

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Centro de Química-Instituto de Ciencias

Posgrado en Ciencias Químicas

Síntesis de diferentes derivados orgánicos
y estudios de actividad biológica

“Tesis presentada para obtener el grado de:
Doctora en Ciencias Químicas
en el área de Química Orgánica”

“Presenta”:

M.C. Alma Griselda Fuentes Aguilar

Director

Co-director


Dra. Socorro Meza Reyes

Dr. José Luis Vega Baez


Julio 2021

Agradecimientos:

CONACYT (621334) por la beca otorgada



VIEP por los apoyos durante congresos



CONACYT (Proyecto 256495)



A la Universidad de Sevilla, España por la estancia realizada y las pruebas biológicas realizadas



A la Universidad de la Laguna, Tenerife, España por las pruebas realizadas de actividad antiproliferativa



PARTICIPACION EN CONGRESOS

2017

“Synthesis of (16R)- 3-hydroxyestra-1,3,5(10),17-tetraene[16,17-b][3,2-e][1,4]oxazin-17-one”,
Internacional, The XXVI Italo Latin-American Congress of Ethnomedicine Society-SILAE and
The IX Colombian Congress of Chromatography-COCOCRO 2017, Colombia.

ALMA GRISELDA FUENTES AGUILAR, SARA MONTIEL SMITH, PENÉLOPE MERINO MONTIEL,
JOSÉ LUIS VEGA BÁEZ, SOCORRO MEZA REYES

2017

“Síntesis de nuevos dímeros esteroidales diversamente fucionalizados”,
Nacional, XXII SIMPOSIO INTERNO DEL POSGRADO EN CIENCIAS QUIMICAS, BUAP, México.
ALMA GRISELDA FUENTES AGUILAR SOCORRO MEZA REYES JOSÉ LUIS VEGA BÁEZ

2018

“Síntesis de nuevos derivados esteroidales con heterociclos de 1,3,4-tiadiazolinas”, Internacional,
Congreso Iberoamericano de Química XXIX Congreso Peruano de Química, Perú.
ALMA GRISELDA FUENTES AGUILAR, SARA MONTIEL SMITH, PENÉLOPE MERINO MONTIEL,
JOSE M. PADRÓN JOSÉ LUIS VEGA BÁEZ SOCORRO MEZA REYES.

“Síntesis De Nuevos Derivados Esteroidales Diversamente Funcionalizados”, Nacional,
VII Encuentro De La Investigación En Las Ciencias Químicas, México.
ALMA GRISELDA FUENTES AGUILAR SOCORRO MEZA REYES JOSÉ LUIS VEGA BÁEZ

2019

“Síntesis de 1,4-oxazinas esteroidales”, Nacional,
VII Encuentro De La Investigación En Las Ciencias Químicas, México.
ALMA GRISELDA FUENTES AGUILAR SARA MONTIEL SMITH PENÉLOPE MERINO MONTIEL JOSÉ
LUIS VEGA BÁEZ SOCORRO MEZA REYES,

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por prestarme la vida, haciéndome fuerte con cada uno de los retos que puso en mi camino y aprendiendo de ellos, disfrutándolos al máximo.

Familia

Gracias a mis padres Genoveva y Lázaro, por creer en mí, sin dudar en ningún instante de lo que soy yo, al mismo tiempo por todo el apoyo incondicional y cariño brindando en toda mi vida.

A mis hermanos Jesús y Martín por sus palabras de aliento, por estar cuando los necesito y por crecer juntos día a día.

A mis abuelos, por cada uno de sus consejos que me ofrecieron para crecer en esta vida, además de todo el cariño y cada uno de los momentos que pase con ellos.

Al resto de mi familia por siempre estar conmigo y por nunca olvidarse de mí, en especial a mi novio por estar en los momentos más difíciles apoyándome y alentándome para salir adelante.

Amigos

A todos los que han formado parte de mí desde la infancia y el resto de mi vida, los que se han ido de mi vida y han dejado experiencias aprendidas. En especial a Sebastian, que llegó a mi vida para darme un sentido diferente demostrándome que de lo malo se puede sacar algo bueno, por mostrarme muchas veces la realidad y que no me deja caer en ninguna dificultad, entre muchas cosas que me ha ofrecido desde que forma parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis

Dra. Socorro Meza Reyes por su dedicación, apoyo, paciencia y sobre todo el cariño que me tiene, muchas gracias.

Dr. José Luis Vega Báez por los consejos brindados, gracias.

A mi comisión revisora y jurado de tesis

Dr. Rene Gutiérrez Pérez

Dra. Rosa Luisa Santillán Baca

Dr. Oscar López López

Dr. Jorge Rigoberto Juárez Posadas

Dra. Socorro Meza Reyes

Les agradezco el valioso tiempo que le dedicaron a este trabajo, así como las sugerencias aportadas las cuales sirvieron para mejorar esta tesis. Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Oscar López López de la Universidad de Sevilla

Por permitirme realizar una estancia en el grupo de investigación de Química Fina de Carbohidratos al cual pertenece en la Universidad de Sevilla, ha sido una base más de mi formación, gracias por su desinteresada ayuda, por apoyarme cuando lo necesitaba, por sus consejos y conocimientos que adquirí. Al mismo tiempo por la orientación y ayuda que me brindo para la realización del trabajo que formo parte de esta tesis, por su apoyo y amistad que me permitieron aprender mucho más durante este proyecto. Gracias por que me permitió conocer nuevas cosas e incluso nuevas personas que me ayudaron a crecer, no solo como profesional sino también como persona, gracias.

Al Dr. José M. Padrón de la Universidad de la Laguna

Por las pruebas realizadas de actividad antiproliferativa a los derivados obtenidos en esta tesis y por el tiempo prestado para realizar los estudios, gracias.

A al Dr. Claudiu T. Supuran de la Universidad de Florencia

Por las pruebas realizadas a los derivados obtenidos dentro de la estancia que se realizó en la Universidad de Sevilla, gracias.

Índice

ABREVIATURAS Y SIGLAS	15
RESUMEN	17
Introducción	23
Unidad 1: Síntesis de nuevos derivados esteroidales.....	26
Esquemas de síntesis.....	27
Capítulo 1.1: Introducción	30
Capítulo 1.2: Antecedentes.....	34
2.1 Estrógenos.....	35
2.2 Heteroesteroides.....	36
2.3 Tioderivados	38
2.4 Oxaderivados.....	39
Capítulo 1.3: Objetivos.....	41
Objetivo General:	42
Objetivos Particulares:	42
Capítulo 4: Discusión de Resultados	43
4.1. Obtención de los heterociclos de 1,3,4-tiadiazoles y 1,3,4-oxadiazoles esteroidales.	44
4.1.1 Análisis retrosintético de formación de heterociclos en C-3 del núcleo esteroideal 44	
4.1.2 Obtención del heterociclo de la 1,4-oxazina	74
Capítulo 1.5: Desarrollo Experimental	80
5.1 Equipos y técnicas utilizadas	81
5.2 Síntesis de los derivado esteroidales.....	83
5.2.1. 3-(2'-Metoxi-2'-oxoetoxi)estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (2)	83
5.2.2. Procedimiento general para la preparación de las hidrazidas (4 y 9).....	84
5.2.2.1. 3-(2'-Hidrazinil-2'-oxoetoxi)estra-1,3,5(10)-trien-17-hidrazona (4)	84
5.2.2.2. 3-(2'-Hidrazinil-2'-oxoetoxi)-17-(espiro[1,3]dioxolan-2'-il)estra-1,3,5(10)-trieno (9)85	
5.2.3. 3-[2'-Fenilaminotioxometilhidrazinil-2'-oxoetoxi]-17(fenilaminotioxometil)hidrazonoestra-1,3,5(10)-trieno (5)	86
5.2.4 3-[(5'-(Fenilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]-17-acetohidrazonoestra-1,3,5(10)-trieno (7)	87
5.2.5. 3-(2'-Metoxi-2'-oxoetoxi)-17-(espiro[1,3]dioxolan-2'-il)estra-1,3,5(10)-trieno (8)	88

5.2.6. 3-(2'-Hidrazinil-2'-oxoetoxi)estra-1,3,5(10)-trien-17-one (3)	89
5.2.7. Procedimiento general para la preparación de las 1,3,4-tiadiazoles esteroidales (11a–h).....	90
5.2.7.1. 3-[(5'-(Fenilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11a) .	90
5.2.7.2. 3-[(5'-(p-Tolilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11b)	91
5.2.7.3. 3-[(5'-(p-Metoxifenilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11c).....	91
5.2.7.4. 3-[(5'-(p-Clorofenilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11d)	92
5.2.7.5. 3-[(5'-(p-Fluorofenilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11e)	93
5.2.7.6. 3-[(5'-(Ciclohexilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11f)	93
5.2.7.7. 3-[(5'-(Butilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11g)	94
5.2.7.8. 3-[(5'-(Propilamino)-1,3,4-tiadiazol)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11h)	94
5.2.8. Procedimiento general para la preparación de las 1,3,4-oxadiazoles esteroidales (12a–c,e).....	95
5.2.8.1. 3-[(5'-(Fenilamino)[1.3.4]oxadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (12a)	96
5.2.8.2. 3-[(5'-(p-Tolilamino)[1.3.4]oxadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (12b)	96
5.2.8.3. 3-[(5'-(p-Metoxifenilamino)[1.3.4]oxadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (12c).....	97
5.2.8.4. 3-[(5'-(p-Fluorofenilamino)[1.3.4]oxadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (12e)	97
5.2.9 Obtención de 3-hidroxi-2-nitroestra-1,3,5(10)-trien-17-ona (14).....	98
5.2.10 Obtención de 3-metoxi-2-aminoestra-1,3,5(10)-trien-17-ona (16).....	99
Capítulo 1.6: Conclusiones	101
Unidad 2: Síntesis de nuevos derivados de cumarinas.	103
Esquemas de síntesis.....	104
Capítulo 2.1: Introducción	110
Capítulo 2.2: Antecedentes.....	116
2.1 Anhidrasas Carbónicas (CA).....	117
2.1.1 Mecanismo catalítico de CA.....	118

2.1.2 Isoformas de la α -CA	120
2.1.3 Inhibidores de la CA.....	121
2.2 Cumarinas.....	125
2.2.1 Cumarinas como inhibidores de la CA.....	127
2.3 Guanidinas.....	131
2.4 Tioureas.....	134
2.5 Sales de fosfonio	137
2.6 Benzoxazoles.....	141
Capítulo 2.3: Objetivos.....	144
Objetivo General:	145
Objetivos Particulares:	145
Capítulo 2.4: Discusión de Resultados	146
4.1 Estructuras de los derivados de cumarina obtenidos.....	147
4.2. Retrosíntesis de derivados de cumarina	148
4.2.1. Obtención de los derivados de guanidina.	150
4.2.2. Obtención de las sales de fosfonio derivadas de cumarinas.	172
4.2.3. Obtención de benzoxazoles bicíclicos derivados de cumarinas.....	176
Capítulo 2.5: Desarrollo Experimental	184
5.1 Equipos y técnicas utilizadas	185
5.2 Síntesis de nuevos derivados de cumarina.....	187
5.2.1. Procedimiento general para la preparación de las cumarinas (20a-d).	187
5.2.2. Procedimiento general para la preparación de los derivados 21a-k.....	187
5.2.2.1 7-[(12-Bromododecil)oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona (21e).	188
5.2.3. Procedimiento general para la preparación de las azidas (22a-k).	188
5.2.3.1 7-[(5-Azidopentil)oxi]-3,4-dimetil-2H-chromen-2-ona (22b).	189
5.2.3.1 7-[(5-Azidopentil)oxi]-3-cloro-4-metil-2H-cromen-2-ona (22c).....	189
5.2.3.1 7-[(5-Azidopentil)oxi]-4-fenil-2H-cromen-2-ona (22d).....	190
5.2.4. Procedimiento general para la preparación de las aminas (23a-k).	190
5.2.5. Procedimiento general para la preparación de las tioureas (24a-f).....	191
5.2.5.1 N-{5-[(4'-Metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)tiourea (24a).....	191
5.2.5.2 N-{5-[(3',4'-Dimetil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)tiourea (24b) ...	191

5.2.5.3 N-{5-[(3'-Cloro-4'-metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)tiourea (24c).	192
5.2.5.4 N-{5-[(4'-Fenil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)tiourea (24d).	192
5.2.5.5 N-{12-[(4'-Metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]dodecyl}-N'-(p-tolil)tiourea (24e).	193
5.2.5.6 N-{2-[(4'-Metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]etil}-N'-(p-tolil)tiourea (24f).	193
5.2.6. Procedimiento general para la preparación de las guanidinas (25a-f).	194
5.2.6.1 N''-Bencil-N-{5-[(4'-Metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)guanidina (25a).	194
5.2.6.2 N''-Bencil-N-{5-[(3',4'-dimetil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)guanidina (25b).	195
5.2.6.3 N''-Bencil-N-{5-[(3'-cloro-4'-metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)guanidina (25c).	195
5.2.6.4 N''-Bencil-N-{5-[(4'-Fenil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)guanidina (25d).	196
5.2.6.5 N''-Bencil-N-{12-[(4'-metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]dodecil}-N'-(p-tolil)guanidina (25e).	196
5.2.6.6 N''-Bencil-N-{2-[(4'-metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]etil}-N'-(p-tolil)guanidina (25f).	197
5.2.7. N-{5-[(4'-Fenil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)urea (26).	197
5.2.8. N-{5-[(4'-Metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)urea (27).	198
5.2.9. Procedimiento general para la preparación de las sales de fosfonio (29a-g).	199
5.2.9.1 Bromuro de {5-[(4-Metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]pentil}trifenilfosfonio (29a).	199
5.2.9.2 Bromuro de {5-[(3,4-Dimetil-2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]pentil}trifenilfosfonio (29b).	199
5.2.9.3 Bromuro de {5-[(3-Cloro-4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]pentil}trifenilfosfonio (29c).	200
5.2.9.4 Bromuro de {5-[(2-Oxo-4-fenil-2H-cromen-7-il)oxi]pentil}trifenilfosfonio (29d).	200
5.2.9.5 Bromuro de {12-[(4-Metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]dodecil}trifenilfosfonio (29e).	201
5.2.9.6 Bromuro de {3-[(4-Metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]propil}trifenilfosfonio (29g).	201
5.2.10. Procedimiento general para la preparación los isotiocianatos (30a,h,j,k).	202
5.2.11. Procedimientos generales para la preparación de los benzoxazoles (31a,g-o).	202
5.2.11.1 7-{[5-(Benzo[d]oxazol-2-ilamino)pentil]oxi}-4-metil-2H-cromen-2-ona (31a).	203
5.2.11.2 7-{[3-(benzo[d]oxazol-2-ilamino)propil]oxi}-4-metil-2H-cromen-2-ona (31g).	203

5.2.11.3 7-[[6-(benzo[d]oxazol-2-ilamino)hexil]oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona (31h).	204
5.2.11.4 7-[[6-(benzo[d]oxazol-2-ilamino)hexil]oxi]-3,4-dimetil-2H-cromen-2-ona (31i). ..	204
5.2.11.5 7-[[6-(benzo[d]oxazol-2-ilamino)hexil]oxi]-3-cloro-4-metil-2H-cromen-2-ona (31j).	205
4.2.11.6 7-[[6-(benzo[d]oxazol-2-ilamino)hexil]oxi]-3-metil-4-fenil-2H-cromen-2-ona (31k).	205
5.2.11.7 7-[[5-((5-bromobenzo[d]oxazol-2-il)amino)pentil]oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona (31l).....	206
5.2.11.8 7-[[5-((5-metilbenzo[d]oxazol-2-il)amino)pentil]oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona (31m).	206
5.2.11.9 7-[[5-((5-fenilbenzo[d]oxazol-2-il)amino)pentil]oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona (31n).	207
5.2.11.10 7-[[5-((5-sulfonamidobenzo[d]oxazol-2-il)amino)pentil]oxi]-4-metil-2H-cromen-2- ona (31o).	207
Capítulo 2.6: Conclusiones	209
Unidad 3: Síntesis de nuevos derivados de escuaramidas.....	212
Esquemas de síntesis.....	213
Capítulo 3.1: Introducción	216
Capítulo 3.2: Antecedentes.....	219
2.1 Alzheimer.....	220
2.1.1 Efectividad del fármaco y sus efectos secundarios en la enfermedad de Alzheimer ..	224
2.2 Tacrina.....	226
2.3 Donepecilo.....	229
2.4 Escuaramida.....	232
Capítulo 3.3: Objetivos.....	239
Objetivo General:.....	240
Objetivos Particulares:.....	240
Capítulo 3.4: Discusión de Resultados	241
4.1 Estructuras de los derivados de escuaramida obtenidos	242
4.2. Retrosíntesis de derivados de escuaramida	243
4.2.1. Obtención de los derivados de híbridos de tacrina.	244
Capítulo 3.5: Desarrollo Experimental	272

5.1 Equipos y técnicas utilizadas	273
5.2 Síntesis de los derivados de escuaramidas	275
5.2.1. 3,4-dimetoxiciclobut-3-eno-1,2-diona (40).....	275
5.2.2. Procedimiento general para la preparación de las cumarinas (20 y 42).	275
5.2.3. 7-Hidroxi-4-(N-metil-N-propargilamino)metil-2H-cromen-2-ona (43).....	276
5.2.4. Procedimiento general para la preparación de los derivados 21h y 44.....	277
5.2.4.1 7-[(6-Bromohexil)oxi]-4-[[metil(prop-2-in-1-il)amino]metil]-2H-cromen-2-ona (44).	277
5.2.5. Procedimiento general para la preparación de las azidas (22h, 35, 45 y 48).....	278
5.2.5.1 7-[(6-Azidohexil)oxi]-4-[[metil(prop-2-in-1-il)amino]metil]-2H-cromen-2-ona (45). 278	
5.2.6. Procedimiento general para la preparación de las aminas (23h, 49 y 36).	279
5.2.7. 7-[(6-Aminohexil)oxi]-4-[[metil(prop-2-in-1-il)amino]metil]-2H-cromen-2-ona (46).....	279
5.2.8. Procedimiento de la hidrolisis de melatonina (51).....	280
5.2.9. 1,2,3,4-Tetrahidroacridin-9-amina 33.	280
5.2.10. N-(6-Bromohexil)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (34).	281
5.2.11. 3-Metoxi-4-[[6-((1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-il)amino)hexil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (37).....	281
5.2.12. Procedimiento general para la preparación de las escuaramidas con tacrina (38a-e).	282
5.2.12.1 3-[[2'-(5''-Metoxi-1''H-indol-3''-il)etil]amino]-4-[[6'-((1'',2'',3'',4''- tetrahidroacridin-9''-il)amino)hexil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (38a).....	282
5.2.12.2 3-[[2'-(1''H-indol-3''-il)etil]amino]-4-[[6'-((1'',2'',3'',4''-tetrahidroacridin-9''- il)amino)hexil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (38b).	283
5.2.12.3 3-[[6'-((4''-metil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi)hexil]amino]-4-[[6'-((1'',2'',3'',4''- tetrahidroacridin-9''-il)amino)hexil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (38c).	284
5.2.12.4 3-[[6'-((4''-((metil(prop-2'''-in-1'''-il)amino)metil)-2''-oxo-2''H-cromen-7''- il)oxi)hexil]amino]-4-[[6'-((1'',2'',3'',4''-tetrahidroacridin-9''-il)amino)hexil]amino]ciclobut- 3-eno-1,2-diona (38d).	285
5.2.12.5 3-[[3',4''-dimetoxifenetil]amino]-4-[[6'-((1'',2'',3'',4''-tetrahidroacridin-9''- il)amino)hexil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (38e).	286
5.2.13. 2- (1-Bencilpiperidin-4-iliden)acetato de metilo (53).....	286
5.2.14. 2- (1-Bencilpiperidin-4-il)acetato de metilo (54).....	287
5.2.15. 2- (1-Bencilpiperidin-4-il)etan-1-ol (55).....	287

5.2.16. 1-Bencil-4-(2-cloroetil)piperidina (56).....	288
5.2.17. 4-(2-Azidoetil)-1-bencilpiperidina (57).....	288
5.2.18. 2-(1-Bencilpiperidin-4-il)etan-1-amina (58).....	289
5.2.19. Procedimiento general para la preparación de las escuaramidas con un derivado de donepezilo (60a-e).....	289
5.2.19.1 3-[[2'-(5''-metoxi-1''H-indol-3''-il)etil]amino]-4-[[2'-(1''-bencilpiperidin-4''-il)etil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (60a).....	290
5.2.19.2 3-[[2'-(1''H-indol-3''-il)etil]amino]-4-[[2'-(1''-bencilpiperidin-4''-il)etil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (60b).....	290
5.2.19.3 3-[[6''-(4''-metil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]hexil]amino]-4-[[2'-(1''-bencilpiperidin-4''-il)etil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (60c).....	291
5.2.19.4 3-[[6''-(4''-(etnil(metil)amino)metil)-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]hexil]amino]-4-[[2'-(1''-bencilpiperidin-4''-il)etil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (60d).....	292
5.2.19.5 3-[[3'',4''-dimetoxifenetil]amino]-4-[[2'-(1''-bencilpiperidin-4''-il)etil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (60e).....	293
Capítulo 3.6: Conclusiones	294
Unidad 4: Resultados Biológicos	296
4.1. Ensayos de pruebas bilógica.....	297
4.2 Ensayos de actividad antiproliferativa.....	299
4.2.1. Metodología	299
4.2.2. Discusión de los resultados del ensayo de actividad antiproliferativa.....	299
4.2.2.1 Derivados de Esteroides.....	299
4.2.2.2 Derivados de Cumarina.....	303
4.2.2.2 Derivados de Escuaramidas.....	306
4.3 Ensayos de capacidad inhibitoria de la anhidrasa carbónica (CA).....	308
4.3.1. Metodología	308
4.3.2. Discusión de los resultados del ensayo de capacidad inhibitoria de la anhidrasa carbónica (CA).....	309
4.2.2.1 Derivados de Cumarinas.....	309
4.4 Ensayos de inhibición de las colinesterasas (AChEy BuChE).....	311
4.4.1. Metodología	312
4.4.1. Discusión de los resultados del ensayo de inhibición de las colinesterasas (AChE y BuChE).....	312

4.4.3.2 Derivados de Escuaramidas.	314
4.5. Conclusiones de los ensayos de pruebas bilógica.....	316
4.5.1. Ensayos de actividad antiproliferativa.....	317
4.5.2 Ensayos de la capacidad inhibitoria de la anhidrasa carbónica (CA).....	318
4.5.3. Ensayos de inhibición de las colinesterasas (AChE y BuChE).	318

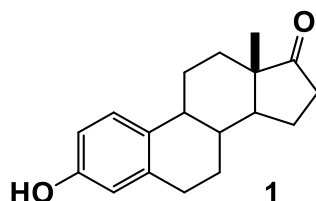
ABREVIATURAS Y SIGLAS

CCF	Cromatografía en capa fina
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
δ	Desplazamiento químico
Hz	Hertz
ppm	Partes por millón
p.f.	Punto de fusión
p.eb.	Punto de ebullición
t. a.	Temperatura ambiente
m.p	Materia prima
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
CA	Anhidrasa Carbónica
hCA	Anhidrasa Carbónica humana
CAI	Inhibidor de la Anhidrasa Carbónica
AChE	Acetilcolinesterasa
BuChE	Butilcolinesterasa
GI ₅₀	Inhibición del crecimiento 50%

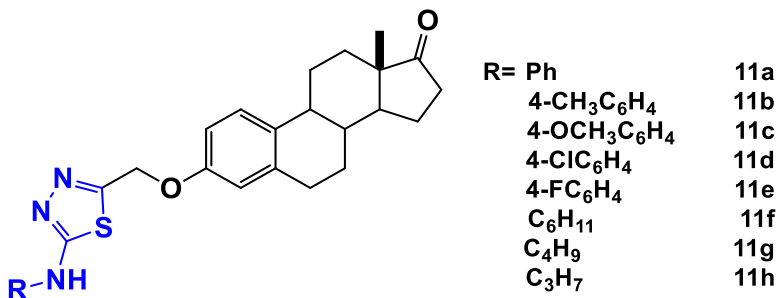
d	Doble
dd	Doble de dobles
UV	Ultravioleta
V	Velocidad
m	Múltiple
t	Triplete
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
MHz	Megahertz
s	Simple
THF	Tetrahidrofurano
FAB	Fast Atom Bombardment

RESUMEN

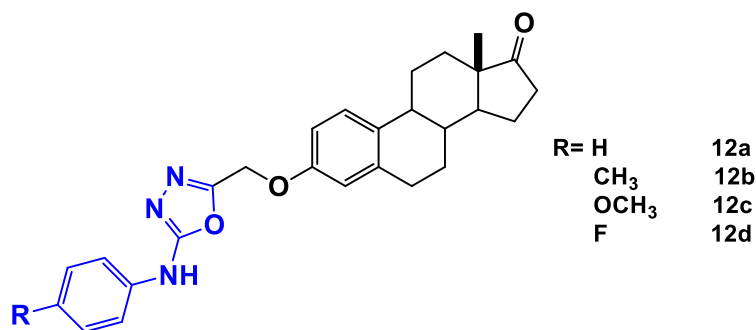
En esta primera unidad se realizó la síntesis de nuevos derivados esteroidales con diversos heterociclos en la posición 3 del núcleo esteroidal que contienen átomos como N, O y/o S a partir de estrona (1) para ser evaluados como posibles agentes antiproliferativos.



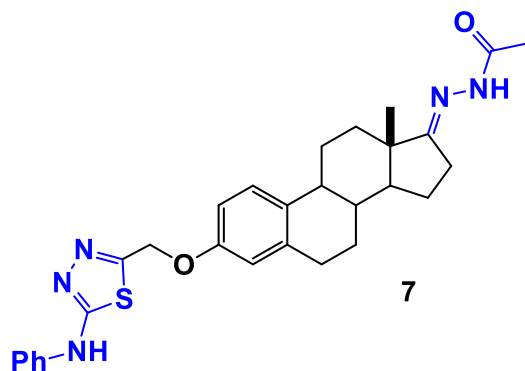
Dentro de estos nuevos derivados de estrona se encuentran derivados que contienen heterociclos 1,3,4-tiadiazolinas esteroidales (**11a-h**) que fueron obtenidos comenzando por una eterificación en el grupo hidroxilo en C-3 de la estrona (1) por una sustitución nucleofílica (reacción de Williamson) seguida de otra sustitución por hidracina y acoplamiento de diversos isotiocinatos, que después se somete a una ciclación para dar **11a-h**.



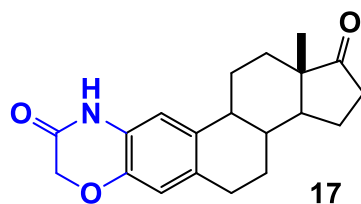
Otros derivados obtenidos son los 1,3,4-oxadiazolinas esteroidales (**12a-d**) sintetizados por la modificación de las condiciones de ciclación, partiendo de la misma ruta sintética realizada para los derivados **11a-h**.



También se obtuvo el derivado **7** al utilizar el método descrito por Salman A. Khan¹³; el cual se aplicó en el derivado **5** proveniente sintetizado por medio de un acoplamiento con isotiocianato de fenilo, proveniente de hacer reaccionar el derivado **2** con hidracina y formando la hidrazona en el C-17 de la estrona **1**.



