 del núcleo heterocíclico.

El grupo *N*-metilo se identificó como una señal simple a δ_H 3.74 ppm, con correlación HSQC a δ_C 34.1 ppm. Las correlaciones HMBC de esta señal con C-2 y C-8a permitieron confirmar su unión al nitrógeno del sistema quinolin-4-ona.

El conjunto de correlaciones observadas permitió realizar una asignación completa y sin ambigüedades de la estructura de leptomerina. Las correlaciones más relevantes para el establecimiento del esqueleto quinolin-4-ona y la localización de los sustituyentes se resumen en la Figura 8. Esta asignación resuelve las discrepancias presentes en reportes previos.

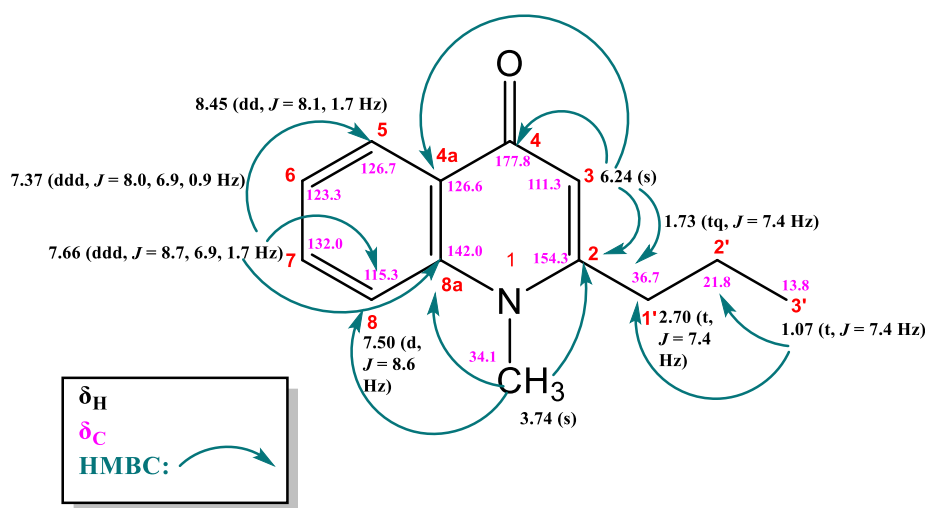


Figura 8. Desplazamientos químicos δ_H , δ_C y correlaciones HMBC representativas de leptomerina empleados para su asignación estructural.

La comparación cronológica de los datos de RMN de 1H y ^{13}C disponibles en la literatura (Tablas 1 y 2) muestra con claridad las inconsistencias entre reportes. En particular, el trabajo de *Esenbeckia leiocarpa* presenta desplazamientos notablemente distintos para H-1' y H-2', lo que sugiere una asignación incorrecta en la cadena lateral.

Tabla 1. Datos comparativos de RMN de ^1H de leptomerina

Posición	<i>Haplophyllum leptomerum</i> 1986 (CDCl_3 , 100 MHz)	Síntesis 1993 (CDCl_3 , 500 MHz)	<i>Esenbeckia leiocarpa</i> 2010 (CDCl_3 , 500 MHz)	Este trabajo (CDCl_3 , 500 MHz)
H-3	6.11 (1H, s)	6.19 (1H, s)	6.36 (s)	6.24 (1H, s)
H-5	8.34 (1H, q, 9, 3 Hz)	8.40 (1H, dd, 1.7, 8.0 Hz)	8.41 (dd)	8.45 (1H, dd, 8.1, 1.7 Hz)
H-6	7.42 (3H, m)	7.32 (1H, dd, 8.0, 8.0 Hz)	7.34 (t)	7.37 (1H, ddd, 8.0, 6.9, 0.9 Hz)
H-7		7.62 (1H, ddd, 1.7, 8.0, 8.0 Hz)	7.52 (d)	7.66 (1H, ddd, 8.7, 6.9, 1.7 Hz)
H-8		7.46 (1H, d, 8.0 Hz)	7.63 (d)	7.50 (1H, d, 8.6 Hz)
H-1' CL	2.59 (2H, t, 7.5 Hz)	2.65 (2H, dd, 7.8, 7.8 Hz)	1.60 (m)	2.70 (2H, t, 7.4 Hz)
H-2' CL	1.63 (3H, m)	1.65-1.73 (2H, m)	1.60 (m)	1.73 (2H, tq, 7.4 Hz)
H-3' CL	0.99 (3H, t, 7.5 Hz,)	1.03 (3H, t, 7.3 Hz),	0.85 (t)	1.07 (3H, t, 7.4 Hz)
N-CH ₃	3.62 (s, 3H)	3.69 (3H, s)	3.77 (s)	3.74 (3H, s)

CL= cadena lateral

En RMN de ^{13}C , se observó además el intercambio de las señales correspondientes a C-4a y C-8a en dicho reporte, situación comprensible dada la similitud electrónica de estos carbonos cuaternarios cuando no se dispone de correlaciones bidimensionales.

Adicionalmente, la señal de C-2 no fue reportada en el estudio de 2010, mientras que en este trabajo se observa con claridad y se encuentra respaldada por correlaciones HMBC desde H-3 y desde el grupo N-metilo. Esto resalta la importancia de realizar asignaciones completas apoyadas en RMN bidimensional.

Tabla 2. Datos comparativos de RMN de ^{13}C de leptomerina

Posición	Síntesis 1993 (CDCl_3 , 125 MHz)	<i>Esenbeckia leiocarpa</i> 2010 (CDCl_3 , 125 MHz)	Este trabajo (CDCl_3 , 125 MHz)
C-2	154.4	No rep	154.3
C-3	111.2	109.0	111.3
C-4	177.8	177.23	177.8
C-4a	126.5	142.14	126.6
C-5	126.6	126.57	126.7
C-6	123.2	123.70	123.3
C-7	132.0	132.18	132.0
C-8	115.3	115.9	115.3
C-8a	141.9	126.7	142.0
C-1' CL	36.6	27.6	36.7
C-2' CL	21.7	27.6	21.8
C-3' CL	13.7	11.6	13.8
N-CH ₃	34.0	34.4	34.1

CL=cadena lateral; No rep=no reportado.

Con la estructura de leptomerina correctamente confirmada y con sus elementos de conectividad y sustitución claramente establecidos, se contó con una base estructural confiable para interpretar su comportamiento químico y para definir posiciones adecuadas de modificación estructural. En particular, la posición C-2 del núcleo quinolin-4-ona se identificó como un punto directo de variación, adecuado para introducir cambios sistemáticos en tamaño, volumen estérico y carácter lipofílico del sustituyente, sin comprometer la integridad del esqueleto heterocíclico.

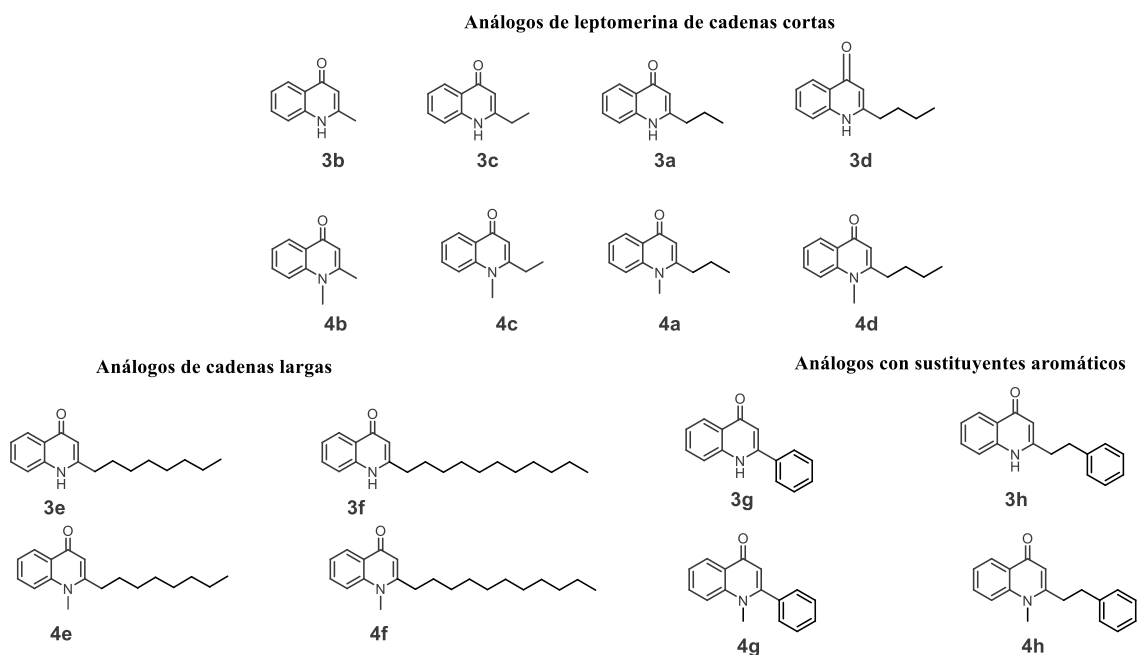
Con base en ello, se planteó la síntesis sistemática de una serie de análogos variando la naturaleza y longitud del sustituyente en C-2, así como el estado de metilación del nitrógeno, con el fin de explorar la relación estructura-actividad dentro de esta familia de compuestos.

Diseño y síntesis de análogos de leptomerina

Con base en la validación estructural de leptomerina y en la identificación de la posición C-2 como un sitio privilegiado de modificación, se abordó el diseño de una serie de análogos estructurales orientados a explorar de manera sistemática el efecto de cambios en tamaño, volumen estérico y carácter lipofílico del sustituyente, así como el impacto del estado de metilación del nitrógeno del sistema.

Bajo este planteamiento, se preparó una biblioteca enfocada de análogos variando de forma controlada la naturaleza y longitud del sustituyente en C-2, manteniendo constante el núcleo quinolin-4-ona. Este enfoque permite evaluar de manera comparativa el efecto de modificaciones estructurales específicas sobre el comportamiento biológico dentro de una misma familia química.

La estrategia sintética empleada para la obtención de estos derivados se muestra en el Esquema 12, donde se presenta la síntesis modular de las series *N*-H libres y *N*-metiladas. La ruta permite generar de manera consistente múltiples análogos a partir de intermediarios comunes, facilitando una exploración sistemática de la relación estructura-actividad.



Esquema 12. Síntesis modular de análogos de leptomerina (**3a–h** y **4a–h**) con variación sistemática en la posición C-2 del núcleo quinolin-4-ona.

Análisis *in vitro* de inhibición de acetilcolinesterasa

La actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados frente a la enzima acetilcolinesterasa se evaluó mediante un ensayo espectrofotométrico basado en el método de Ellman, el cual consiste en la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina por acción de la AChE, produciendo tiocolina, que posteriormente reacciona inmediatamente con el reactivo de Ellman, ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), formando el anión 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB⁻), el cual presenta un color amarillo intenso. La intensidad del color amarillo generado es directamente proporcional a la actividad enzimática y la cual puede cuantificarse mediante espectrofotometría, a una longitud de onda de 412 nm (Figura 9).

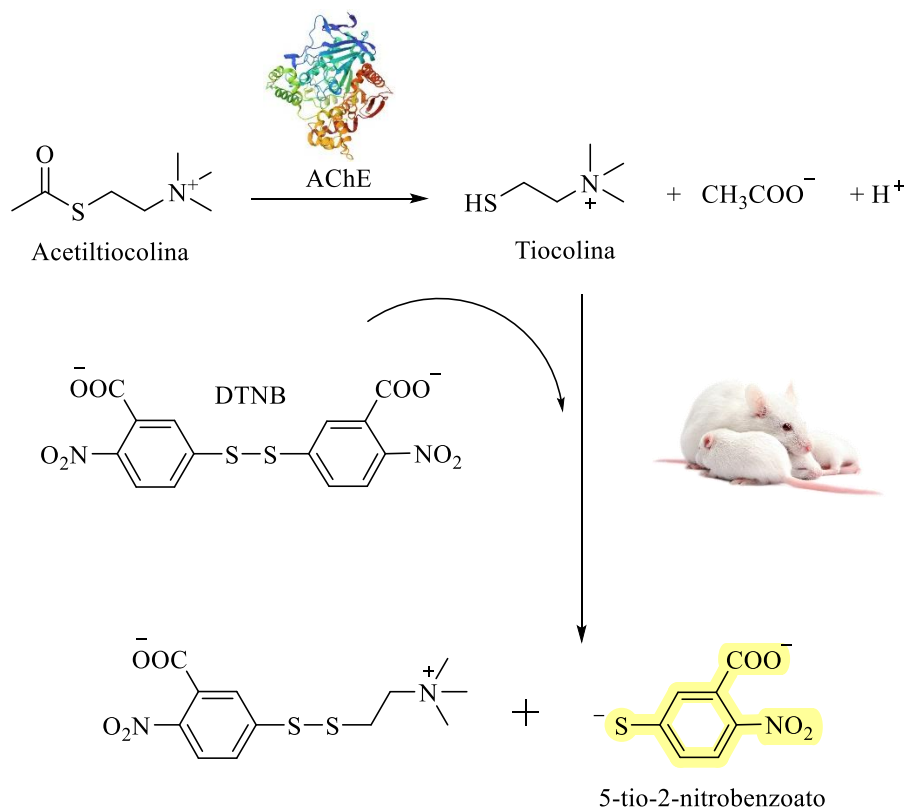


Figura 9. Representación general del ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa mediante el método de Ellman.

Los ensayos se realizaron empleando como controles positivos inhibidores de referencia, y cada medición fue efectuada por triplicado con el fin de asegurar consistencia en los resultados. La actividad enzimática se determinó a partir de la pendiente de la curva de absorbancia en función del tiempo, y el porcentaje de inhibición se calculó con respecto al control negativo, considerado como el 100 % de actividad enzimática.

Es importante señalar que, debido a limitaciones de solubilidad bajo las condiciones del ensayo, únicamente se evaluaron aquellos compuestos que presentaron solubilidad completa en el sistema de disolución empleado. Por lo tanto, los resultados biológicos reportados corresponden a un subconjunto de los análogos sintetizados. Esta restricción experimental se tomó en cuenta en la interpretación de los datos y en el análisis posterior de relación estructura-actividad.

Los valores de inhibición obtenidos permitieron identificar tendencias dentro de la serie de análogos de tipo quinolin-4-ona, particularmente en función de la naturaleza y longitud de la cadena sustituyente en C-2 y del estado de metilación del nitrógeno. En esta etapa, el análisis se enfocó en comparar comportamientos relativos dentro de la misma familia estructural, más que en establecer comparaciones absolutas con fármacos comerciales.

Con base en estos criterios, la discusión detallada de la actividad inhibitoria se realiza a partir de los valores de IC_{50} obtenidos, los cuales se presentan y analizan en la siguiente sección.

Discusión comparativa de la actividad inhibitoria con base en valores de IC_{50}

En concordancia con el enfoque comparativo descrito anteriormente, los valores de IC_{50} obtenidos para los análogos de leptomerina permitieron analizar de manera sistemática el efecto de la naturaleza del sustituyente en C-2 y del estado de metilación del nitrógeno sobre la actividad inhibitoria frente a AChE.

La actividad inhibitoria frente a la acetilcolinesterasa de los análogos de leptomerina que presentaron solubilidad adecuada fue determinada en términos de IC_{50} (μM), y los resultados se resumen en la Tabla 3. Los valores obtenidos se ubican en el rango submicromolar a micromolar bajo, lo que confirma que el sistema quinolin-4-ona sustituido en C-2 constituye una plataforma activa dentro de esta serie.

Tabla 3. Actividad inhibitoria in vitro de acetilcolinesterasa (IC_{50} , μM) de análogos de leptomerina y compuestos de referencia

Compuesto	Sustituyente en C-2	IC_{50} frente a AChE (μM)
Derivados de cadena alifática corta		
3a	$-(CH_2)_2CH_3$	0.35
3c	$-CH_2CH_3$	0.17
4a	$-(CH_2)_2CH_3$	0.33
4b	$-CH_3$	0.06
4c	$-CH_2CH_3$	1.36
4d	$-(CH_2)_3CH_3$	1.10
Derivados de cadena alifática larga		
4e	$-(CH_2)_7CH_3$	4.09
4f	$-(CH_2)_{10}CH_3$	0.41
Derivados aromáticos		
4g	-Ph	0.52
4h	$-(CH_2)_2Ph$	0.73
Compuestos de referencia		
Tacrina		0.04
Donepezilo		0.18

Dentro del subconjunto evaluado, varios compuestos con cadenas alifáticas cortas en la posición C-2 mostraron las mayores potencias inhibitorias. En particular, los compuestos **3a**,

3c, **4a** y **4b** presentaron valores de IC_{50} en el intervalo submicromolar, destacando **4b** como uno de los derivados más activos de la serie. Estos resultados indican que sustituyentes alquilo de tamaño reducido favorecen la interacción con la enzima bajo las condiciones evaluadas.

La comparación directa entre análogos *N*-H y *N*-metilados fue posible en los pares correspondientes (por ejemplo, **3a/4a** y **3c/4c**). En estos casos, la *N*-metilación no produjo una pérdida marcada de actividad, lo que sugiere que la presencia de un NH libre no es un requisito estricto para la inhibición de la enzima. Este comportamiento apunta a que las contribuciones hidrofóbicas y estéricas asociadas al sustituyente en C-2 y al núcleo quinolin-4-ona tienen un peso mayor que una posible donación de enlace de hidrógeno desde el nitrógeno lactámico.

El aumento en la longitud de la cadena alifática mostró efectos no lineales sobre la potencia inhibitoria. Mientras que algunos derivados de cadena larga conservaron actividad apreciable, otros presentaron disminución en la inhibición, lo cual puede relacionarse con restricciones estéricas dentro de la garganta catalítica de la enzima y con cambios en el balance entre hidrofobicidad y ajuste conformacional.

Los derivados aromáticos evaluados mostraron inhibición moderada, consistente con la introducción de mayor rigidez estructural y posibles interacciones de tipo π - π , aunque con menor flexibilidad conformacional en comparación con las cadenas alifáticas cortas.

Al comparar los valores obtenidos con los inhibidores de referencia incluidos en el ensayo, se observa que varios análogos presentan IC_{50} del mismo orden de magnitud que donepezilo bajo las condiciones experimentales empleadas. Esta cercanía de orden de potencia respalda el interés del núcleo quinolin-4-ona sustituido como sistema de partida para estudios adicionales, sin implicar equivalencia farmacológica directa.

En conjunto, los resultados muestran que modificaciones relativamente sutiles en la posición C-2 generan cambios medibles en la actividad inhibitoria, estableciendo una base experimental clara para el análisis de relación estructura-actividad, la cual se explora a mayor detalle en la siguiente sección mediante estudios de acoplamiento molecular.

Análisis de la relación estructura-actividad de análogos de leptomerina mediante acoplamiento molecular (*docking*)

Como se mostró en la sección anterior, la confirmación inequívoca de la estructura química de la leptomerina mediante técnicas de RMN 1D y 2D constituye un punto de partida esencial para el análisis posterior de su comportamiento biológico. Contar con una estructura correctamente asignada es un requisito indispensable para cualquier estudio de relación estructura-actividad, ya que errores en la definición estructural pueden conducir a interpretaciones incorrectas de los resultados biológicos y computacionales.

En este contexto, el estudio de acoplamiento molecular se emplea como una herramienta bioinformática que permite explorar, a nivel molecular, las posibles interacciones entre un ligando y una proteína blanco. En el presente trabajo, la proteína de interés es la acetilcolinesterasa humana, mientras que los ligandos evaluados corresponden a la leptomerina y a una serie de análogos de tipo quinolin-4-ona diversamente funcionalizados en la posición C-2, diseñados a partir de la estructura confirmada del alcaloide natural.

El análisis de acoplamiento permite proponer modelos de unión proteína-ligando y estimar de manera comparativa la afinidad relativa de los compuestos mediante funciones de puntuación (*scoring functions*). Estos valores de score no deben interpretarse como predictores cuantitativos directos de la actividad biológica experimental, sino como parámetros útiles para comparar tendencias de interacción dentro de una misma serie de compuestos evaluados bajo condiciones computacionales consistentes. Por ello, los resultados de acoplamiento molecular se emplean con fines interpretativos y de apoyo al análisis de relación estructura-actividad, y se discuten en conjunto con los datos experimentales de inhibición enzimática.

A partir de la estructura correctamente asignada de la leptomerina, se diseñó una serie de análogos con variaciones sistemáticas en la longitud y naturaleza de la cadena alquílica en C-2, así como en el estado de metilación del nitrógeno del sistema quinolin-4-ona. Este diseño racional permitió evaluar cómo modificaciones estructurales específicas influyen en la interacción con los diferentes sitios de la acetilcolinesterasa, incluyendo el sitio catalítico (CAS) y el sitio periférico (PAS), ambos relevantes en la inhibición de la enzima.

De esta manera, el estudio de acoplamiento molecular no se presenta como un análisis aislado, sino como una extensión lógica de la caracterización estructural previamente

realizada. Los resultados obtenidos a partir del acoplamiento se discuten en función de la estructura confirmada de la leptomerina y se utilizan para racionalizar las tendencias observadas en la actividad inhibitoria de los análogos sintetizados, contribuyendo así a una comprensión integral de la relación estructura-actividad dentro de esta familia de compuestos.

Como se mencionó anteriormente, se presentaron limitaciones en la solubilidad de algunos compuestos bajo las condiciones del ensayo biológico, por lo que únicamente se evaluó un subconjunto representativo de 10 análogos en los estudios de acoplamiento molecular (Figura 10).

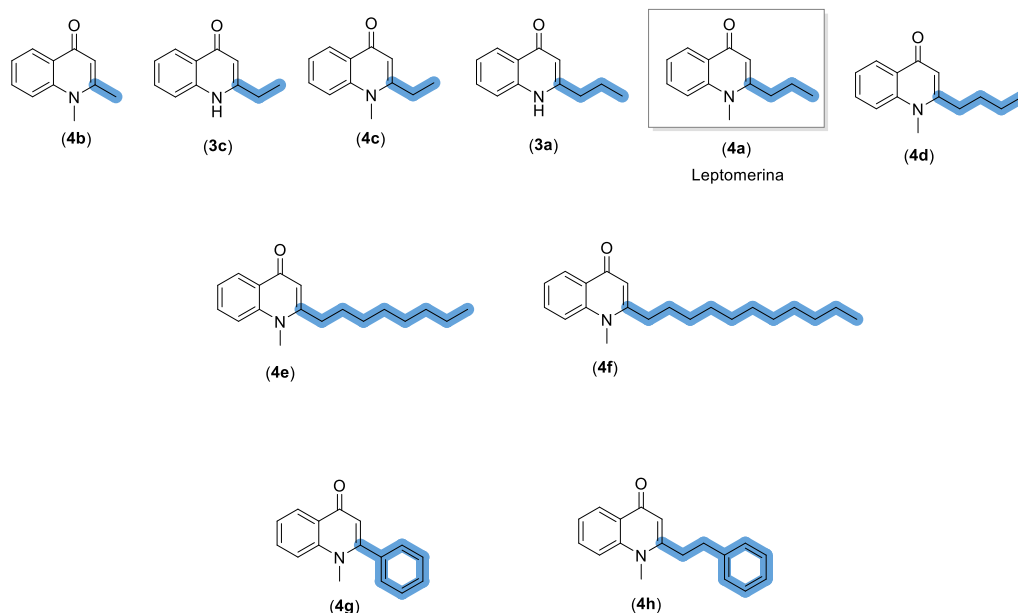


Figura 10. Leptomerina y análogos evaluados en el estudio de acoplamiento molecular.

Para la realización de los estudios de acoplamiento molecular se emplearon dos estructuras cristalinas de acetilcolinesterasa humana, correspondientes a los complejos con tacrina (PDB ID: 7XN1) y con donepezilo (PDB ID: 4EY7), Figura 11.