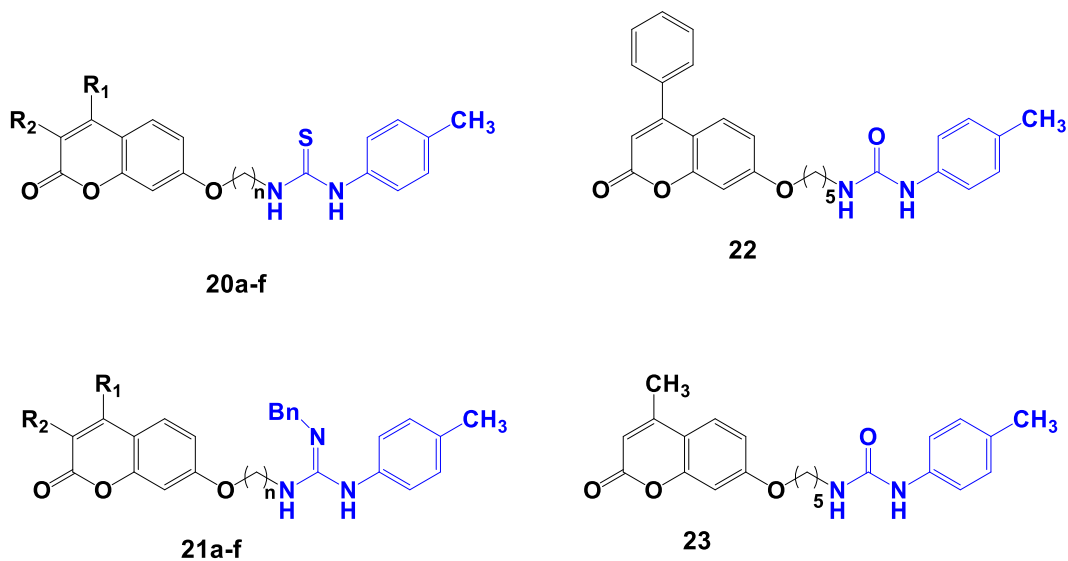
Se realizó la síntesis en tres pasos de la oxazolidinona **17** sobre el anillo A de **1**, partiendo de una nitración de esta y seguida de una reducción catalítica para dar la amina **16**, que fue puesta a reaccionar en condiciones básicas con cloruro de cloroacetilo.



En esta tesis también se describe la síntesis de diversas familias de cumarinas (*2H*-cromen-2-one) con diversas funcionalidades, siendo estudiadas como potenciales agentes antiproliferativos,

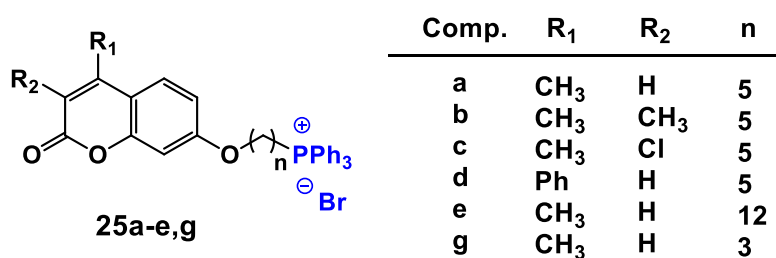
donde uno de los posibles mecanismos de acción sea la inhibición de anhidrasas carbónicas relacionado a procesos tumorales (CA IX, XII). En estos derivados se ha empleado un núcleo de cumarina con diversos sustituyentes, al que se han conectado diferentes residuos aromáticos a través de distintos conectores: sales de fosfonio, bicíclicos de benzaxazoles y guanidinas, además de la obtención de dos ureas y del aislamiento de las tioureas que sirven como precursores para la obtención de los derivados de guanidinas.

Los derivados de guanidinas fueron los primeros derivados en obtenerse, estos fueron sintetizados por medio de seis etapas partiendo de la obtención de las cumarinas sustituidas en las posiciones C-3 y/o C-4 con resorcinol y diferentes β -ceto-ésteres por una reacción de Pechman. Seguido de una alquilación con un exceso de α,ω -dibromoalcanos, desplazamiento nucleofílico del bromo terminal con NaN_3 , reducción y acoplamiento de la amina resultante con isotiocianato de *p*-tolilo obteniendo las tioureas (**20a-f**) que se aíslan para su estudio. Dichas tioureas se emplearon, a su vez, como materias primas en la preparación de las guanidinas **21a-f**; para ello, las tioureas se sometieron a una reacción de desulfuración promovida por HgO amarillo, dando lugar a una carbodiimida intermedia, que reaccionó con bencilamina. En el proceso de optimización de esta reacción se obtuvieron accidentalmente también las ureas **22** y **23**.

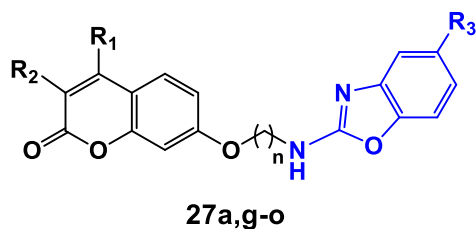


Comp.	R ₁	R ₂	n
a	CH ₃	H	5
b	CH ₃	CH ₃	5
c	CH ₃	Cl	5
d	Ph	H	5
e	CH ₃	H	12
f	CH ₃	H	2

Los bromuros de trifenilfosfonio **25a-e,g** fueron preparados mediante desplazamiento nucleofílico del bromo terminal de las diferentes cumarinas alquiladas previamente obtenidas con Ph₃P. Tanto las guanidinas, como las sales de fosfonio se diseñaron como potenciales agentes mitocondriotrópicos, es decir, sustancias que específicamente se dirijan a las mitocondrias, en este caso, de las células tumorales (mitocans).



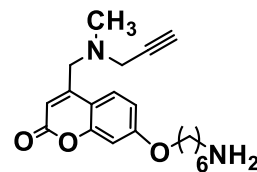
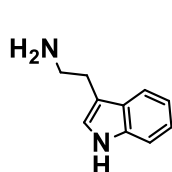
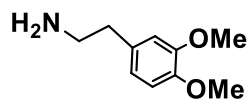
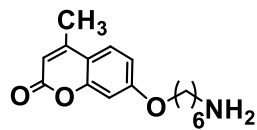
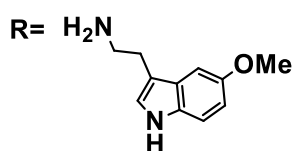
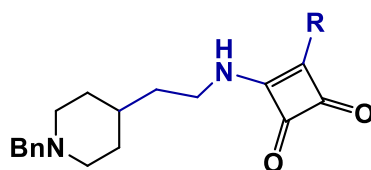
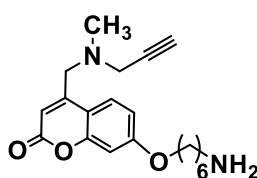
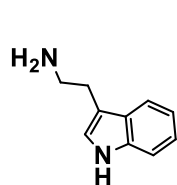
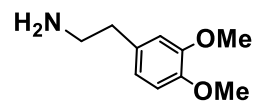
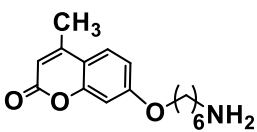
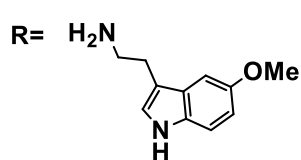
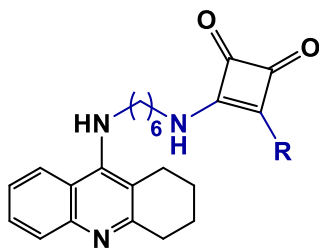
Los bicíclidos de benzoxazoles **27a,g-o** se sintetizaron en 5 o 6 etapas, a partir de las aminocumarinas empleadas como intermediarios en la preparación de las tioureas, mediante conversión en isotiocianatos con tiofosgeno, seguido de formación de las correspondientes tioureas intermedias por tratamiento con *o*-aminofenoles, y ciclodesulfuración promovida por H₂O₂ y TBAI.



Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	n
a	CH ₃	H	H	5
g	CH ₃	H	H	3
h	CH ₃	H	H	6
i	CH ₃	CH ₃	H	6
j	CH ₃	Cl	H	6
k	Ph	H	H	6
l	CH ₃	H	Br	5
m	CH ₃	H	CH ₃	5
n	CH ₃	H	Ph	5
o	CH ₃	H	SO ₂ NH ₂	5

En esta tesis al igual se realizaron heterodímeros tanto de tacrina como de donepecilo, empleando como conector la función escuaramida, como potenciales nuevos agentes anti-Alzheimer. Las dos familias preparadas tienen como estructura general un núcleo de escuaramida al que se encuentran unidos dos tipos de farmacóforos. Por un lado, un residuo que permita la interacción con las colinesterasa; para ello se empleó la tacrina, que a su vez estaba unida por un espaciador hidrocarbonado, o una *N*-bencilpiperidina, que imita la estructura del donepecilo.

Como segunda unidad esencial se encuentra un residuo aromático, que pueda, bien reforzar la interacción del inhibidor con la colinesterasa a través de la región conocida como PAS, o incluso introducir potenciales actividades adicionales (ej. función antioxidante, inhibición de MAO). A tal efecto se emplearon índoles o cumarinas, adecuadamente funcionalizadas, así como residuos de tipo dimetoxifenilo, análogo estructural al donepecilo.



Introducción

El concepto de “una molécula, un objetivo, una enfermedad” dominó la industria farmacéutica en el siglo XX. A partir de este concepto se han desarrollado muchos fármacos selectivos con éxito, que predominarán para determinadas enfermedades.¹ Sin embargo, para enfermedades multifactoriales que son muy variables, heterogéneas y afectan a múltiples sistemas de órganos o tejidos ya no funciona este concepto. Estas enfermedades multifactoriales como la aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer (EA), el síndrome metabólico, el asma, la artritis reumatoide, la osteoartritis, las complicaciones diabéticas, la malaria, la tuberculosis, el cáncer, el neurotrauma, diversos trastornos del SNC (sistema nervioso central) y la esclerosis múltiple tienen una etiopatología extremadamente compleja e involucran dos o más indicaciones.²

Por lo tanto, el objetivo se ha desplazado ahora al diseño de una única entidad química con múltiples actividades biológicas. Estas moléculas se denominan “fármacos multifuncionales” y han demostrado ser eficaces debido a su índice terapéutico mejorado debido a los efectos sinérgicos o menos efectos secundarios.^{3,4} La “multifuncionalidad” es el resultado de la interacción de sustancias químicas polipotentes con varios receptores o dianas moleculares. Existen diversos sinónimos de estos fármacos pero se ha sugerido un término unificado: “diseñado para múltiples ligandos” (DML), es decir, compuestos que están diseñados racionalmente para exhibir dos o más acciones farmacológicas específicas.² Las ventajas de los DML sobre las combinaciones de fármacos incluyen (i) acciones tanto paliativas como modificadoras de la enfermedad, (ii) respuestas terapéuticas aditivas o sinérgicas, (iii) características mejoradas para el medicamento del componente terapéutico, (iv) relaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas más predecibles y (v) duración prolongada de la eficacia. Los DML pueden diseñarse como una sola molécula que actúa sobre múltiples dianas o que han sido capaces de exhibir dos o más actividades farmacológicas en una enfermedad multifactorial.⁵

¹ Zhou J.; Jiang X.; He S.; Jiang H.; Feng F.; Liu W.; Qu W.; Sun H.; *J. Med. Chem.* **2019** 62, 20, 8881-8914.

² Bansal Y.; Silakari O.; *Eur. J. Med. Chem.* **2014** 76, 31-42.

³ Morphy R.; Kay C.; Rankovic Z.; *Drug Discov. Today* **2004** 9, 641-651.

⁴ Cavalli A.; Bolognesi M. L.; Minarini A.; Rosini M.; Tumiatti V.; Recanatini M.; Melchiorre C.; *J. Med. Chem.* **2008** 51, 347-372.

⁵ Buccafusco J. J.; *Neurotherapeutics* **2009** 6, 4-13.

El principal desafío que persiste con el concepto de DML es el diseño intencional y racional de ligandos de múltiples objetivos con perfiles biológicos bien definidos. La cuestión crucial es mantener el equilibrio de afinidad hacia diferentes dianas. De manera similar, mantener el equilibrio adecuado en el objetivo para lograr el perfil de eficacia *in vivo* deseado es otro desafío clave. Surge claramente que el aspecto básico del diseño de un DML puede involucrar cualquiera de dos estrategias: (1) diseño racional mediante una combinación de farmacóforos, también conocido como el enfoque basado en fragmentos y (2) involucrando cribado en computación asistido de bibliotecas de fármacos conocidos, que es más riguroso.⁶

Para obtener nuevos agentes multifuncionales, generalmente se aplica una estrategia de diseño en la que se integran distintos farmacóforos de diferentes fármacos en la misma estructura para producir moléculas híbridas. En principio, cada farmacóforo de estos agentes multidireccionales debería conservar la capacidad de interactuar con su (s) sitio (s) específico (s) en el objetivo y, en consecuencia, producir respuestas farmacológicas específicas que, en conjunto, deberían interrumpir la progresión. Lo común de los agentes multidireccionales es el modo de múltiples farmacóforos (Fig.1) que se puede dividir en los siguientes tres tipos: modo de farmacóforo enlazado no escindible o enlazado escindible, modo de farmacóforo fusionado y modo de farmacóforo combinado (*linked*, *fused* y *merged*).^{7,8}

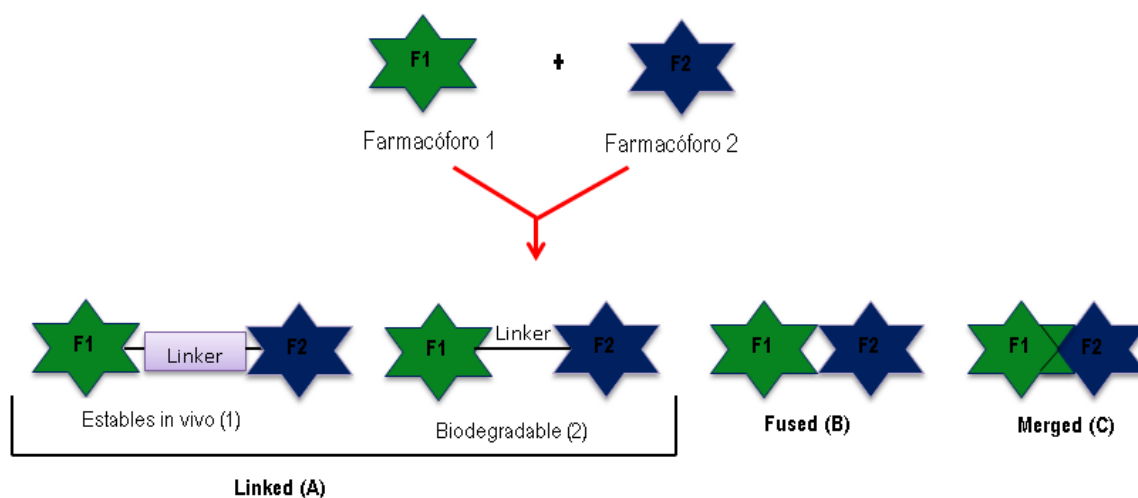


Figura 1. Clasificación de los fármacos multidiana.⁸

⁶ Singh P. K.; Silakari O.; *Key Heterocycle Cores for Designing Multitargeting Molecules* **2018** 1-29.

⁷ Ramsay R. R.; Popovic-Nikolic M. R.; Nikolic K.; Uliassi E.; Bolognesi M. L.; *Clin. Transl. Med.* **2018** 7, 3.

⁸ Fu R.-g.; Sun Y.; Sheng W.-b.; Liao D.-f.; *Eur. J. Med. Chem.* **2017** 136, 195-211.

Los farmacóforo tipo linked, dos farmacóforos distintos están conectados a través de un enlazador que no existe inicialmente en ninguno de ellos. Dependiendo de las propiedades del espaciador, este grupo se puede dividir en dos: aquellos cuyo linker es estable *in vivo* (Fig. 1.A1) y los que el linker es biodegradable y se puede descomponer para liberar los fragmentos que actúan en las correspondientes dianas (Fig. 1.A2).^{8,9} Los otros dos grupos de fármacos difieren del primero en la ausencia de espaciadores entre los farmacóforos, obteniéndose compuestos con distinto grado de solapamiento que se caracterizan por ser más simples con propiedades fisicoquímicas favorables y de peso molecular más reducido. Así, los tipo fused (Fig. 1.B) contienen dos farmacóforos distintos que se superponen ligeramente, mientras que los merged (Fig. 1.C) muestran el mayor grado de solapamiento.^{8,9}

En el presente, los objetivos principales son el cáncer y el Alzheimer, dos enfermedades que además de provocar un deterioro irreversible en los pacientes, suponen una carga sustancial en la economía y en la sociedad en todo el mundo. El principal objetivo perseguido, por tanto, ha sido el desarrollo eficaz de nuevas moléculas con actividad antiproliferativa, capacidad inhibitoria de anhidrasa carbónica o anti-Alzheimer, enfermedades de mayor complejidad e incidencia en nuestra sociedad actual.

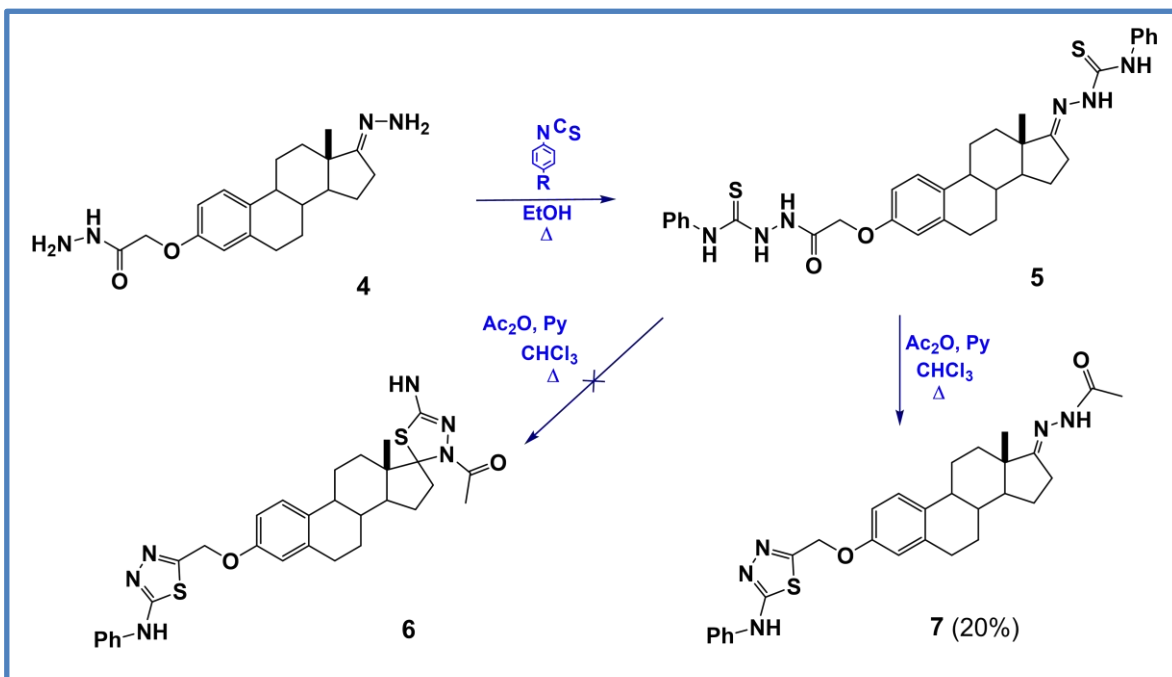
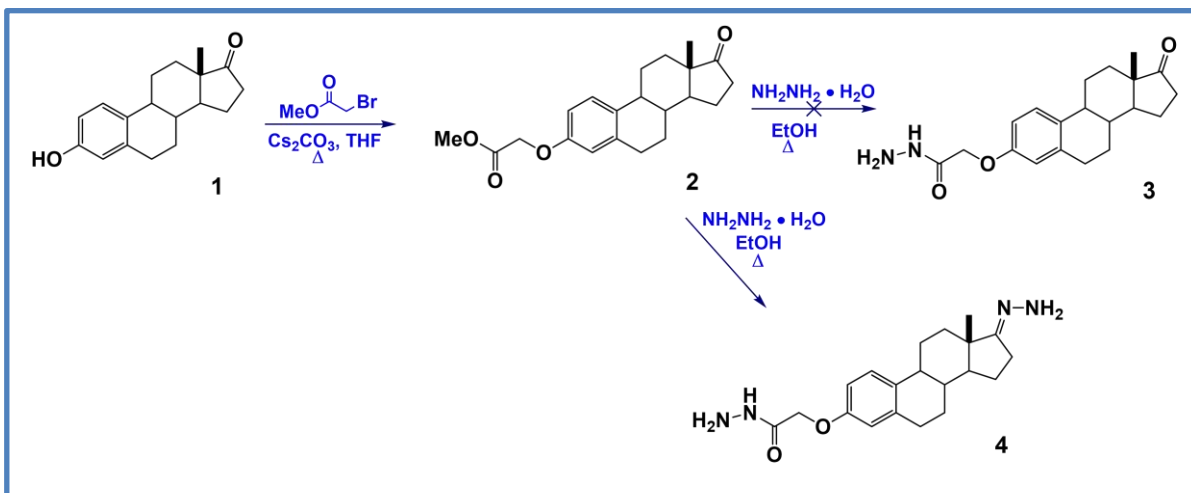
⁹ Morphy R.; Rankovic Z.; *J. Med. Chem.* **2005** 48, 6523-6543.

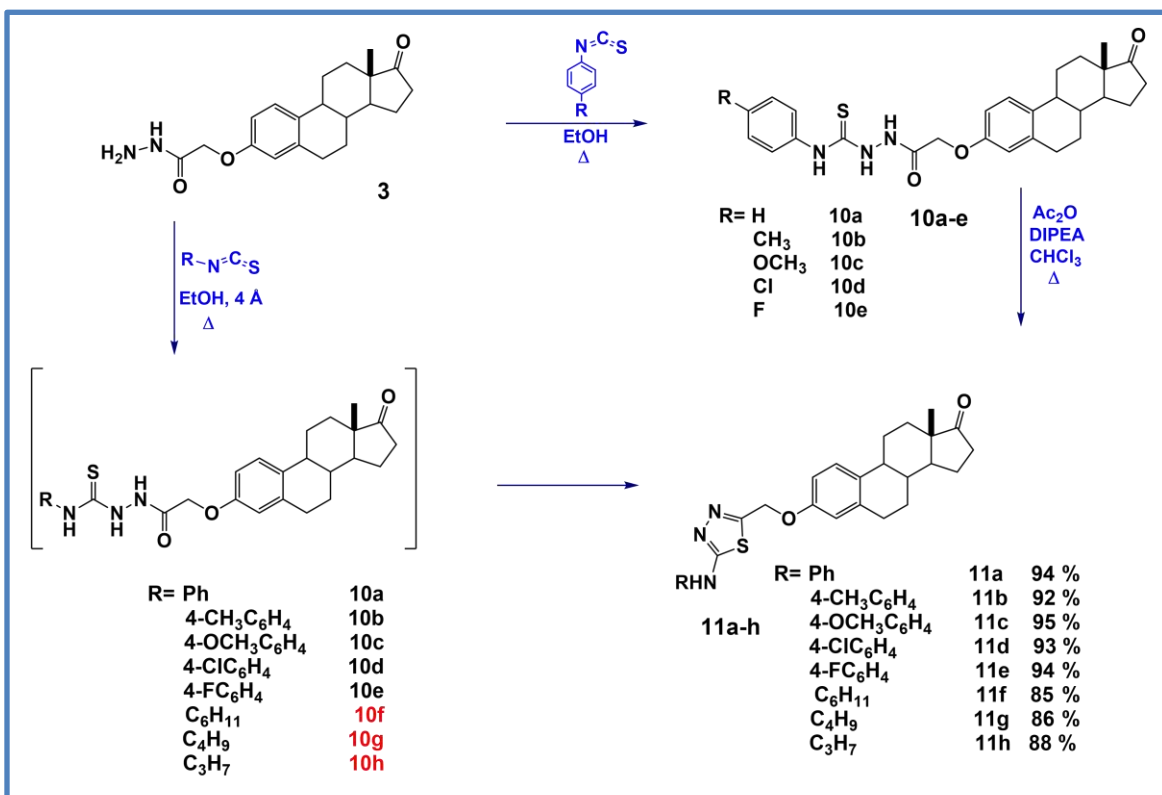
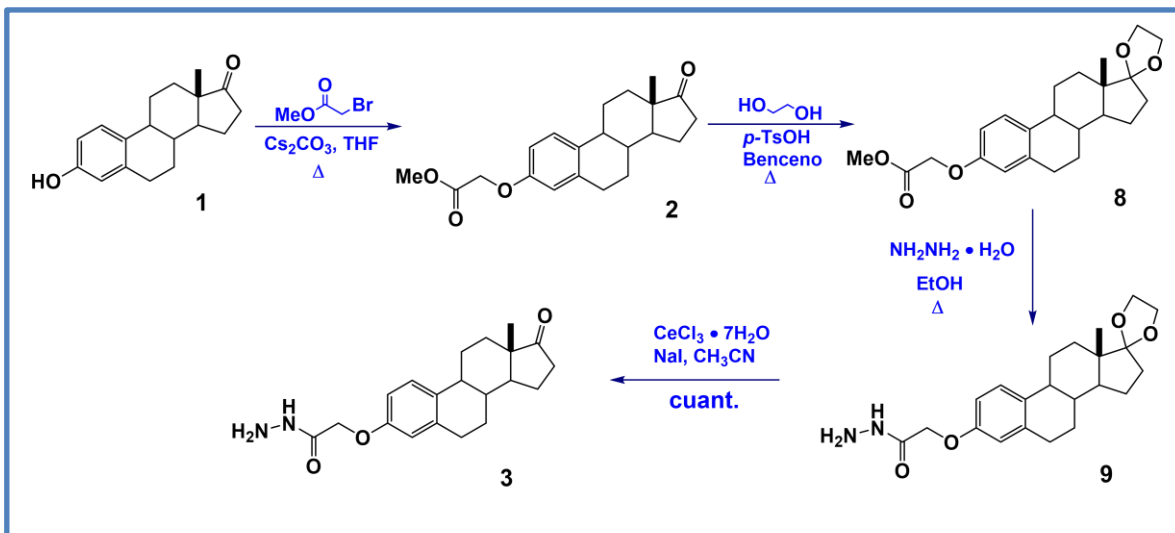


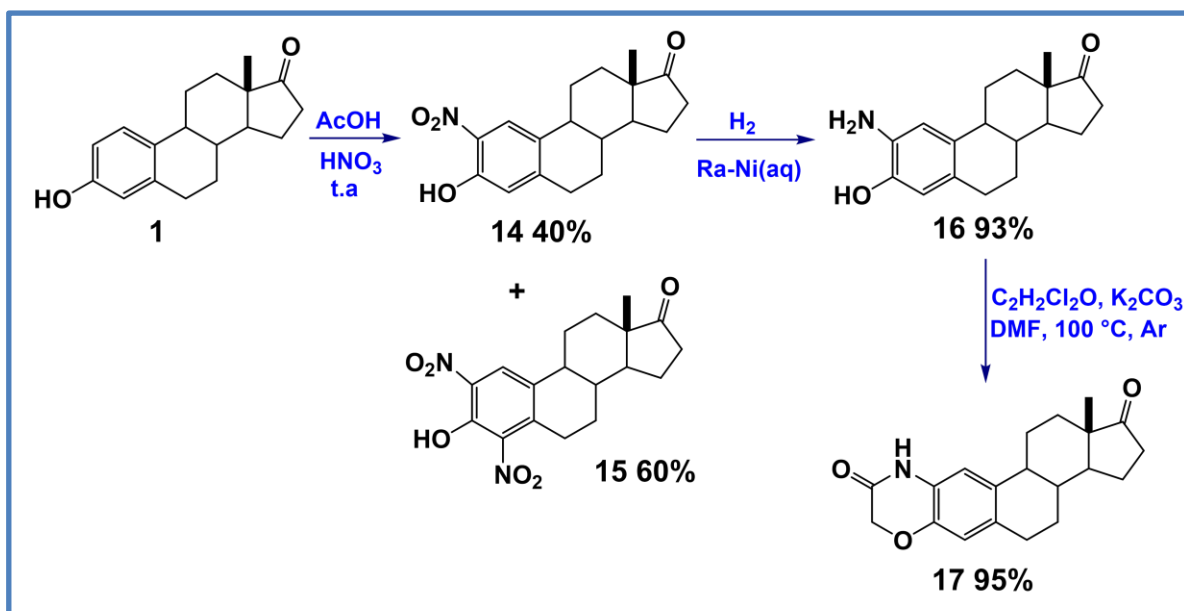
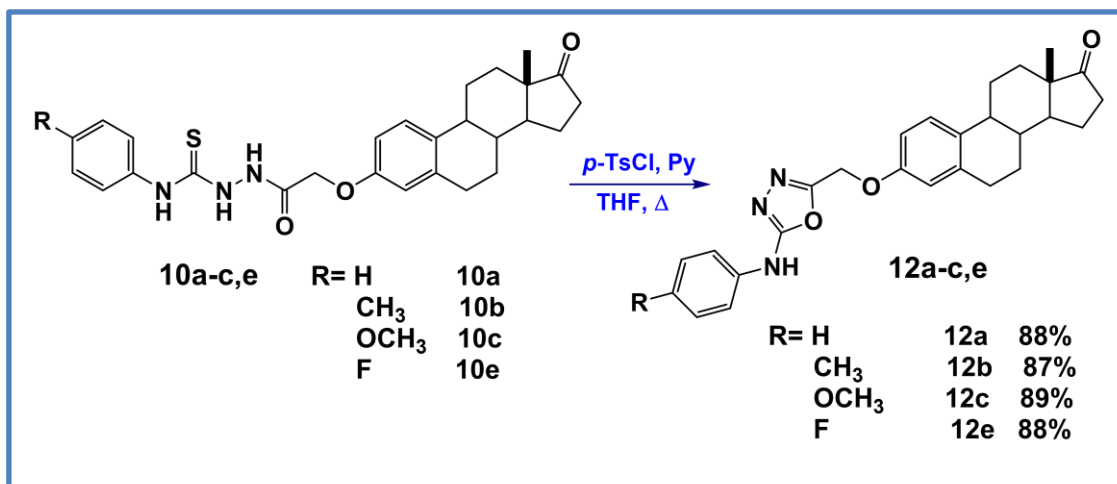
Unidad 1: Síntesis de nuevos derivados esteroidales



Esquemas de síntesis







Capítulo 1.1: Introducción

En las últimas décadas, los productos naturales han sido ampliamente explorados para el desarrollo de infinidad de fármacos como medicamentos contra el cáncer y actualmente alrededor del 80% de los agentes anticancerígenos clínicamente importantes provienen de ellos.¹⁰ Dentro de los que se encuentran los compuestos esteroidales que son abundantes en la naturaleza y muestran una variedad de actividades biológicas.¹¹ Estos ejercen una notable amplitud en funciones fisiológicas a pesar de la estructura conservada, indicando que pequeños cambios químicos pueden conducir a moléculas con diferentes propiedades biológicas.¹² Por lo tanto, el esqueleto esteroide es la columna vertebral para el diseño y síntesis de candidatos a fármacos originales con una amplia gama de actividades farmacológicas.¹³ Se ha informado que muchos esteroides poseen propiedades inotrópicas, antiinflamatorias y antioxidantes.¹⁴ La capacidad anticancerígena es uno de los caracteres más investigados de productos esteroides naturales y análogos sintéticos.⁴ La funcionalización específica del núcleo esteroide sigue siendo una cuestión sintética clave para la obtención de nuevos fármacos.¹⁵

El cáncer es la proliferación incontrolada de células anormales, no es solo una enfermedad, sino un gran grupo de casi 100 enfermedades con las características del crecimiento sin control, sin tener en cuenta las reglas normales de la división celular, la capacidad de migrar desde el sitio original y extenderse a sitios distantes. Es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y explica 7.6 millones de muertes (alrededor del 13% de todas las muertes) en 2008 y muertes de cáncer en todo el mundo se prevé que continúe aumentando a más de 13,1 millones en 2030. De hecho, casi el 90% de las muertes relacionadas con cáncer se deben a la diseminación tumoral o difusión. Varias técnicas que implican cirugía, radiación, inmunoterapia y quimioterapia fueron adoptadas para la erradicación de células cancerosas.¹⁶

A pesar del progreso sustancial en estrategias de tratamientos contra el cáncer, todavía hay una necesidad urgente en la búsqueda de nuevos procedimientos que sean altamente terapéuticos y

¹⁰ Dangroo N. A.; Singh J.; Rath S. K.; Gupta N.; Qayum A.; Singh S.; Sangwan P. L.; *Steroids* **2017**, 123, 1–12.

¹¹ Lopes S. M. M.; Sousa E. P.; Barreira L.; Marques C.; Rodrigues M. J.; Pinho e Melo T. M.V.D.; *Steroids* **2017**, 122, 16–23.

¹² Minorics R.; Szekeres T.; Krupitza G.; Saiko P.; Giessrigl B.; Wölfling J.; Frank É.; Zupkó I.; *Steroids* **2011** 76, 156-162.

¹³ Prokai-Tatrai K.; Perjesi P.; Rivera-Portalatin N. M.; Simpkins J. W.; Prokai L.; *Steroids* **2008** 73, 280-288.

¹⁴ Berényi Á.; Minorics R.; Iványi Z.; Ocsosvski I.; Ducza E.; Thole H.; Messinger J.; Wölfling J.; Mótyán G.; Mernyák E.; Frank É.; Schneider G.; Zupkó I.; *Steroids* **2013**, 78, 69–78.

¹⁵ Shon U.; Messinger J.; Solodenko W.; Kirschning A.; *Synthesis* **2012**, 44, 3822–3828.

¹⁶ Parihar S.; Kumar A.; Chaturvedi A. K.; Sachan N. K.; Luqman S.; Changkija B.; Manohar M.; Prakash O.; Chanda D.; Khan F.; Chanotiya C.S.; Shanker K.; Dwivedi A.; Konwar R.; Negi A. S.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2013**, 137, 332–344.

eficientes. En las últimas décadas, surgió el desarrollo de fármacos basados en la identificación de sustancias con alta selectividad para el cáncer. Medicamentos que combinan dos fracciones diferentes que actúan por diferentes mecanismos y son de gran interés terapéutico,¹⁷ ya que pueden superar efectivamente la mayor parte de los inconvenientes farmacocinéticos encontrados cuando se usa el tradicional medicamento contra el cáncer.¹⁸ Los efectos prometedores de estas moléculas se deben a su alta potencia y selectividad, que pueden iniciar dos o más modos de acción farmacológicas que actúan en paralelo para suprimir el crecimiento tumoral del cáncer,⁸ como por ejemplo las que se muestran en la **Figura 1.1**.¹

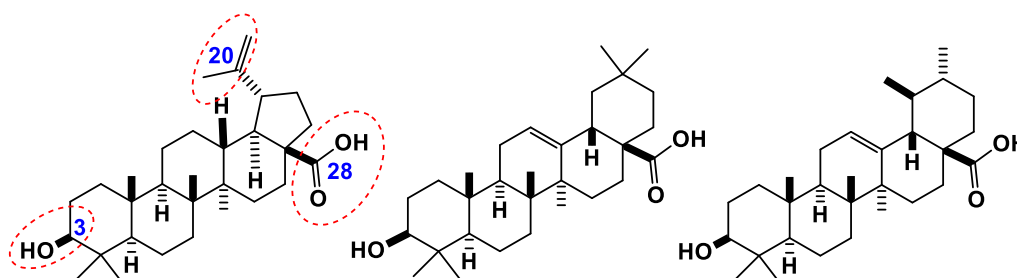


Figura 1.1. Triterpenos como potentes agentes contra el cáncer.

Los derivados de esteroides modificados condensados o fusionados con varios anillos heterocíclicos han ganado una gran atención por muchos grupos de investigación. Sabiendo que el reemplazo de uno o más átomos de carbono en una molécula del esteroide con heteroátomos o la adición de heterociclos a la estructura podría modificar su actividad biológica.¹⁹ Debido a que los heterociclos pueden modular la lipofilia de las moléculas del fármaco o mejorar la solubilidad acuosa de los compuestos, proporcionando así las propiedades farmacocinéticas y farmacéuticas deseadas. La versatilidad de los heterociclos en el descubrimiento moderno de fármacos contra el cáncer está ampliamente demostrada en varios fármacos nuevos como axitinib, ponatinib, imatinib, gefitinib, lapatinib, etc.,²⁰ tal como se observa en la figura 1.2.

¹⁷ Yahya S. M.M.; Abdelhamid A. O.; Abd-Elhalim M. M.; Elsayed G. H.; Eskander E. F.; *Steroids* **2017**, 126, 15–23.

¹⁸ Teiten M.-H.; Dicato M.; Diederich M.; *Molecules* **2014**, 19, 20839-20863.

¹⁹ Elmegeed G. A.; Yahya S. M.M.; Abd-Elhalim M. M.; Mohamed M. S.; Mohareb R. M.; Elsayed G. H.; *Steroids* **2016**, 115, 80–89.

²⁰ Cui J.; Liu L.; Zhao D.; Gan C.; Huang X.; Xiao Q.; Qi B.; Yang L.; Huang Y.; *Steroids* **2015**, 95, 32–38.

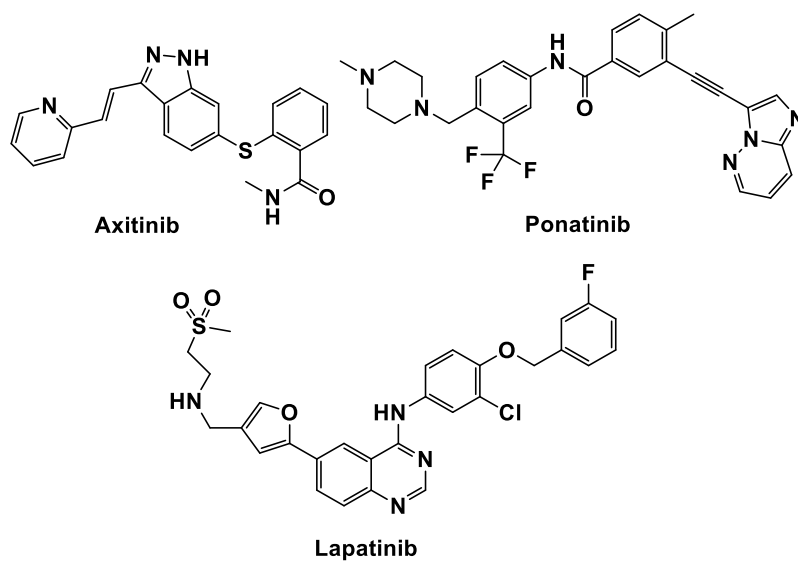


Figura 1.2. Fármacos utilizados contra el cáncer.

Los estudios han revelado que la incorporación de heteroátomos (N / O / S) en los anillos de cinco o seis miembros mejora la actividad de los compuestos, ya que varios fármacos ampliamente implicados en la medicina contienen en su estructura heterocíclicos.²¹ Los compuestos con heterocíclcos como el tiazol, la tiazolidinona y la tiadiazolina son abundantes en la naturaleza y de gran importancia para la vida porque sus subunidades estructurales que existen en muchos productos naturales como vitaminas, hormonas, antibióticos, etc.²²

Desafortunadamente, no hay actualmente disponibles drogas contra el cáncer que erradiquen las células cancerosas sin dañar los tejidos normales. En consecuencia, se necesita investigación continua para desarrollar nuevos agentes antitumorales eficientes.²³ Tomando en cuenta lo anterior el presente trabajo de investigación está orientado a la búsqueda de nuevos derivados heteroesteroidales que tengan actividad biológica y al mismo tiempo que contribuyan al descubrimiento de nuevos fármacos.

²¹ Yusuf M.; Kaur A.; Abid M.; *J. Heterocyclic Chem.* **2017** 54, 2536-2547.

²² Khan S. A.; Asiri A. M.; *J. Heterocyclic Chem.* **2012**, 49, 1452-1457.

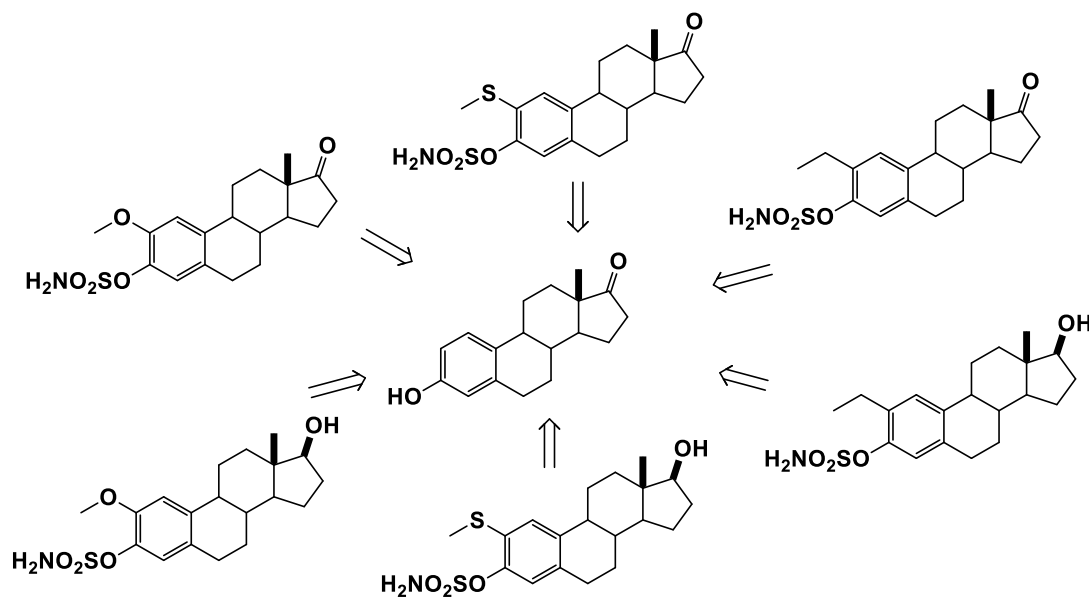
²³ El-Ansary S. L.; Hussein M. M.; Rahman A. D. E.; Ghany A. L. M.A.; *Bioorg. Chem.* **2014**, 53, 50–66.

Capítulo 1.2: Antecedentes

2.1 Estrógenos

Los esteroides son una clase importante de compuestos orgánicos que son capaces de penetrar fácilmente a través de las membranas celulares y estar vinculados a los receptores nucleares y de membrana. Entre ellos se encuentran los estrógenos (como estrona, estradiol, estriol) que son un conjunto de esteroides comunes que se encuentran en hombres y mujeres pero que desempeñan papeles importantes en varios procesos fisiológicos.²⁴ Son muy conocidos por sus actividades hormonales y la contribución a la progresión del cáncer de mama dependiente de estrógenos y en particular sus análogos han adquirido un mayor interés debido a su capacidad para afectar a otros procesos biológicos sin producir los efectos secundarios negativos asociados con el tratamiento de estrógenos.¹⁵

Se han desarrollado síntesis eficientes y flexibles de estrona, utilizando la metodología de *orto*-litiación dirigida para la obtención de nuevos derivados. En el **Esquema 1.1** muestra los derivados que tuvieron además de su efecto antiproliferativo contra diferentes tumores de cáncer, también mostraron ser inhibidores eficaces de la angiogénesis utilizando tres marcadores *in vitro*, y ser inhibidores de la sulfatasa esteroidea.²⁵

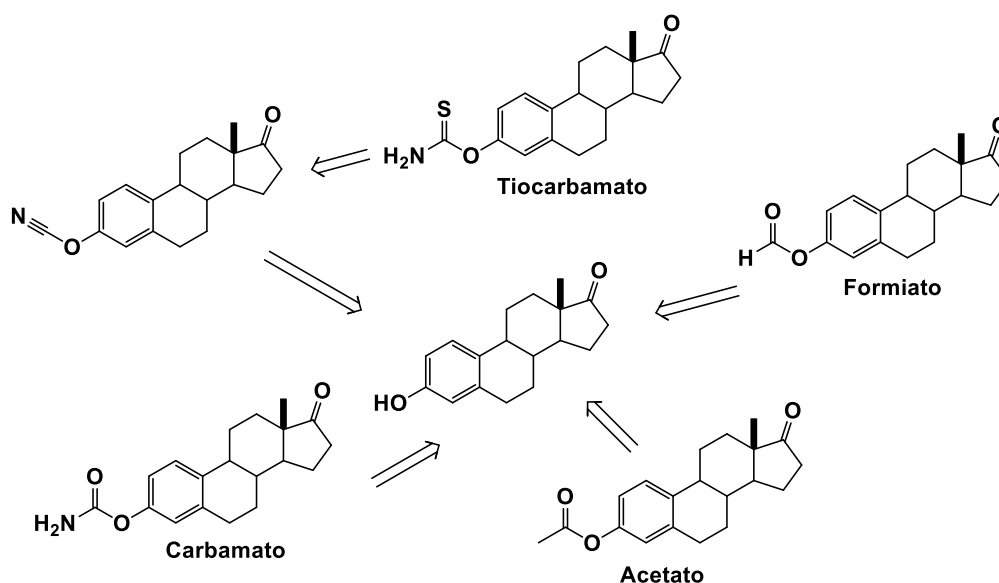


Esquema 1.1.

²⁴ Li P.-K.; Pillai R.; Dibbelt L., *Steroids* **1995**, 60, 299-306.

²⁵ Leese M. P.; Hejaz H. A. M.; Mahon M. F.; Newman S. P.; Purohit A.; Reed M. J.; Potter B. V. L.; *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5243-5256.

Otro tipo de moléculas sintetizadas son las desarrolladas por Erwin P. Schreiner, que sintetizó una serie de conjugados de estrona del tipo estrona-3-O-C(O, S)-X los que fueron evaluados para la inhibición de esteroide sulfatasa humana (STS). Entre ellos está el carbamato, tiocarbamato, formiato y acetato de estrona, se encontró que el derivado formiato inhiben la STS de una manera dependiente del tiempo y de la concentración con un IC_{50} de $0.42 \mu\text{M}$ (**Esquema 1.2**).²⁶



Esquema 1.2.

2.2 Heteroesteroides

Existen muchas moléculas cíclicas en las que otro elemento distinto del carbono forma parte del anillo, tales moléculas se denominan heterociclos que generalmente son ciclos que contienen nitrógeno, oxígeno y azufre entre otros.²⁷ Los científicos han descubierto que introducir algunos heterociclos en los esteroides, cambiar la cadena lateral esteroidal o la sustitución del esqueleto del esteroide, introducir algún heteroátomo o reemplazar uno o más átomos de carbono en una molécula esteroidal puede dar como resultado un cambio en sus actividades biológicas.

Los esteroides que llevan heterociclos fusionados al anillo A o D del esqueleto esteroidal siguen atrayendo mucho interés farmacéutico ya que muchos de estos heteroesteroides poseen diversas actividades biológicas.²⁸ Se han desarrollado métodos para la obtención de nuevos

²⁶ Schreiner E. P.; Billich A.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004** 14, 4999–5002.

²⁷ Weininger S. J.; Stermitz F. R., “Química Orgánica Avanzada”, Reverté, España, 1998, 1017.

²⁸ Ackerman J.H.; Potts G.O.; Beyler A.L.; Clinton R.O., *J. Med. Chem.* **1964**, 7, 238–240.

derivados 2,4-disustituido benzo[b][1,4]tiazepina para ser usados como anticonvulsivos, antimicrobianos o antifúngicos. Uno de ellos es por medio de la reacción de aldehídos esteroidales con 2-aminotiofenoles en DMF, catalizadas con Pd(OAc)₂ dando nuevos benzo[b][1,4]tiazepina fusionadas con esteroides (Figura 1.3).²⁹

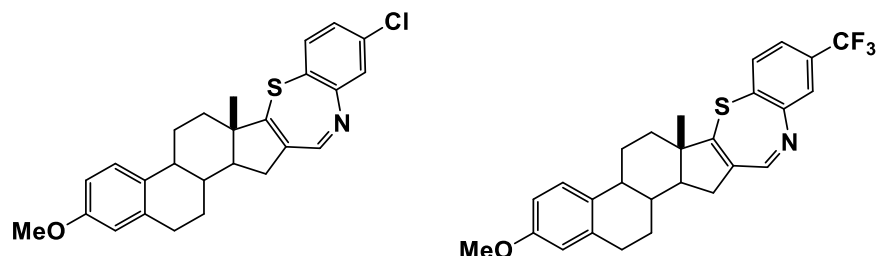


Figura 1.3.

Al igual que casi todos los medicamentos contra el cáncer, su uso clínico ha sido limitado por la toxicidad para los tejidos normales. Un enfoque para mejorar la selectividad es fusionar diferentes heterociclos que contienen nitrógeno unidos al núcleo esteroidal.³⁰ Muchos estudios previos tratan de la interacción entre esteroides y sus receptores para controlar el crecimiento de células cancerosas. Al igual que otros agentes contra el cáncer tenemos aquellos que contienen dos fragmentos en su estructura, una es el esqueleto esteroidal y la otra el heterocíclico. Se sabe que al contener átomo de nitrógeno en diversos derivados esteroidales han incrementado su actividad biológica. Por lo que una variedad de estos derivados con estructuras inusuales e interesantes se han sintetizado y evaluado para su actividad antitumoral.²¹

Se han reportado diferentes síntesis para la preparación de heterociclos esteroidales que contengan átomos de nitrógeno en su estructura como la reportada por Mervat M. Abdelhalim y colaboradores,²¹ donde describen derivados de la epiandrosterona tal como se muestran en la figura 1.4, los cuales ejercen la mayor actividad antiproliferativa en la línea celular de carcinoma de hígado humano HEPG2.

²⁹ Kaishap P. P.; Shekarrao K.; Saikia P.; Gogoi S.; Boruah R. C., *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55 1927–1930.

³⁰ Abdelhalim M. M.; Kamel E. M.; Rabie S. T.; M. Nadia R.; *Steroids* **2011**, 76, 78–84.

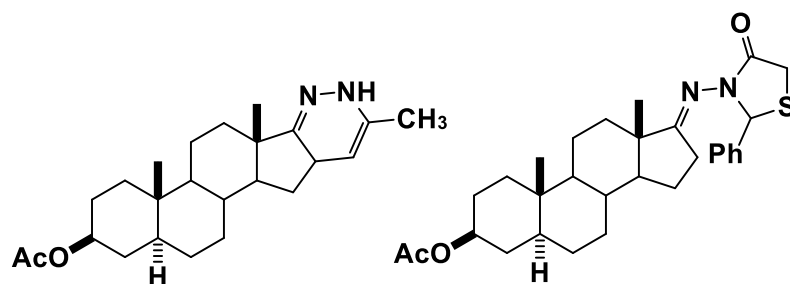


Figura 1.4.

2.3 Tioderivados

La búsqueda de nuevas estrategias sintéticas y flexibles, utilizando un intermediario común de manera conjunta para formar una serie de heterociclos estructuralmente diversos, ha estado a la vanguardia de la investigación en química orgánica durante mucho tiempo. Estos métodos sintéticos pueden conectar bloques de construcción fácilmente accesibles y convertirse en estrategias sintéticas por la obtención de nuevos fármacos.³¹

Los 1,3,4-tiadiazol es un resto versátil que exhibe una gran variedad de actividades biológicas. El primer uso de los tiadiazoles se encontró en el área farmacéutica, como antibacterianos con propiedades similares a las de las sulfonamidas. Más tarde se descubrió que poseían diversas actividades biológicas como anticancerígeno, antiproliferativo, antioxidante, antidepresivo o antitripanosomal.³²

Al igual los derivados de tiazol que son una de las clases más importantes de estructuras heterocíclicas de cinco miembros usados en una variedad de aplicaciones. Sus análogos han atraído un interés continuo a lo largo de los años debido a sus amplias aplicaciones farmacológicas, como anticancerígeno, antiinflamatorio, antihipertensivo, anticonvulsiónante, antimicótico, antibacteriano, anti-VIH, y actividades psicotrópicas. Recientemente, se han identificado análogos de 2-aminotiazol en el tratamiento de la diabetes y la tuberculosis. Además de las propiedades biológicas, las películas de poliaminotiazol conjugado han demostrado recientemente propiedades electroquímicas

³¹ Volkova Y. A.; Chernoburova E. I.; Petrova A. S.; Shtil A. A.; Zavarzin I. V.; *Phosphorus, Sulfur, and Silicon* **2017**, 192, 2, 237-240.

³² Raviprabha K.; Poojary B.; Manjunatha K.; Vasantha K.; N. Fernandes J.; Kumarie S. N.; *Der Pharma Chemica* **2016**, 8, 2, 1-9.

con alta estabilidad térmica. Por consiguiente, se han reportado varios métodos para la preparación de diversas estructuras que contengan azufre.³³

Uno de ellos es el reportado por Salman A. Khan¹³ (figura 1.5), el cual sintetizó nuevo derivado esteroidal de (6R)-espiro-1,3,4-tiadiazolina mediante la ciclación de tiosemicarbazonas esteroideas con anhídrido acético, el cual fue evaluado *in vitro* contra la actividad antibacteriana usando el método de difusión en disco y la concentración inhibidora mínima. Los resultados mostraron que los derivados de tiadiazolina esteroideos exhibieron una mejor actividad antibacteriana que los derivados de tiosemicarbazona esteroideas.

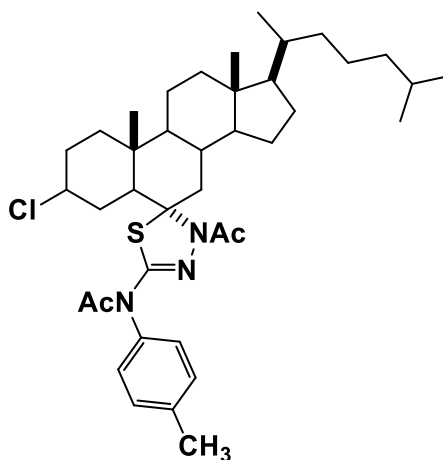


Figura 1.5.

2.4 Oxaderivados

Los compuestos que contienen anillos heterocíclicos son de gran valor tanto medicinal como industrial, así los heterociclos de cinco miembros demostraron su eficacia en la química medicinal. El heterociclo de oxadiazol que contiene un átomo de oxígeno y dos átomos de nitrógeno en el anillo de cinco miembros es un compuesto de gran importancia. El anillo de oxadiazol actúa como un farmacóforo en varios medicamentos usados clínicamente, como Raltegravir o Zibotentan (figura 1.6).³⁴

³³ Venkateswararao E.; Jalani H. B.; Manoj M.; Jung S.-H.; *J. Heterocyclic Chem.* **2016**, 53, 1449.

³⁴ Rubina B.; Dharam P. P.; Garima K.; Ravi K.; Manni D.; *Indian J. Pharm. Educ.* **2019**, 53, 2, S1-S16.

Capítulo 1.3: Objetivos

Objetivo General:

Sintetizar nuevos derivados esteroidales que contengan heterociclos sobre alguna posición o fusionado al núcleo esteroideal que puedan presentar posible actividad biológica.

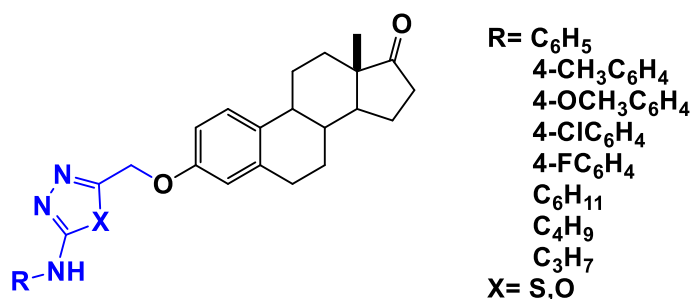
Objetivos Particulares:

- Desarrollar nuevas rutas sintéticas alternativas a las reportadas para obtener nuevos derivados esteroidales con heterociclos utilizando estrona como materia de partida.
- Proponer los mecanismos de reacción que justifiquen la formación de los productos obtenidos.
- Caracterizar inequívocamente los productos obtenidos, empleando para ello los diferentes métodos físicos y espectroscópicos.
- Realizar pruebas de actividad antiproliferativa en distintas líneas celulares cancerosas.