La preparación de los sistemas, definición del sitio de unión y los cálculos de acoplamiento molecular se llevaron a cabo utilizando el programa Chimera versión 1.19.

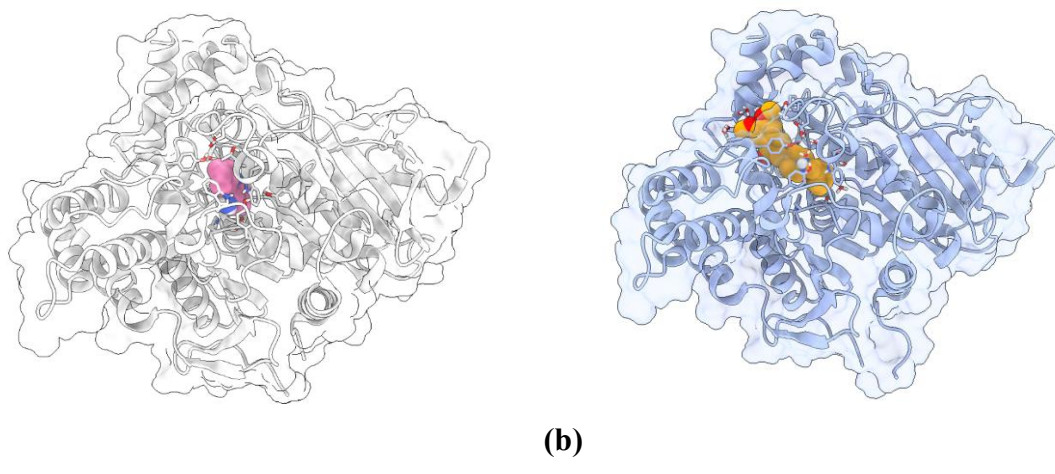


Figura 11. Estructuras cristalinas de acetilcolinesterasa humana empleadas en los estudios de acoplamiento molecular: (a) complejo con tacrina (PDB ID: 7XN1) y (b) complejo con donepezilo (PDB ID: 4EY7).

Resultados de acoplamiento molecular empleando la estructura 7XN1

Los compuestos con cadenas alifáticas cortas mostraron un modo de unión preferente al sitio catalítico (CAS), con interacciones predominantes con residuos conservados como Trp86 e His447, lo cual se describió de manera más adecuada utilizando la estructura 7XN1, que contiene un inhibidor pequeño y presenta una garganta catalítica más estrecha (Figura 12).

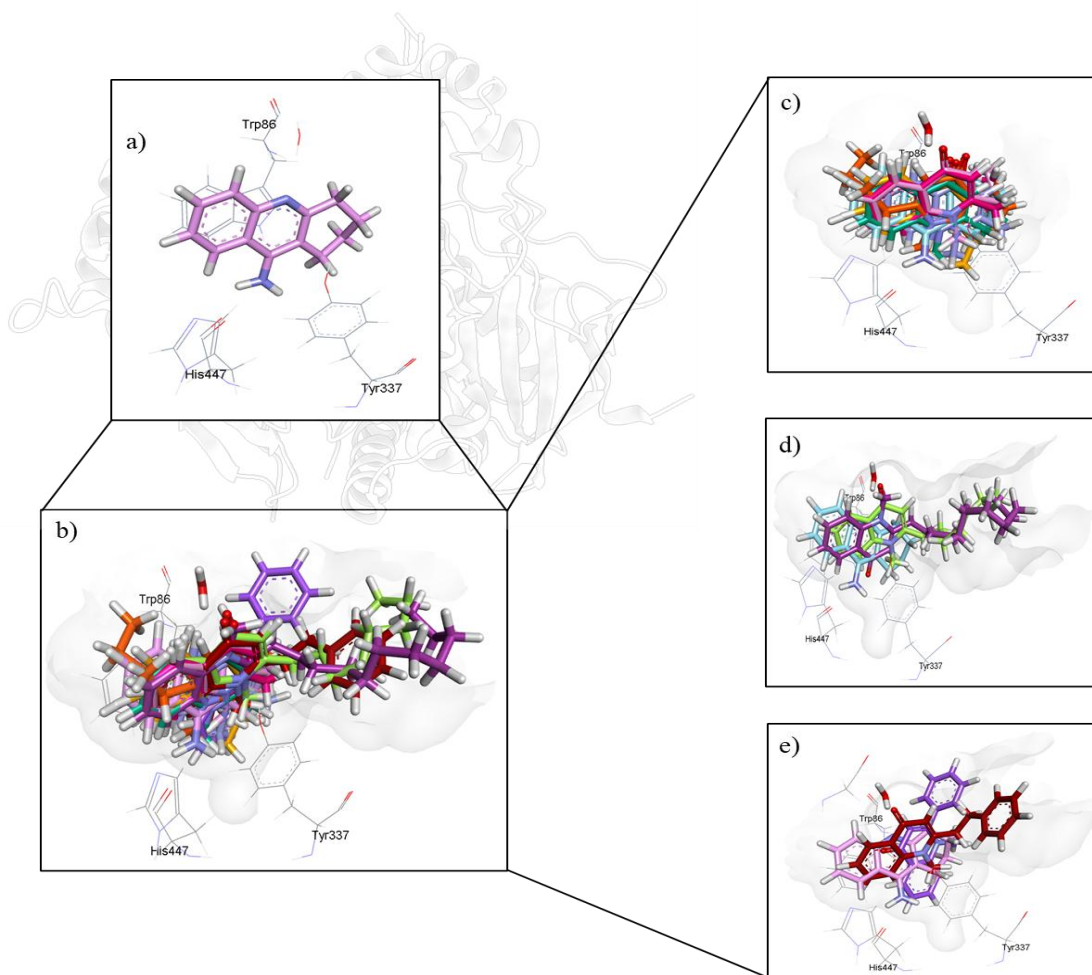
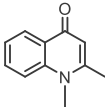
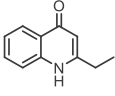
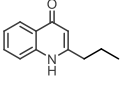
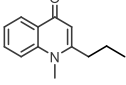
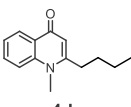


Figura 12. Poses obtenidas del cálculo de acoplamiento molecular en la estructura 7XN1. (a) Tacrina (color rosa). (b) Superposición de las poses de todos los ligandos evaluados. (c) Ligandos con cadenas alifáticas cortas. (d) Ligandos con cadenas alifáticas largas. (e) Ligandos con sustituyentes aromáticos.

Las energías de interacción calculadas para los compuestos de cadena alifática corta acoplados en el modelo 7XN1 se resumen en la Tabla 4. En general, los valores de *score* obtenidos se encuentran en un rango consistente con interacciones favorables dentro de la garganta catalítica de la enzima y guardan concordancia con las tendencias experimentales de inhibición.

Tabla 4. Energías de interacción de ligandos de cadena corta con la estructura 7XN1.

	IC ₅₀ (μM)	Score (kcal/mol)
 4b	0.06	-7.2
 3c	0.17	-7.7
 4c	1.36	-7.1
 3a	0.35	-7.5
 4a	0.33	-7.3
 4d	1.10	-6.9
Tacrina	0.04	-9.7

Como se observa en la Figura 12c, los compuestos de cadena corta adoptan una orientación similar a la de tacrina dentro del sitio catalítico. El grupo carbonilo del núcleo quinolin-4-ona establece interacciones mediadas por una molécula de agua de cristalización, de manera análoga al inhibidor de referencia. Asimismo, se identifican interacciones de apilamiento π - π con el residuo aromático Trp86 en todos los ligandos, así como contactos adicionales con Tyr337.

En algunos compuestos, particularmente **4c** y **4d**, se observaron interacciones adicionales con His447, que incluyen enlaces de hidrógeno convencionales y contactos C-H $\cdots$ O, lo que podría contribuir a la estabilización del complejo.

Los compuestos más activos de la serie, **4b** ($IC_{50} = 0.06 \mu M$) y **3c** ($IC_{50} = 0.17 \mu M$), presentan un modo de unión bien definido dentro de la garganta catalítica. En el caso de **4b**, además de las interacciones π - π con Trp86 y Tyr337, se identifican contactos π -alquilo con Trp439 y Tyr449, así como una interacción π -donador de enlace de hidrógeno con Tyr337.

El ligando **3c** muestra igualmente interacciones de apilamiento π - π con Trp86 y Tyr337, así como contactos hidrofóbicos con Trp439, lo que concuerda con su elevada potencia inhibitoria (Figura 13).

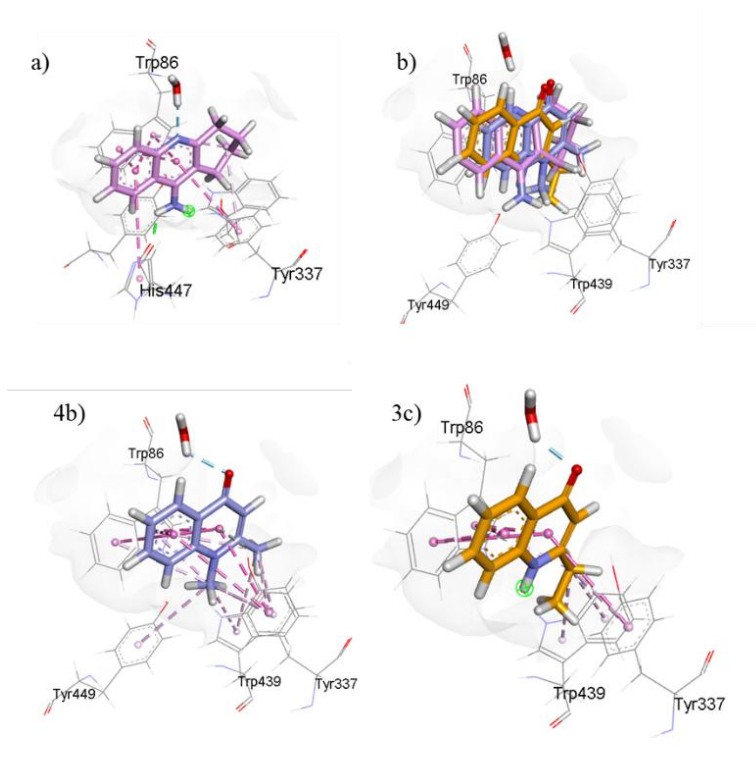


Figura 13. Representación bidimensional de las interacciones ligando-acetilcolinesterasa obtenidas a partir de estudios de acoplamiento molecular empleando la estructura cristalina 7XN1. (a) Modo de unión de referencia de tacrina. (b) Superposición de los ligandos **4b** y **3c**. (c) Interacciones del compuesto **4b** con AChE. (d) Interacciones del compuesto **3c** con AChE.

Los demás ligandos de cadena corta conservan un patrón de interacción similar, caracterizado por contactos consistentes con los residuos Trp86 y Tyr337 y, en algunos casos, con Gly121, lo que sugiere un modo de unión conservado dentro de esta subserie.

Los ligandos de cadena larga **4e** y **4f** interactúan tanto con el sitio catalítico (CAS), de manera similar a tacrina, como con el sitio aniónico periférico (PAS). En particular, se observan

contactos con residuos característicos del PAS, tales como Trp286, Phe297 y Tyr124, lo que sugiere un modo de unión de tipo dual para estos compuestos (Figura 14).

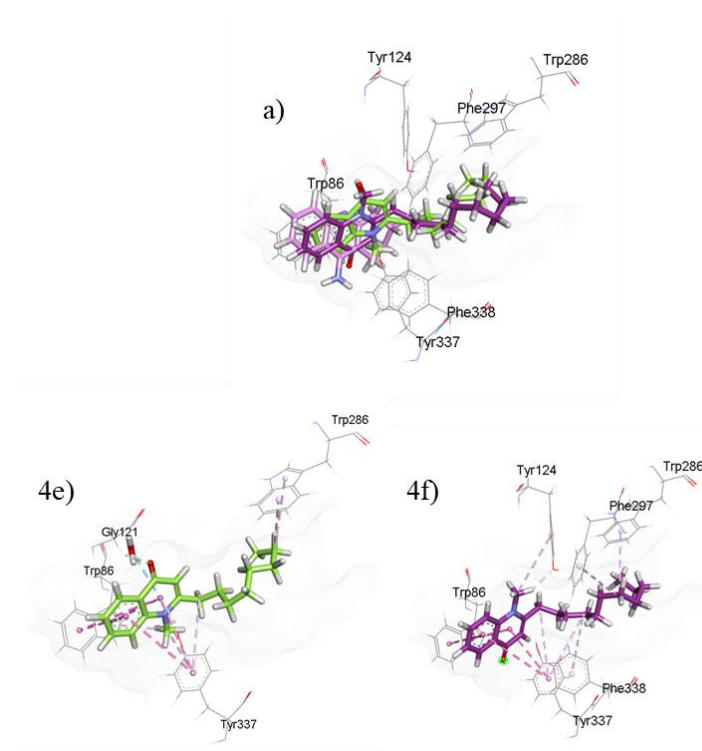


Figura 14. Representación bidimensional de las interacciones ligando-acetilcolinesterasa obtenidas a partir de estudios de acoplamiento molecular empleando la estructura cristalina 7XN1. (a) Superposición de los ligandos **4e**, **4f** y tacrina. (b) Interacciones del compuesto **4e** con 7XN1. (c) Interacciones del compuesto **4f** con 7XN1.

Los ligandos con sustituyentes aromáticos presentan un modo de unión similar al de tacrina dentro del sitio catalítico, particularmente el compuesto **4h**. Por otro lado, el compuesto **4g** muestra interacciones adicionales con Tyr124 mediante apilamiento π - π en forma de T y con Asp74 a través de una interacción π -anión, como se observa en la Figura 15.

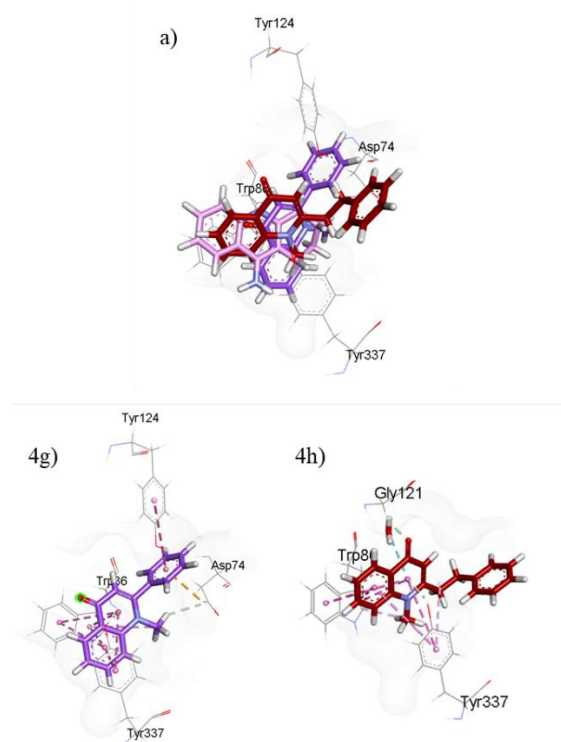
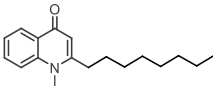
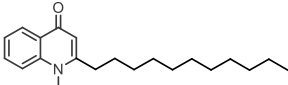
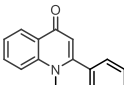
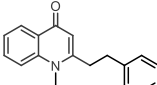


Figura 15. Representación bidimensional de las interacciones ligando-acetilcolinesterasa obtenidas a partir de estudios de acoplamiento molecular empleando la estructura cristalina 7XN1. (a) Superposición de los ligandos **4g**, **4h** y tacrina. (b) Interacciones del compuesto **4g**. (c) Interacciones del compuesto **4h**.

Acoplamiento molecular en la estructura 4EY7

Como se observó en la sección anterior, el modelo 7XN1 describe de manera adecuada el comportamiento de los compuestos de cadena corta. Sin embargo, los derivados con cadenas largas y sustituyentes aromáticos se racionalizan de forma más clara empleando la estructura 4EY7. Las energías de interacción calculadas para estos compuestos en el modelo 4EY7 se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Energías de interacción con 4EY7.

	IC ₅₀ (μM)	Score (kcal/mol)
 4e	4.09	-8.9
 4f	0.41	-7.8
 4g	0.52	-7.2
 4h	0.73	-10.4
Donepezil	0.18	-12.2

Como se observa en la Figura 16, los compuestos se insertan profundamente en la cavidad catalítica y establecen interacciones con residuos aromáticos como Tyr337, Phe338, Tyr341 e His447. Estas interacciones están dominadas por apilamiento π - π y contactos hidrofóbicos, los cuales desempeñan un papel central en la estabilización del complejo. Asimismo, se observan contactos adicionales con residuos cercanos a la región periférica, como Tyr124, Gly120 y Gly121.

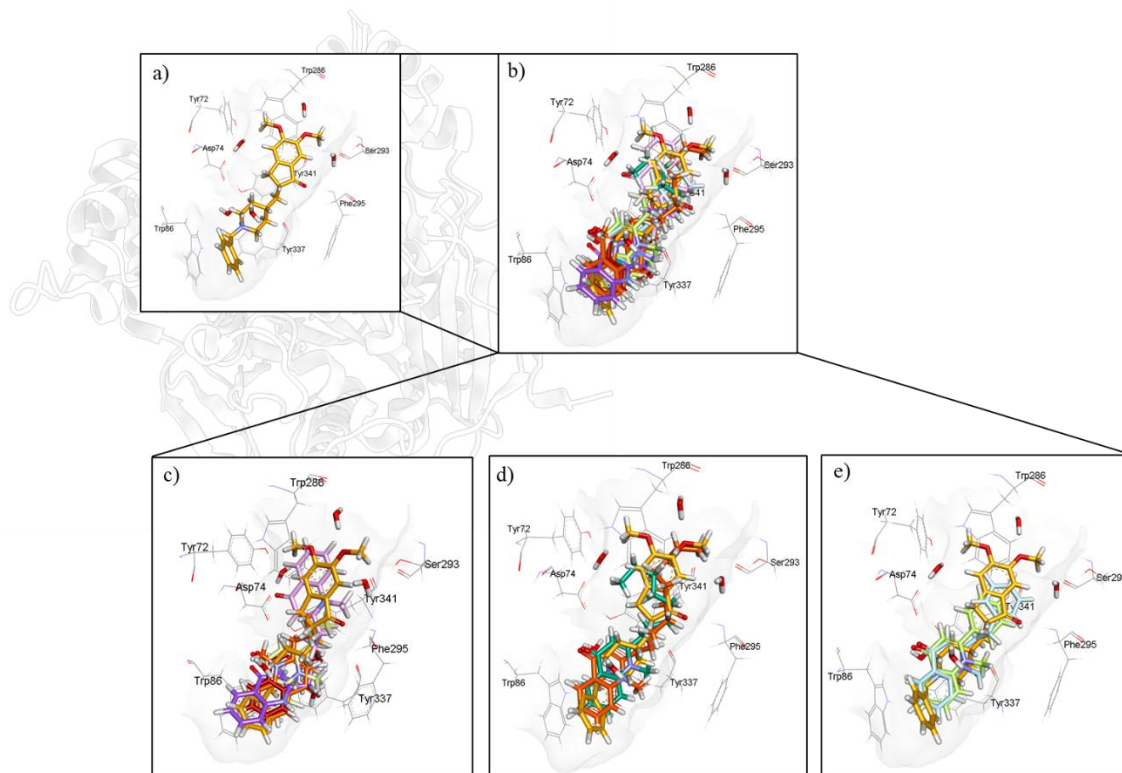


Figura 16. Poses de acoplamiento representativas obtenidas empleando la estructura cristalina de la acetilcolinesterasa 4EY7. (a) Modo de unión de referencia de donepezilo. (b) Superposición de todos los ligandos acoplados. (c-e) Orientaciones de unión representativas de análogos de leptomerina de cadena corta, cadena larga y con sustituyentes aromáticos dentro del sitio activo catalítico.

Los compuestos más activos, **4b** y **3c**, muestran en este modelo interacciones tanto con el sitio catalítico como con el PAS y, en comparación con donepezilo, se ubican en una región más profunda de la garganta catalítica (Figura 17).

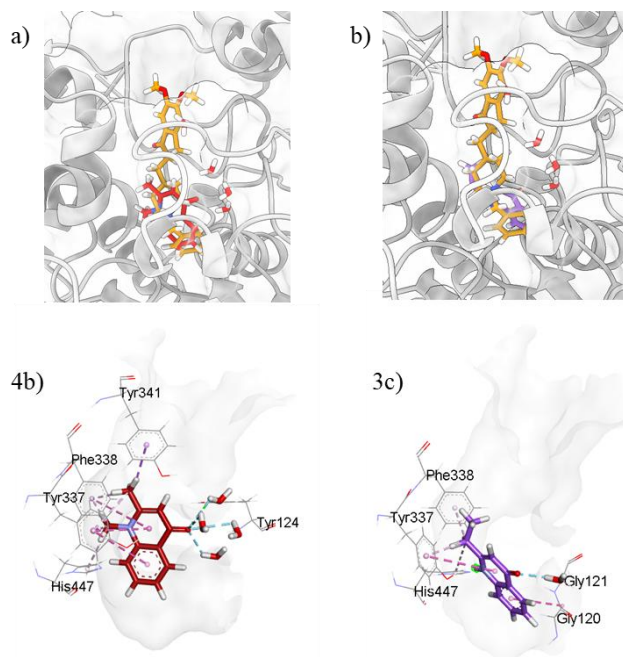


Figura 17. a) Superposición de los ligandos donepezilo y los compuestos más activos **4b** y **3c** en la estructura 4EY7. (a) Donepezilo y **4b**. (b) Donepezilo y **3c**. (c) Interacciones del compuesto **4b** con AChE. (d) Interacciones del compuesto **3c** con AChE.

Por otro lado, los ligandos **4e** y **4f** adoptan una conformación extendida a lo largo del canal catalítico, estableciendo contactos con residuos aromáticos como Tyr337, Phe338, Tyr341, Trp286 e His447. Además, las interacciones por enlace de hidrógeno con Tyr124 contribuyen a la estabilización del ligando. La participación de Trp286, residuo localizado en el sitio aniónico periférico, sugiere que estos compuestos actúan como inhibidores de unión dual, interactuando simultáneamente con las regiones catalítica y periférica de la enzima (Figura 18).

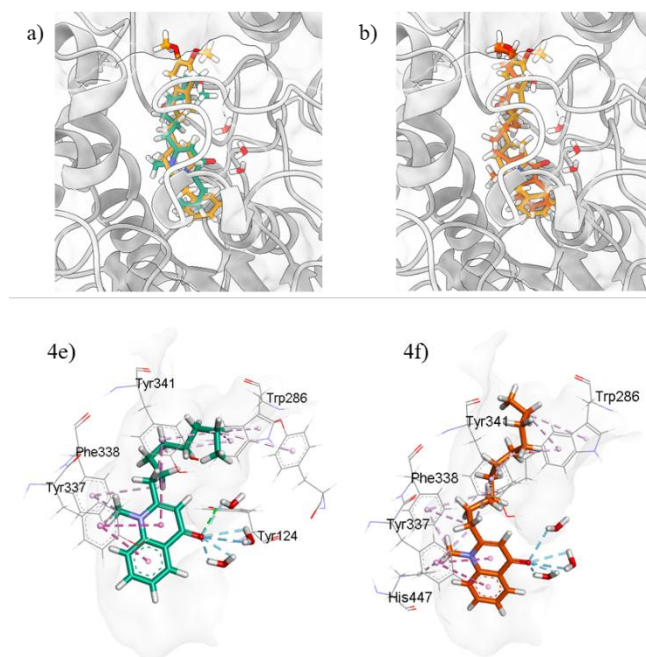


Figura 18. a) Interacciones de los ligandos de cadena larga **4e** y **4f** en la estructura 4EY7. (a) Superposición de donepezilo y el compuesto **4e**. (b) Superposición de donepezilo y el compuesto **4f**. (c) Interacciones del compuesto **4e** con AChE. (d) Interacciones del compuesto **4f** con AChE.