Capítulo 4: Discusión de Resultados

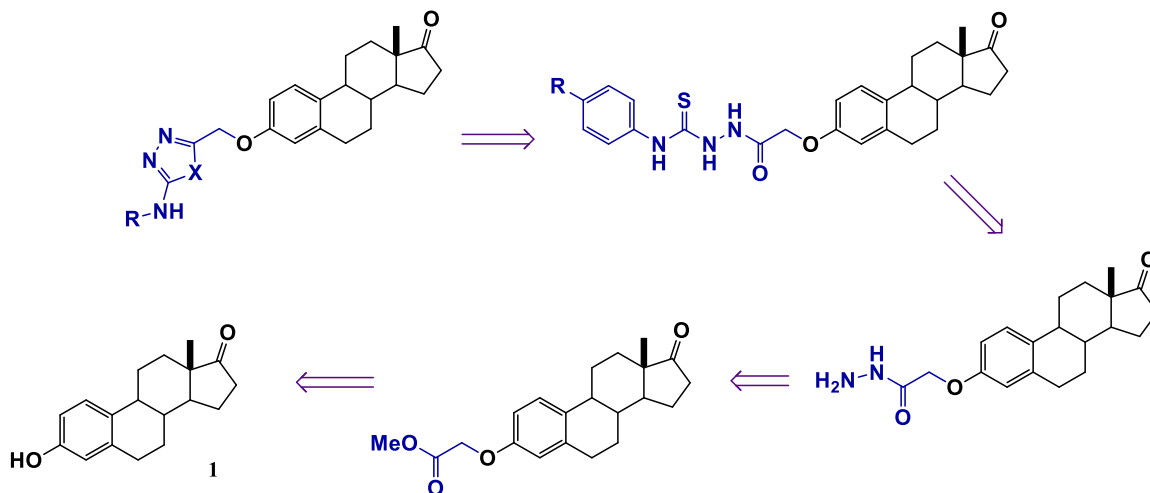
Con base a lo anterior y de comprender la importancia farmacológica que tienen los heterociclos con diferentes heteroátomos en alguna posición del núcleo esteroidal, se dio a la tarea de sintetizar nuevas estructuras con un anillo heterocíclico de tipo 1,3,4-tiadiazol y 1,3,4-oxadiazol como sustituyente en el hidroxilo de la posición 3 de la estrona (1), además de obtener un heterociclo de tipo oxazina fusionado al anillo A de la misma.

4.1. Obtención de los heterociclos de 1,3,4-tiadiazoles y 1,3,4-oxadiazoles esteroidales.



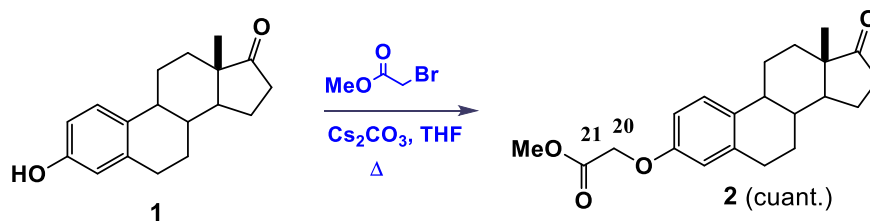
4.1.1 Análisis retrosintético de formación de heterociclos en C-3 del núcleo esteroidal

En el esquema 1.3 se muestra la retrosíntesis que se planteó para obtenerlos a partir de estrona (1).



Esquema 1.3. Retrosíntesis de los derivados de heteroesteroides.

Se inició la síntesis llevando a cabo la obtención de **2** como se muestra en el esquema 1.4, se realizó primero una eterificación en el grupo hidroxilo en C-3 de la estrona (**1**) por una sustitución nucleofílica (reacción de Williamson) con bromoacetato de metilo y carbonato de cesio como base.



Esquema 1.4. Producto obtenido de la eterificación.

La reacción se desarrolló como fue propuesta pero al monitorearla por cromatografía en capa fina para saber si ya había concluido, se observó que el producto tiene el mismo R_f que la estrona (**1**), por lo que el seguimiento de la reacción fue difícil, a pesar de la utilización de diferentes sistemas de elución no se logró observar la diferencia de R_f entre la **1** y el compuesto **2** esperado; excepto por el cambio de color al revelar la placa con vainillina, donde la muestra **1** mostraba un color café y el compuesto **2** con un color azul, así que se decidió continuar la reacción y a las 10 h se dio por finalizada, dando un rendimiento cuantitativo del derivado **2**.

El derivado **2** cristalizó en un sistema Hex/AcOEt confirmando la estructura deseada tal como se muestra en la figura 1.7 y la tabla 1.

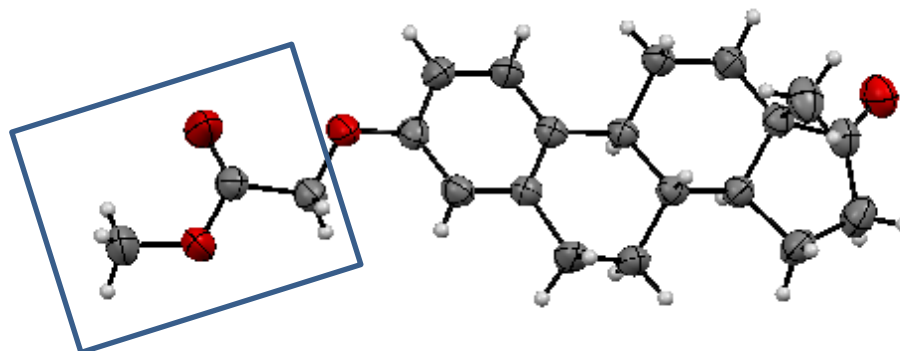


Figura 1.7. Vista ORTEP de la estructura cristalina del derivado **2**.

Tabla 1. Datos de la estructura del cristal 2.

Fórmula empírica	C ₂₁ H ₂₆ O ₄	
Peso de la fórmula	342.42	
Temperatura	295 (2) K	
Longitud de onda	0.56083 Å	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	P21	
Dimensiones de celda unitaria	a = 9.0517(6) Å	α = 90°
	b = 9.4180(4) Å	β = 95.896(5)°
	c = 10.5595(7) Å	γ = 90°
Volumen	895.42 (9) Å ³	
Z	2	
Densidad (calculada)	1.270 Mg / m ³	
Coefficiente de absorción	0.055 mm ⁻¹	
F (000)	368	
Tamaño de cristal	0.600 x 0.300 x 0.300 mm ³	

Se muestran algunos datos de la descripción de la estructura del cristal, de los cuales se puede ver el peso del compuesto que es de 342.42 g/mol que corresponde a una fórmula molecular de C₂₁H₂₆O₄, además de conocer la temperatura de 295 (2) K, entre otras. El compuesto cristalizó en un sistema monoclinico, este cristal tiene un tamaño de 0.600 x 0.300 x 0.300 mm³, con dimensiones de celda unitaria como se muestra en la tabla anterior en la cual también se ve muchos más datos. Otros datos de interés se muestran en la tabla 2, por ejemplo se observa las longitudes de enlace del grupo CH₃OCOCH₂ que se adiciono; del C(19)-O(2) con 1.410(3), el C(19)-C(20) de 1.499(3), la de C(20)-O(3) de 1.179(3), entre otras. Además de los ángulos de enlace, por ejemplo de C(20)-C(19)-H(19A) de 110.2 que es el hidrogeno del grupo CH₂ unido al carbono del carbonilo del grupo éster, otro seria el O(2)-C(19)-H(19) que tendría el mismo ángulo de 110.2, uno más seria el del O(4)-C(21)-H(21A) de 109.5 que corresponde al oxigeno unido al carbonilo y este a su vez a grupo CH₃ todos correspondes a una hibridación sp³, otro más es O(3)-C(20)-C(19) de 125.7(3) que corresponde al grupo carbonilo que esta único al carbono del grupo CH₂ y es cercano a una hibridación sp², por mencionar algunos.

Tabla 2. Longitudes de enlace [Å] y ángulos diedros [°] para **2**.

C(1)-C(2)	1.381(3)	C(1)-C(10)	1.397(3)
C(1)-H(1A)	0.9300	C(2)-C(3)	1.380(3)
C(2)-H(2A)	0.9300	C(3)-C(4)	1.377(4)
C(3)-O(2)	1.380(3)	C(4)-C(5)	1.398(3)
C(4)-H(4A)	0.9300	C(5)-C(10)	1.395(3)
C(5)-C(6)	1.517(3)	C(6)-C(7)	1.511(4)
C(19)-C(20)	1.499(3)	C(19)-O(2)	1.410(3)
C(19)-H(19B)	0.9700	C(19)-H(19A)	0.9700
C(20)-O(4)	1.311(3)	C(20)-O(3)	1.179(3)
C(21)-H(21A)	0.9600	C(21)-O(4)	1.446(3)
C(21)-H(21C)	0.9600	C(21)-H(21B)	0.9600
C(2)-C(1)-C(10)	122.0(2)	C(2)-C(1)-H(1A)	119.0
C(10)-C(1)-H(1A)	119.0	C(3)-C(2)-C(1)	119.6(2)
C(3)-C(2)-H(2A)	120.2	C(1)-C(2)-H(2A)	120.2
C(4)-C(3)-O(2)	125.3(2)	C(4)-C(3)-C(2)	119.7(2)
O(2)-C(3)-C(2)	115.0(2)	C(3)-C(4)-C(5)	120.9(2)
C(3)-C(4)-H(4A)	119.6	C(5)-C(4)-H(4A)	119.6
C(10)-C(5)-C(4)	120.0(2)	C(10)-C(5)-C(6)	121.7(2)
C(4)-C(5)-C(6)	118.3(2)	O(2)-C(19)-C(20)	107.7(2)
O(2)-C(19)-H(19A)	110.2	C(20)-C(19)-H(19A)	110.2
O(2)-C(19)-H(19B)	110.2	C(20)-C(19)-H(19B)	110.2
H(19A)-C(19)-H(19B)	108.5	O(3)-C(20)-O(4)	124.4(3)
O(3)-C(20)-C(19)	125.7(3)	O(4)-C(20)-C(19)	109.9(2)
O(4)-C(21)-H(21A)	109.5	O(4)-C(21)-H(21B)	109.5
H(21A)-C(21)-H(21B)	109.5	O(4)-C(21)-H(21C)	109.5
H(21A)-C(21)-H(21C)	109.5	H(21B)-C(21)-H(21C)	109.5
C(3)-O(2)-C(19)	117.31(19)	C(20)-O(4)-C(21)	118.5(2)

El producto **2** fue caracterizado por RMN (^1H y ^{13}C), en el espectro de RMN de ^1H (figura 1.8), las señales más características que se observan es en 4.62 ppm del CH_2 unido al oxígeno de la estrona y la señal en 3.82 ppm el OCH_3 del éster; las demás señales no sufren cambios significativos.

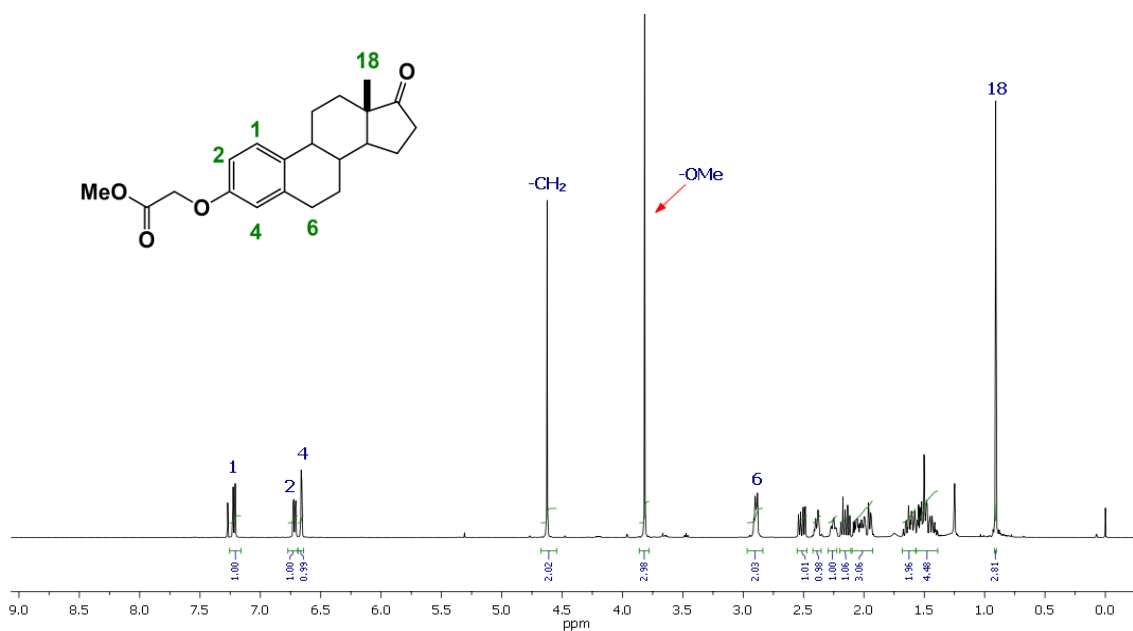


Figura 1.8. Espectro de RMN de ^1H del derivado **2**.

En el espectro de ^{13}C se observa una señal en 169.6 ppm correspondiente al carbonilo del éster, además de la señal de CH_2 unido a él en 65.1 ppm y en 52.3 ppm del OMe del éster, confirmando que se ha obtenido el compuesto **2**; las demás señales del esteroide no sufrieron cambio significativo (figura 1.9).

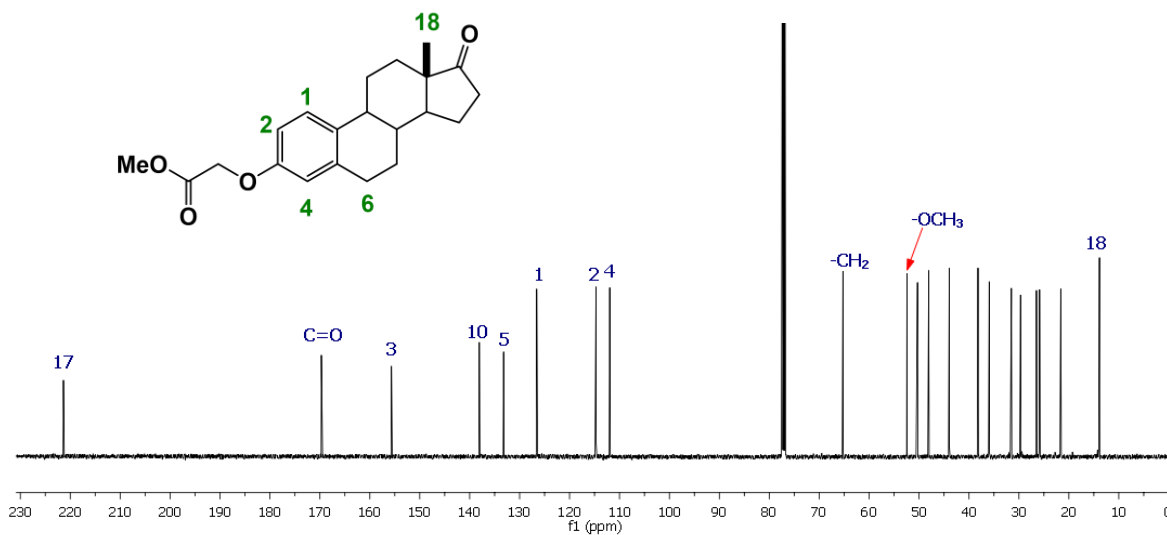
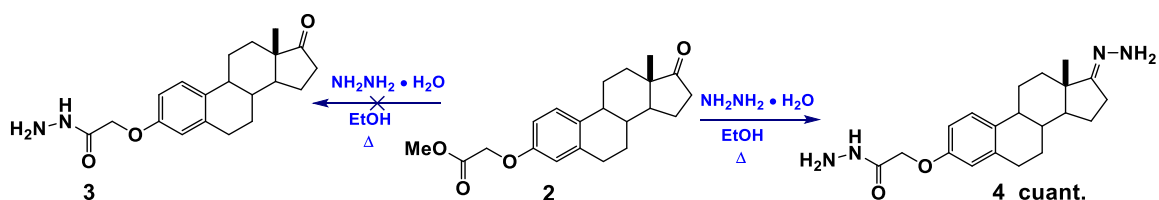


Figura 1.9. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **2**.

Después se sustituyó el grupo metoxi del éster con hidracina en EtOH a reflujo para generar el compuesto **3** el cual no se aisló, en su lugar se obtuvo el derivado **4**; llevando a cabo una reacción de adición-eliminación en el grupo carbonilo formando una hidrazona, tal como se muestra en el esquema 1.5 con rendimientos cuantitativos. Observando este resultado se cambió el EtOH por disolventes polares apróticos como CH₂Cl₂ y THF para obtener el derivado **3** pero no hubo reacción.



Esquema 1.5. Formación de la hidrazona.

En el espectro de ¹H de RMN se observa la desaparición de la señal de los protones del OMe que se aparecían en 3.82 ppm por lo que indica que se ha llevado a cabo la sustitución por la hidracina, ahora se observa las señales de los NH y NH₂ en 7.83, 4.84 y 3.94 ppm de la hidracida. La señal de CH₂ que está unido al carbonilo sufrió un pequeño cambio de estar en 4.63 ppm se deslaza a frecuencias más bajas a 4.47 ppm, el resto de señales no sufren cambios significativos (Figura 1.10).

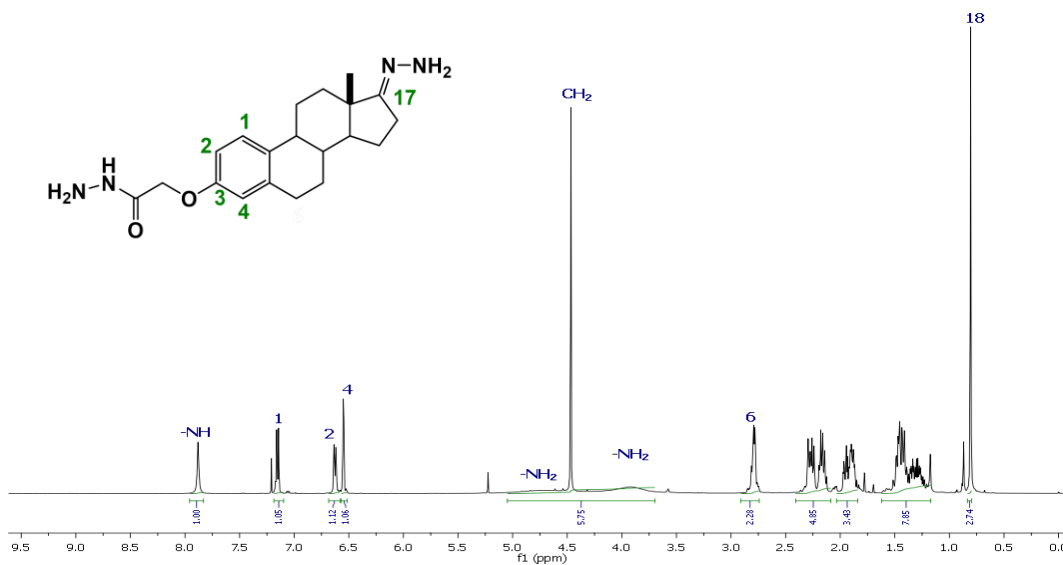


Figura 1.10. Espectro de RMN de ¹H del compuesto **4**.

En el espectro de ^{13}C de RMN la señal de C-17 se desplazó a frecuencias bajas de 221.4 ppm a 165.9 ppm confirmando que se formó la hidrazona en el C-17 y no se mantuvo el carbonilo como se esperaba de esta reacción. El CH_2 que esa unido al oxígeno en C-3 se encuentra en 68.9 ppm y desapareció la señal del carbono del OMe reafirmando la sustitución de dicho grupo por la hidracina, el resto de señales no mostro cambios significativos (Figura 1.11).

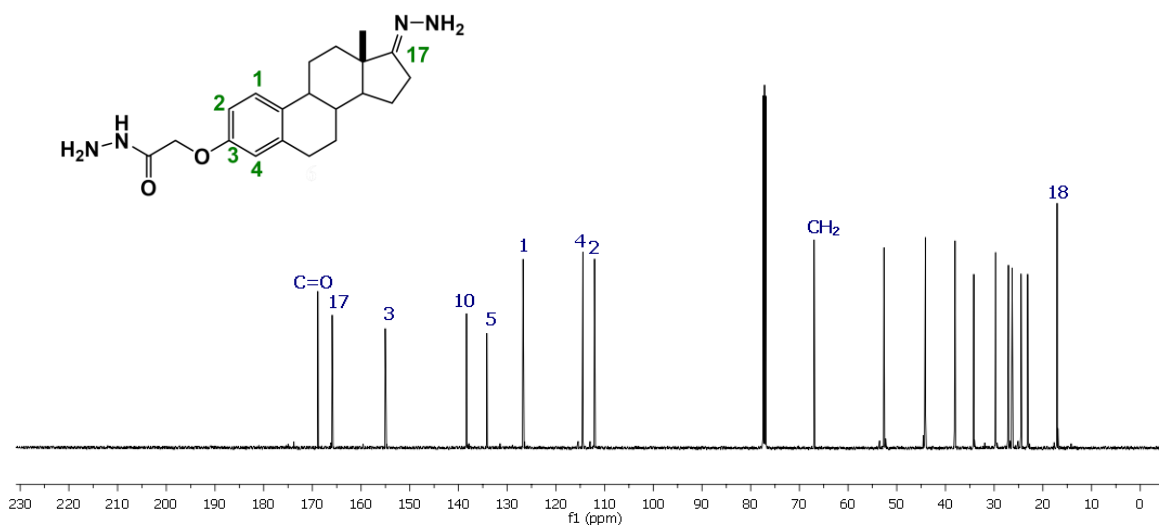
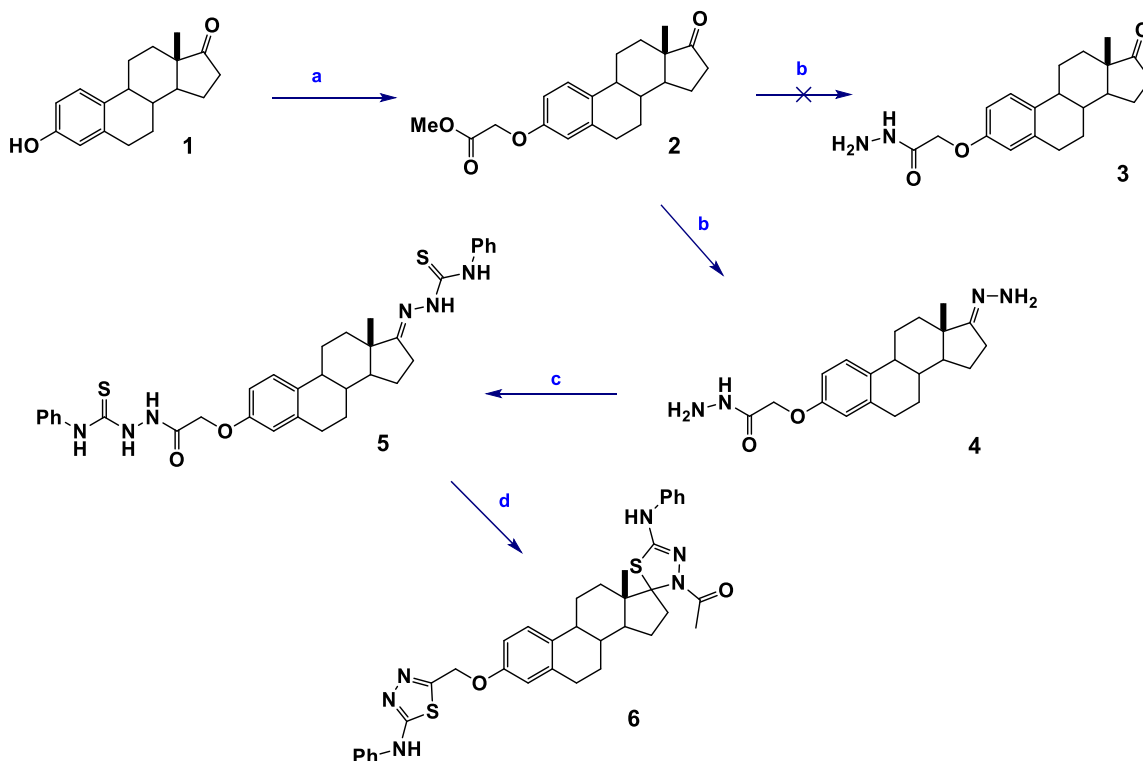


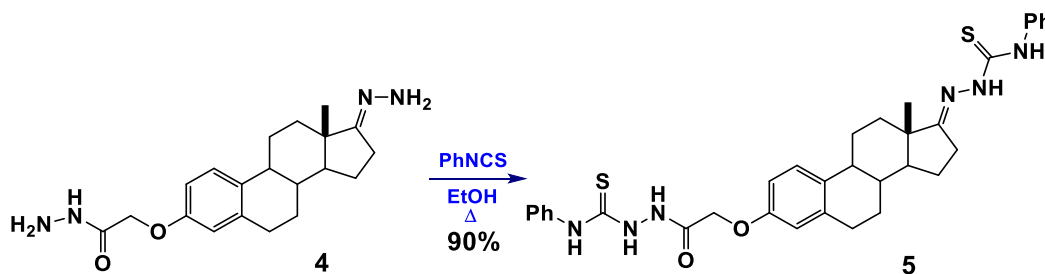
Figura 1.11. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **4**.

Tomado en cuenta los resultados obtenidos con una estructura interesante se planteó una ruta sintética para la obtención del compuesto **6** a partir del derivado **4** como se muestra en el esquema 1.6.



Esquema 1.6. Reactivos y condiciones: a) bromoacetato de metilo, Cs_2CO_3 , THF, Δ ; b) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, Δ ; c) PhNCS, EtOH, Δ ; d) Ac_2O , Py, CHCl_3 , Δ .

En el esquema 1.7 se muestra la reacción del compuesto **4**, el cual se adiciono al isotiocianato de fenilo en EtOH a reflujo y obtener el derivado **5** con un rendimiento de 90% en un tiempo de 5 h.



Esquema 1.7. Formación del compuesto **5**.

Dentro del espectro de RMN de ^1H de **5** tal como se muestra en la figura 1.12, se observa las señales de los protones aromáticos de 7.68 ppm a 7.25 ppm confirmando el acoplamiento de

compuesto **4** al isotiocianato de fenilo, además de las señales de los NH en 9.30 ppm y 8.71 ppm, el resto de señales no sufrieron cambios significativos.

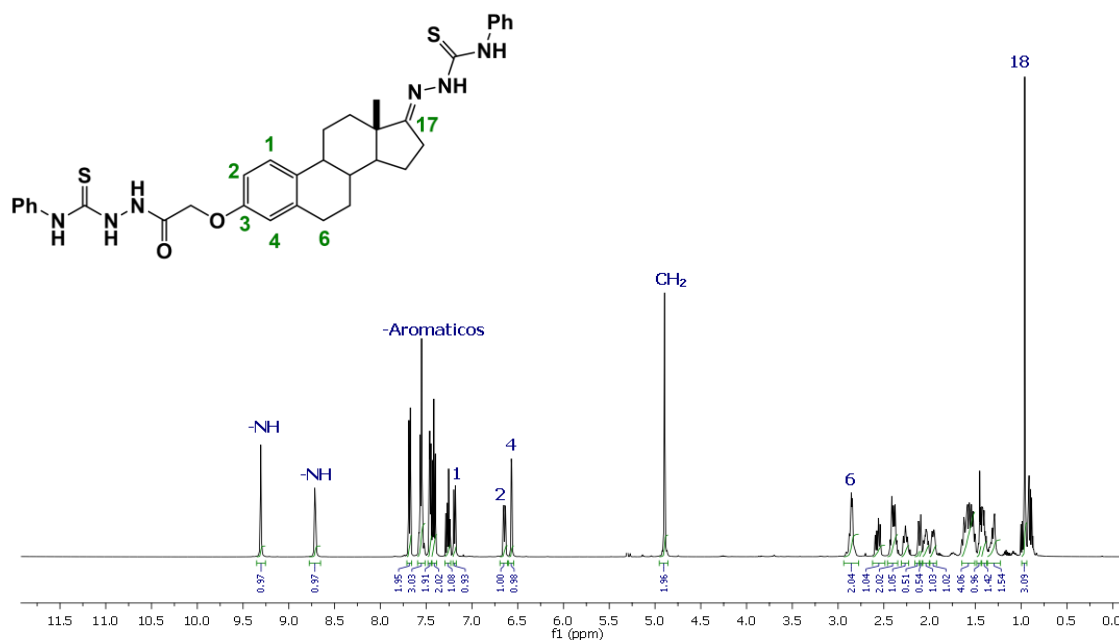


Figura 1.12. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **5**.

En el espectro RMN de ^{13}C de la figura 1.13 se muestra las señales de los C=S en 176.0 ppm y 169.2 ppm que confirman el acoplamiento de los NH₂ con el isotiocianato de fenilo, entre otras señales se observan lo carbonos de los aromáticos en 138.6 ppm a 124.2 ppm y el desplazamiento a frecuencia bajas del C=O de 168.9 ppm a 148.5 ppm, las demás señales no muestran cambios significativos.

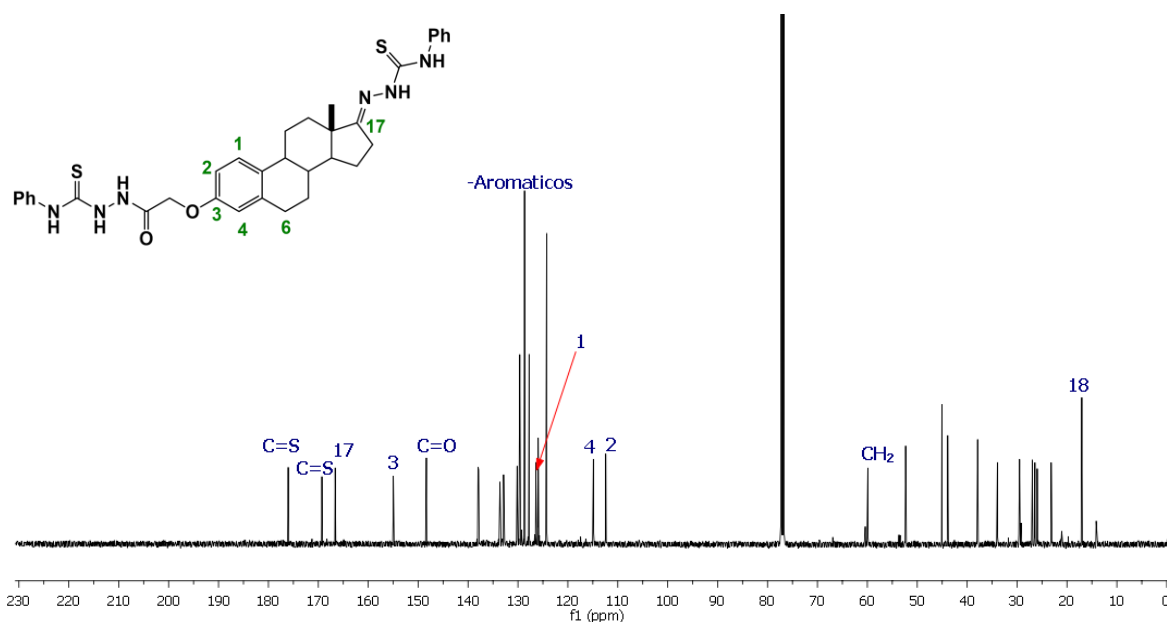
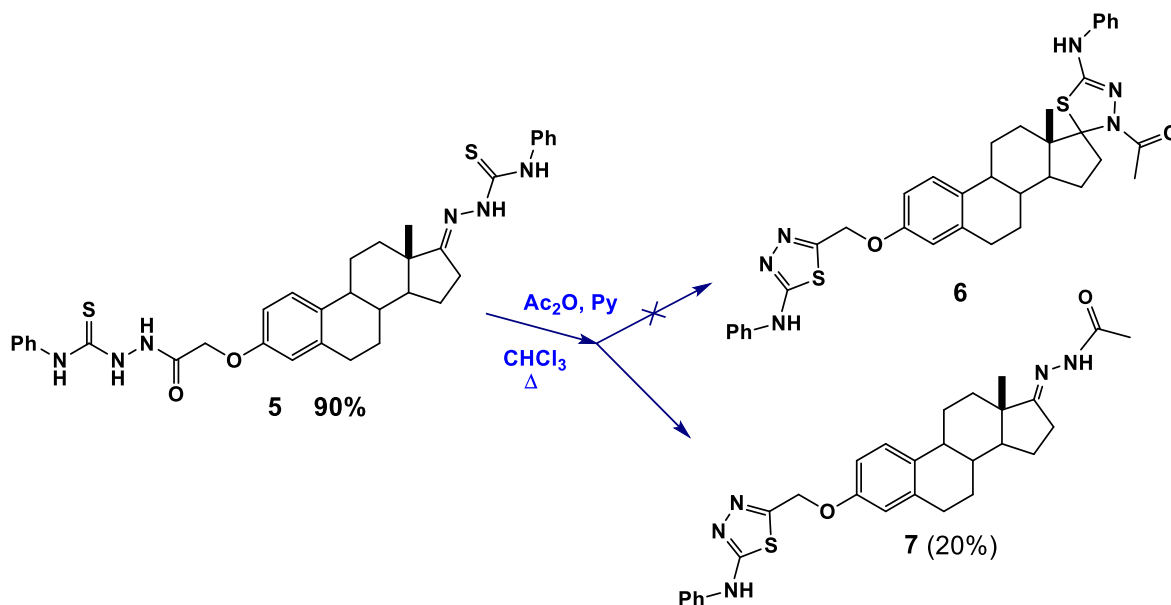


Figura 1.13. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **5**.

Posteriormente se llevó a cabo la ciclación del derivado **5** tal como se muestra en el esquema 1.8, se probaron diferentes condiciones de reacción: primero se trató con NaOH en EtOH a un pH=10 a reflujo para la obtención de **6** pero no hubo reacción, en seguida se cambió el disolvente por acetona, THF, CHCl_3 y CH_3CN manteniendo la base, pero tampoco hubo reacción, tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Optimización de las condiciones para obtener del compuesto **6**.

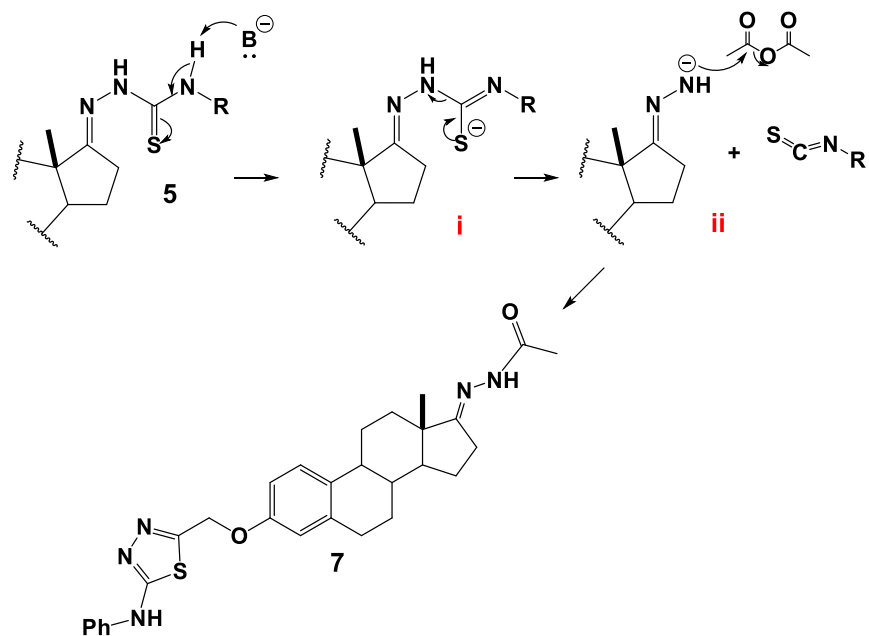
Condiciones	Disolventes	Rendimiento
NaOH (1 eq.)	EtOH	No hubo reacción
	Acetona	
	THF	
	CH_3CN	
	CHCl_3	
Py / Ac_2O (1 eq./ 9 eq.)	CHCl_3	20 % de 7



Esquema 1.8. Formación del compuesto 7.

A continuación se probó las condiciones reportadas por Salman A. Khan¹³ con una variación, con Ac_2O y piridina a reflujo en CHCl_3 ; dentro de estas condiciones se realizaron diferentes variaciones en los equivalentes de Ac_2O comenzando con 3 hasta llegar a 9 equivalentes para consumir en su totalidad **5**, el tiempo de reacción fue de 4 h y la purificación del crudo de reacción por cromatografía en columna, mostró la obtención del derivado **7** donde ocurrió la eliminación selectiva del fragmento PhNCS y acetilación de la amina, y no la formación del compuesto **6** como se esperaba, dentro de esta purificación se notó que el compuesto no es muy estable por lo que fue aislado **7** en un rendimiento bajo del 20%.

El mecanismo que se propone para la obtención del derivado **7** se muestra en el esquema 1.9, el cual comienza con la desprotonación de NH por la base y deslocalización del par de electrones hacia el átomo de azufre el cual vuelve a retornar hacia el átomo de nitrógeno (i), eliminación del fragmento RNCS y libera la parte esteroidea formando ion amiduro (ii) que ataca al anhídrido acético dando así el compuesto **7**.



Esquema 1.9. Mecanismo de reacción propuesto del compuesto 7.

La figura 1.14 muestra el espectro de RMN de ^1H donde se observa las señales de protones aromáticos 7.52 ppm a 7.41 ppm que solo integran para un solo anillo aromáticos lo que confirma que se ha eliminado el fragmento de PhNCS, otra señal que también ratifica la eliminación de dicho fragmento es la que se mostraba en 2.25 ppm de un CH_3 de acetilo. El resto de señales no tienen cambios significativos.

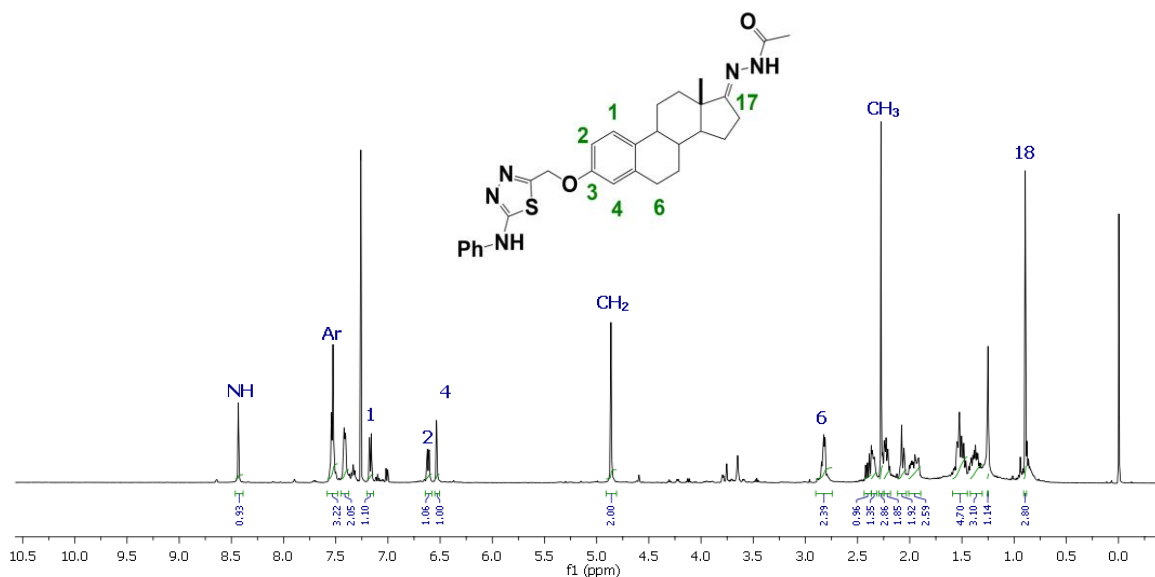


Figura 1.14. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 7.

El RMN de ^{13}C se comprobó que el compuesto obtenido fue 7 con desplazamientos de C-17 en 165.9 ppm, en 173.7 ppm para carbonilo y 148.5 ppm para N=C-S del heterociclo, además de a señal CH_3 del acetilo en 20.3 ppm y el resto de señales no muestra cambios significativos. (Figura 1.15).

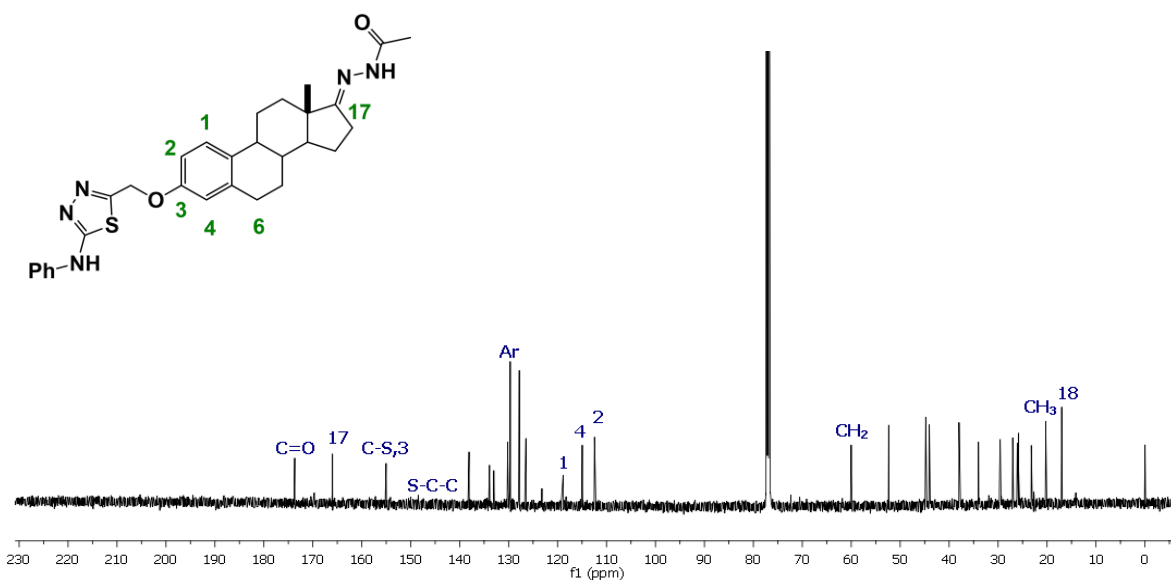
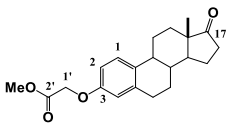
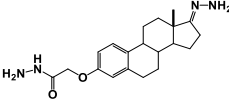
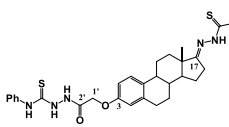
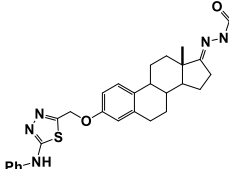


Figura 1.15. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 7.

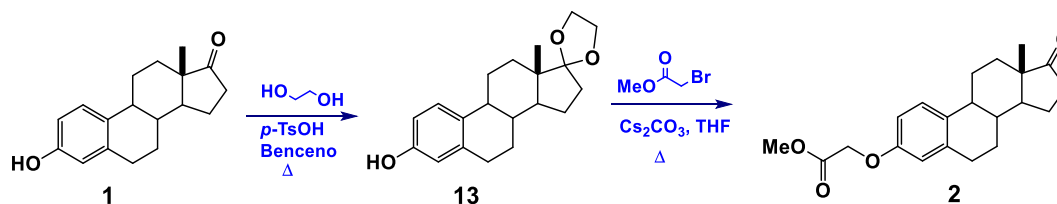
En la tabla 4 se muestra la comparación de las señales de RMN tanto de ^1H y ^{13}C , más representativas de la ruta sintética realizada anteriormente descrita para la obtención del derivado **6**, el cual no se logró obtener si no que se aisló el derivado **7**, dentro de las cuales se observan, por ejemplo el grupo CH_2 fue desplazándose de 4.63 ppm a 4.90 en RMN de ^1H conforme se cambiaba el grupo que estaba unido en las diferentes reacciones, al igual en el ^{13}C se ve reflejado ese desplazándose de 65.2 a 60.0 ppm, además del grupo carbonilo unido al éster que se observa en RMN de ^{13}C en 169.7 ppm hasta frecuencias bajas en 148.5 ppm, otra señal interesante es la de C-17 que se encuentra en ^{13}C en 221.4 ppm y se desplaza a frecuencias bajas a 165.9 ppm.

Tabla 4. Comparación de las señales de RMN de la ruta sintética para del derivado **7**.

Compuestos	 2		 4		 5		 7	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	7.22	126.6	7.15	126.7	7.19	126.5	7.17	126.5
2	6.72	111.9	6.62	112.0	6.65	112.4	6.61	112.5
3	---	155.7	---	155.0	---	155.0	---	155.0
4	6.66	114.7	6.55	114.5	6.56	115.0	6.54	115.0
17	---	221.4	---	165.9	---	166.5	---	165.9
COCH_2O	4.63	65.2	4.47	66.9	4.90	60.0	4.86	60.0
$\text{C}=\text{O}$	---	169.7	---	168.9	---	148.5		
OCH_3	3.82	52.4						
NH_2NHCO			3.94	---				
NHCO			7.83	---				
$\text{NH}_2\text{NC-17}$			4.84	---				
NCSN					---	169.2		
CSNHNC-17					---	176.0		
PhNHCSN							---	155.0

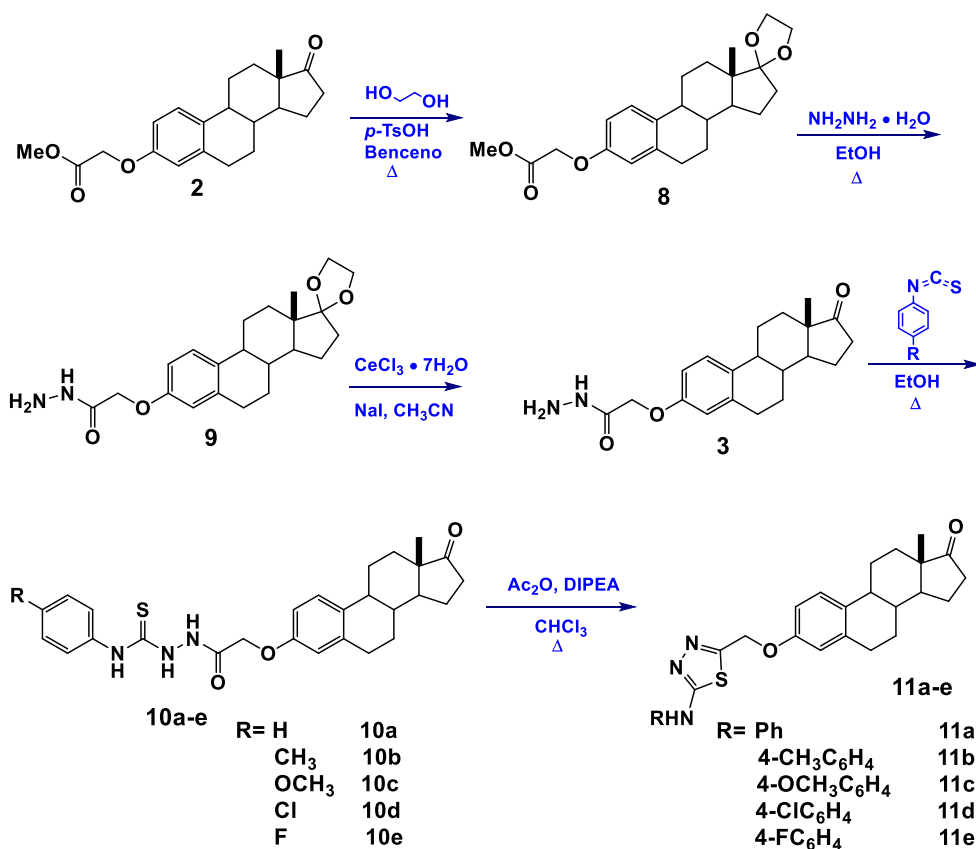
<u>S</u> CCH ₂ O							---	148.5
<u>C</u> H ₃ CO							2.25	20.3
CH _{3<u>C</u>O}							---	173.7

Al observar los resultados anteriores se decidió replantear la ruta sintética mostrada anteriormente con la protección del grupo carbonilo de C-17. Primero se protegió el grupo carbonilo de la estrona (**1**) formando el cetal **13** como se muestra en el esquema 1.10, el cual se sometió a la eterificación previamente ya probada; pero se produjo la desprotección de carbonilo obteniendo nuevamente el derivado **2**.



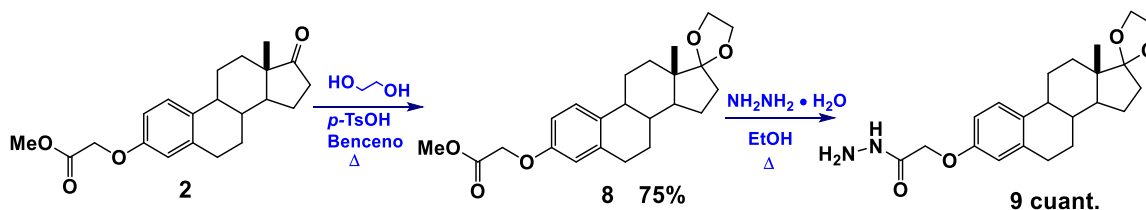
Esquema 1.10. Protección de la estrona **1**.

Con este resultado, se decidió proteger el grupo carbonilo de **2** y continuar con la ruta sintética propuesta para obtener los derivados **11a-e** en 5 pasos tal como se muestra en el esquema 1.11,



Esquema 1.11. Ruta sintética de los derivados 11a-e.

Se realizó la protección con etilenglicol, catalizado con *p*-TsOH en benceno a reflujo y obtener el cetal **8**, posteriormente se realizó la sustitución del grupo metoxido del éster por tratamiento con hidracina en etanol y generar la hidrazida **9** (Esquema 1.12).



Esquema 1.12. Obtención del derivado **9**.

Dentro de los espectros de RMN de ¹H de los compuestos **8** y **9**, se observa cambios en la señal del CH₃ que estaba en 3.83 ppm en **8** que ahora no se observa en **9** confirmando que se llevó la sustitución del OMe por la hidracina. Además de las señales de los CH₂ del cetal que se

adicionaron en el compuesto **8** en 3.88-3.82 ppm y que permanecen en **9** en 3.97-3.92 ppm, y la señal de NH₂ en 3.59 ppm afirmando que se llevó a la sustitución, el resto de señales no sufrieron cambio alguno que sea significativo (Figura 1.16).

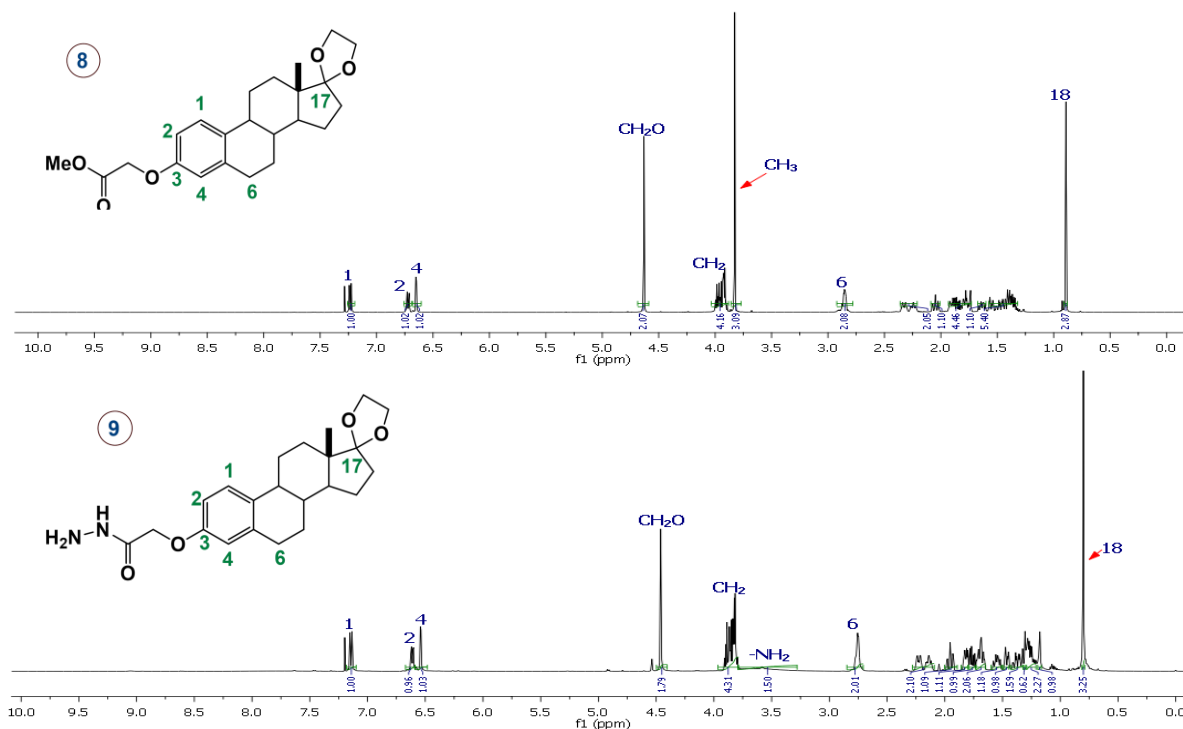


Figura 1.16. Espectro de RMN de ¹H de los compuestos **8** y **9**.

En el espectro de ¹³C del compuesto **8** se puede ver la señal de CH₃ del OMe del éster en 52.4 ppm que en el compuesto **9** ya no se presenta, las señales nuevas del CH₂ del cetal en 65.3 ppm y 64.6 ppm en ambos compuestos confirmando que se protegió en el compuesto **8** y que permanece en el compuesto **9**. Otra señal que confirma que se llevó a cabo la protección del grupo carbonilo de C-17 en **8** y que permanece en **9**, es la señal en 119.4 ppm del C-17 que en el derivado **2** se observaba en 221.4 ppm y que ahora se desplazó a frecuencias bajas, el resto de señales no tuvieron cambio significativo (Figura 1.17).

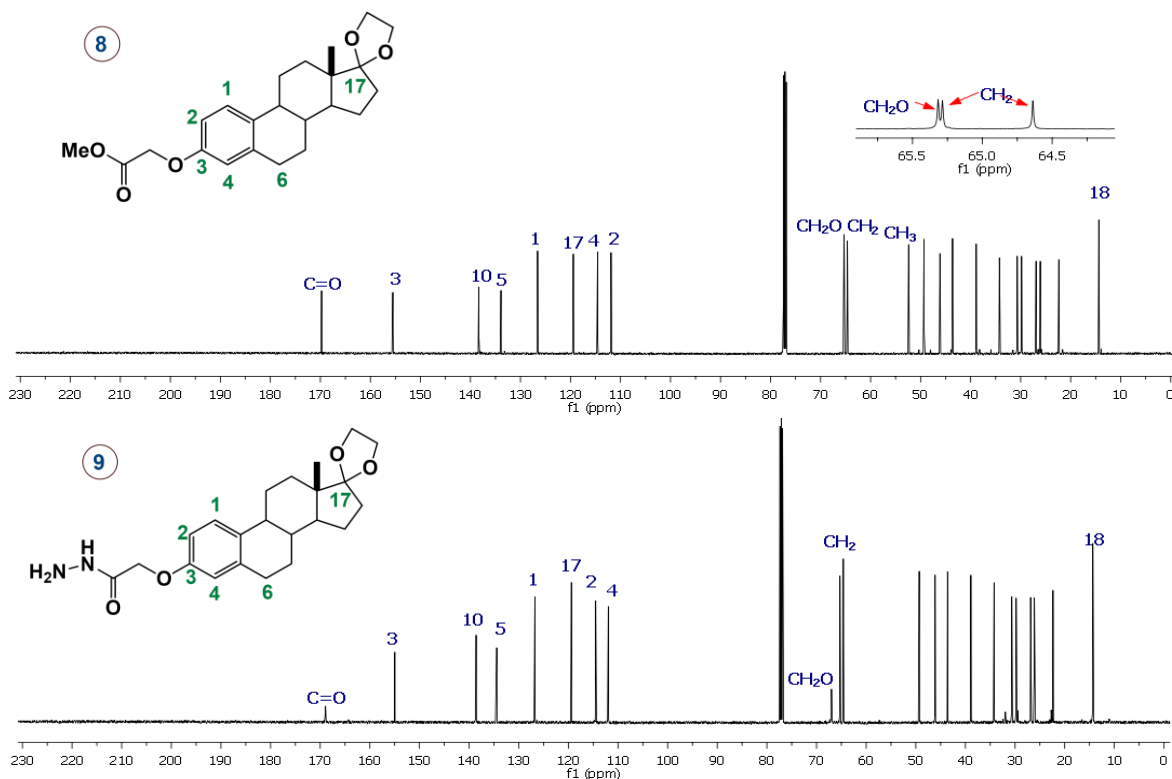
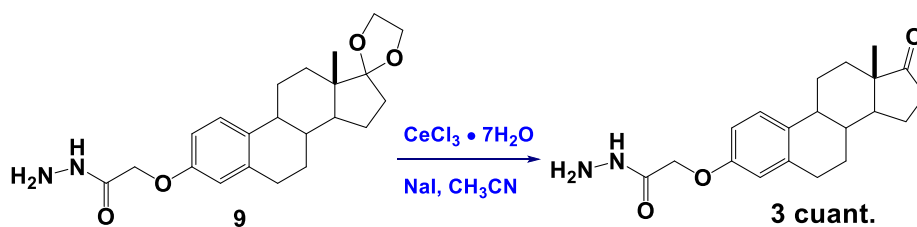


Figura 1.17. Espectro de RMN de ^{13}C de los compuestos **8** y **9**.