Para los compuestos aromáticos **4g** y **4h** también se observan interacciones de apilamiento π - π e interacciones hidrofóbicas con residuos aromáticos como Tyr337, Phe338, Tyr341 y Trp286. Además, las interacciones por puente de hidrógeno con Tyr124 contribuyen a la estabilización del ligando. La participación de Trp286, ubicado en el sitio aniónico periférico, confirma la capacidad de estos ligandos para interactuar con ambos sitios del bolsillo catalítico (Figura 19).

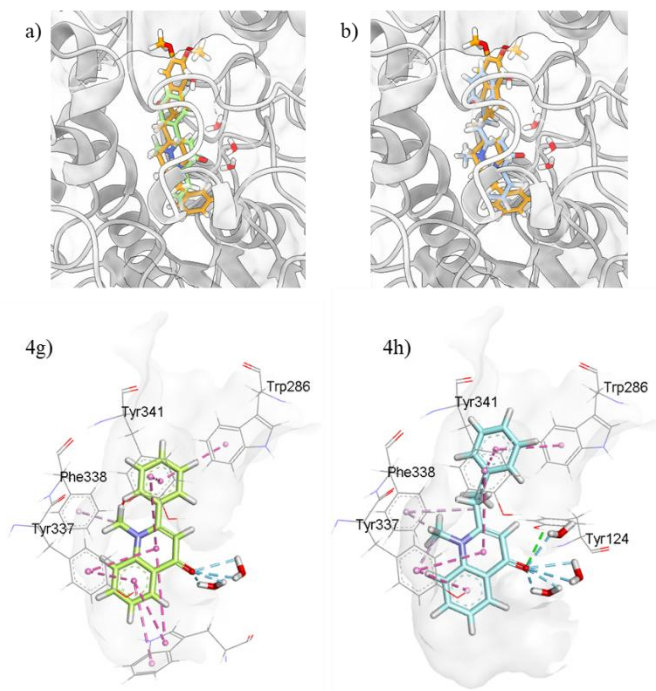


Figura 19. Interacciones de los ligandos aromáticos **4g** y **4h** en la estructura 4EY7. (a) Superposición de donepezilo y el compuesto **4g**. (b) Superposición de donepezilo y el compuesto **4h**. (c) Interacciones del compuesto **4g** con AChE. (d) Interacciones del compuesto **4h** con AChE.

En conjunto, los estudios de acoplamiento molecular empleando las estructuras 7XN1 y 4EY7 permiten racionalizar de manera coherente las tendencias observadas en la actividad inhibitoria de los análogos de leptomerina. Los derivados de cadena corta muestran preferencia por el sitio catalítico, mientras que los compuestos con cadenas largas y sustituyentes aromáticos presentan la capacidad de interactuar simultáneamente con el sitio catalítico y el sitio aniónico periférico, comportándose como inhibidores de unión dual. Estas observaciones concuerdan con los valores de IC_{50} obtenidos experimentalmente y apoyan el diseño racional de la serie, confirmando que las modificaciones en C-2 y el estado de metilación del nitrógeno modulan de manera significativa el modo de unión y la potencia inhibitoria.

Desarrollo Experimental

La cromatografía analítica en capa fina (*TLC*) se ejecutó utilizando placas de gel de sílice con un indicador de fluorescencia (F254), específicamente placas de gel de sílice 60 de calidad comercial. Los sistemas de elución de fase móvil empleados fueron hexano/acetato de etilo (AcOEt) y diclorometano/metanol. El desarrollo de placas *TLC* se facilitó utilizando luz ultravioleta de onda corta a 254 nm. En el caso de la cromatografía en columna se utilizó gel de sílice 60 de Merck®, siguiendo la técnica de cromatografía en columna (CC) flash. El sistema de elución consistió en una combinación de hexano/AcOEt y DCM/MeOH.

Resonancia Magnética Nuclear:

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se obtuvieron en un espectrómetro *BRUKER-AVANCE III* (500 MHz). Como disolvente se utilizó cloroformo deuterado (CDCl_3). Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales de los diferentes espectros de ^1H está referida como “s” para una señal simple, “d” para una señal doble, “dd” para una señal doble de dobles, “ddd” para una señal doble de doble de dobles, “m” para una señal múltiple.

Puntos de fusión:

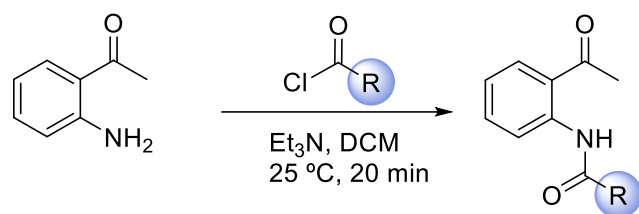
Los puntos de fusión se determinaron utilizando un fusiómetro marca SEV con técnica de cubreobjetos, con escala en grados Celsius.

Disolventes y materias primas:

Los reactivos que se utilizaron fueron de calidad grado analítico.

Los disolventes empleados fueron purificados y secados de acuerdo con los métodos reportados.¹

Procedimiento general para la obtención orto-amidoacetofenonas



Rendimiento 90-95 %

Cloruro de acetilo: R = CH₃

Cloruro de propionilo: R = CH₂CH₃

Cloruro de butirilo: R = CH₂CH₂CH₃

Cloruro valerilo: R = CH₂CH₂CH₂CH₃

Cloruro de nonanoilo: R = (CH₂)₇CH₃

Cloruro de dodecanoilo: R = (CH₂)₁₀CH₃

Cloruro de benzoilo: R = Ph

Cloruro de hidrocinaoilo: R = (CH₂)₂Ph

2b: R = CH₃

2c: R = CH₂CH₃

2a: R = CH₂CH₂CH₃

2d: R = CH₂CH₂CH₂CH₃

2e: R = (CH₂)₇CH₃

2f: R = (CH₂)₁₀CH₃

2g: R = Ph

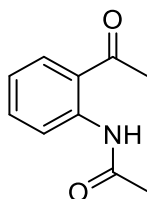
2h: R = (CH₂)₂Ph

Esquema 23. Procedimiento general para la obtención de amidas con diversos cloruros de acilo.

A una solución de 2-aminoacetofenona (4.11 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL), se añaden el cloruro de ácido correspondiente (5.8 mmol), y Et₃N (4.29 mmol). Se adiciona a la mezcla más CH₂Cl₂ (2mL) y se agita durante 20 min a temperatura ambiente. La reacción se termina por la adición de agua (5 mL) y CH₂Cl₂ (5 mL). A continuación, se extrae con CH₂Cl₂ (2 x 10 mL) y se lava con solución acuosa salina (10 mL). La fase orgánica se recupera y se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida.

La purificación se lleva a cabo por cromatografía en columna en gel de sílice y se eluye con un sistema Hexano/AcOEt (8:2), dando como resultado las *orto*-amidoacetofenonas (**2a–2h**) con un rendimiento del 90% al 95%.

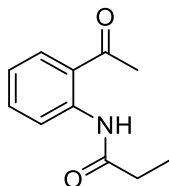
***N*-(2-acetilfenil)acetamida (2b)**



Sólido beige, 95%. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 11.71 (s, 1H), 8.74 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.89 (dd, *J* = 7.7, 2.0 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H), 7.11 (dd, *J* = 7.6, 7.6 Hz, 1H),

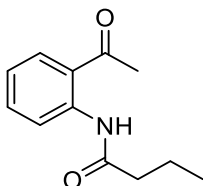
2.67 (s, 3H), 2.23 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 202.8, 169.4, 140.9, 135.1, 131.5, 122.2, 121.6, 120.6, 28.6, 25.5.

***N*-(2-acetilfenil)propionamida (2c)**



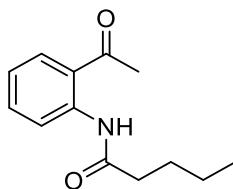
Sólido verde, 94%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.73 (s, 1H), 8.78 (dd, J = 8.5, 1.1 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.55 (dd, J = 8.5, 8.5 Hz, 1H), 7.10 (ddd, J = 8.1, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 2.67 (s, 3H), 2.48 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.28 (t, J = 7.6 Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 202.8, 173.3, 141.1, 135.1, 131.6, 122.1, 121.6, 120.6, 31.7, 28.5, 9.5.

***N*-(2-acetilfenil)butiramida (2a)**



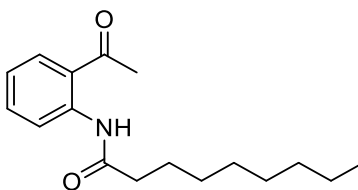
Sólido blanco, 94%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.72 (s, 1H), 8.78 (dd, J = 8.5, 1.3 Hz, 1H), 7.89 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.55 (ddd, J = 8.6, 7.3, 1.6 Hz, 1H), 7.10 (dd, J = 7.7, 7.7 Hz, 1H), 2.67 (s, 3H), 2.42 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.79 (tq, J = 7.4, 7.4 Hz, 2H), 1.02 (t, J = 7.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 202.8, 172.5, 141.1, 135.1, 131.6, 122.1, 121.6, 120.7, 40.6, 28.5, 18.9, 13.7.

***N*-(2-acetilfenil)pentanamida (2d)**



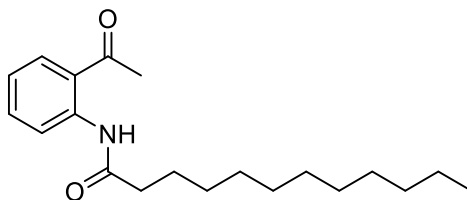
Aceite incoloro, 93%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.72 (s, 1H), 8.77 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.53 (dd, J = 8.6, 8.6 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 2.65 (s, 3H), 2.43 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.74 (tt, J = 7.6, 7.6 Hz, 2H), 1.42 (dq, J = 7.4, 7.4 Hz, 2H), 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 202.7, 172.6, 141.0, 135.0, 131.5, 122.0, 121.5, 120.5, 38.3, 28.4, 27.4, 22.2, 13.6.

***N*-(2-acetilfenil)nonanamida (2e)**



Aceite incoloro, 92%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.71 (s, 1H), 8.78 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.55 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, 1H), 7.11 (dd, J = 7.7, 7.7 Hz, 1H), 2.67 (s, 3H), 2.43 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.75 (tt, J = 7.0, 6.9 Hz, 2H), 1.41 – 1.23 (m, 10H), 0.87 (t, J = 6.3 Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 202.8, 172.9, 141.1, 135.2, 131.6, 122.2, 121.7, 120.8, 38.8, 31.8, 29.3, 29.2, 29.1, 28.6, 25.5, 22.6, 14.1.

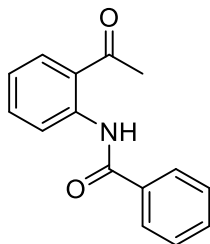
***N*-(2-acetilfenil)dodecanamida (2f)**



Aceite amarillo, 91%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.71 (s, 1H), 8.78 (dd, J = 8.5, 1.2 Hz, 1H), 7.89 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.55 (ddd, J = 8.7, 7.2, 1.6 Hz, 1H), 7.10 (ddd, J = 8.3, 7.4, 1.2 Hz, 1H), 2.67 (s, 3H), 2.43 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.75 (tt, J = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 1.41 –

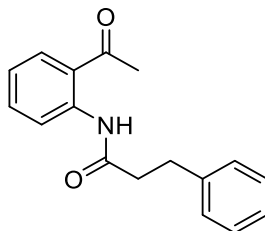
1.22 (m, 16H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 202.8, 172.8, 141.2, 135.1, 131.6, 122.1, 121.6, 120.7, 38.8, 31.9, 29.6 (2C), 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 28.6, 25.5, 22.6, 14.1.

***N*-(2-acetilfenil)benzamida (2g)**



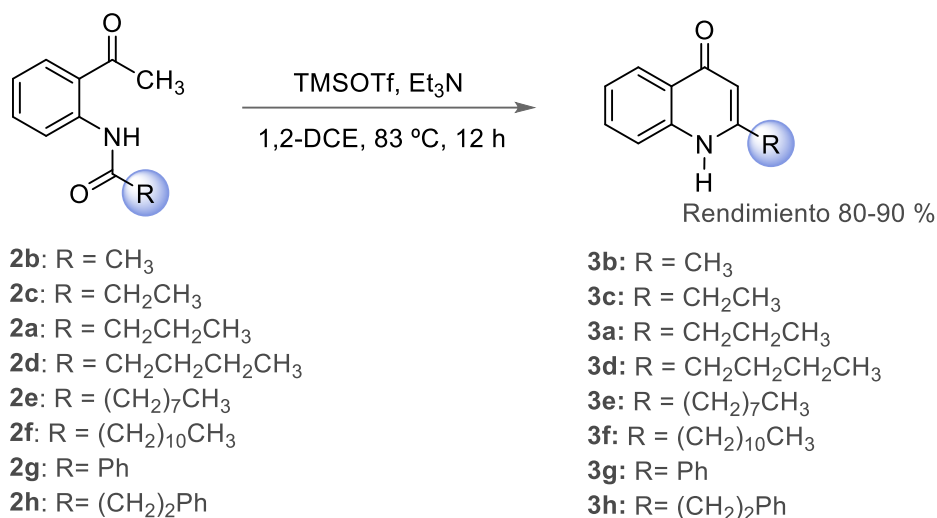
Sólido amarillo, 90%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 12.70 (s, 1H), 8.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.96 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.62 (dd, $J = 7.9, 7.9$ Hz, 1H), 7.59 – 7.49 (m, 3H), 7.16 (dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, 1H), 2.72 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 203.2, 166.1, 141.4, 135.4, 134.8, 132.0, 131.8, 128.8 (2C), 127.5 (2C), 122.5, 121.9, 120.8, 28.6.

***N*-(2-acetilfenil)-3-fenilpropanamida (2h)**



Sólido blanco, 90%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.72 (s, 1H), 8.76 (dd, $J = 8.5, 1.2$ Hz, 1H), 7.88 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H), 7.55 (ddd, $J = 8.6, 7.4, 1.6$ Hz, 1H), 7.32 – 7.23 (m, 4H), 7.19 (dd, $J = 7.1, 7.1$ Hz, 1H), 7.11 (dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, 1H), 3.08 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.76 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.65 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 202.8, 171.5, 141.0, 140.6, 135.1, 131.6, 128.5 (2C), 128.4 (2C), 126.2, 122.3, 121.7, 120.8, 40.2, 31.4, 28.6.

Procedimiento general para la ciclación intramolecular de orto-amidoacetofenonas

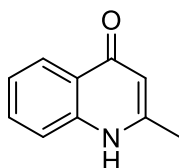


Esquema 24. Procedimiento general para la ciclación intramolecular.

A una solución de la correspondiente amida (**2a-2h**) (11.05 mmol) en 9 mL de DCE anhidro, se adicionan con jeringa Et₃N, (33.5 mmol) y TMSOTf (55.25 mmol) en atmósfera inerte de N₂ a temperatura ambiente y posteriormente se eleva la temperatura a reflujo (83 °C) y se agita durante toda la noche (12h). Posteriormente se detiene la reacción adicionando 20 mL de MeOH y 50 mL de una solución 2M de NaOH. Se extrae con ActOEt (2 x 50 mL) y se lava con una solución 2M de NaOH (2 x 50 mL). Para asegurar la máxima extracción de (**2a-h**), se extrae nuevamente con ActOEt (2 x 50 mL) la fase acuosa. Las fases orgánicas se combinan se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida.

El producto se purifica por cromatografía en columna en gel de sílice con un sistema eluyente CH₂Cl₂/CH₃OH (95:5), obteniendo las correspondientes *orto*-amidoacetofenonas (**3a-3h**) con un rendimiento del 80–90%

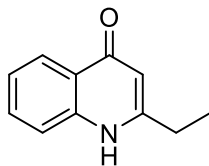
2-metilquinolin-4(1H)-ona (**3b**)



Sólido beige, 90%. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.33 (s, 1H), 8.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.33 (dd, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 1H), 6.18 (s, 1H), 2.44 (s, 3H);

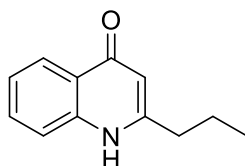
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 178.5, 150.8, 140.2, 132.0, 125.2, 124.5, 123.8, 118.2, 108.8, 20.2.

2-etilquinolin-4(1H)-ona (3c)



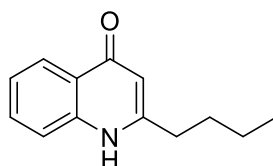
Sólido blanco, 89%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 12.94 (s, 1H), 8.37 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.59 (ddd, $J = 8.3, 7.1, 1.4$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 2.80 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.33 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 179.0, 156.9, 140.7, 131.8, 125.0, 124.8, 123.6, 118.8, 107.1, 27.3, 13.2.

2-propilquinolin-4(1H)-ona (3a)



Sólido rojizo, 90%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 13.01 (s, 1H), 8.38 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.60 (dd, $J = 7.7, 7.7$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 2.71 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 1.77 (tq, $J = 7.4, 7.4$ Hz, 2H), 0.90 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 178.8, 155.5, 140.8, 131.7, 125.0, 124.9, 123.5, 118.8, 108.0, 36.1, 22.3, 13.5.

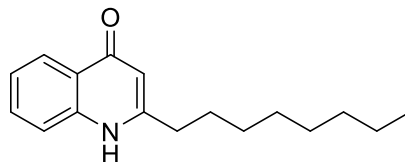
2-butilquinolin-4(1H)-ona (3d)



Sólido beige, 88%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 12.89 (s, 1H), 8.37 (dd, $J = 8.1, 1.6$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J = 8.5, 8.5$ Hz, 1H), 7.34 (ddd, $J = 8.1, 7.0, 1.1$ Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 2.66 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 1.70 (tt, $J = 7.7, 7.7$ Hz, 1H), 1.30 (tq, $J = 7.4, 7.4$

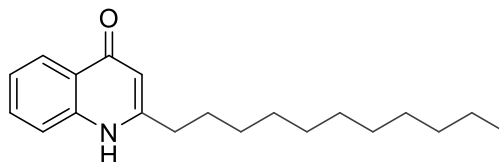
Hz, 2H), 0.82 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 178.8, 155.7, 140.8, 131.7, 125.0, 124.9, 123.5, 118.8, 107.9, 34.0, 31.1, 22.2, 13.6.

2-octilquinolin-4(1H)-ona (3e)



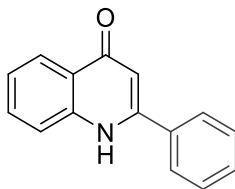
Sólido blanco, 87%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 12.25 (s, 1H), 8.36 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, 1H), 6.26 (s, 1H), 2.70 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 1.71 (tt, $J = 7.8, 7.7$ Hz, 2H), 1.34 – 1.13 (m, 10H), 0.82 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 178.8, 155.3, 140.6, 131.8, 125.2, 124.8, 123.6, 118.5, 108.1, 34.4, 31.8, 29.3, 29.2, 29.1, 29.1, 22.6, 14.1.

2-undecilquinolin-4(1H)-ona (3f)



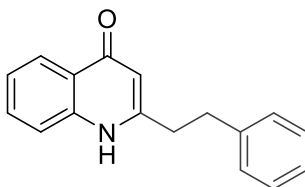
Sólido blanco, 86%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.61 (s, 1H), 8.36 (dd, $J = 8.1, 1.4$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.58 (ddd, $J = 8.4, 6.8, 1.5$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 7.5, 7.5$ Hz, 1H), 6.23 (s, 1H), 2.68 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 1.72 (tt, $J = 7.8, 7.7$ Hz, 2H), 1.32 – 1.17 (m, 16H), 0.85 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 178.9, 154.8, 140.5, 131.7, 125.4, 125.0, 123.5, 118.2, 108.3, 34.4, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 29.2, 29.0, 22.7, 14.1.

2-phenylquinolin-4(1H)-one (3g)



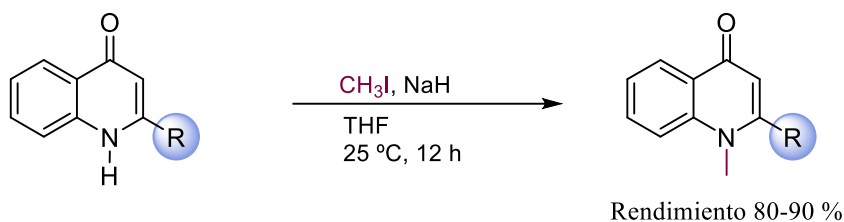
Sólido blanco, 88%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.75 – 7.69 (m, 1H), 7.67 – 7.61 (m, 2H), 7.57 – 7.48 (m, 3H), 7.37 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H), 6.56 (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 179.2, 151.2, 140.2, 134.1, 132.1, 130.5, 128.9 (2C), 127.1 (2C), 125.1, 124.5, 124.0, 118.1, 107.8.

2-feniletilquinolin-4(1H)-ona (3h)



Sólido blanco, 87%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.26 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J = 8.2, 8.2$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.38 – 7.31 (m, 1H), 7.30 – 7.26 (m, 2H), 7.24 – 7.17 (m, 3H), 6.22 (s, 1H), 3.03 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 2.93 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 179.1, 153.3, 139.9, 139.9, 131.8, 128.5 (2C), 128.2 (2C), 126.4, 125.3, 124.6, 123.7, 117.7, 108.3, 35.8, 35.0

Procedimiento general para la N-metilación del sistema quinolin-4-ona.



3b: R = CH₃
3c: R = CH₂CH₃
3a: R = CH₂CH₂CH₃
3d: R = CH₂CH₂CH₂CH₃
3e: R = (CH₂)₇CH₃
3f: R = (CH₂)₁₀CH₃
3g: R = Ph
3h: R = (CH₂)₂Ph

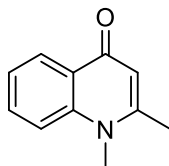
4b: R = CH₃
4c: R = CH₂CH₃
4a: R = CH₂CH₂CH₃
4d: R = CH₂CH₂CH₂CH₃
4e: R = (CH₂)₇CH₃
4f: R = (CH₂)₁₀CH₃
4g: R = Ph
4h: R = (CH₂)₂Ph

A un matraz que contiene a las correspondientes quinolin-4-onas (**32–35**) (2.67 mmol) se adiciona NaH (4.08 mmol) en 20 mL de THF, se deja agitar a temperatura ambiente (25 °C), durante 4 min. Posteriormente se adiciona CH₃I (64.25 mmol), y la mezcla resultante se mantiene en agitación a temperatura ambiente (25 °C) durante toda la noche (12 h).

La reacción se detiene adicionando NH₄Cl (20 mL), se deja agitando 5 min. Enseguida, se separa la fase acuosa con NaOH 10% (20 mL). Se extrae con AcOEt (3 x 20 mL). La fase orgánica resultante se seca con Na₂SO₄ anhidro se filtra y se concentra a presión reducida.

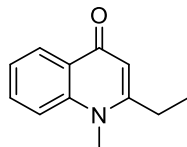
Los productos se purifican por cromatografía en columna en un sistema 95:5 CH₂Cl₂/CH₃OH, dando un rendimiento del 80% al 90%

1,2-dimetilquinolin-4(1H)-ona (4b)



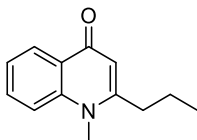
Sólido blanco, 90%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.44 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.65 (ddd, $J = 8.7, 6.9, 1.7$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.37 (ddd, $J = 8.0, 7.0, 0.9$ Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.47 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 177.7, 150.9, 141.7, 132.0, 126.6, 126.5, 123.2, 115.1, 111.8, 34.2, 22.2.