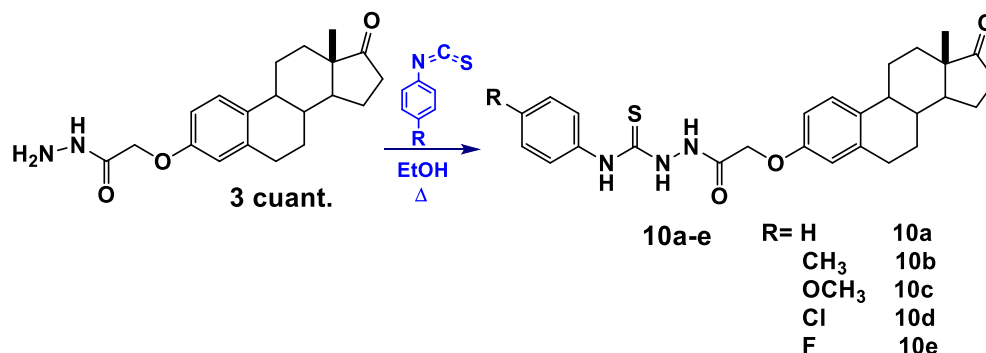
Una vez obtenido el compuesto **9** se sometió a una desprotección con HCl - 2N dando como resultado la descomposición de dicho derivado. Nuevamente se modificaron las condiciones de reacción por una más suave de desprotección, ahora utilizando $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaI en acetonitrilo reportadas por Enrico Marcantoni³⁵ dando el compuesto **3** en rendimientos cuantitativos y se utilizó sin previa purificación en la siguiente reacción (Esquema 1.13).



Esquema 1.13. Obtención del derivado **3**.

³⁵ Marcantoni E., Nobili F., *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 4183-4184.

Una vez aislado **3** se adiciono a diferentes isotocianatos y generar las tiosemicarbazidas (**10a-e**) como se muestra en el esquema 1.14, pero estas son inestables; ya que al purificarlos lentamente se degradaban en la columna o cuando se llevaban a RMN para caracterizarlos siempre presentaban impurezas, por lo que se decidió purificar rápidamente solo para eliminar el exceso e isotocianato e inmediatamente pasar a la siguiente reacción.



Esquema 1.14. Obtención de los derivados **10a-e**.

Para llevar a cabo la ciclación y formación del heterociclo **11a** en condiciones de Ac₂O, Py y CHCl₃ utilizadas anteriormente, ahora para del derivado **10a** que fue el primer compuesto probado en estas condiciones. Solo se obtuvo en un 60% de rendimiento en la formación del heterociclo recuperándose materia prima, por lo que se decidió incrementar los equivalentes de Ac₂O pero no se observa una mejora en el rendimiento. Teniendo estos resultados se decidió cambiar la base por DIPEA mejorando notablemente el rendimiento a 70%, y al incrementar el Ac₂O se observó un rendimiento de 94%, tal como se muestra en la tabla 5.

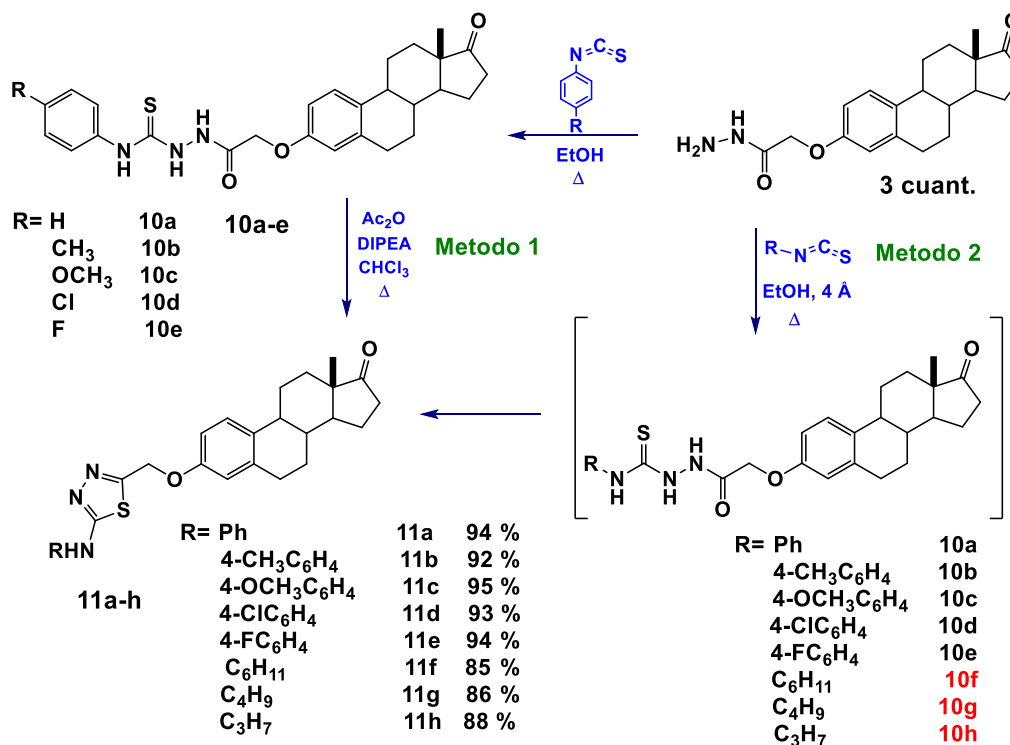
Tabla 5. Optimización de las condiciones para la obtención del compuesto **11a**.

Condiciones	Equivalentes	Rendimiento
Py / Ac ₂ O	3 / 3	60 %
DIPEA / Ac ₂ O	3 / 3	80 %
DIPEA / Ac ₂ O	4 / 7	92-95 %

Posteriormente como se muestra en el esquema 1.15 se probaron las mismas condiciones de **10a** para los derivados **10b-e** y obtener los derivados **11b-e** con rendimientos buenos de 92-94 %.

Para poder evaluar la relación estructura-actividad en los estudios de actividad antiproliferativa de cómo podría afectar el cambiar los sustituyentes de anillos aromáticos a sustituyentes alifáticos dentro del anillo de las tiadiazoles se dio a la tarea de realizar la síntesis de estos derivados.

Se comenzó con la obtención los intermediarios **10f-h** que posteriormente se utilizarían las condiciones ya establecidas para los heterociclos **11a-e**. Inesperadamente no se pudieron aislar, debido a que ocurría una ciclación intramolecular de una parte de estos intermediarios **10f-h** durante el acoplamiento con el isotiocianato y el resto era materia prima que no reaccionaba. Al observar que no se lograban aislar, se propone que pueden suceder dos cosas: a) una de ellas es que, al ser intermediarios alifáticos no se podían estabilizar por resonancia al contrario de los derivados **10a-e**, por lo que la ciclación ocurre inmediatamente pasando por los intermediarios **10f-10h**; b) la segunda es que, para terminar de consumir la materia prima se tendrían que romper los puentes de hidrogeno que se formaban con los NH del derivado **3** con el agua del disolvente y terminar de consumirse la materia prima, así, que se decidió añadir malla molecular durante las reacciones con los isotiocianato alifáticos. Esto llevó al acoplamiento y ciclación de **3** y obtener los derivados **11f-h** con rendimientos de 85-88 %.



Esquema 1.15. Obtención de los derivados **11a-h**.

Tomando en cuenta los resultados anteriores se consideró probar el método 2 para la obtención de los derivados **11a-e** a partir del derivado **3** sin asilar los intermediarios **10a-e**, si no pasar directamente de **3** a los derivados **11a-h**; dentro de las cuales se lograron obtener los heterociclos con rendimientos similares a los anteriormente obtenidos y corroborando que los intermediarios **10a-e** son los que probablemente se forman antes de la ciclación y la formación de tiadiazolinas, esto se puede atribuir a la formación de puentes de hidrógeno que pueden ocurrir cuando se usa etanol, al adicionar malla molecular se elimina un gran porcentaje el agua del medio de reacción, lo que evita la formación de puentes de hidrógeno que estabilizan estos derivados, es decir, el disolvente que se usa no es anhidro por lo que contiene un porcentaje de agua con la cual puede formar puentes de hidrogeno con los grupos de carbonilo, tiocarbonilo o las aminas de la molécula, también el mismo etanol puede formarlos e incluso una mezcla de las dos moléculas como se muestra en la figura 1.18.

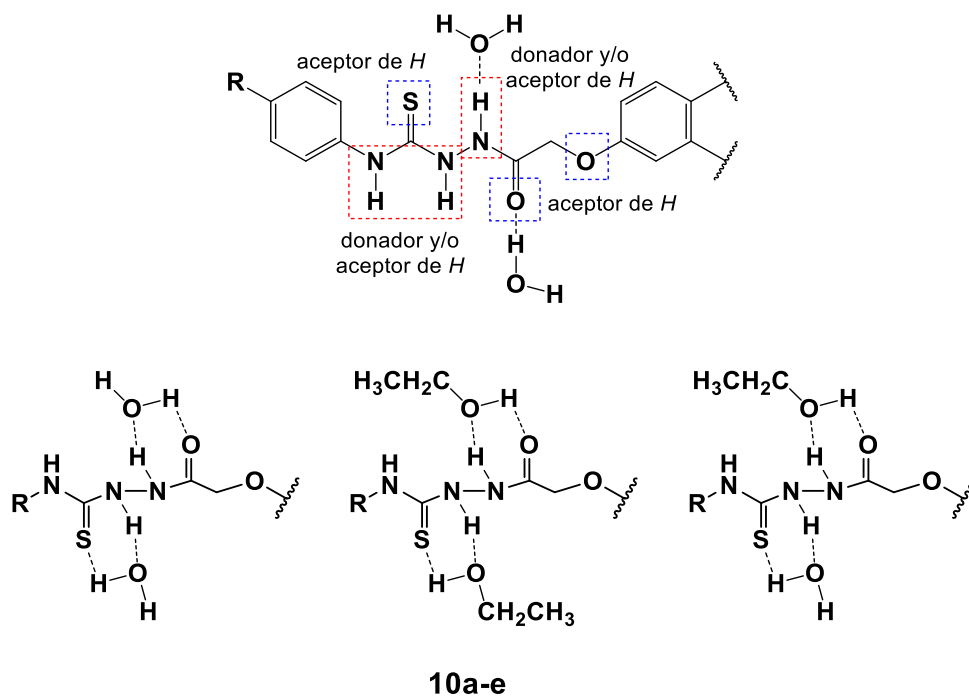
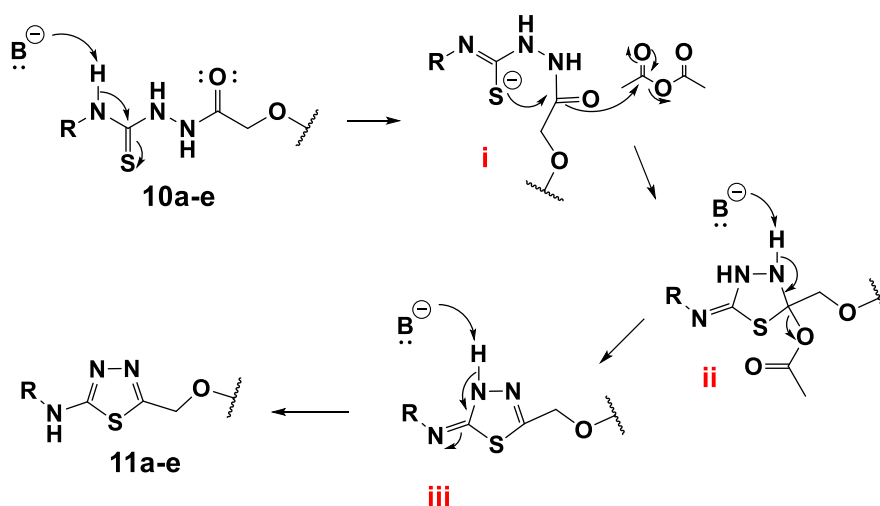


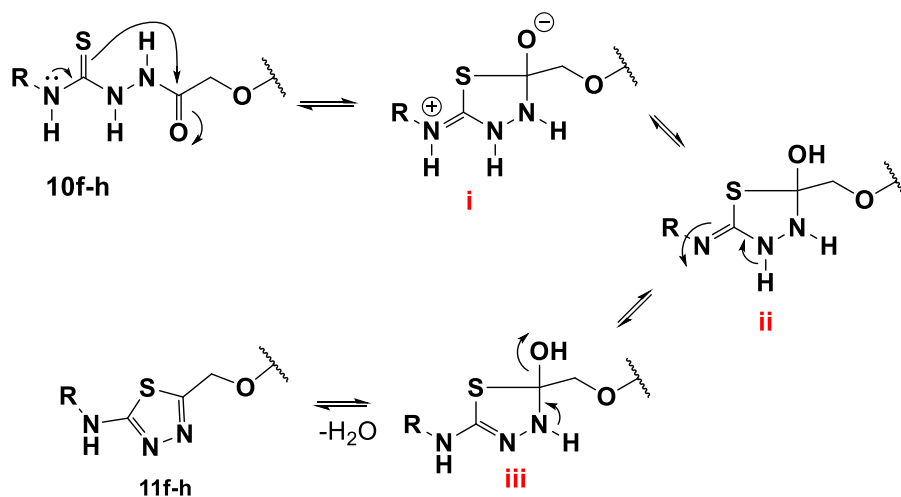
Figura 1.18. Representación de la formación de puentes de hidrógeno.

En el esquema 1.16 se propone un mecanismo para la formación de los derivados de **11a-e** por medio del método 1, comenzando con la desprotonación de NH, donde la base extrae el protón del NH deslocalizando el par de electrones hacia el átomo de azufre, el cual ataca al carbonilo desplazando el par de electrones y acetilándose a la vez, y así llevando cabo la ciclación (i). La base nuevamente extrae el hidrogeno del NH expulsando el acetato (ii), posteriormente la base extrae el átomo de hidrogeno del NH favoreciendo la aromatizando la molécula (iii) recuperando el par de electrones del nitrógeno dando los derivados **11a-e**.



Esquema 1.16. Mecanismo de reacción de los derivados **11a-e** por medio del método 1.

Como se muestra en el esquema 1.17 se propone el mecanismo de reacción para las condiciones del método 2, en donde no fueron aislados los derivados **10f-h** pero como se corrobora para los derivados **11a-e** son los intermediarios que se forman antes de la reacción de ciclación. El cual comienza con la deslocalización de par de electrones del nitrógeno hacia el azufre desplazando el par que ataca al carbonilo formando el intermediario i, el cual se desprotona y protona para estabilizar las cargas (ii), en el intermediario ii comienza la amortización de la molécula; por parte el par de electrones de NH que desplaza los electrones al nitrógeno y a su vez protonándose. En seguida el par de electrones del nitrógeno entra y desplaza al grupo hidroxilo (iii) para terminar de aromatizar la molécula y formando así los derivado **11e-h**.



Esquema 1.17. Mecanismo de reacción de los derivados **11f-h** por medio del método 2.

En la figura 1.19 se muestra el espectro de RMN de 1H del derivado **11a**, donde se puede observar las señales de los hidrógenos del anillo aromático en 7.45 ppm a 7.33 ppm, además de la señal de CH_2 que está unido al grupo hidroxilo de la estrona en 4.80 ppm, el resto de señales no tienen cambio significativo.

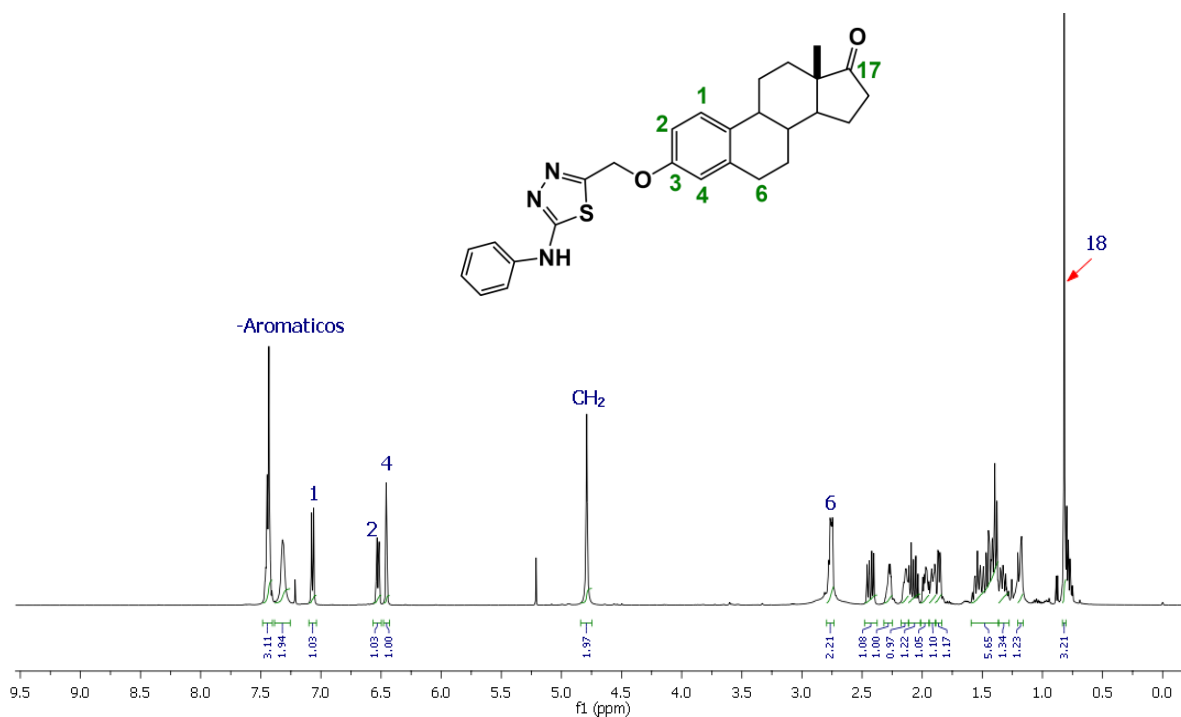


Figura 1.19. Espectro de RMN de 1H del compuesto **11a**.

En el espectro de ^{13}C se observa el desplazamiento de la señal de C=O del éster que se encontraba en 168.8 ppm hacia 148.7 ppm ahora como parte del heterociclo N=C-S, otra señal que se muestran es la de 155.1 ppm del carbono que está unido al NHPH. La señal de $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ que estaba en 66.9 ppm ahora en 60.0 ppm, el resto de señales no mostraron cambios significativos (figura 1.20).

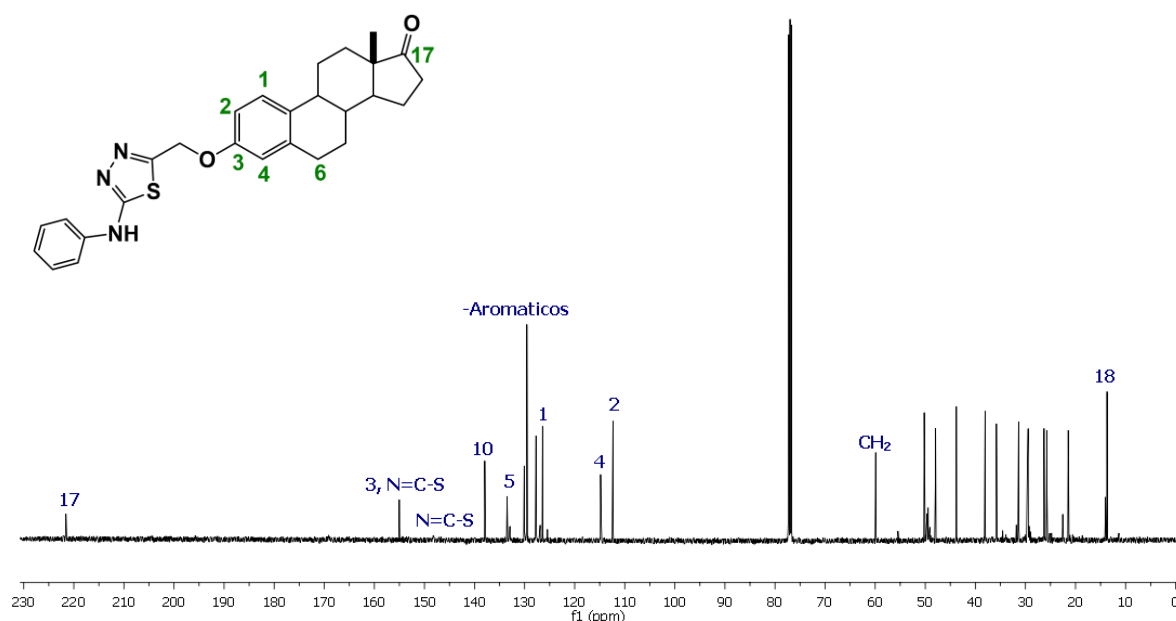


Figura 1.20. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **11a**.

En la figura 1.21 se muestra una expansión del experimento de HMBC del derivado **11a**, en la cual se observa el acoplamiento de la señal de los hidrógenos del grupo CH_2 que está unido al oxígeno del C-3 de la estrona a dos enlaces del carbono cuaternario del heterociclo N=C-S, además de acoplarse con el C-3 a tres enlaces de distancia.

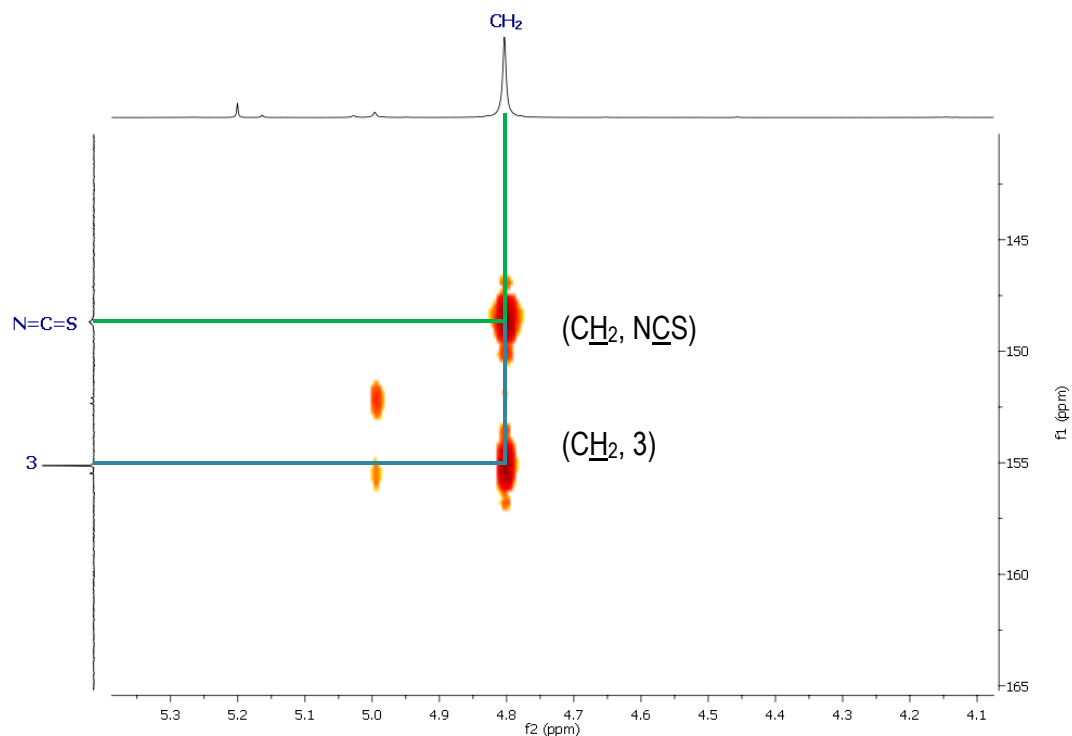


Figura 1.21. Expansión del espectro de RMN de HMBC del compuesto **11a**.

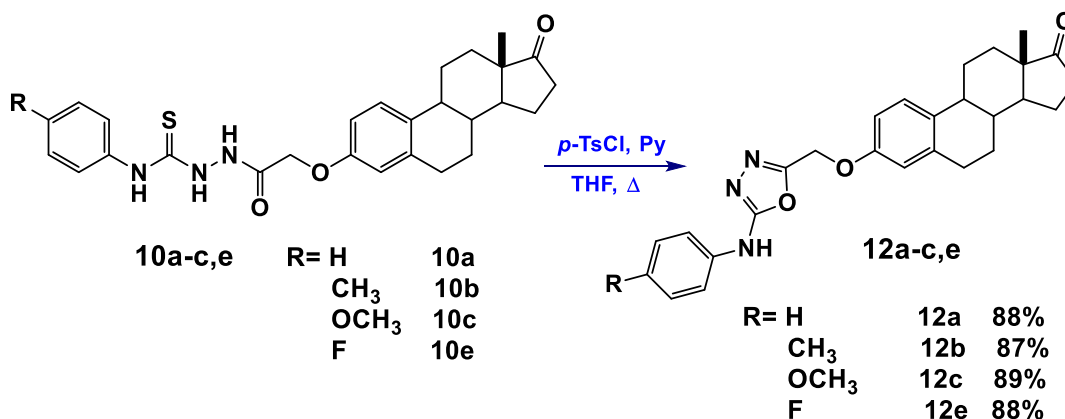
En la tabla 6 se muestra una comparación de las señales de RMN tanto de ^1H y ^{13}C , más representativas de los derivados **11a-h** y los espectros se encuentran en el anexo de esta tesis. Dentro de las cuales se puede observar en ^{13}C que las señales de los carbonos cuaternarios del heterociclo se encuentran en un rango de 148.3-155.6 ppm para el que está unido al CH_2 que está unido a la estrona, mientras que el otro se encuentra en 154.9-155.2 ppm que corresponde al que se une ya sea al anillo aromático o una cadena alifática. En el RMN de ^1H de la señal de los hidrógenos del CH_2 se observan en un rango de 4.80-5.10 ppm, mientras que en ^{13}C se muestra entre 60.0 ppm por mencionar algunas señales.

Tabla 6. Comparación de las señales de RMN de los derivados **11a-h**.

Com pue stos	RMN (ppm)	Señales										
		1	2	3	4	17	CH ₂ O	SCC H ₂	PhNHC S	Ar-p	CH	CH ₂ N
11a	¹ H	7.07	6.53	---	6.46	---	4.80	---	---	7.45	---	---
	¹³ C	126. 5	112. 5	155. 7	115.0	221. 5	60.0	148.7	155.1	130. 2	---	---
11b	¹ H	7.12	6.79	---	6.73	---	4.89	---	---	---	---	---
	¹³ C	126. 4	112. 5	155. 2	115.0	221. 1	60.0	149.6	155.2	130. 1	---	---
11c	¹ H	7.13	6.61	---	6.53	---	4.82	---	---	---	---	---
	¹³ C	126. 4	112. 4	155. 1	114.9	221. 1	59.9	148.9	155.1	160. 5	---	---
11d	¹ H	7.16	6.61	---	6.53	---	4.95	---	---	---	---	---
	¹³ C	126. 5	112. 3	155. 0	114.7	221. 0	59.9	150.6	155.0	131. 2	---	---
11e	¹ H	7.15	6.60	---	6.54	---	4.89	---	---	---	---	---
	¹³ C	126. 4	112. 2	154. 9	114.7	221. 3	59.8	148.6	154.9	163. 9- 161. 9	---	---
11f	¹ H	7.23	6.78	---	6.71	---	5.08	---	---	---	4.61	---
	¹³ C	126. 7	112. 3	154. 9	114.7	221. 1	60.7	148.1	154.9	---	58.1 4	---
11g	¹ H	7.21	6.77	---	6.71	---	5.10	---	---	---	---	4.06

	¹³ C	126. 6	112. 1	155. 0	114.6	221. 1	60.2	148.7	155.0	---	---	44.6
11h	¹ H	7.22	6.78	---	6.71	---	5.08	---	---	---	---	4.04
	¹³ C	126. 6	112. 1	155. 0	114.6	221. 1	60.2	148.3	155.0	---	---	46.2

Por otro lado, aprovechando que se lograron aislar los derivados **10a-c** y **10e**, y ver cómo afecta el heteroátomo del heterociclo en la relación estructura-actividad se hicieron las 1,3,4-oxadiazolinas tal como se muestra en el esquema 1.18. Se probaron las condiciones reportadas por Weiwei Liu³⁶ dando como resultado la obtención de los derivados **12a-c,e** con rendimientos de 87-93%, además se observó que los sustituyentes que se encuentran en la posición “*para*” del anillo aromático ya sea grupos electroattractores o electrodonadores se pueden convertir fácilmente en los productos deseados **12a-c,e** en tiempos cortos de 4 h.



Esquema 1.18. Obtención de los derivados **12a-c,e**.

En el espectro de RMN de ¹H como se muestra en la figura 1.22 se observa las señales de los hidrógenos del anillo aromático apareciendo en 7.46 ppm a 7.07 ppm, otra señal se muestra en este espectro es la de CH₂O, que anteriormente estaba en 4.53 ppm y ahora se encuentra en 5.15

³⁶ Liu W., Li Q., Cheng F., Shi D., Cao Z., *Heterocycl. Commun.* **2014**, 20, 6, 333–338.

ppm. Otra señal que se observa en 8.62 ppm que integra para 1 hidrogeno es la del NH, el resto de señales corresponde al esqueleto esteroidal y que no muestran cambios significativos.

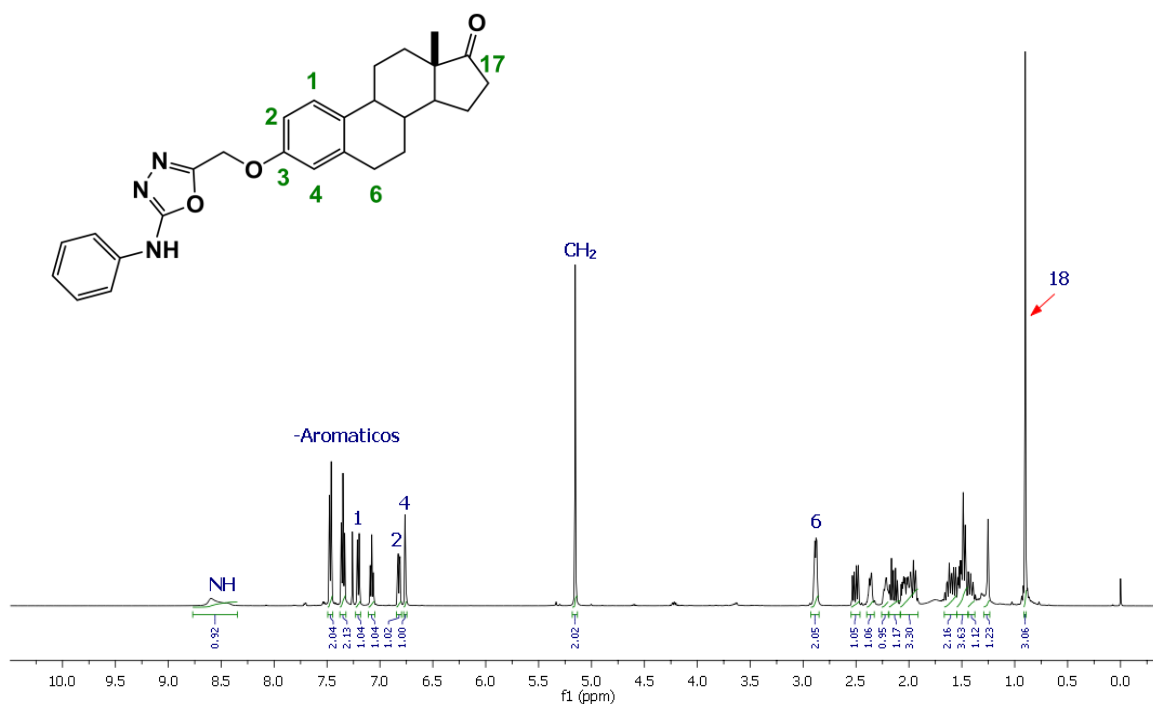


Figura 1.22. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **12a**.

La figura 1.23 se muestra el espectro de RMN de ^{13}C la señal de C-S en 156.4 ppm que antes se presentaba en 168.8 ppm como una señal de C=O del éster, otra señal que nos indica que se adicione el isotiocianato es la señal de C-S en 161.1 ppm que está unido al NPh además de las señales de los carbonos del anillo aromático en 137.5 ppm a 117.7 ppm. La señal que sufrió un pequeño cambio es la señal del CH_2O que estaba en 66.9 ppm y ahora en 60.0 ppm, el resto de señales no sufren cambio significativo.

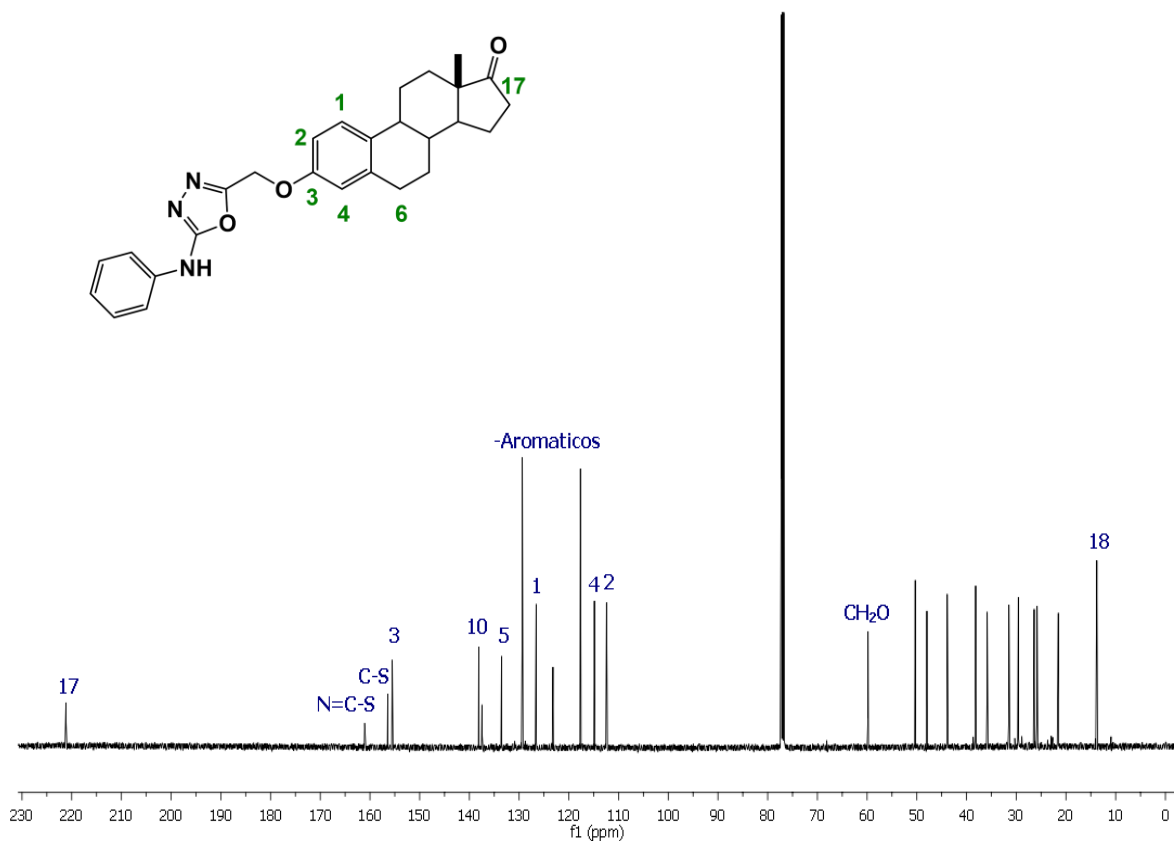


Figura 1.23. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **12a**.

En la figura 1.24 se muestra una expansión del espectro de RMN de HMBC del derivado **12a**, en que se observa el acoplamiento de los hidrógenos del CH_2 que está enlazado al oxígeno del C-3 de la estrona con la señal del carbono cuaternario del heterociclo a dos enlaces, al mismo tiempo esta señal se acopla con el C-3 a tres enlaces de distancia corroborando asignación de estas señales.

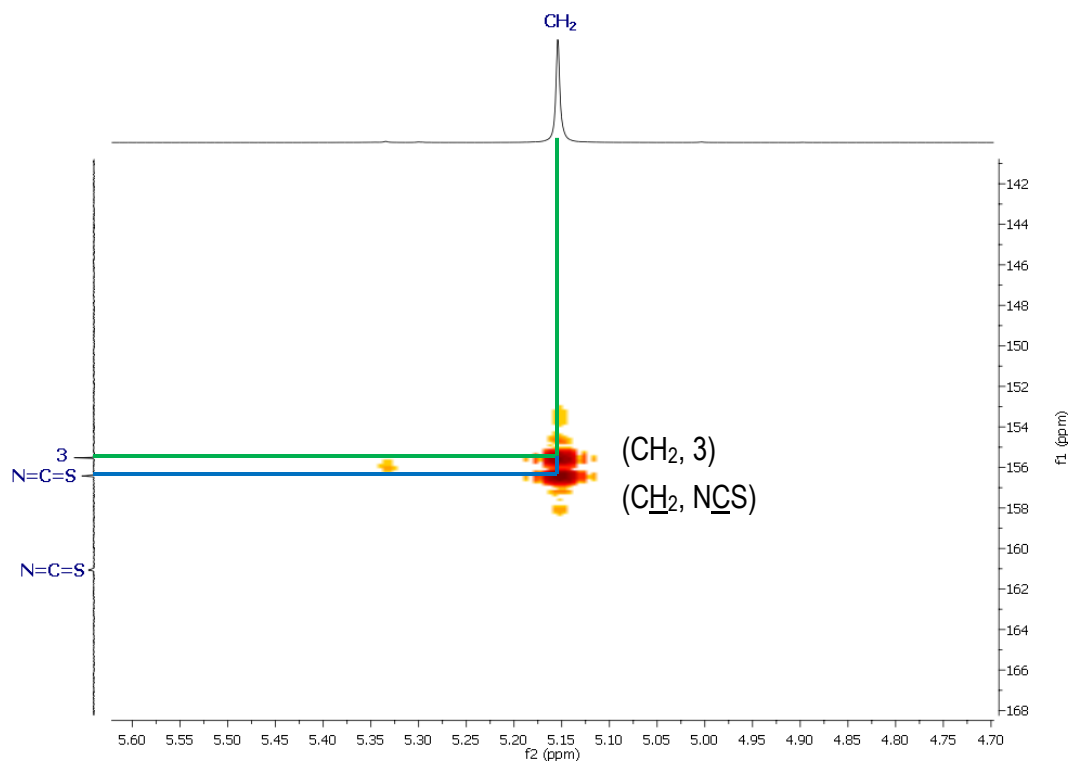


Figura 1.24. Expansión del espectro de RMN de HMBC del compuesto **12a**.

En la tabla 7 se muestra una comparación de los desplazamientos de las señales de RMN tanto de ^1H y ^{13}C , más representativas de los derivados **12a-c,e** y los espectros se encuentran en el anexo de esta tesis. En la cual podemos observar que la señal de los hidrógenos del CH_2 en RMN de ^1H están en 5.15 ppm y solo varía en decimales, mientras que en ^{13}C se muestra en 60.0 ppm. Otras desplazamientos son las de los carbonos cuaternarios en RMN de ^{13}C , para la señal del carbono del heterociclo que está unido al CH_2 en 156.4 ppm y para el otro carbono que está unido al anillo aromático esta en 161.2 ppm, por mencionar algunas señales.

Tabla 7. Comparación de las señales de RMN de los derivados **12a-c,e**.

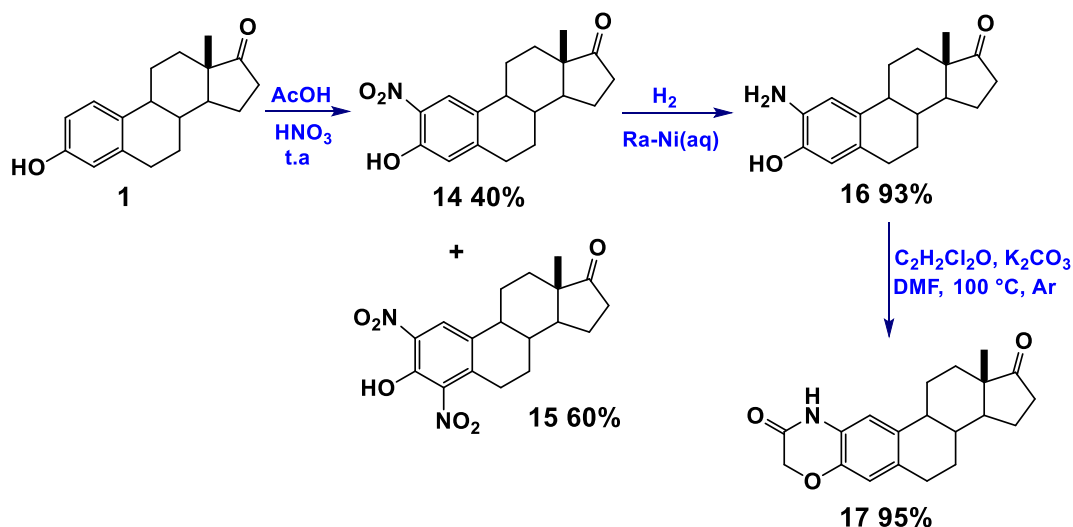
Compuestos	RMN (ppm)	Señales								
		1	2	3	4	17	CH ₂	SCCH ₂	PhNHCS	Ar-p
12a	¹ H	7.20	6.82	---	6.76	---	5.15	---	---	---
	¹³ C	126. 6	112. 4	155. 5	114. 9	221. 1	60.0	156.4	161.1	123. 2
12b	¹ H	7.19	6.81	---	6.75	---	5.13	---	---	---
	¹³ C	126. 5	112. 4	155. 5	114. 8	221. 2	60.0	156.2	162.6	132. 7
12c	¹ H	7.18	6.80	---	6.74	---	5.11	---	---	---
	¹³ C	126. 5	112. 4	155. 5	114. 8	221. 2	59.8	156.1	161.6	155. 7
12e	¹ H	7.20	6.81	---	6.75	---	5.14	---	---	---
	¹³ C	126. 6	112. 4	155. 5	114. 8	221. 2	59.8	156.4	161.2	159. 7- 157. 8

4.1.2 Obtención del heterociclo de la 1,4-oxazina

El derivado **17** se obtuvo a través de tres etapas de reacción tal como se muestra en el esquema 1.19, comenzando con una reacción de sustitución electrofílica aromática sobre el anillo A, a través de una nitración con HNO₃ y AcOH que es una técnica clásica. En esta reacción el rendimiento fue de un 40% de 2-nitroestróna (**14**) con respecto al 2,4-dinitroestróna (**15**) y los datos espectroscópicos

fueron comparados con la literatura.³⁷ La obtención de la amina en C-2 se realizó mediante hidrogenación catalítica con Ra-Ni(aq) como catalizador. La reacción es bastante limpia, por lo que no es necesario purificar el compuesto **16** por cromatografía en columna obteniéndolo en excelentes rendimientos de 93%. Los datos espectroscópicos fueron comparados con la literatura.³⁸

Finalmente, para la obtención de la oxazina **17** se lleva a cabo una reacción de Williamson del 2-aminoestróna con cloruro de cloroacetilo en presencia de K₂CO₃ como base, y a su vez, la condensación de la amina primaria con el grupo carbonilo obteniendo como resultado el derivado **17**, que se purificó por cromatografía en columna, para eliminar las impurezas y obtener así, la molécula objetivo con un rendimiento de 95%.



Esquema 1.19. Síntesis del derivado 1,4-oxazina **17**.

En el espectro de RMN de ¹H de la figura 1.25, pueden apreciarse las señales de los protones aromáticos correspondientes a H-1 que se desplaza a 7.70 ppm y H-4 en 6.59 ppm, mientras que la señal que se muestra como una señal simple que integra para dos protones correspondiente a los hidrógenos del grupo metileno del anillo de 1,4-oxazina en 4.14 ppm. El resto

³⁷ Bose A.; Sanjoto W. P.; Villarreal S.; Aguilar H.; Banik B. K.; *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 3945-3947.

³⁸ Enginar H.; Unak P.; Lambrecht F. Y.; Biber F. Z.; Medine E.; Cetinkaya B.; *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2005**, 264, 535-539.

de señales que se observan son correspondientes al esqueleto esteroidal de la estrona que no sufren cambio significativo.

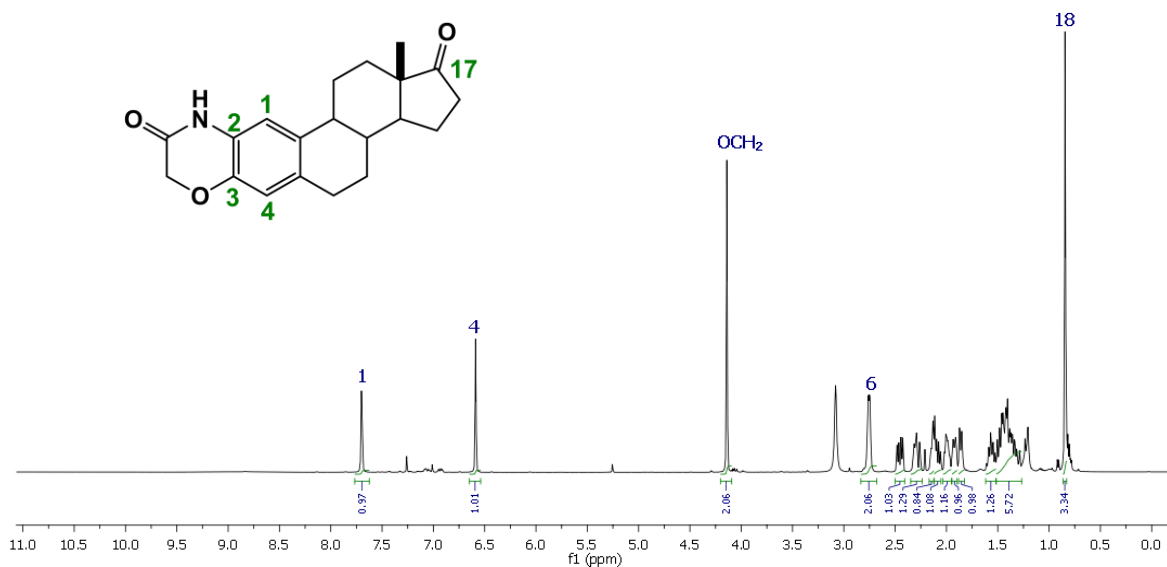


Figura 1.25. Espectro de RMN de ¹H del compuesto 17.

En la figura 1.26 se muestra el espectro de RMN de ¹³C, en cual se observa las señales primero la del carbonilo del grupo amida en 164.6 ppm y en 42.6 ppm se muestra el carbono del CH₂ unido a este grupo carbonilo. Las señales de los C-2 se muestran en 122.6 ppm, mientras que para el C-1 en 117.9 ppm y el C-4 en 116.2 ppm; el resto de señales que se ven en el espectro corresponden a los carbonos del esqueleto esteroidal de la estrona que no se muestra cambios significativos.

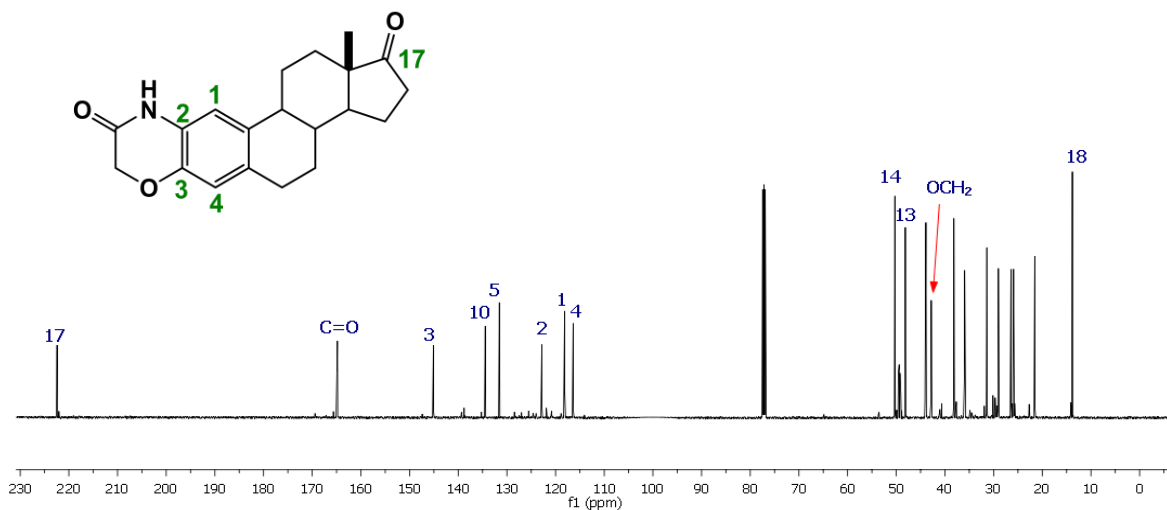


Figura 1.26. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **17**.

En la figura 1.27 se muestra una expansión del espectro de RMN de HMBC de 2D del derivado **17**, en el cual se muestran los acoplamientos de los hidrógenos del grupo CH_2 del heterociclo con el carbono cuaternario del grupo amida del mismo heterociclo, también se observa el acoplamiento del hidrogeno de C-4 con los carbonos de las posiciones del esqueleto esteroidal 5, 3 y 2. Otro acoplamiento es la del hidrogeno del C-1 con los carbonos de las posiciones 10, 3 y 2 del esqueleto esteroidal, todos estos a dos o tres enlaces corroborando la asignación de las señales que se observan en los espectros de ^1H y ^{13}C .

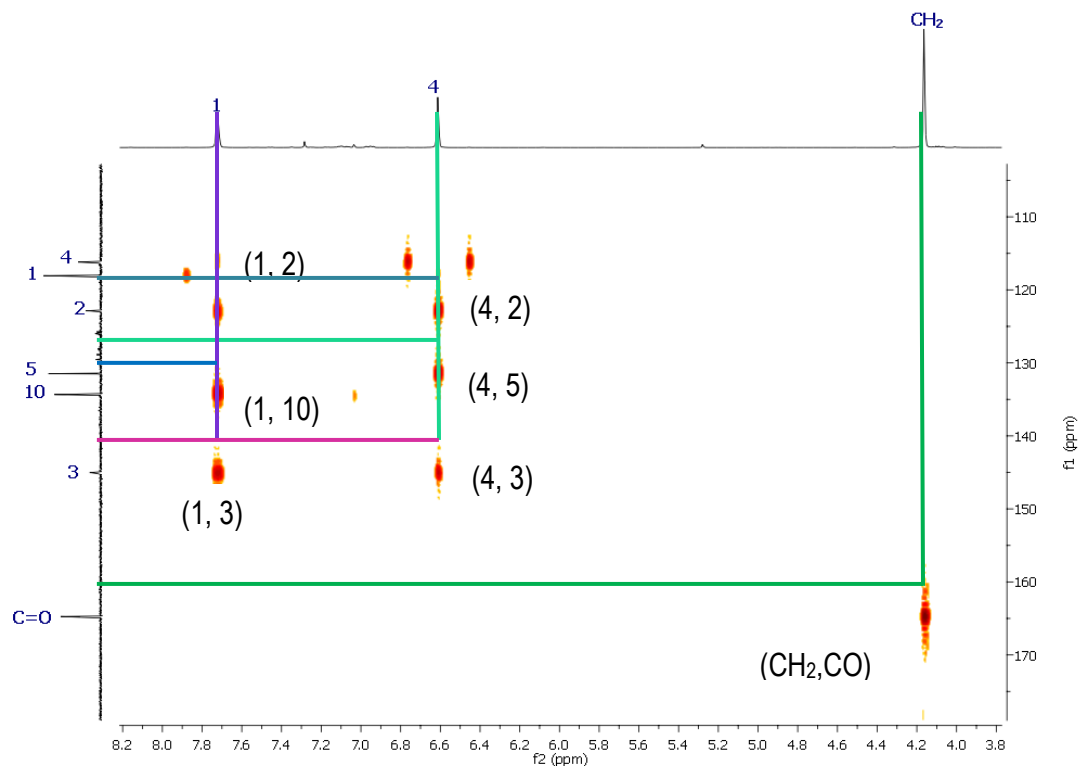
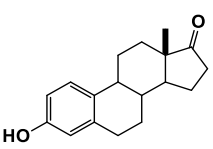
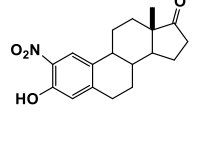
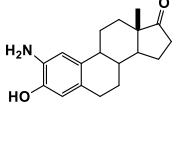
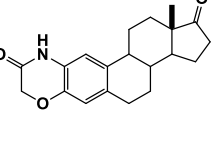


Figura 1.27. Expansión del espectro de RMN de HMBC del compuesto **17**.

En la tabla 8 se muestra la comparación de algunas señales en RMN de ^1H y ^{13}C de los derivados de la ruta sintética para obtención del compuesto **7**. Una de ellas es la de la posición 2 de la estrona que aparece en 6.55 ppm en ^1H que posteriormente ya no se muestra, pero si se observa una nueva señal del CH_2 que forma parte del heterociclo de 1,4-oxazina en 4.14 ppm en el derivado **17**. Mientras que en ^{13}C se ve como la señal de C-2 varía de 133.5 ppm en el derivado **16** a 144.5 ppm en la estrona **1** cuando no ha sufrido ninguna reacción, pero en el derivado **17** esta se observa en 122.6 ppm junto con la señal del carbono del CH_2 en 42.6 ppm y para el carbonilo en 164.6 ppm que forman parte de la 1,4-oxazina, estas son algunas de las señales que se muestran en esta tabla.

Tabla 8. Comparación de las señales de RMN de la ruta sintética para del derivado 7.

Compuestos	 1		 14²⁷		 16²⁸		 17	
	RMN (ppm)	¹H	¹³C	¹H	¹³C	¹H	¹³C	¹H
1	6.88	128.0	7.95	122.0	6.39	115.0	7.70	117.9
2	6.55	114.5	---	131.0	---	133.5	---	122.6
3	---	156.0	---	153.0	---	142.1	---	144.9
4	6.4	115.8	6.82	119.0	6.20	112.5	6.59	116.2
CH₂	---	---	---	---	---	---	4.14	42.6
C=O	---	---	---	---	---	---	---	164.6

Capítulo 1.5: Desarrollo Experimental

5.1 Equipos y técnicas utilizadas

Puntos de fusión

Los puntos de fusión fueron determinados por la técnica de capilar abierto en un equipo MELT-TEMP, utilizando la escala de grados Celsius y no fueron corregidos.