2-etil-1-metilquinolin-4(1H)-ona (4c)



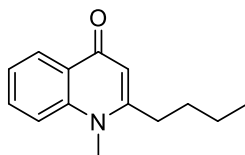
Sólido blanco, 89%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.43 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.64 (dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 7.5, 7.5$ Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.73 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.31 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 177.9, 155.8, 141.8, 131.9, 126.5, 126.3, 123.1, 115.2, 109.9, 33.8, 27.6, 12.8.

1-metil-2-propilquinolin-4(1H)-ona (4a)



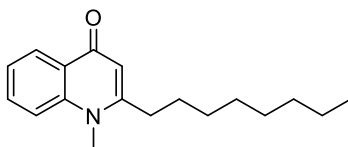
Sólido amarillo, 89%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.45 (dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, 1H), 7.66 (ddd, $J = 8.7, 6.9, 1.7$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.37 (ddd, $J = 8.1, 6.9, 0.9$ Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.70 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.73 (tq, $J = 7.4, 7.4$ Hz, 2H), 1.07 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 177.8, 154.3, 142.0, 132.0, 126.7, 126.6, 123.3, 115.3, 111.3, 36.7, 34.1, 21.8, 13.8.

2-butil-1-metilquinolin-4(1H)-ona (4d)



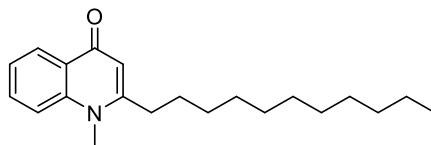
Sólido amarillo, 88%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.43 (dd, $J = 8.1, 1.6$ Hz, 1H), 7.64 (dd, $J = 8.5, 7.2$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.36 (dd, $J = 7.5, 7.5$ Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.69 (t, 2H), 1.65 (tt, $J = 8.0, 7.5$ Hz, 2H), 1.46 (tq, $J = 7.4, 7.4$ Hz, 2H), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 177.7, 154.6, 141.8, 131.9, 126.4, 126.4, 123.2, 115.3, 111.0, 34.4, 34.1, 30.5, 22.3, 13.7.

1-methyl-2-octilquinolin-4(1H)-one (4e)



Sólido beige, 86%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.45 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.67 (ddd, $J = 8.7, 7.0, 1.8$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.38 (dd, $J = 7.5, 7.5$ Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.72 (t, 2H), 1.68 (tt, $J = 7.8, 7.7$ Hz, 2H), 1.43 (tt, $J = 7.2, 6.8$ Hz, 2H), 1.31 – 1.26 (m, 8H), 0.88 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 177.8, 154.8, 141.9, 132.0, 126.6, 126.4, 123.3, 115.3, 111.1, 34.8, 34.1, 31.7, 29.2 (2C), 29.1, 28.5, 22.6, 14.1.

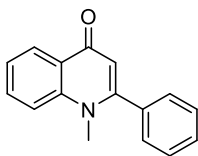
1-metil-2-undecilquinolin-4(1H)-ona (4f)



Sólido beige, 84%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.46 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.66 (ddd, $J = 8.7, 6.9, 1.7$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.38 (ddd, $J = 7.9, 6.9, 0.9$ Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.72 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 1.74 – 1.65 (m, 4H), 1.48 – 1.35 (m, 2H), 1.38 – 1.21 (m, 12H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 177.8, 154.7, 142.0,

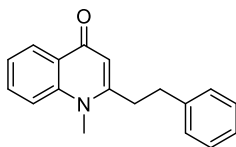
132.0, 126.7, 126.6, 123.3, 115.3, 111.2, 34.8, 34.1, 31.9, 29.6 (2C), 29.5, 29.3, 29.3, 28.6, 22.7, 14.1.

1-metil-2-fenilquinolin-4(1H)-ona (4g)



Sólido blanco, 87%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.73 (dd, $J = 8.1, 8.1$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.54 – 7.49 (m, 3H), 7.48 – 7.39 (m, 3H), 6.31 (s, 1H), 3.62 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 177.6, 154.7, 141.9, 135.8, 132.4, 129.6, 128.8 (2C), 128.5 (2C), 126.8, 126.7, 123.7, 115.9, 112.7, 37.3.

1-metil-2-feniletilquinolin-4(1H)-ona (4h)



Sólido beige, 86%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.47 (dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 1H), 7.68 (dd, $J = 7.9, 7.9$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 7.5, 7.5$ Hz, 1H), 7.36 – 7.29 (m, 2H), 7.29 – 7.18 (m, 3H), 6.30 (s, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.07 – 2.98 (m, 4H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 177.8, 153.8, 141.9, 139.6, 132.1, 128.8 (2C), 128.3 (2C), 126.8, 126.7, 126.6, 123.4, 115.3, 111.1, 36.5, 35.1, 34.1.

Análisis *in vitro* de acetilcolinesterasa.

Los reactivos y fármacos utilizados en este estudio se adquirieron de Sigma-Aldrich. Se utilizaron Microplacas Falcon de 96 pozos con tapa, volumen 0.37 ml, de fondo plano transparente.

Los resultados se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.

Preparación Amortiguador de fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 M, pH 7.4, J.T Baker)

Se preparó un buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4), el cual se utilizó como medio de reacción en todos los ensayos.

Calibración del potenciómetro

Preparación de las soluciones patrón

Se emplearon soluciones buffer estándar de pH conocido (7.00 y 10.00).

Calibración inicial

El electrodo se sumergió en la solución buffer de pH 7.00, asegurando que el detector de membrana estuviera completamente cubierto. Se esperó hasta la estabilización de la lectura y se ajustó el potenciómetro al valor correspondiente al pH de la solución patrón.

Calibración de la pendiente

Posteriormente, el electrodo se enjuagó con agua destilada y se sumergió en una segunda solución buffer (pH 10.00). Una vez estabilizada la señal, se ajustó la pendiente del equipo según el valor del buffer empleado.

Condiciones de medición

Todas las calibraciones se realizaron a temperatura controlada y bajo las mismas condiciones experimentales que las mediciones posteriores.

Preparación del reactivo de Ellman (DTNB).

El reactivo de Ellman (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) se preparó a una concentración final de 10 mM. Para ello, se pesaron 39.6 mg de DTNB y se disolvieron en 10 mL de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4). La solución se mezcló suavemente hasta obtener una disolución homogénea. El reactivo preparado se protegió de la luz y se mantuvo a 4 °C hasta su uso, empleándose preferentemente el mismo día de su preparación.

Preparación de Etopropazina

La etopropazina se preparó a una concentración final de 6 mM. Para ello se pesaron 2 mg de etopropazina y se disolvieron en 10 mL de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4). La solución se mezcló hasta obtener una disolución homogénea.

Preparación de Yoduro de acetilcolina (sustrato)

El yoduro de acetilcolina se preparó a una concentración final de 28 mM, se disolvieron 7.7 mg de yoduro de acetilcolina en 10 mL de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4).

Preparación de la muestra sanguínea

La muestra sanguínea se obtuvo a partir de la vena caudal de rata (*Rattus norvegicus*). La rata fue inmovilizada levemente. Posteriormente, se realizó una punción distal utilizando una lanceta estéril.

La sangre recolectada se depositó inmediatamente en un tubo de EDTA y se mantuvo en refrigeración hasta su procesamiento. Para el ensayo de acetilcolinesterasa, la muestra sanguínea fue diluida 1:100 en Triton X-100 al 0.03 %, con el fin de hemolizar los eritrocitos y liberar la enzima.

Las muestras preparadas se utilizaron de manera inmediata en la determinación de la actividad de AChE mediante el método espectrofotométrico de Ellman, evitando ciclos de congelación-descongelación.

Preparación de controles positivos

La tacrina y el donepezilo, utilizados como controles positivos de inhibición de la acetilcolinesterasa, se disolvieron en etanol al 35% para obtener soluciones stock. A partir de estas, se realizaron diluciones seriadas en buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4) hasta alcanzar las concentraciones finales de ensayo (0.005, 0.01, 0.02, 0.04 y 0.08 μ M)

Preparación de los compuestos a evaluar

Los compuestos a evaluar se prepararon siguiendo el mismo procedimiento que los controles positivos, asegurando condiciones experimentales homogéneas. Se realizaron diluciones seriadas en buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4) hasta alcanzar las concentraciones finales de 30, 15, 7.5, 3.75, 1.875, 0.937, 0.468 y 0 μ M.

Procedimiento

El ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) se realizó mediante una adaptación del método espectrofotométrico descrito por Ellman et al., utilizando microplacas de 96 pocillos.

En cada pocillo se adicionaron 50 μ L de la muestra enzimática (sangre de rata diluida 1:100 en Triton X-100 al 0.03 %), 100 μ L de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4), 50 μ L de la solución del compuesto en estudio o del control positivo (tacrina o donepezilo), 70 μ L de DNTB (reactivo de Ellman) y 5 μ L de etopropazina. Para el control negativo (concentración 0), el compuesto fue sustituido por el solvente correspondiente.

La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 10 min para permitir la interacción enzima-inhibidor. Posteriormente, se añadieron 5 μ L de yoduro de acetiltiocolina (28.3 mM) para iniciar la reacción enzimática.

Inmediatamente después de la adición del sustrato, se monitoreó el incremento de absorbancia a 410 nm utilizando un lector de microplacas. Las lecturas se realizaron cada minuto durante 3 min.

La actividad enzimática se calculó a partir de la pendiente de la curva de absorbancia en función del tiempo. El porcentaje de inhibición se determinó comparando la actividad de cada muestra con respecto al control negativo, considerado como 100 % de actividad enzimática. Todos los ensayos se realizaron al por triplicado.

Acoplamiento molecular

Todos los programas utilizados en este proyecto son de acceso libre. Para el acoplamiento se usaron diferentes programas, tales como el servidor en línea CB-Dock2, PyRx y Chimera 1.19. Para la visualización de las imágenes se utilizaron Discovery Studio 2025 y Chimera X.

La información de las proteínas se obtuvo servidores en línea tales como Proteins Plus y Protein Data Bank. Mientras que la alineación de secuencias se realizó en el servidor Crystal Omega.

Validación del método por Acoplamiento ciego

Selección de los cristales en PDB

Los criterios de selección para la validación del acoplamiento ciego son los siguientes:

1. Similitud estructural
2. Similitud de secuencias

1. Similitud estructural

La búsqueda se inició con cristales que contengan inhibidores conocidos de AChE. En este caso, tacrina y derivados, dado su parecido estructural con los compuestos sintetizados, especialmente con aquellos de cadenas cortas, se consideró un punto de partida adecuado para el acoplamiento molecular (Figura 20). Esta aproximación permitió evaluar si los compuestos estudiados podrían acomodarse en el sitio activo de manera similar a la tacrina, y así prever posibles modos de unión y afinidades relativas.

Los cristales encontrados son los siguientes, PDB Id: 7XN1, 1ACJ, 1E66, 1UT6, 6G1U. También se buscaron cristales estructuralmente más grandes, ya que también tenemos cadenas más largas en nuestros compuestos, PDB Id: 5FUM, 5FOQ, 7QB4 y 4EY7. Tabla 6.

Tabla 6. PDB ID de los cristales con ligandos similares estructuralmente.

Proteínas (PDB ID)	Organismo	Resolución (Å)	Ligandos
1ACJ	<i>Tetronarce californica</i>	2.80 Å	THA_A_999
1E66	<i>Tetronarce californica</i>	2.10 Å	HUX_A_803
1UT6	<i>Tetronarce californica</i>	2.40 Å	A8N_A_1538
5FOQ	<i>Mus musculus</i>	2.30 Å	GC8_A_1543
5FUM	<i>Mus musculus</i>	2.50 Å	SOF_A_1543
7QB4	<i>Mus musculus</i>	2.50 Å	AJ9_A_603
7XN1	<i>Homo sapiens</i>	2.85 Å	THA_A_601
4EY6	<i>Homo sapiens</i>	2.40 Å	GNT_A_604
4EY7	<i>Homo sapiens</i>	2.35 Å	E20_A_604

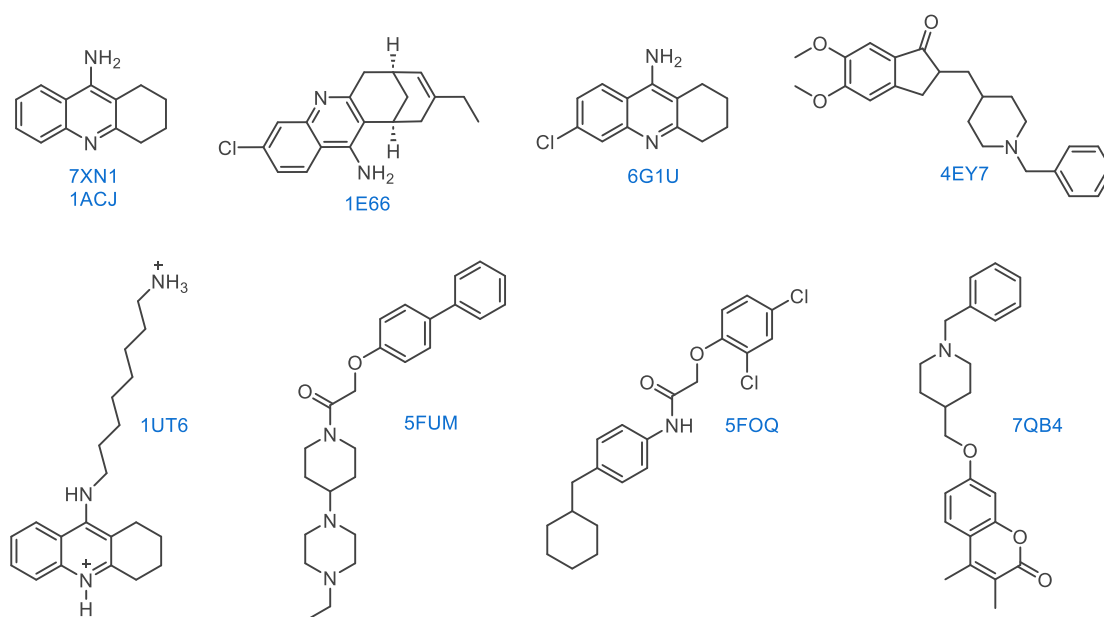


Figura 20. Ligandos de los diferentes cristales de AChE, seleccionados para la validación del método de acoplamiento ciego.

2. Similitud de secuencias

Con la finalidad de comprender el comportamiento de las interacciones de los ligandos con los diferentes cristales de acetilcolinesterasa, se realizó un análisis comparativo de secuencias de estos, con el objetivo de identificar que aminoácidos se conservan en el sitio de unión de acetilcolinesterasa. El alineamiento múltiple de las secuencias de acetilcolinesterasa de *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Tetronarce californica* reveló una alta conservación de los residuos catalíticos esenciales. Sin embargo, se identificaron diferencias en residuos aromáticos localizados en el sitio aniónico periférico y la garganta catalítica al comparar la enzima humana con la de *Tetronarce californica*. Dado que estos residuos participan directamente en la unión de inhibidores voluminosos y en el reconocimiento molecular, dichas variaciones podrían influir en las predicciones de acoplamiento molecular (Figuras 21-24).

Todas las proteínas y ligandos fueron preparados en el programa Chimera X, eliminando el agua de cristalización, demás ligandos y las fuerzas aplicadas fueron las de Gasteiger.

Una vez que se realizaron las validaciones con todas las proteínas y sus respectivos ligandos, se realizó la validación “cruzada” utilizando una proteína, pero cambiando los ligandos, por ejemplo, para el receptor 1ACJ se corrieron los acoplamientos moleculares con todos los ligandos de los demás receptores seleccionados, y así con cada uno Tabla 7.

Tabla 7. PDB ID de los receptores utilizados para la validación cruzada.

Proteína	Ligandos	
1acj	1e66	5fum
	1ut6	7qb4
	6glu	5foq
1e66	1acj	5fum
	1ut6	7qb4
	6glu	5foq
1ut6	1acj	5fum
	1e66	7qb4
	6glu	5foq
6glu	1acj	5fum
	1e66	7qb4
	1ut6	5foq
5fum	1acj	6glu
	1e66	7qb4
	1ut6	5foq
7qb4	1acj	6glu
	1e66	5fum
	1ut6	5foq
5foq	1acj	6glu
	1e66	5fum
	1ut6	7qb4

Sin embargo, CB-DOCK 2 contiene información de coincidencia de plantillas, que busca complejos conocidos con proteínas y ligandos similares en la base de datos de proteína-ligando y transferirlos a la proteína y ligando de consulta. Si se recupera algún complejo similar, CB-Dock2 utilizará dos tipos de información; acoplamiento ciego basado en la estructura y basado en plantillas para realizar la simulación de acoplamiento. Lo que le permite obtener los modos de acoplamiento de las estructuras complejas similares en la base de datos con la suposición de que los ligandos similares dan como resultado modos de unión similares³⁰.

Por otro lado, nosotros buscamos solo realizar un acoplamiento ciego para asegurar que nuestro método de validación sea correcto y que no exista una predisposición en los resultados.

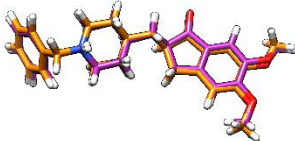
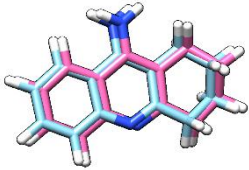
Por lo que se optó realizar de nuevo los acoplamientos, pero en el software PyRx, el cual permite realizar un acoplamiento ciego, utilizando AutoDock Vina. La metodología fue la misma a la anterior, bajo las mismas condiciones solo cambiando el programa. Una vez realizado este método y que los resultados concordaban en cuanto a los sitios de unión originales de los ligandos con sus respectivos receptores, se inició el acoplamiento dirigido.

Validación estructural del modelo de acoplamiento

El siguiente paso de nuestro método consistió en predecir el modo de unión de nuevos compuestos, considerando los dos modos de unión descritos previamente. Por lo tanto, la validación del acoplamiento molecular computacional fue fundamental para evaluar la capacidad predictiva de nuestro método. Para ello, se comparó la conformación original del ligando en el cristal de cada sistema con la obtenida mediante el acoplamiento molecular. Para evaluar la reproducibilidad conformacional, se empleó el valor de la desviación cuadrática media (RMSD), como se muestra en la Tabla 8.

³⁰ Liu, Y.; Yang, X.; Gan, J.; Chen, S.; Xiao, Z. X.; Cao, Y. *Nucleic Acids Res.* **2022**, 50 (1), 159-164.

Tabla 8. Valores de RMSD obtenidos para la validación estructural del modelo computacional donde tacrina (azul) y donepezilo (amarillo) son la pose original. La pose en morado (donepezilo) y rosa (tacrina) corresponden al valor obtenido en las moléculas tras el experimento.

Cristal	Score (kcal/mol)	RSMD	Figura
4EY7	-13.0	0.36	
7XN1	-9.7	0.0008	

Acoplamiento dirigido

Se seleccionaron cuatro cristales para el acoplamiento dirigido.

Estos estudios se realizaron varias veces, primero en en PyRx eliminando aguas de cristalización, conservando las fuerzas de Gasteiger. Después se realizó en Chimera 1.19, pero ahora conservando las aguas de cristalización ya que se observó que son necesarias para la interacción del ligando con el receptor. Este estudio se realizó dos veces, uno con cargas de Gasteiger y otro con cargas AM1-BCC para observar el comportamiento entre una y otra. Después se realizó un último acoplamiento, el cual es el modelo que permite explicar la actividad de nuestros compuestos, en el que, se conservaron las aguas de cristalización, en el caso de tacrina se conservaron solo las aguas de cristalización cercanas al ligando, se asignaron cargas de Gasteiger y no se removieron los hidrógenos no polares. Los acoplamientos se realizaron en todos los receptores antes mencionados (Tabla 9).

Visualizando los resultados solo dos de los cuatro modelos explican la actividad anticolinesterásica, estos en los receptores 4EY7 y 7XN1.

Tabla 9. Dimensiones de las cajas del acoplamiento dirigido.

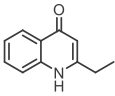
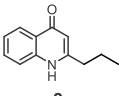
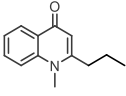
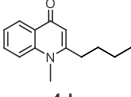
Receptores	Dimensiones de las cajas
7XN1	Center: 48.3086, -39.1064, -32.1399 Size: 23.0843, 16.1116, 16.5226
4EY7	Center: -11.5061, -43.665, 28.1954 Size: 23.3203, 17.8812, 19.0662
5FUM	Center: 33.2057, 22.738, 11.5477 Size: 29.552, 17.2978, 16.5658
7QB4	Center: 34.016, 22.4989, 9.72714 Size: 21.4875, 10.6236, 15.6715

El acoplamiento dirigido con el receptor 7XN1 se realizó dos veces

1. Dejando todas las aguas de cristalización.
2. Dejando las aguas que estaban cerca del ligando. En este caso se dejaron solo dos aguas cerca del ligando. Este modelo es el más preciso.

Los resultados de ambos acoplamientos se describen en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados de los acoplamientos moleculares de 7XN1.

	IC ₅₀ (μM)	Score (kcal/mol) Modelo: Todas las aguas de cristalización	Score (kcal/mol) Modelo: Solo dos aguas de cristalización (cerca del ligando)
 4b	0.06	-7.3	-7.2
 3c	0.17	-8.2	-7.7
 4c	1.36	-7.4	-7.1
 3a	0.35	-7.9	-7.5
 4a	0.33	-6.8	-7.3
 4d	1.10	-7.0	-6.9
Tacrina	0.04	-9.3	-9.7

Este modelo 7XN1, se adapta mejor a los resultados del estudio *in vitro* para los ligandos que contienen una cadena alifática corta, compuestos **4a-4d**. La selección de la mejor pose para explicar la actividad, se basó en que los ligandos se colocaran de forma similar a tacrina: los dos anillos aromáticos de tacrina con los dos anillos aromáticos de los ligandos **4a-4d**,

cadena laterales sobre C2 posicionados en dirección hacia el ciclo de tacrina; donadores de enlaces de H en la misma dirección, dirigidos hacia la molécula de H₂O.

El compuesto **4d** fue el único que contenía la cadena alifática del mismo lado del anillo aromático de tacrina. Figura 25.

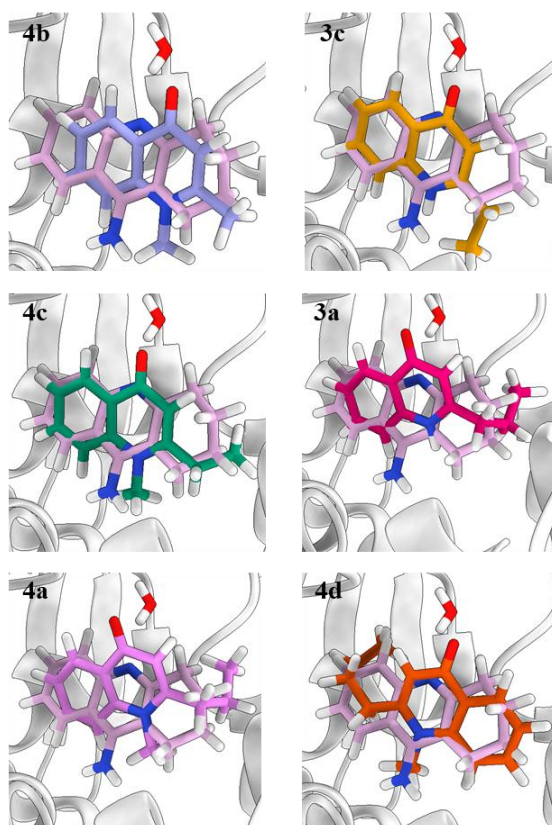


Figura 25. Superposición de los ligandos de cadena corta con donepezilo en 7XN1.

Por otro lado, el modelo que explica mejor las interacciones entre los ligandos de cadena alifática larga y los aromáticos entre el receptor se explican mejor con el modelo 4EY7, basándonos en la similitud estructural del ligando, en este caso donepezilo, ya que este es más largo y las interacciones ocurren a lo largo del bolsillo de acetilcolinesterasa. Figura 26.

Las poses que se seleccionaron se basan en el carácter hidrofóbico similar a donepezilo, como se muestra en la figura 27, la parte hidrofóbica se ubica en la parte superior y externa del bolsillo de la acetilcolinesterasa, las cadenas largas alifáticas de los compuestos **4e** y **4f** aumentan la hidrofobicidad, por lo que se acomodan de forma similar a donepezilo.

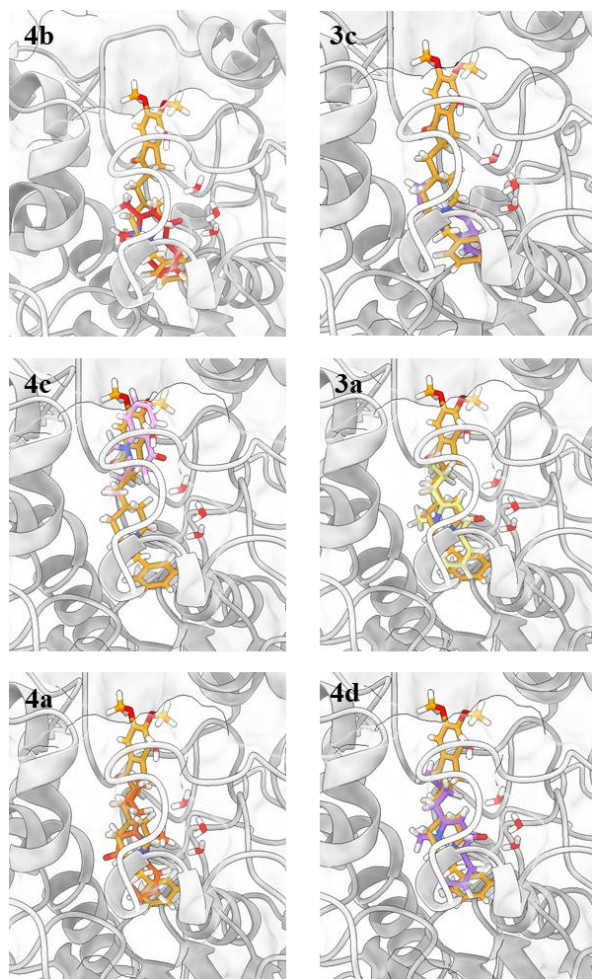


Figura 26. Superposición de los ligandos de cadena corta con donepezilo en 4EY7.

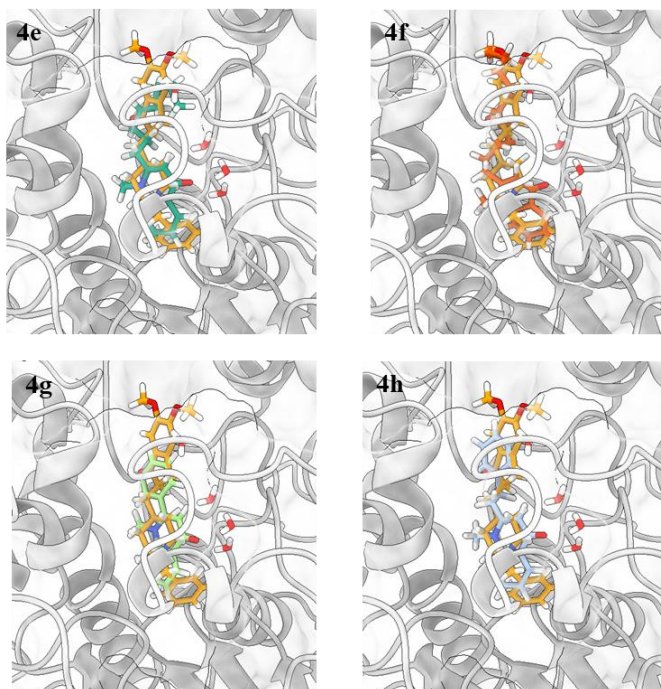
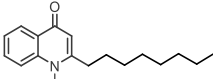
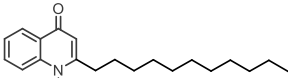
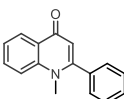
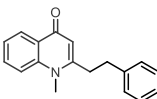


Figura 27. Superposición de los ligandos de cadena larga y con sustituyentes aromáticos con donepezilo en 4EY7.

Tabla 11. Resultados del acoplamiento dirigido en 4EY7.

	IC ₅₀ (μM)	Score (kcal/mol)
 4e	4.09	-8.9
 4f	0.41	-7.8
 4g	0.52	-7.2
 4h	0.73	-10.4
Donepezil	0.18	-12.2

Conclusiones

En el presente trabajo se desarrolló una ruta sintética modular y reproducible para la obtención de leptomerina y de una serie de análogos de tipo quinolin-4-ona diversamente sustituidos en la posición C-2. La estrategia empleada, basada en la formación de orto-amidoacetofenonas seguida de ciclación intramolecular y posterior *N*-metilación, permitió acceder a los compuestos objetivo con buenos rendimientos y adecuada consistencia experimental.

La aplicación de condiciones de ciclación activadas con TMSOTf en presencia de trietilamina resultó más adecuada que los protocolos clásicos evaluados, al proporcionar conversiones más limpias y tiempos de reacción menores. Asimismo, la optimización de la etapa de *N*-alquilación permitió favorecer selectivamente la formación de los productos *N*-metilados, etapa necesaria para la obtención de leptomerina y derivados relacionados.

La caracterización estructural completa de leptomerina mediante técnicas modernas de RMN 1D y 2D permitió realizar una asignación inequívoca de sus señales protónicas y de carbono, así como resolver discrepancias presentes en reportes previos de la literatura. Esta revisión estructural proporciona una base confiable para el análisis posterior de la relación estructura-actividad dentro de esta familia de compuestos.

La evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria frente a la acetilcolinesterasa permitió identificar tendencias de comportamiento dentro de la serie sintetizada, observándose diferencias asociadas con la naturaleza y longitud de los sustituyentes en C-2 y con el estado de metilación del nitrógeno. Debido a consideraciones de solubilidad, únicamente una parte de los compuestos pudo evaluarse experimentalmente, lo cual se tomó en cuenta en la interpretación comparativa de los resultados.

Los estudios de acoplamiento molecular se emplearon como herramienta de apoyo para analizar posibles modos de interacción de leptomerina y sus análogos con la acetilcolinesterasa. Los modelos obtenidos permiten proponer interacciones plausibles con regiones relevantes del sitio activo y ayudan a racionalizar, de manera cualitativa, las tendencias observadas en la actividad inhibitoria, sin asumir una correspondencia cuantitativa directa con los valores experimentales.

En conjunto, los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento estructural, sintético y funcional de los sistemas quinolin-4-ona relacionados con leptomerina, y proporcionan una base metodológica y conceptual para el diseño y evaluación futura de análogos con actividad anticolinesterásica.

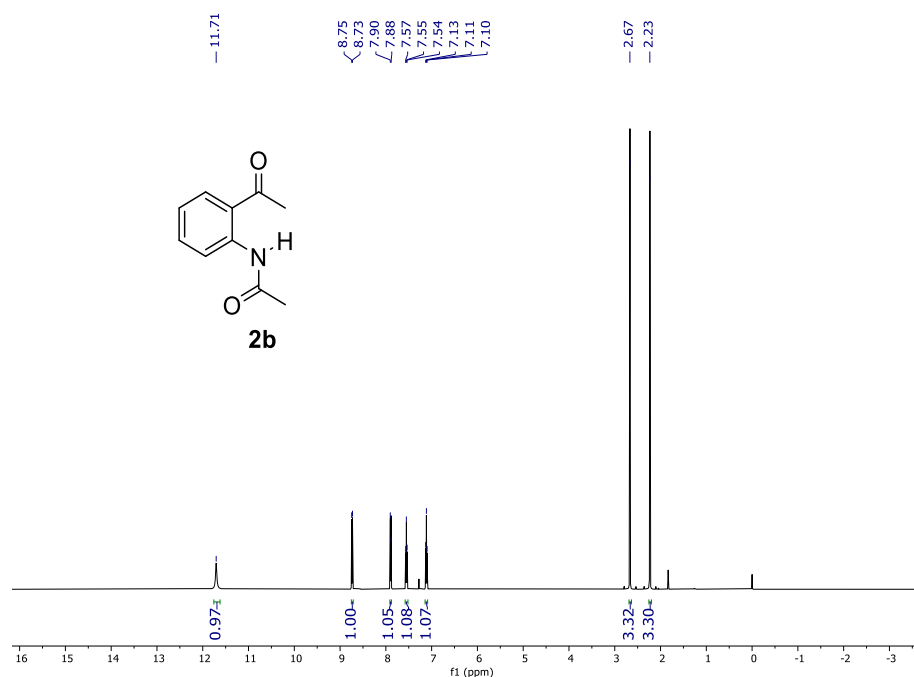
Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo abren varias líneas de continuación tanto en el ámbito sintético como en el biológico y computacional. Desde el punto de vista de síntesis, la estrategia empleada permite extender de manera directa la biblioteca de análogos de tipo quinolin-4-ona mediante la incorporación de nuevos sustituyentes en la posición C-2 y la introducción de modificaciones adicionales en otras posiciones del núcleo heterocíclico. La exploración de sustituyentes con diferentes perfiles estéricos y electrónicos podría ampliar el panorama de la relación estructura-actividad observada.

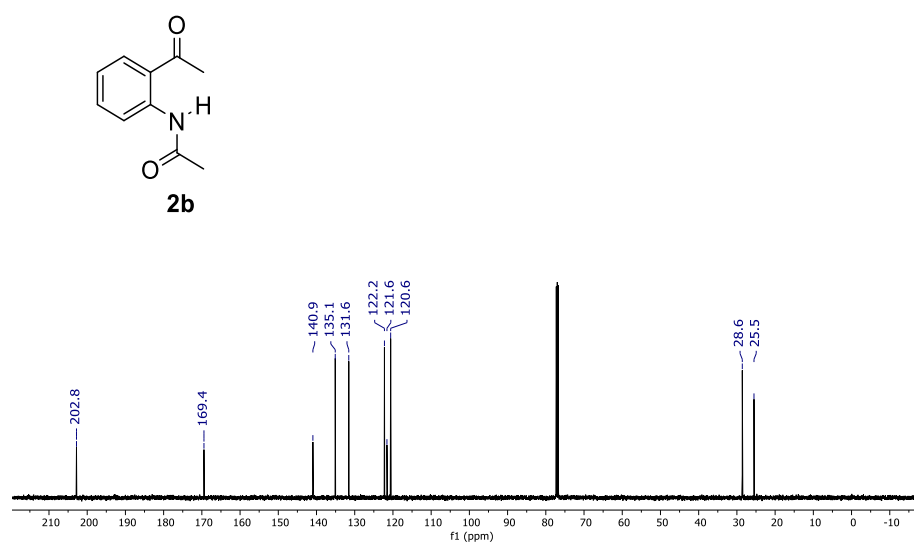
En el plano experimental, resulta conveniente ampliar la evaluación biológica a un mayor número de compuestos, particularmente mediante la optimización de condiciones de solubilidad y formulación que permitan ensayar derivados actualmente no evaluados. Asimismo, la determinación de parámetros cinéticos más detallados y la aplicación de ensayos complementarios contribuirían a una caracterización funcional más completa de los compuestos activos.

Desde la perspectiva computacional, estudios adicionales de modelado molecular, tales como dinámicas moleculares y análisis de estabilidad de complejos proteína–ligando, podrían aportar información más detallada sobre la persistencia de las interacciones propuestas por docking. La integración de estos resultados con nuevos datos experimentales permitiría refinar los modelos de interacción y mejorar la interpretación de las tendencias observadas.

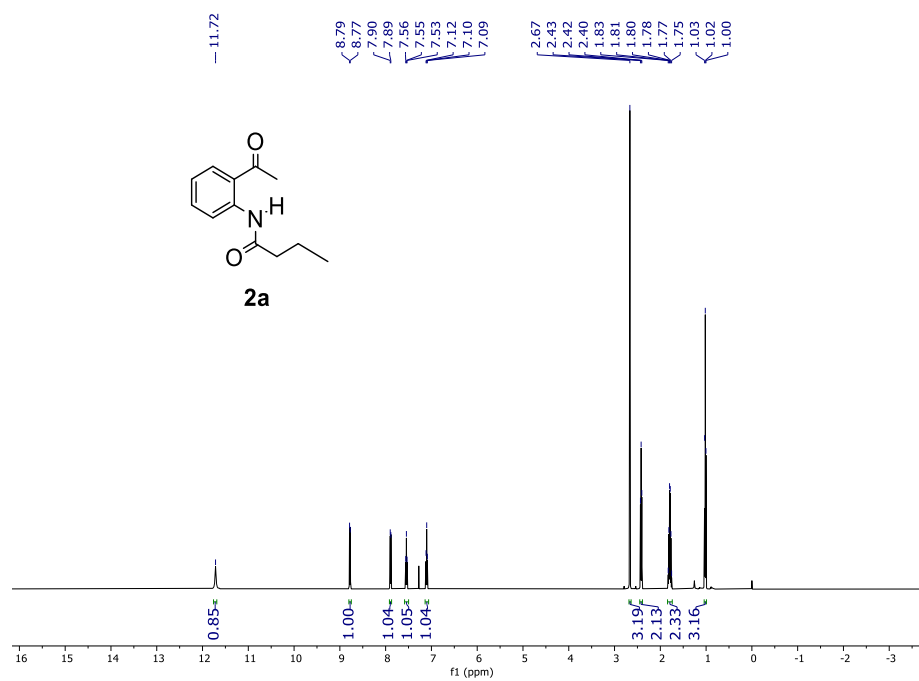
En conjunto, la combinación de expansión sintética, evaluación biológica ampliada y modelado computacional avanzado ofrece una ruta clara para profundizar en el estudio de derivados de leptomerina como sistemas de interés en la investigación de inhibidores de acetilcolinesterasa.



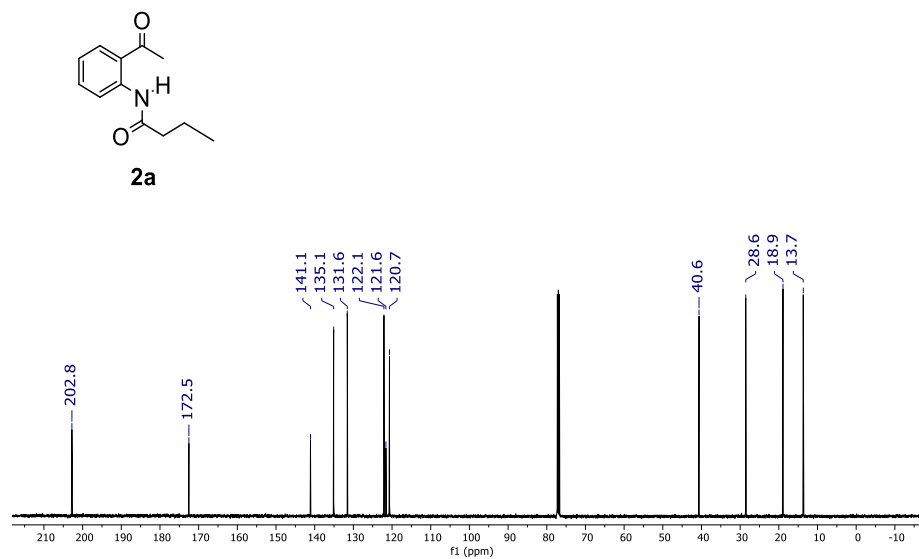
Espectro 1. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2b**).



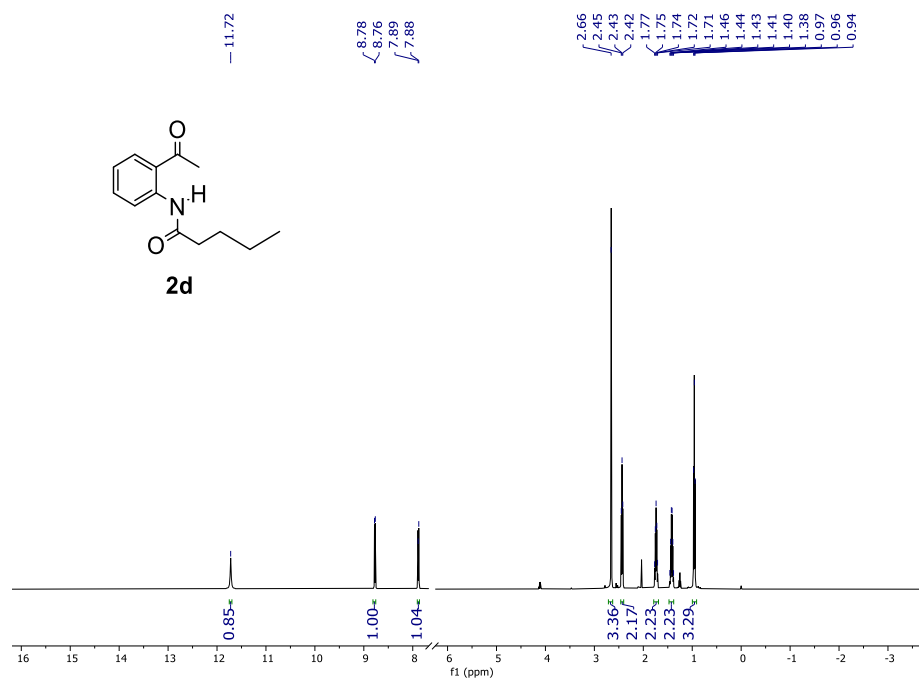
Espectro 2. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2b**).



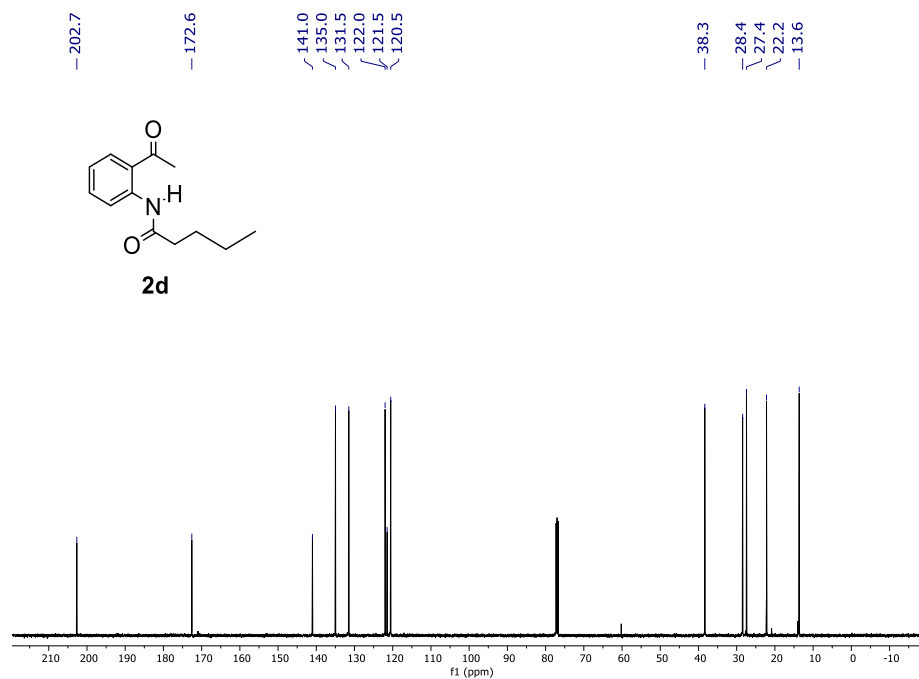
Espectro 5. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2a**).



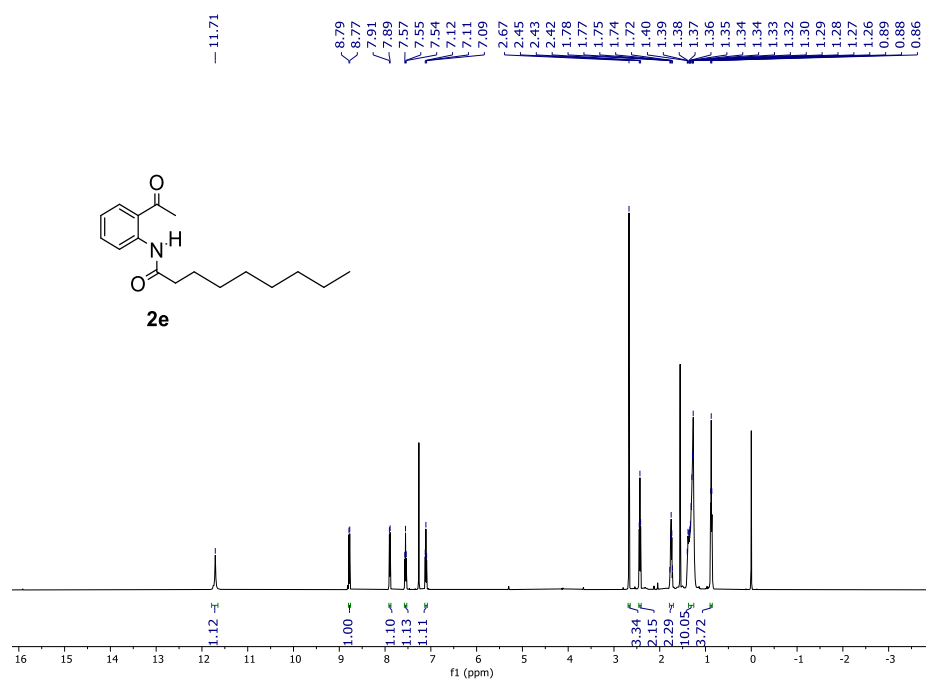
Espectro 6. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2a**).



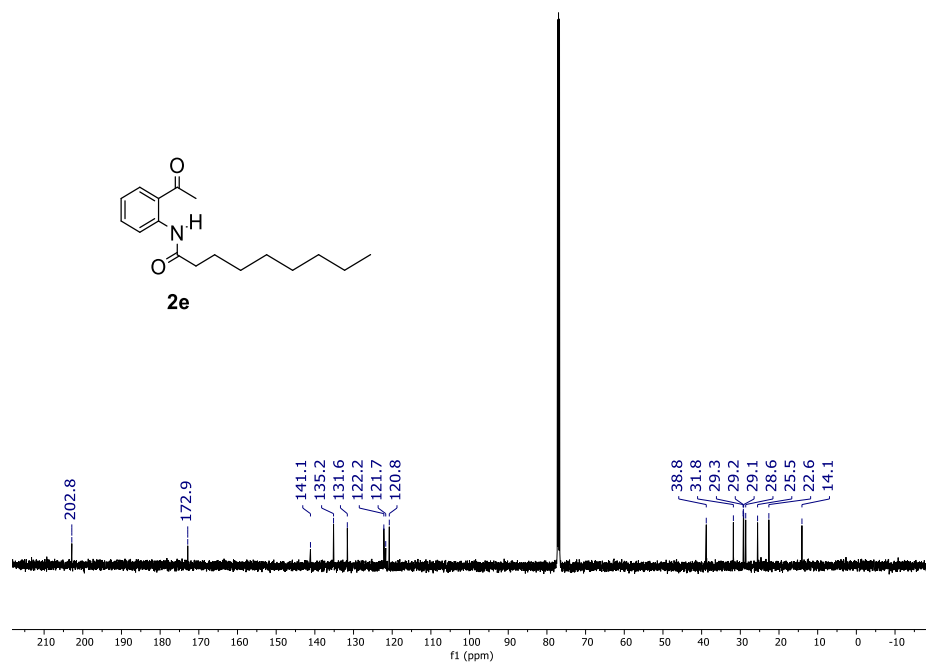
Espectro 7. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2d**).



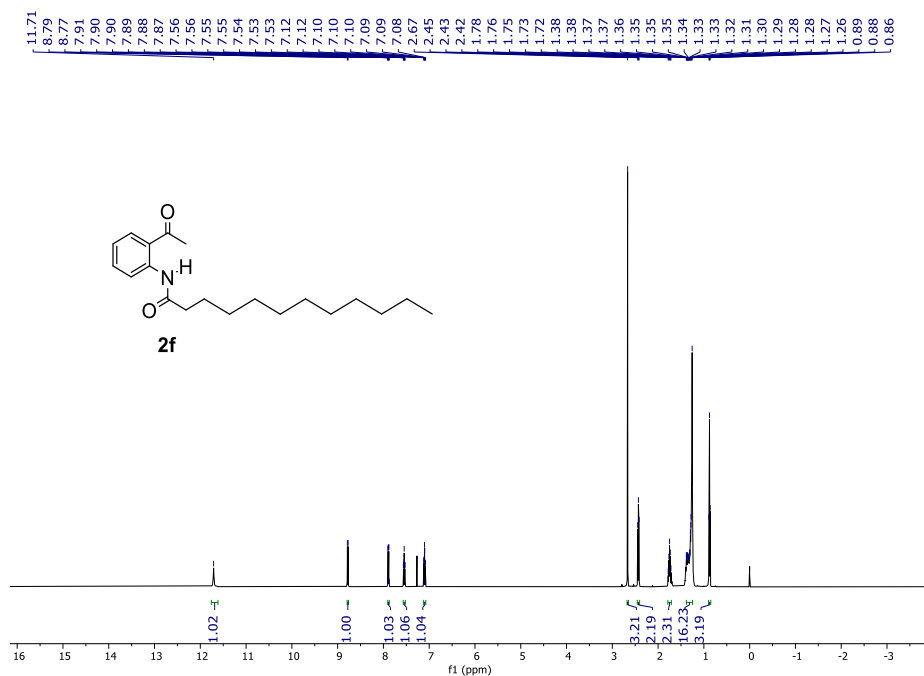
Espectro 8. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2a**).



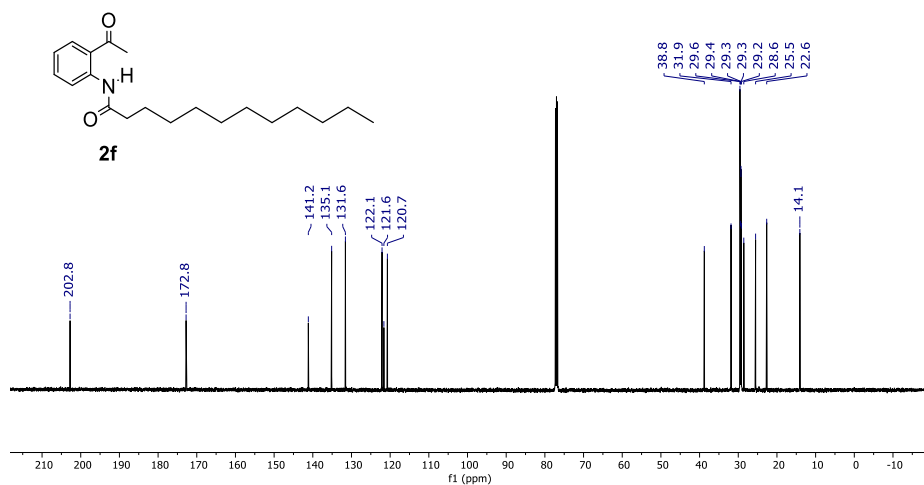
Espectro 9. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2e**).



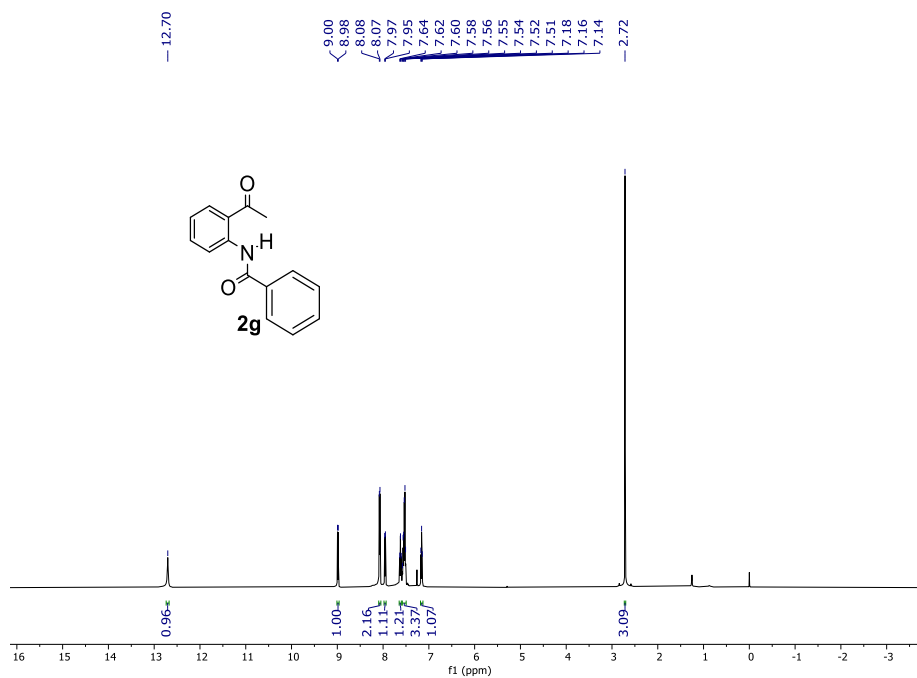
Espectro 10. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2e**).



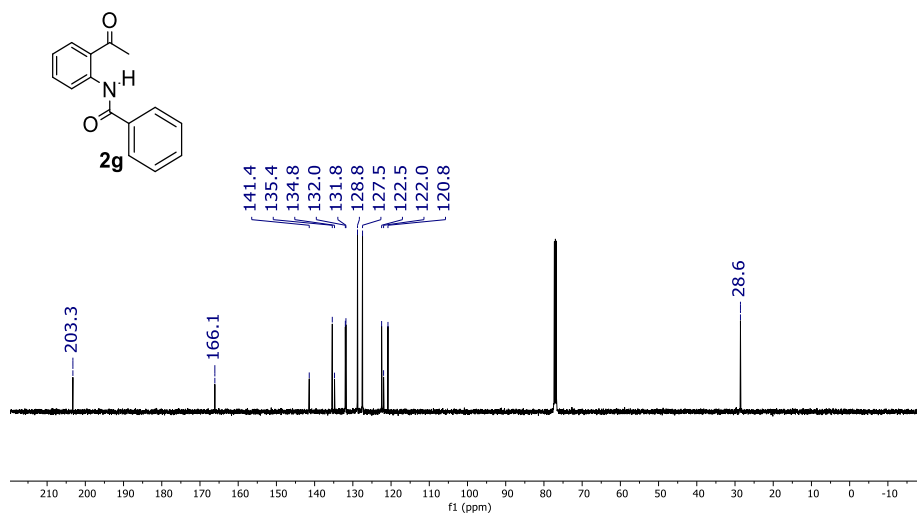
Espectro 11. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2f**).



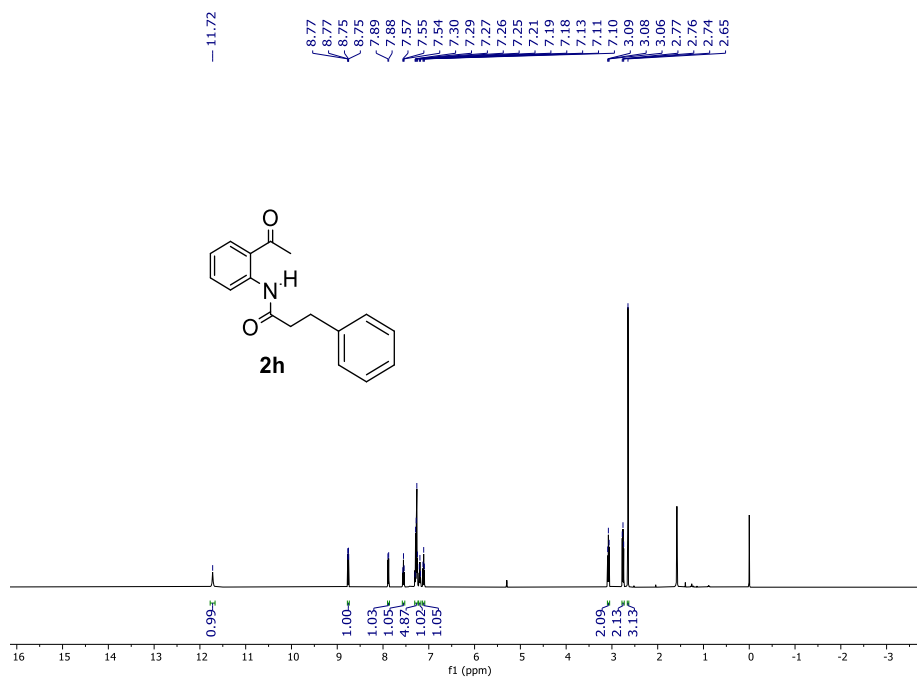
Espectro 12. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2f**).



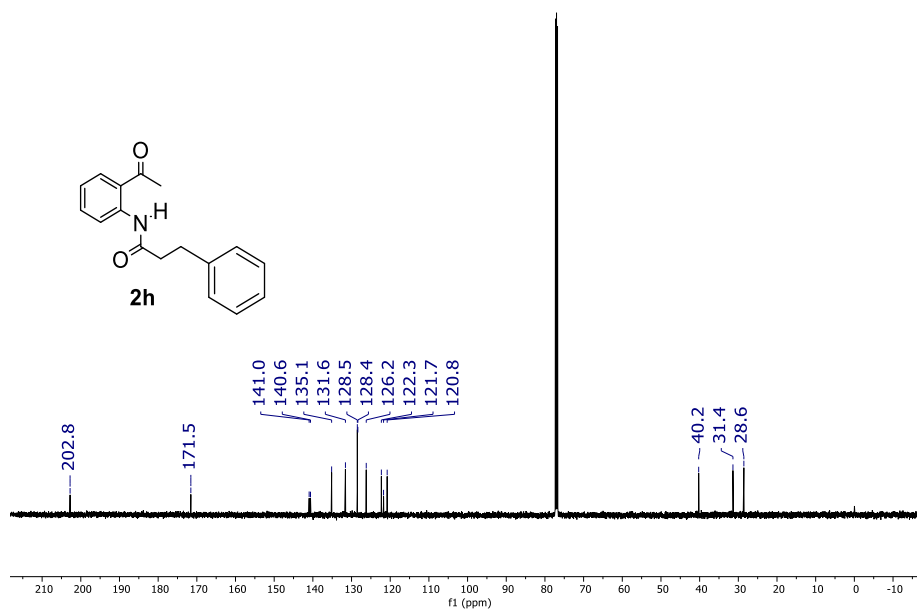
Espectro 13. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2g**).



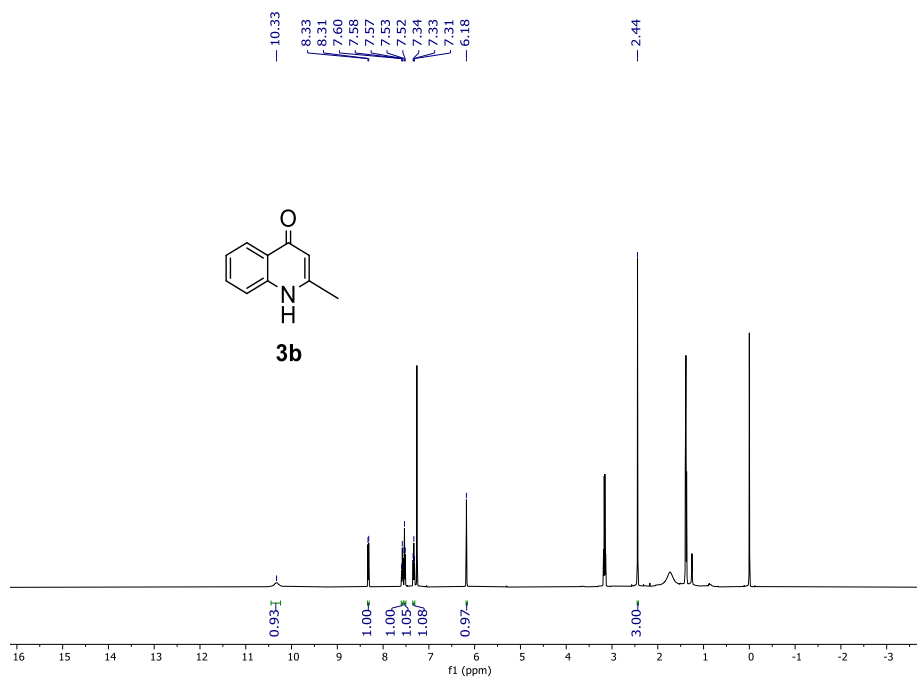
Espectro 14. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2g**).



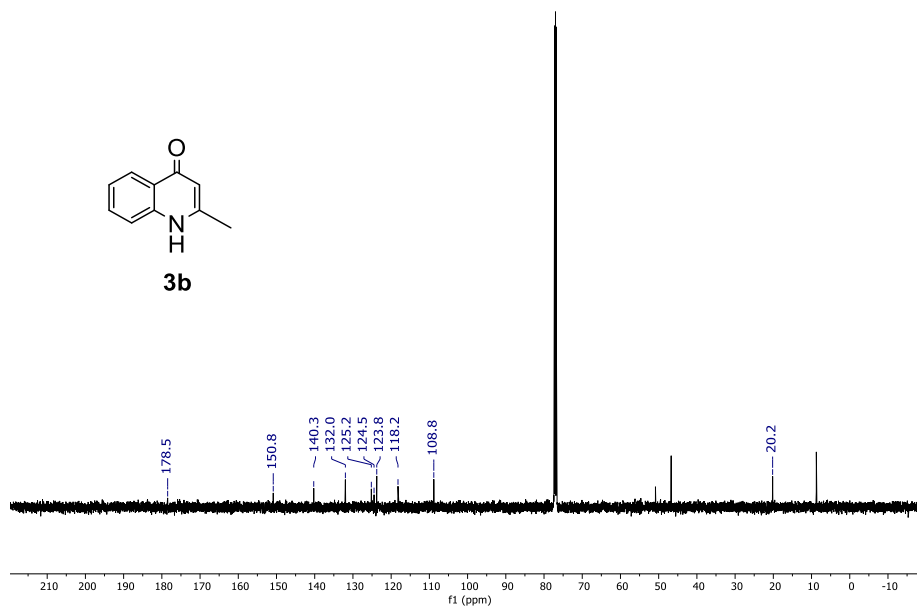
Espectro 15. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2h**).



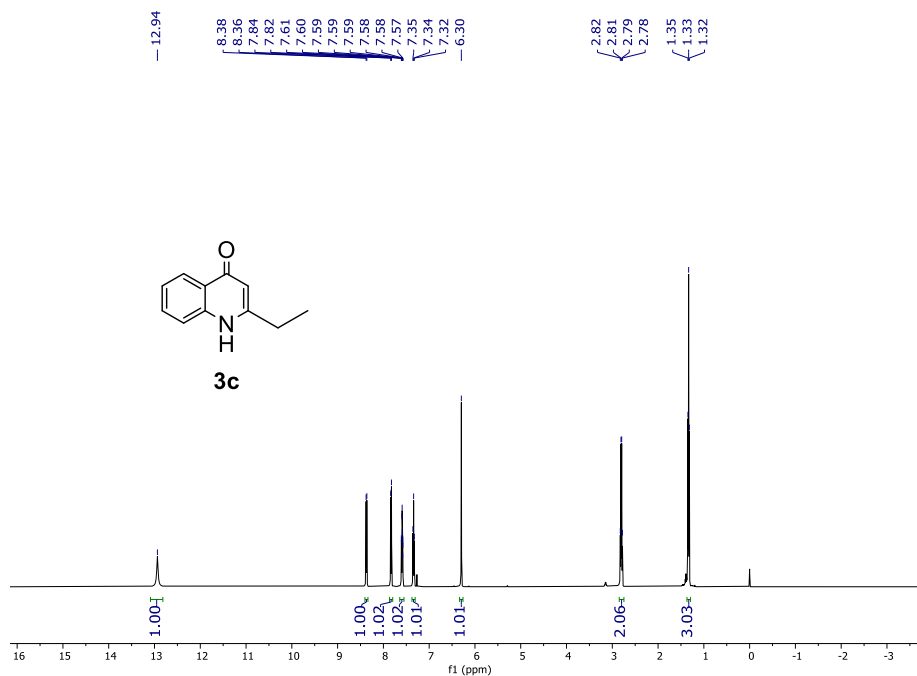
Espectro 16. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**2h**).



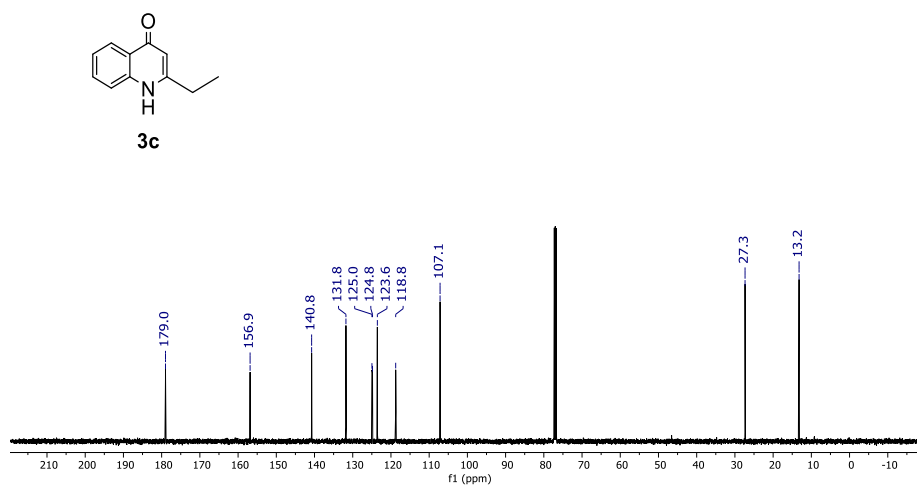
Espectro 17. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**3b**).



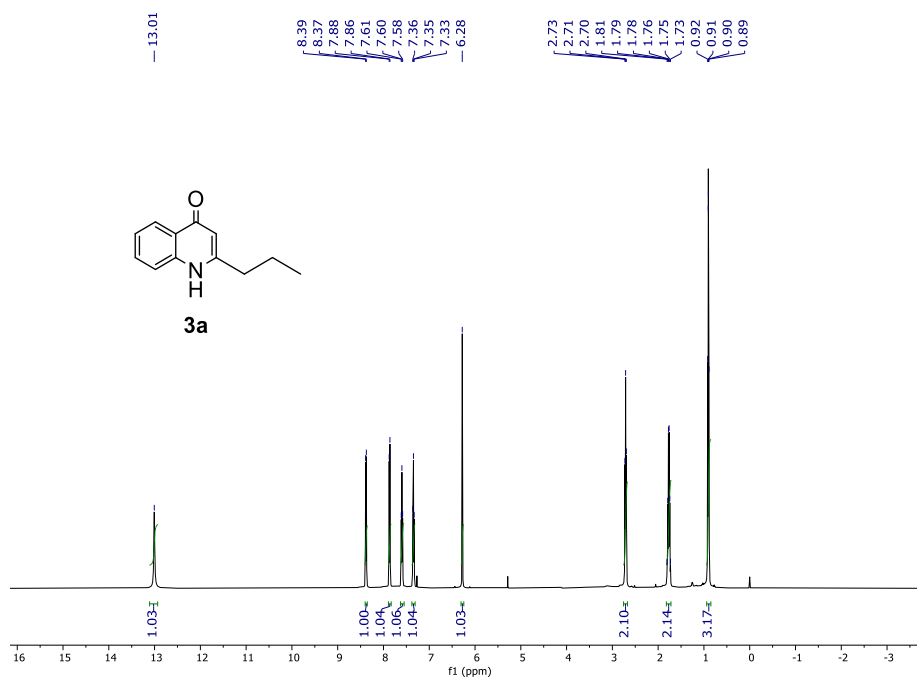
Espectro 18. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**3b**).



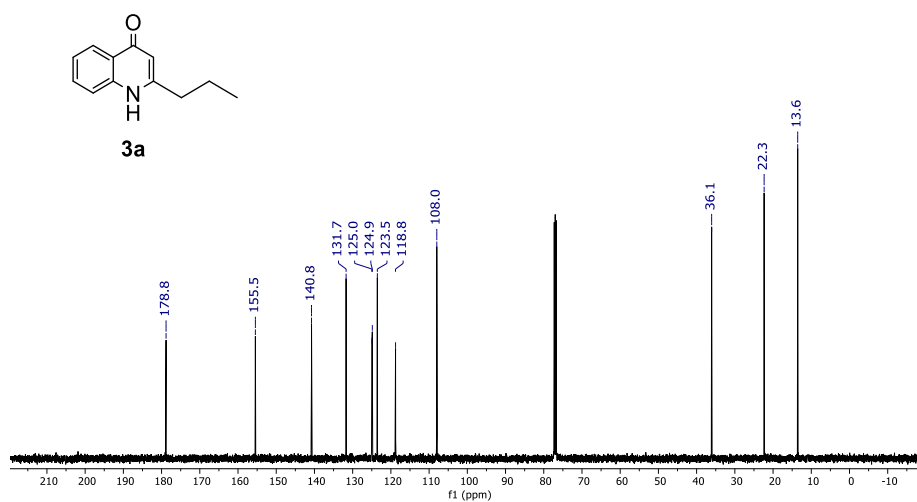
Espectro 19. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**3c**).



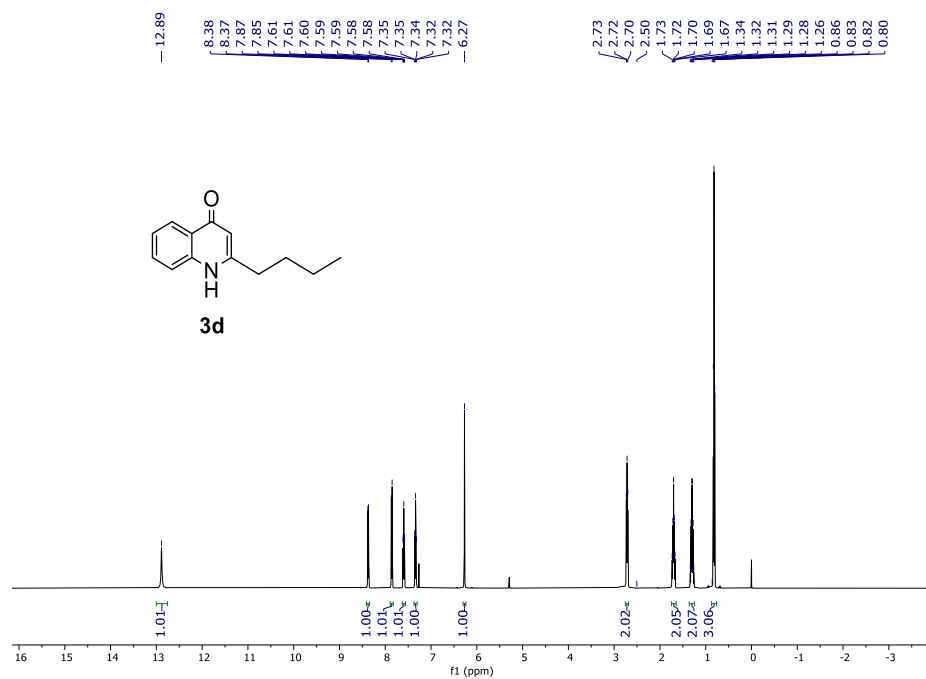
Espectro 20. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**3c**).



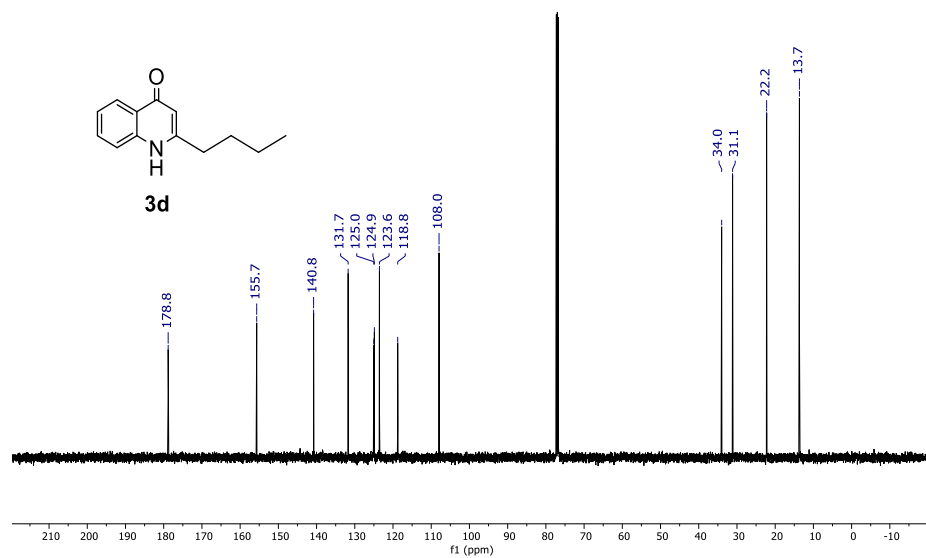
Espectro 21. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto (**3a**).



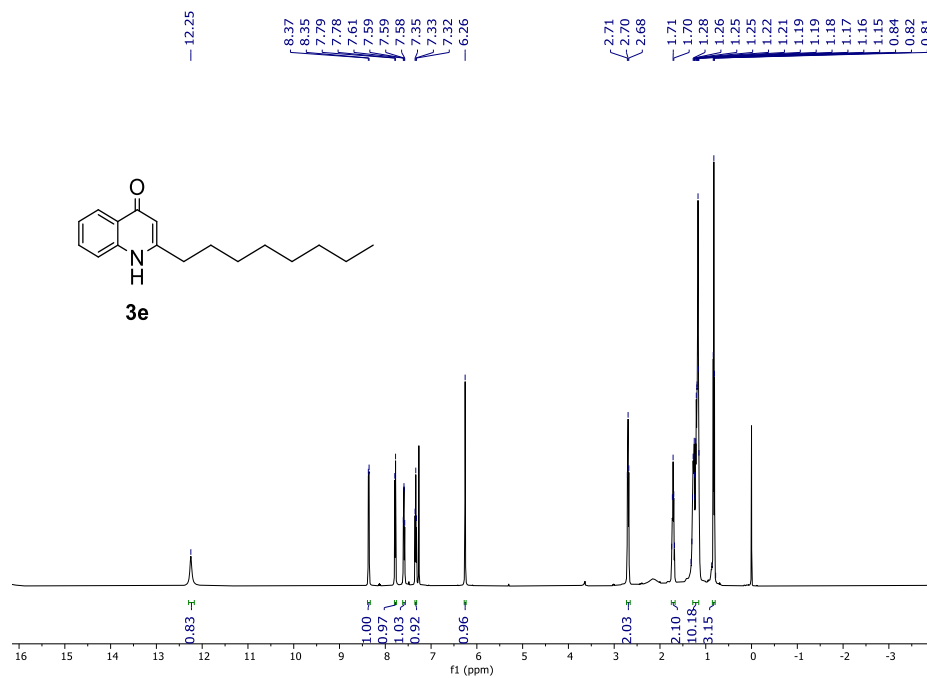
Espectro 22. Espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) del compuesto (**3a**).



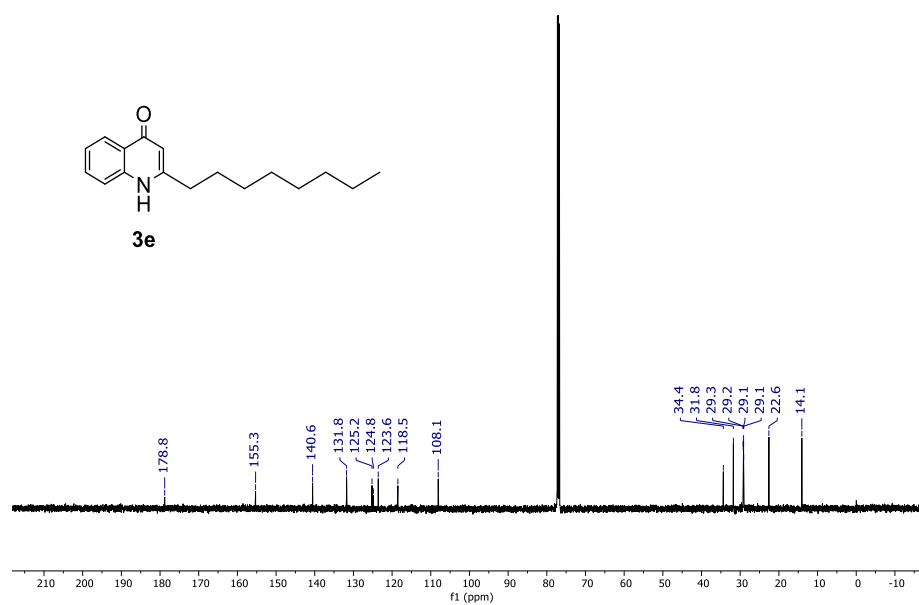
Espectro 23. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**3d**).



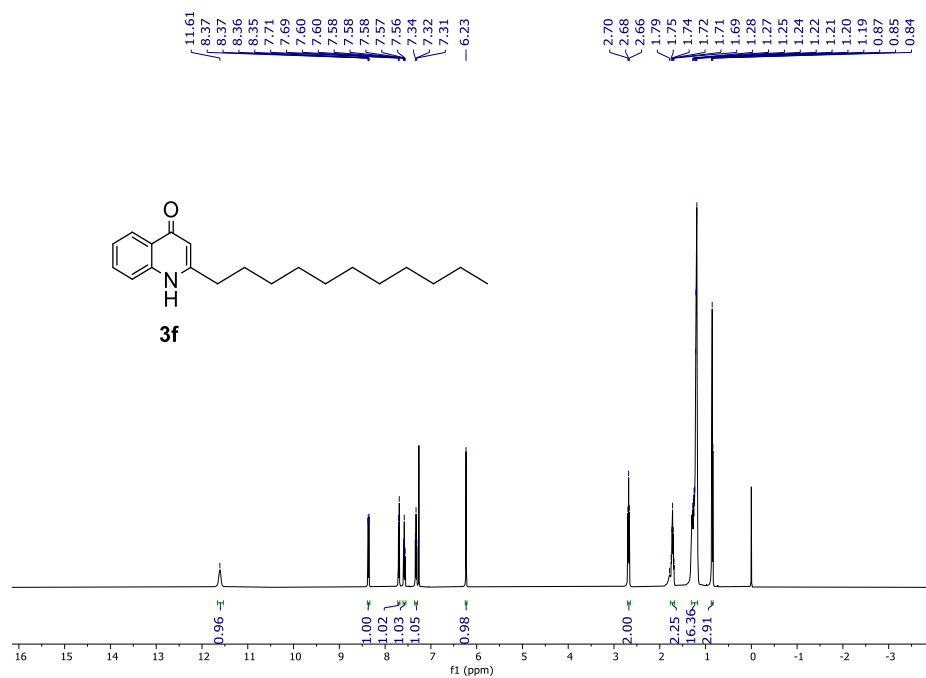
Espectro 24. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**3d**).



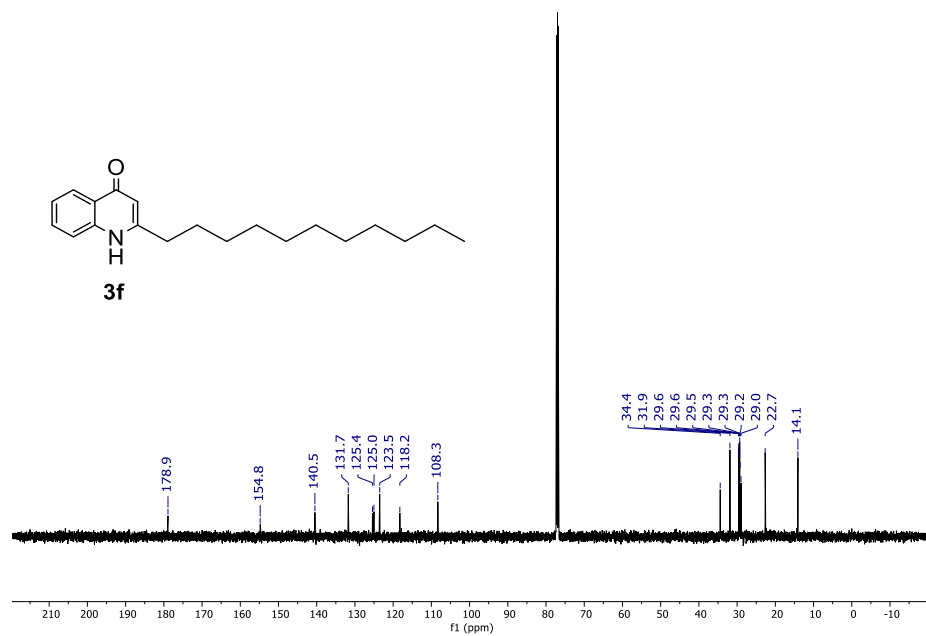
Espectro 25. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto (**3e**).



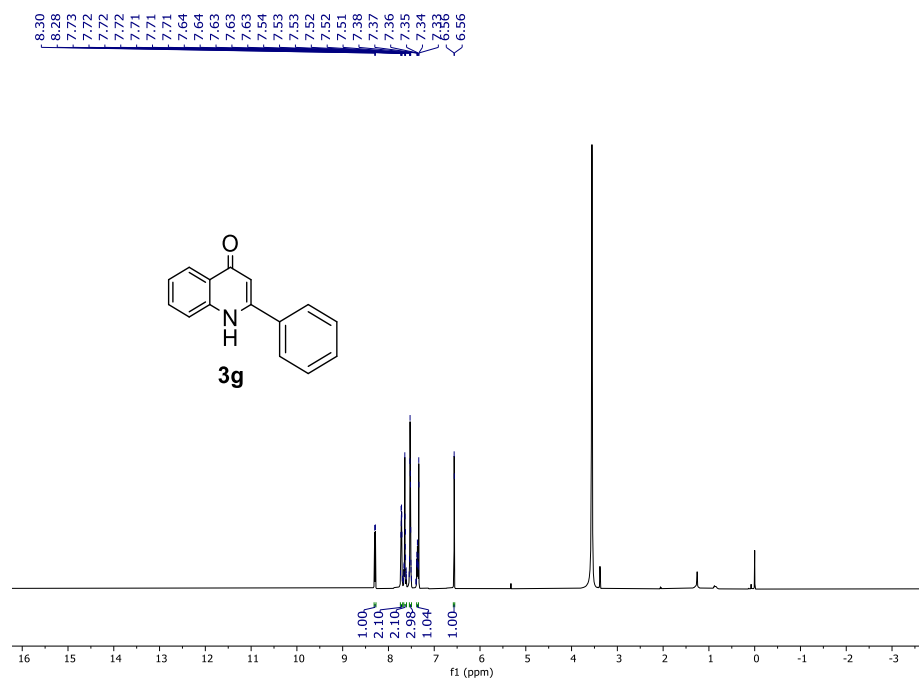
Espectro 26. Espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) del compuesto (**3e**).



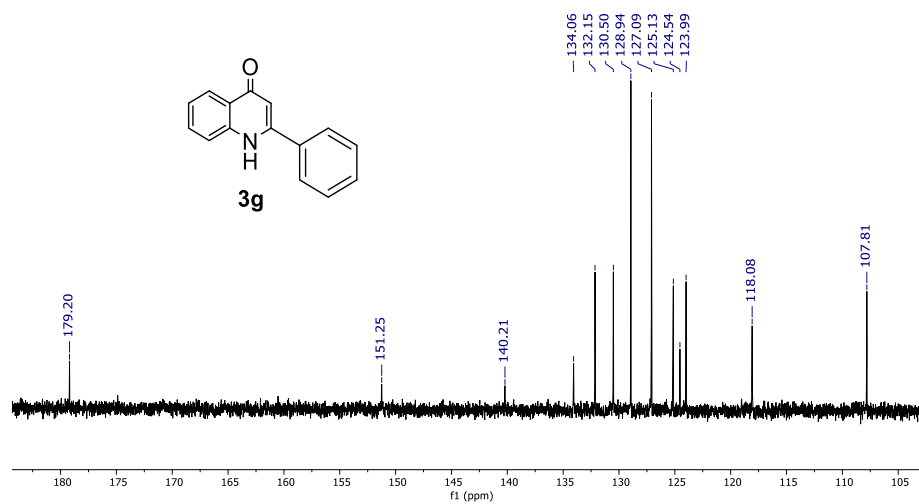
Espectro 27. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**3f**).



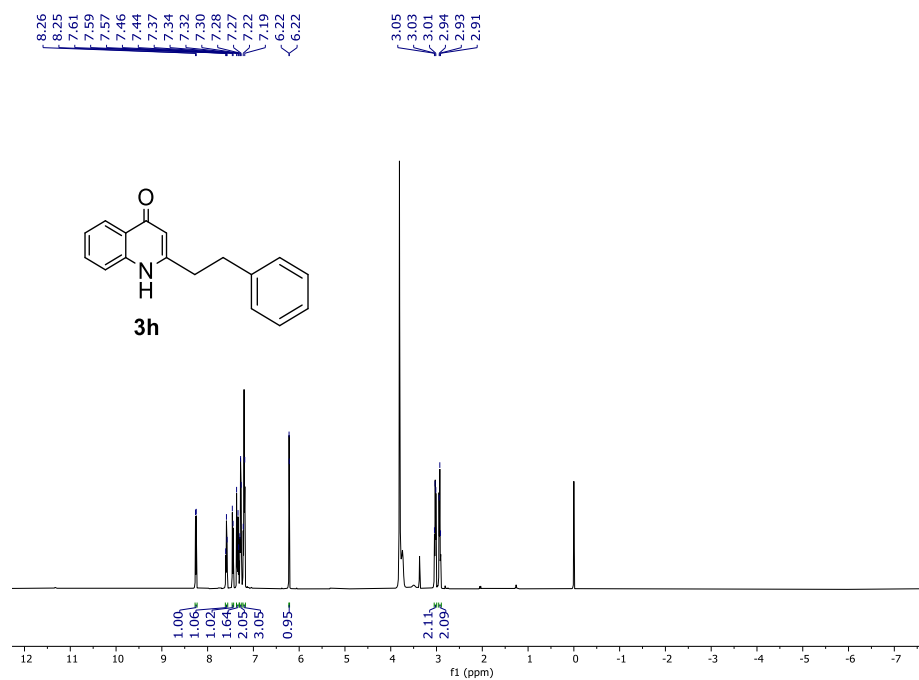
Espectro 28. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**3f**).



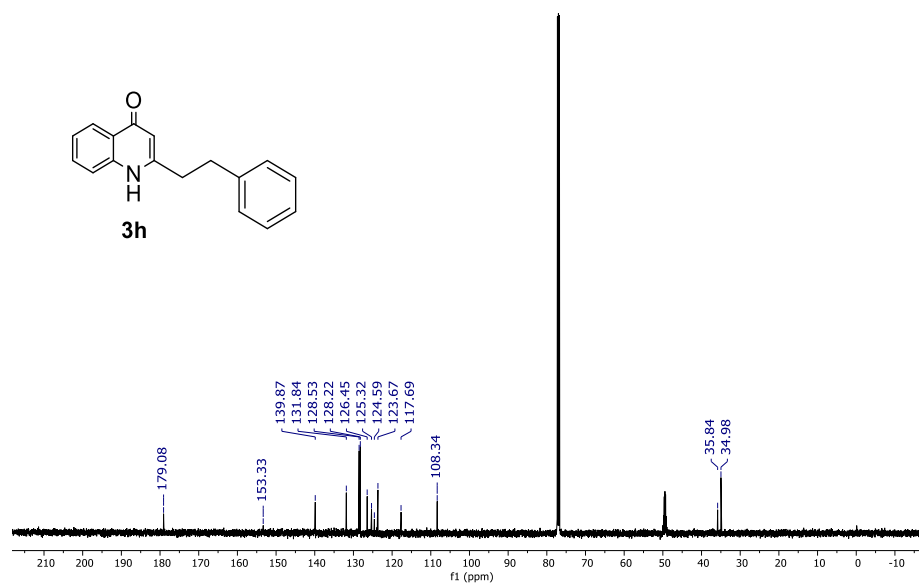
Espectro 29. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**3g**).



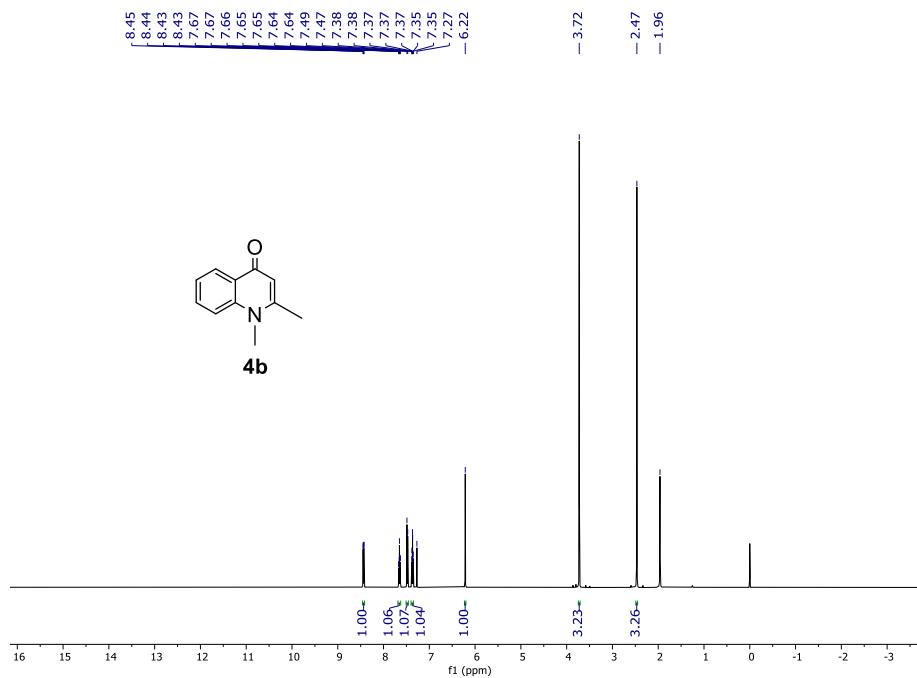
Espectro 30. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**3g**).



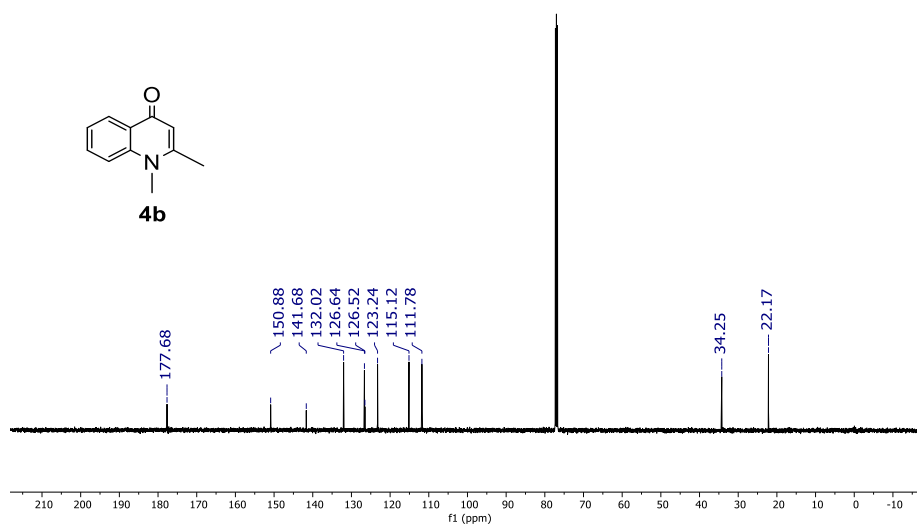
Espectro 31. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**3h**).



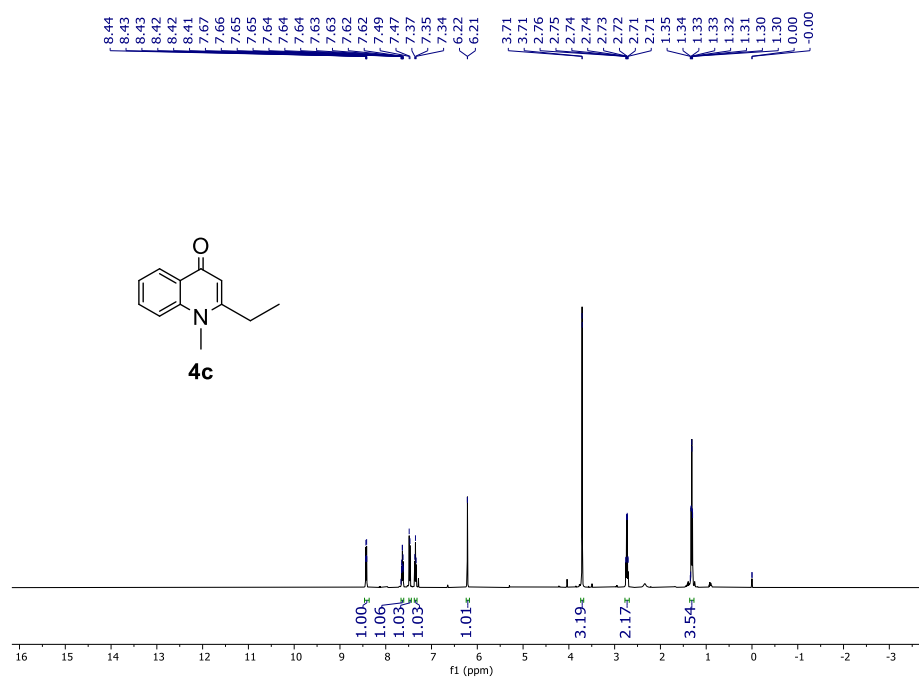
Espectro 32. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**3h**).



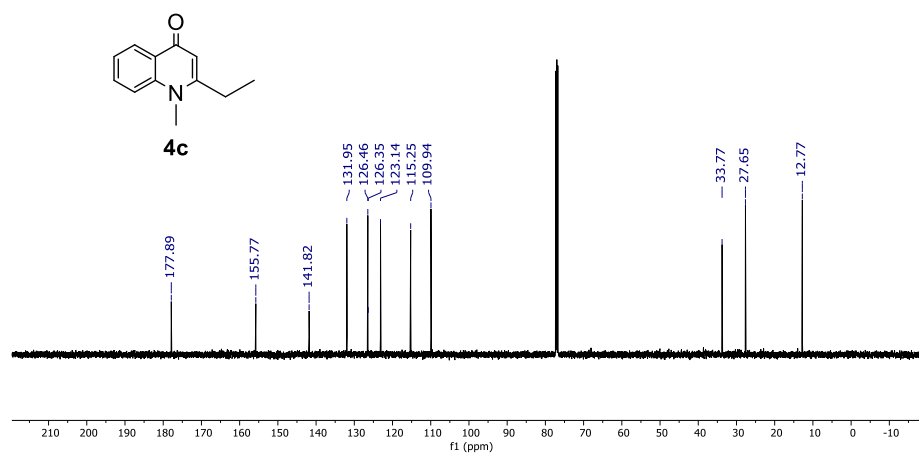
Espectro 33. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4b**).



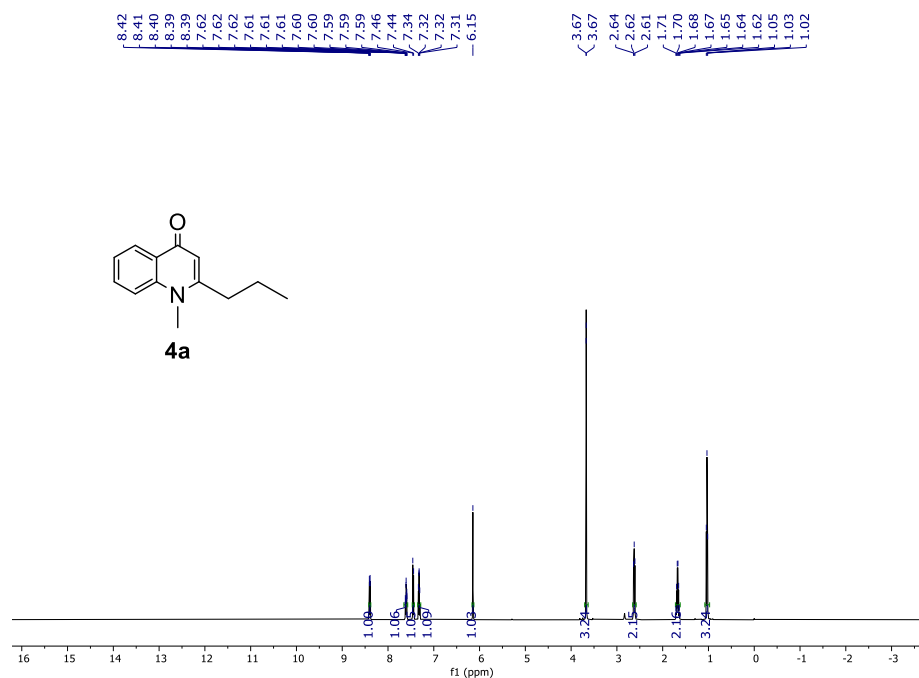
Espectro 34. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4b**).



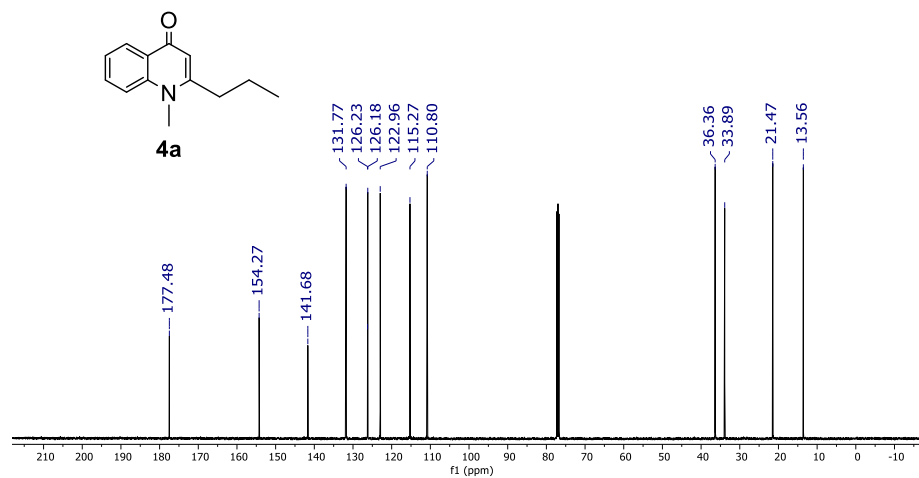
Espectro 35. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4c**).



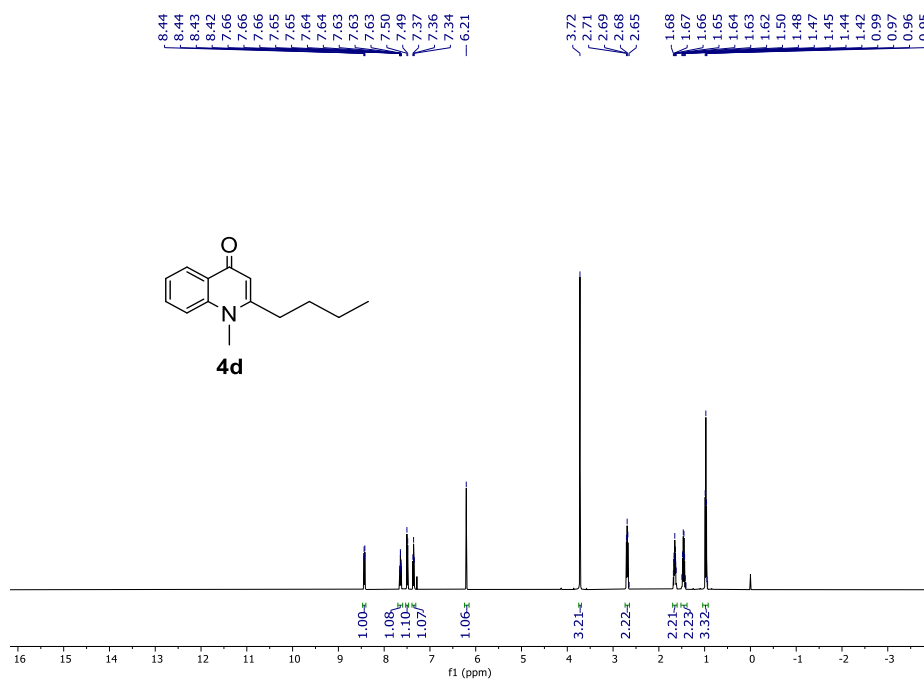
Espectro 36. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4c**).



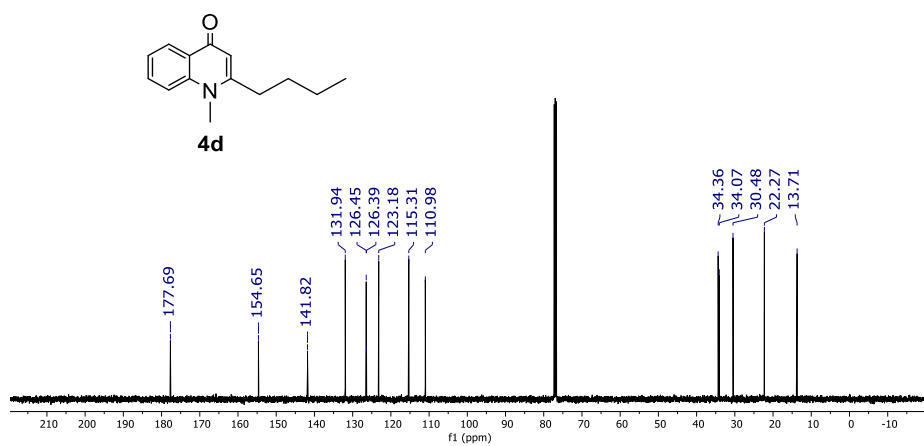
Espectro 37. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4a**).



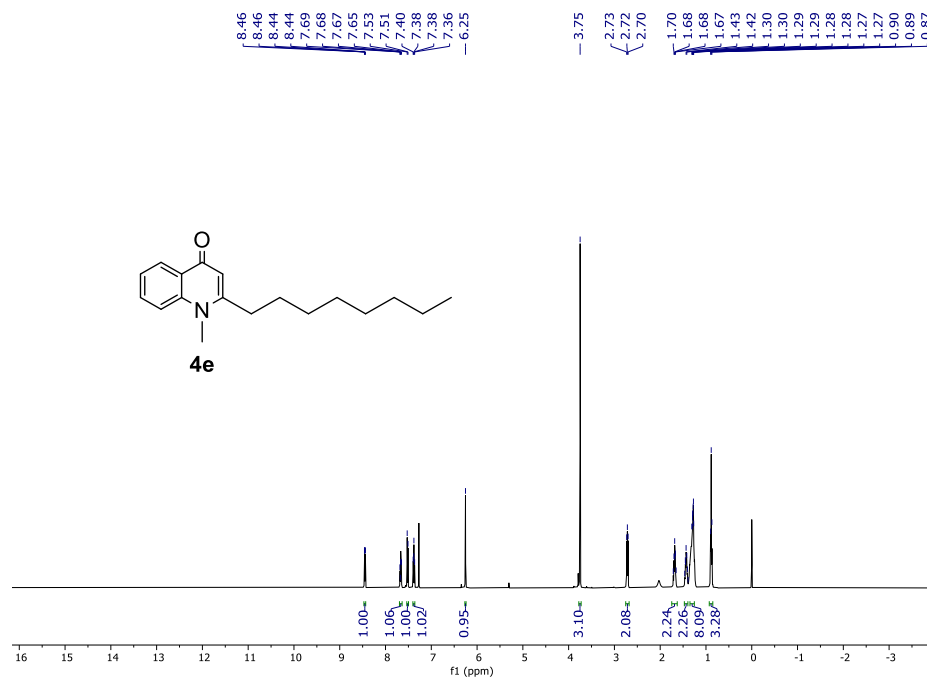
Espectro 38. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4a**).



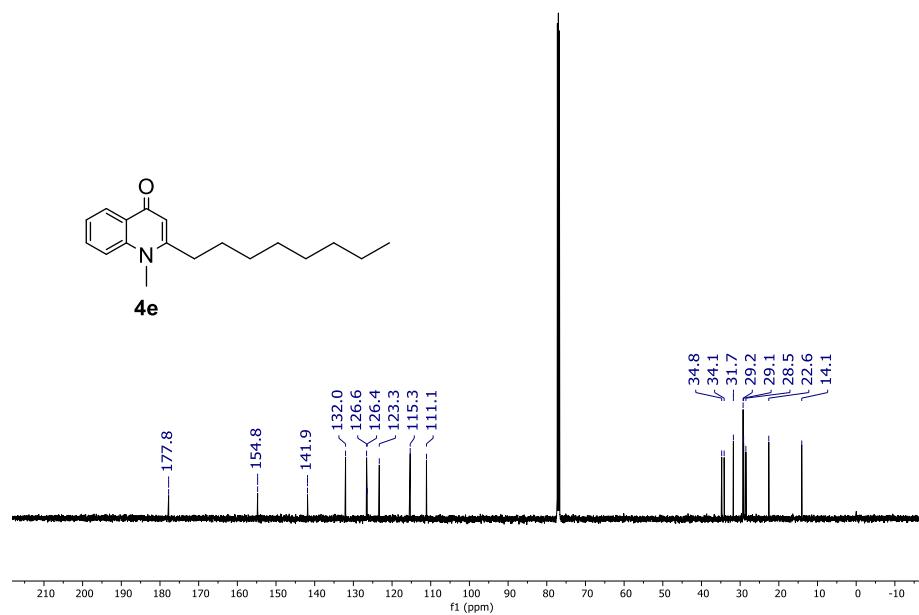
Espectro 39. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4d**).



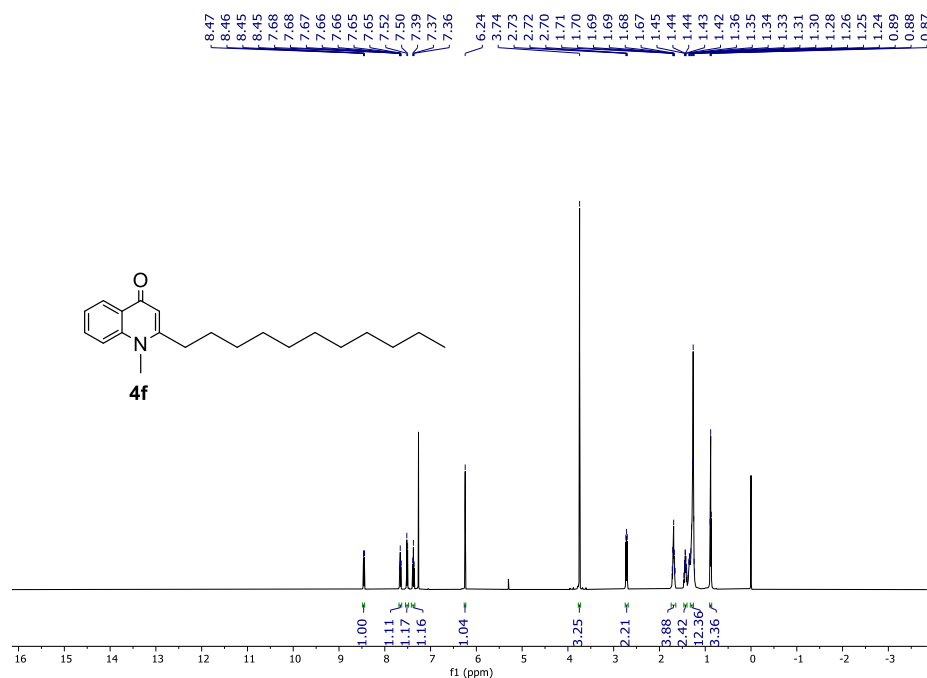
Espectro 40. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4d**).



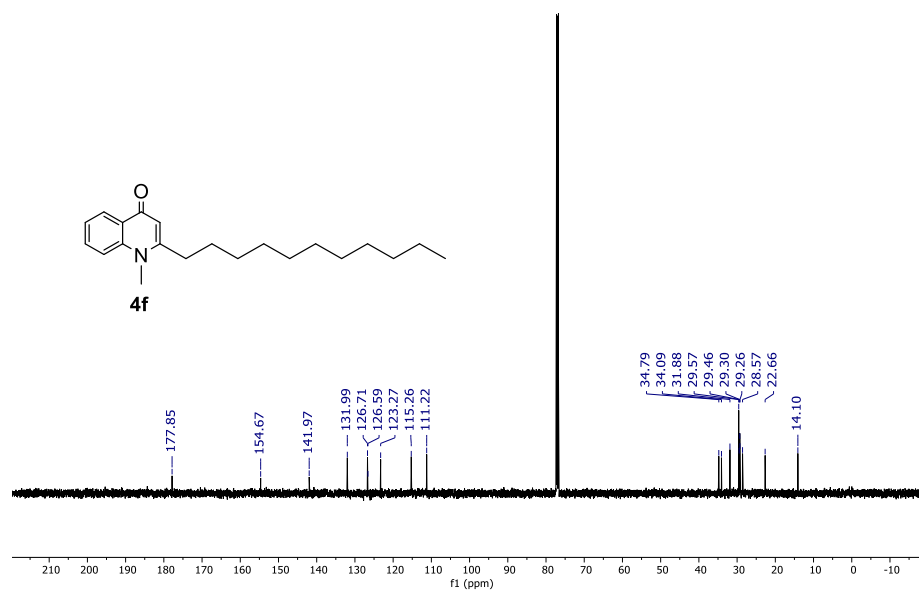
Espectro 41. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4e**).



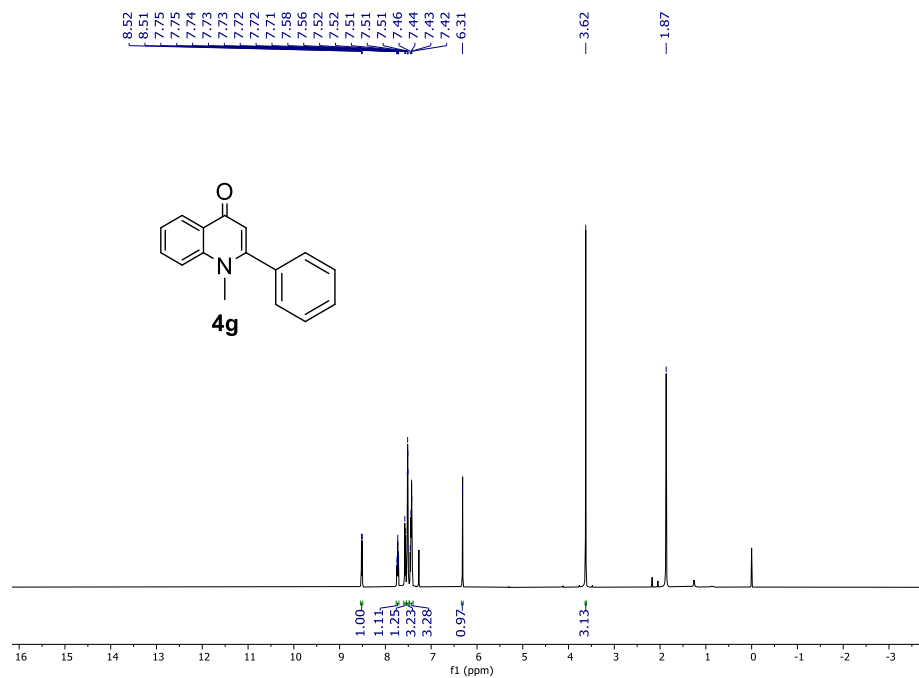
Espectro 42. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4e**).



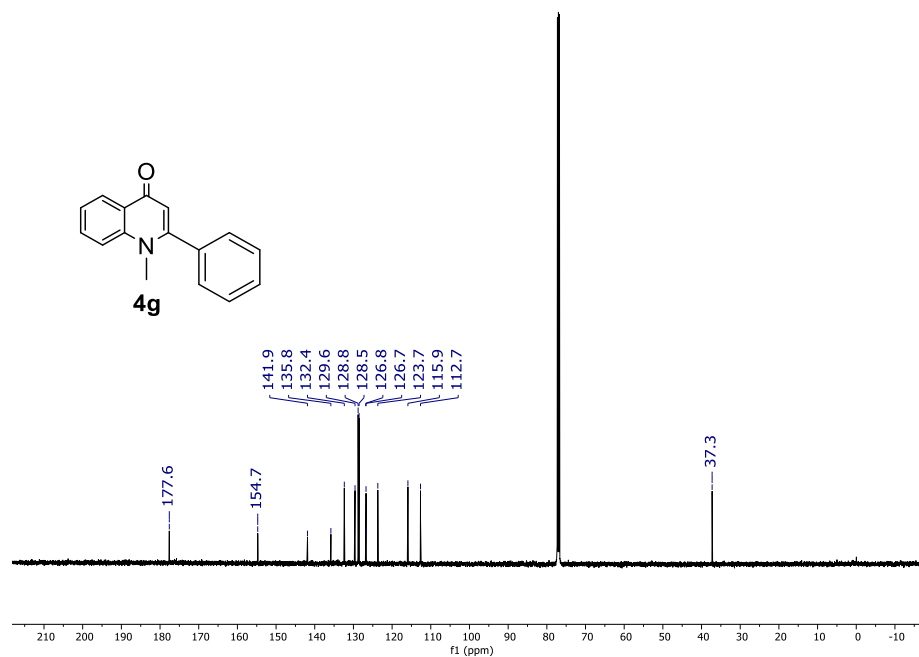
Espectro 43. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4f**).



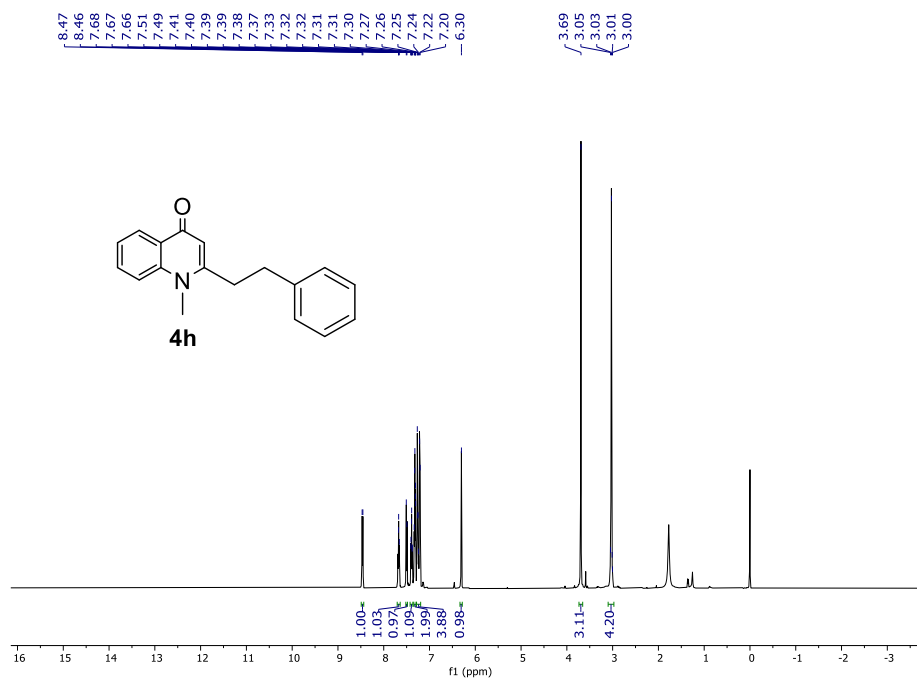
Espectro 44. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4f**).



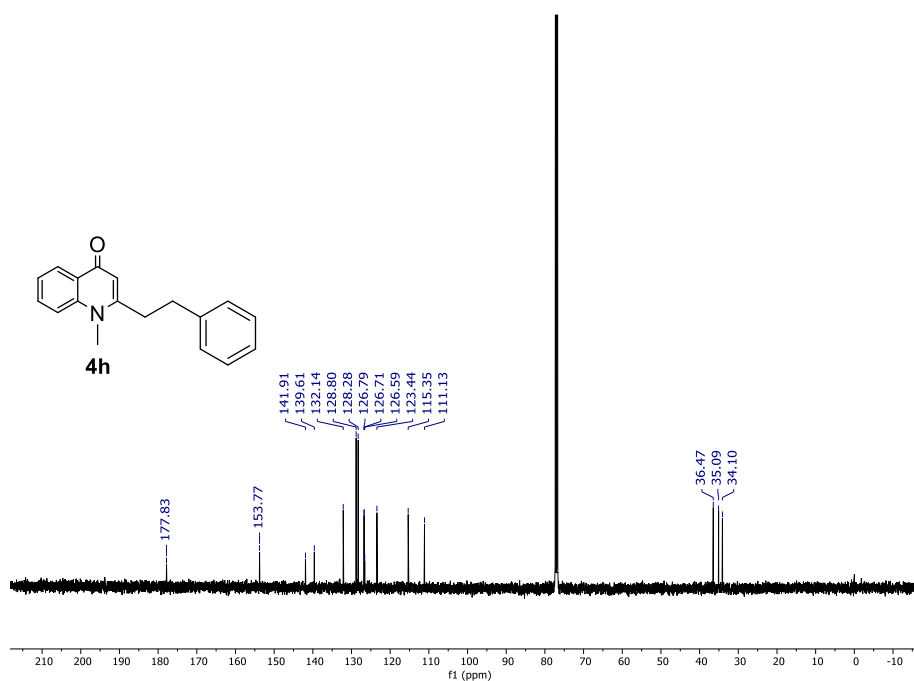
Espectro 45. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4g**).



Espectro 46. Espectro de ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto (**4g**).



Espectro 47. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto (**4h**).



Espectro 48. Espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) del compuesto (**4h**).