Cromatografía

Para la cromatografía analítica en capa fina (CCF) se utilizaron placas comerciales de gel de sílice ALUGRAM[®] SIL G/UV254 y como fase móvil sistemas de elución acetato de etilo-hexano, diclorometano-metanol o diclorometano-hexano. Como revelador se utilizó indicador de fluorescencia, una lámpara de luz ultravioleta de onda corta (254 nm, lámpara UV-G-54) y el revelado por calcinación de las placas con vainillina, ácido fosfomolibdico, ninhidrina o ácido sulfúrico.

Para la cromatografía en columna, se empleó gel de sílice Davisil[™] grado 633 (malla 200–425) de acuerdo a la técnica de cromatografía tipo flash utilizando sistemas de eluyentes de acetato de etilo-hexano o diclorometano-metanol en diversas proporciones.

Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética, fueron obtenidos con un equipo de Bruker Ascend 500 MHz para espectros de ¹H y 125 MHz para los espectros de ¹³C, se utilizó cloroformo deuterado (CDCl₃) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento se expresan en hertzios (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 “t” para una señal triple; “dd” para una señal doble de doble; “ddd” para una señal doble de doble de doble; “dc” para una señal doble de cuartetos, “a” para una señal ancha y “m” para una señal múltiple.

Masas

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrómetro Jeol MStation JMS-700 usando FABQMS, acoplado a un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5990 serie II a 70 eV, por impacto electrónico y las fragmentaciones están referidas como m/z .

Rotación óptica

Las rotaciones ópticas se obtuvieron en un polarímetro PerkinElmer 341.

Espectroscopia de Infrarrojo

Los espectros IR se adquirieron en un espectrofotómetro Nicolet FT-IR 380 ($\bar{\nu}_{\max}$, cm^{-1}).

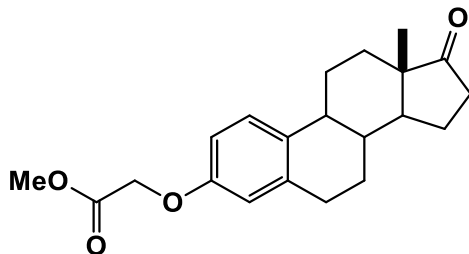
Disolventes y materias primas

Las materias primas no necesitaron ser purificadas previa, los reactivos utilizados fueron grado analítico y no requirieron purificación. Los disolventes utilizados fueron purificados por las técnicas ya reportadas en la literatura.³⁹

³⁹ Perrin D. P.; Armarego W. L. F.; Purification of Laboratory Chemicals, 3a. Edición, Pergamon Press, Oxford, 1985.

5.2 Síntesis de los derivados esteroidales.

5.2.1. 3-(2'-Metoxi-2'-oxoetoxi)estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (2)



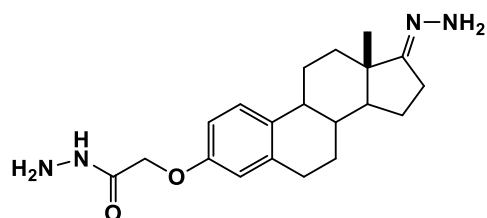
Una mezcla de estrona (400 mg, 1.48 mmol), CsCO₃ (964.03 mg, 2.96 mmol, 2 eq.) y bromoacetato de metilo (0.1 ml, 8.88 mmol, 6 eq.) se disolvió en THF anh., se agitó a reflujo en una atmósfera inerte de argón durante 10 h. La mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3x15 ml), y la fase orgánica se lava con salmuera (3x15 ml), H₂O (2x15 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (95:5 Hex/AcOEt).

Rendimiento cuantitativo; p.f. 128-129 °C; $[\alpha]_D^{20} +108$ (c 0.83, CH₂Cl₂); IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3000 (=C-H Ar), 1763 (C=O cetona), 1733 (C=O éster), 1603,1500 (C=C Ar), 1441 (CH₂-CO), 1431 (COOCH₃), 1211 (C-CO-C cetona), 1209, 1077 (C-O), 820, 784 (=C-H oop). ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ : 7.22 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, H-1), 6.72 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.6$ Hz, $J_{2,4} = 2.8$ Hz, H-2), 6.66 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.8$ Hz, H-4), 4.63 (s, 2H, CH₂O-3), 3.82 (s, 3H, CH₃OCOCH₂O-3), 2.89 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.51 (dd, 1H, $J_{16a,16b} = 19.1$ Hz, $J_{16a,15} = 8.9$ Hz, $J_{16a,15} \approx 0$ Hz, H-16a), 2.38 (m, 1H, H-11a), 2.25 (m, 1H, H-9), 2.14 (dt, 1H, $J_{16b,16a} = 19.1$ Hz, $J_{16b,15a} = J_{16b,15b} = 8.9$ Hz, H-16b), 2.06 (m, 1H, H-15a), 2.00 (m, 1H, H-7a), 1.94 (m, 1H, H-12a), 1.62 (m, 1H, H-15b), 1.57 (m, 1H, H-8), 1.51 (m, 1H, H-14), 1.49 (m, 1H, H-11b), 1.46 (m, 1H, H-12b), 1.42 (m, 1H, H-7b), 0.91 (s, 3H, H-18) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 221.4 (C-17), 169.7 (CH₃OCOCH₂O-3), 155.7 (C-3), 138.0 (C-10), 133.2 (C-5), 126.6 (C-1), 114.7 (C-4), 111.9 (C-2), 65.2 (CH₂O-3), 52.4 (CH₃OCOCH₂O-3), 50.3 (C-14), 48.0 (C-13), 43.9 (C-9), 38.2 (C-8), 35.9 (C-16), 31.5 (C-12), 29.7 (C-6), 26.4 (C-7), 25.8 (C-11), 21.6 (C-15), 13.9 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (m/z) calc. para C₂₁H₂₆O₄ [M+H]⁺: 342.1831.

5.2.2. Procedimiento general para la preparación de las hidrazidas (4 y 9)

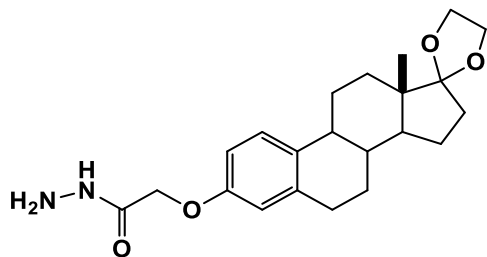
Se siguió el método descrito por El-Ansary¹⁴ con una variación. A una solución de **2** (0.59 mmol) o de **8** (0.74 mmol) e hidracina monohidratada al 99% (2 eq.) en EtOH (5 ml) se agitó a reflujo durante 6 h. La reacción se concentró y el residuo se disolvió en CH₂Cl₂, la fase orgánica se extrajo con CH₂Cl₂ (3x15 ml) y se lavó con salmuera (3x15 ml) seguido de H₂O (2x15 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad.

5.2.2.1. 3-(2'-Hidrazinil-2'-oxoetoxi)estra-1,3,5(10)-trien-17-hidrazona (4)



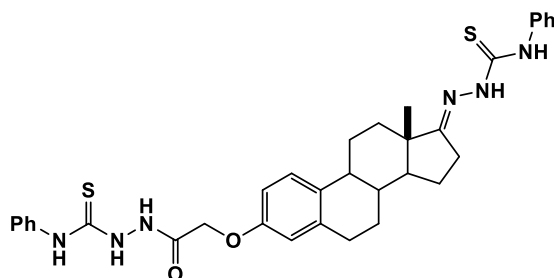
Se utilizó hidracina monohidratada al 99% (58.81 mg, 1.17 mmol) y la reacción tuvo lugar durante 6.3 h. Espuma incoloro. Rendimiento cuantitativo; $[\alpha]_D^{20} +87$ (c 3.00, CH₂Cl₂); IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3314 (N-H), 3000 (=C-H Ar), 1672 (C=O amida), 1605, 1496 (C=C Ar), 1441 (CH₂-CO), 1655, 1575, 1499 (N-H), 810, 782 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.93 (a, 1H, NH₂NHCOCH₂O-3), 7.20 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, H-1), 6.68 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.6$ Hz, $J_{2,4} = 2.7$ Hz, H-2), 6.60 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.5$ Hz, H-4), 4.82 (s, 2H, NH₂NC-17), 4.52 (s, 2H, CH₂O-3), 3.98 (a, 2H, NH₂NHCOCH₂O-3), 2.83 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.36-2.28 (m, 2H, H-16a, H-11a), 2.25-2.17 (m, 2H, H-11b, H-9), 2.00 (m, 1H, H-12a), 1.95 (m, 1H, H-15a), 1.93 (m, 1H, H-7a), 1.51 (m, 1H, H-16b), 1.46 (m, 1H, H-12b), 1.43 (m, 1H, H-8), 1.42 (m, 1H, H-15b), 1.33 (m, 1H, H-7b), 1.29 (m, 1H, H-14), 0.81 (s, 3H, H-18) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 168.9 (NH₂NHCOCH₂O-3), 165.96 (C-17), 155.0 (C-3), 138.4 (C-10), 134.2 (C-5), 126.7 (C-1), 114.5 (C-4), 112.0 (C-2), 66.9 (NH₂NHCOCH₂O-3), 52.5 (C-14), 44.24 (C-13), 44.1 (C-9), 38.0 (C-8), 34.15 (C-12), 29.6 (C-6), 27.0 (C-7), 26.3 (C-16), 24.5 (C-11), 23.0 (C-15), 17.0 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (m/z) calc. para C₂₀H₂₈N₄O₂ [M+H]⁺: 356.2212, observado 356.2217 [M+1]⁺.

5.2.2.2. 3-(2'-Hidrazinil-2'-oxoetoxi)-17-(espiro[1,3]dioxolan-2'-il)estra-1,3,5(10)-trieno (9)



Se utilizó hidracina monohidratada al 99% (74.23 mg, 1.48 mmol) y la reacción tuvo lugar durante 7 h. Espuma incolora. Rendimiento cuantitativo; $[\alpha]_D^{20} +10$ (c 0.91, CH₂Cl₂); IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3325 (N-H), 3000 (=C-H Ar), 1674 (C=O amida), 1606, 1498 (C=C Ar), 1444 (CH₂-CO), 1659, 1573, 1495 (N-H), 812, 782 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.14 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, H-1), 6.61 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.6$ Hz, $J_{2,4} = 2.6$ Hz, H-2), 6.54 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.6$ Hz, H-4), 4.46 (s, 2H, CH₂O-3), 3.88-3.82 (m, 4H, CH₂CH₂C-17), 3.59 (a, 2H, NH₂NHCOCH₂O-3), 2.76 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.23 (m, 1H, H-11a), 2.13 (m, 1H, H-9), 1.95 (ddd, 1H, $J_{16a,16b} = 14.2$ Hz, $J_{16a,15} = 11.7$ Hz, $J_{16a,15} = 2.7$ Hz, H-16a), 1.82 (m, 1H, H-7a), 1.77 (m, 1H, H-16b), 1.70 (m, 1H, H-15a), 1.68 (m, 1H, H-12a), 1.54 (m, 1H, H-14), 1.45 (m, 1H, H-12b), 1.36 (m, 1H, H-11b), 1.30 (m, 1H, H-8), 1.27 (m, 1H, H-7b), 1.24 (m, 1H, H-15b), 1.18 (s, 1H, NH₂NHCOCH₂O-3), 0.80 (s, 3H, H-18) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 168.9 (NH₂NHCOCH₂O-3), 155.0 (C-3), 138.6 (C-10), 134.4 (C-5), 126.7 (C-1), 119.4 (C-17), 114.5 (C-4), 111.9 (C-2), 67.0 (CH₂O-3), 65.3 (CH₂CH₂C-17), 64.6 (CH₂CH₂C-17), 49.3 (C-14), 46.1 (C-13), 43.6 (C-9), 38.9 (C-8), 34.2 (C-16), 30.7 (C-12), 29.8 (C-6), 26.9 (C-7), 26.1 (C-11), 22.4 (C-15), 14.3 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (m/z) calc. para C₂₂H₃₀N₂O₄ [M+H]⁺: 386.2206.

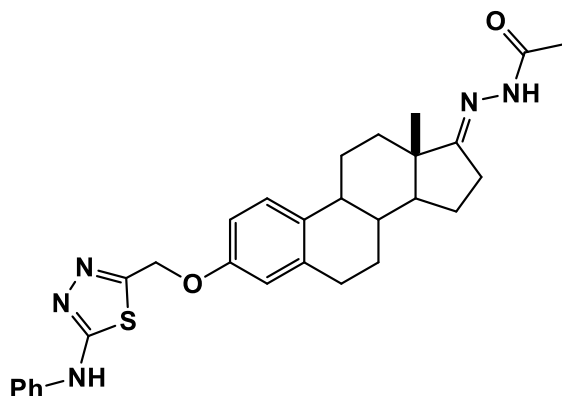
5.2.3. 3-[2'-Fenilaminotioxometilhidrazinil-2'-oxoetoxi]-17(fenilaminotioxometil)hidrazonoestra-1,3,5(10)-trieno (5)



A una solución de **4** (143.1 mg, 0.40 mmol) en EtOH (5 ml) se añadió isotiocianato de fenilo (0.80 mmol, 2 eq.). La mezcla se agitó a reflujo durante 5 h y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (100:0.3 CH₂Cl₂/MeOH).

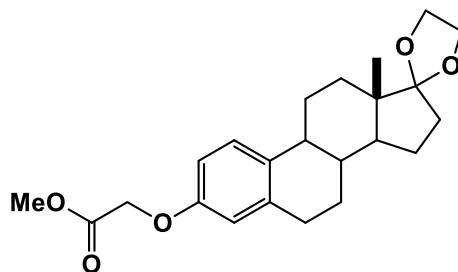
Espuma incolora. Rendimiento 90%; $[\alpha]_D^{20} +38$ (c 1.17, CH₂Cl₂); IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3253 (N-H), 3025 (=C-H Ar), 1661 (C=O amida), 1593,1498 (C=C Ar), 1441 (CH₂-CO), 1621, 1553, 1495 (N-H), 741, 697 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 9.31 (s, 1H, PhNHCSNHNC-17), 8.71 (s, 1H, CSNHNC-17), 7.68 (m, 2H, ArH-o) 7.59-7.53 (m, 3H, ArH-m, ArH-p), 7.46 (m, 2H, ArH-o), 7.42 (m, 2H, ArH-m), 7.26 (m, 1H, ArH-p), 7.19 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.7$ Hz, H-1), 6.65 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.7$ Hz, $J_{2,4} = 2.6$ Hz, H-2), 6.57 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.6$ Hz, H-4), 4.90 (s, 2H, CH₂O-3), 2.86 (m, 2H, H-6a,H-6b), 2.57 (dd, 1H, $J_{16a,16b} = 18.1$ Hz, $J_{16a,15} = 8.8$ Hz, $J_{16a,15} \approx 0$ Hz, H-16a), 2.39 (m, 1H, H-7a), 2.27 (m, 1H, H-9), 2.11 (m, 1H, H-12a), 2.04 (m, 1H, H-15a), 1.96 (m, 1H, H-7b), 1.59 (m, 1H, H-12b), 1.56 (m, 1H, H-15b), 1.54 (m, 2H, H-11), 1.45 (s, 1H, PhNHCSNHNHCOCH₂O-3), 1.43 (dt, 1H, $J_{16b,16a} = J_{16b,15a} = J_{16b,15b} = 8.5$ Hz, H-16b), 1.40 (m, 1H, H-8), 1.38 (m, 1H, H-14), 1.30 (s, 2H, CSNHNHCOCH₂O-3), 0.96 (s, 3H, H-18) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 176.0 (PhNHCSNHNC-17), 169.2 (PhNHCSN), 166.5 (C-17), 155.0 (C-3), 148.5 (NHCOCH₂O-3), 138.6 (ArC-*ipso*), 137.9 (ArC-*ipso*), 133.7 (C-10), 132.9 (C-5), 130.2 (ArC-*p*), 129.6 (ArC-*m*), 128.6 (ArC-*m*), 127.8 (ArC-*o*), 126.5 (C-1), 126.0 (ArC-*p*), 124.2 (ArC-*o*), 115.0 (C-4), 112.4 (C-2), 60.0 (CH₂O-3), 52.3 (C-14), 45.0 (C-13), 44.0 (C-9), 37.4 (C-8), 33.8 (C-12), 29.4 (C-6), 26.9 (C-16), 26.4 (C-7), 26.0 (C-11), 23.2 (C-15), 17.0 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (*m/z*) calc. para C₃₄H₃₈N₆O₂S₂ [M+H]⁺: 626.2498.

5.2.4 3-[(5'-(Fenilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]-17-acetohidrazonoestra-1,3,5(10)-trieno (7)



Se siguió el método descrito por Salman A. Khan¹³ con una variación. Una solución de **5** (150.6mg, 0.24 mmol, 1 eq.) en CHCl₃ (5 mL), con anhídrido acético (0.2 ml, 2.16 mmol, 9 eq.) y Py (0.2 ml, 2.16 mmol, 9 eq.). La mezcla se calienta a reflujo durante 4 h luego, se concentra a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna (100:0.5 CH₂Cl₂/MeOH). Espuma blanca. Rendimiento 20%; [α]_D²⁰ +50 (c 1.00, CH₂Cl₂); IR (ν_{\max} /cm⁻¹): 3137 (N-H), 30 (=C-H Ar), 1666 (C=O amida), 1575,1496 (C=C Ar), 1422 (CH₂-CO), 1642, 1551, 1496 (N-H), 779, 719 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.43 (s, 1H, H-NH), 7.52 (m, 3H, ArH-*p*, ArH-*m*), 7.41 (m, 2H, ArH-*o*), 7.17 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 8.7 Hz, H-1), 6.61 (dd, 1H, $J_{2,1}$ = 8.7 Hz, $J_{2,4}$ = 2.0 Hz, H-2), 6.54 (d, 1H, $J_{4,2}$ = 2.0 Hz, H-4), 4.86 (s, 2H, CH₂O-3), 2.84 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.38 (dd, 1H, $J_{16a,16b}$ = 18.0 Hz, $J_{16a,15a}$ = 9.0 Hz, $J_{16a,15b}$ \approx 0 Hz, H-16a), 2.34 (m, 1H, H-11a), 2.25 (s, 3H, COCH₃), 2.22 (m, 1H, H-9), 2.17 (m, 1H, H-16b), 2.07 (m, 1H, H-12a), 1.97 (m, 1H, H-15a), 1.93 (m, 1H, H-7a), 1.54 (m, 1H, H-12b), 1.52 (m, 1H, H-15b), 1.51 (m, 1H, H-11b), 1.49 (m, 1H, H-8), 1.35 (m, 1H, H-14), 1.39 (m, 1H, H-7b), 1.26 (s, 1H, PhNHCSN), 0.89 (s, 3H, H-18) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 173.7 (C=O), 165.9 (C-17), 155.0 (PhNHCSN), 155.0 (C-3), 148.5 (NSCCH₂O-3), 138.1 (C-10), 133.9 (C-5), 133.0 (ArC-*ipso*), 130.2 (ArC-*p*), 129.7 (ArC-*m*), 127.8 (ArC-*o*), 126.5 (C-1), 115.0 (C-4), 112.5 (C-2), 60.0 (CH₂O-3), 52.3 (C-14), 44.8 (C-13), 44.1 (C-9), 38.0 (C-8), 34.0 (C-12), 29.6 (C-6), 27.0 (C-7), 26.1 (C-16), 25.8 (C-11), 23.2 (C-15), 20.3 (COCH₃), 17.0 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (m/z) calc. para C₂₇H₃₃N₅O₂S [M+H]⁺: 515.2355.

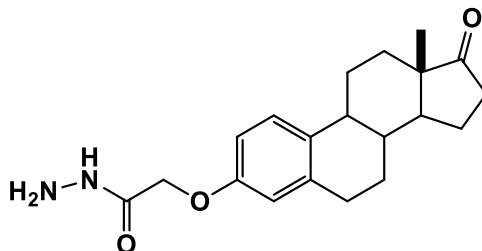
5.2.5. 3-(2'-Metoxi-2'-oxoetoxi)-17-(espiro[1,3]dioxolan-2'-il)estra-1,3,5(10)-trieno (8)



A una solución de **2** (320.8 mg, 0.94 mmol), *p*-TsOH (89.62 mg, 0.47 mmol, 0.5 eq.) y etilengcol (5.2 ml, 94.23 mmol, 2 eq.) en benceno anh. (5 ml) se agitó a reflujo durante 12 h. La mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3x15 ml) y la fase orgánica se lava con salmuera (3x15 ml), H₂O (2x15 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (98:2 Hex/AcOEt).

Espuma incolora. Rendimiento 75%; $[\alpha]_D^{20}$ +22 (c 0.74, CH₂Cl₂); IR (ν_{\max} /cm⁻¹): 3000 (=C-H Ar), 1767 (C=O éster), 1612, 1495 (C=C Ar), 1439 (CH₂-CO), 1429 (COOCH₃), 1208, 1086 (C-O), 812, 751 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.23 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 8.6 Hz, H-1), 6.72 (dd, 1H, $J_{2,1}$ = 8.6 Hz, $J_{2,4}$ = 2.8 Hz, H-2), 6.65 (d, 1H, $J_{4,2}$ = 2.8 Hz, H-4), 4.63 (s, 2H, CH₂O-3), 3.97-3.92 (m, 4H, CH₂CH₂C-17), 3.83 (s, 3H, CH₃COCH₂O-3), 2.86 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.33 (m, 1H, H-11a), 2.24 (m, 1H, H-9), 2.05 (m, 1H, H-16a), 1.91 (m, 1H, H-7a), 1.85 (m, 1H, H-16b), 1.79 (m, 1H, H-15a), 1.70 (m, 1H, H-12a), 1.63 (m, 1H, H-14), 1.55 (m, 1H, H-12b), 1.47 (m, 1H, H-11b), 1.41 (m, 1H, H-8), 1.36 (m, 1H, H-7b), 1.34 (m, 1H, H-15b), 0.89 (s, 3H, H-18). ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 169.8 (CH₃COCH₂O-3), 155.5 (C-3), 138.3 (C-10), 133.9 (C-5), 126.6 (C-1), 119.4 (C-17), 114.6 (C-4), 111.9 (C-2), 65.3 (CH₂O-3), 65.3 (CH₂CH₂C-17), 64.6 (CH₂CH₂C-17), 52.4 (CH₃COCH₂O-3), 49.3 (C-14), 46.1 (C-13), 43.6 (C-9), 38.9 (C-8), 34.3 (C-16), 30.7 (C-12), 29.8 (C-6), 26.9 (C-7), 26.1 (C-11), 22.4 (C-15), 14.4 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (*m/z*) calc. para C₂₃H₃₀O₅ [M+H]⁺: 386.2093.

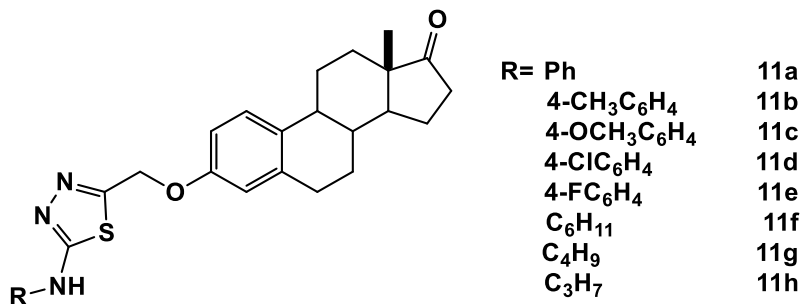
5.2.6. 3-(2'-Hidrazinil-2'-oxoetoxi)estra-1,3,5(10)-trien-17-one (3)



Se siguió el método descrito por Enrico Marcantoni²⁶ Una solución de **9** (204.1 mg, 0.53 mmol) en CH₃CN se adiciona CeCl₃•7H₂O (295.09 mg, 0.79 mmol, 0.15 eq.) y NaI (11.87 mg, 0.08 mmol, 1.5 eq.). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 48 h. Luego, se agregó HCl (0.5 N en H₂O, 10 ml) y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3x15 ml), y la fase orgánica se lavó con salmuera (3x15 ml), H₂O (2x15 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad.

Espuma incolora. Rendimiento cuantitativo; $[\alpha]_D^{20} +71$ (c 0.90, CH₂Cl₂); IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3347 (N-H), 3000 (=C-H Ar), 1685 (C=O amida), 1606, 1498 (C=C Ar), 1424 (CH₂-CO), 1657, 1580, 1496 (N-H), 812, 784 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.21 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, H-1), 6.67 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.6$ Hz, $J_{2,4} = 2.3$ Hz, H-2), 6.61 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.3$ Hz, H-4), 4.53 (s, 2H, CH₂O-3), 3.65 (s, 2H, NH₂NHCOCH₂O-3), 2.82 (m, 2H, H-6a,H-6b), 2.42 (dd, 1H, $J_{16a,16b} = 18.7$ Hz, $J_{16a,15} = 8.5$ Hz, $J_{16a,15} \approx 0$ Hz, H-16a), 2.31 (m, 1H, H-11a), 2.17 (m, 1H, H-9), 2.06 (dt, 1H, $J_{16b,16a} = J_{16b,15a} = J_{16b,15b} = 8.7$ Hz, H-16b), 1.98 (m, 1H, H-15a), 1.94 (m, 1H, H-7a), 1.87 (m, 1H, H-12a), 1.54 (m, 1H, H-15b), 1.49 (m, 1H, H-11b), 1.46 (m, 1H, H-8), 1.43 (m, 1H, H-14), 1.40 (m, 1H, H-12b), 1.35 (m, 1H, H-7b), 1.18 (s, 1H, NH₂NHCOCH₂O-3), 0.83 (s, 3H, H-18) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 221.0 (C-17), 168.8 (NH₂NHCOCH₂O-3), 154.9 (C-3), 138.5 (C-10), 134.3 (C-5), 126.6 (C-1), 114.4 (C-4), 111.8 (C-2), 66.9 (CH₂O-3), 50.1 (C-14), 46.0 (C-13), 43.5 (C-9), 38.5 (C-8), 35.7 (C-16), 30.6 (C-12), 29.7 (C-6), 26.8 (C-7), 26.0 (C-11), 22.0 (C-15), 14.2 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (m/z) calc. para C₂₀H₂₇N₂O₃ [M+H]⁺: 342.2022, observado 343.2036 [M+1]⁺.

5.2.7. Procedimiento general para la preparación de las 1,3,4-tiadiazoles esteroidales (11a–h)



Una solución de **3** (147 mg, 0.43 mmol) en EtOH (5 ml) se añadió diferentes isotiocionatos (2 eq.) y malla molecular 4 Å. La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso. Después de eso, se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna (85:15 Hex/AcOEt).

Los derivados **11a-h** también se pueden obtener a partir de una solución de **3** (147 mg, 0.43 mmol) en EtOH (5 ml) se añadió diferentes isotiocionatos (2 eq.). La mezcla se agitó a reflujo durante 6-8 h, después de eso, se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna (100:0.1 CH₂Cl₂/MeOH). Una vez purificado inmodicamente se pasa a la siguiente reacción, donde una solución de **10a-e** (1 eq.) en CHCl₃ (5 ml), se adicione DIPEA (4 eq.) y Ac₂O (7 eq.). La mezcla de reacción se colocó a reflujo durante 3-4 h, después de eso, se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna (85:15 Hex/AcOEt), se siguió las condiciones reportadas por Salman A. Khan¹³ con una variación.

5.2.7.1. 3-[(5'-(Fenilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11a)

Se utilizó isotiocianato de fenilo (116.07 mg, 0.86 mmol) y la reacción tuvo lugar durante 3 h. Espuma incolora. Rendimiento 94%; $[\alpha]_D^{20}$ +67 (c 1.00, CH₂Cl₂); IR (ν_{\max} /cm⁻¹): 3450 (N-H), 3038 (=C-H Ar), 1731 (C=O cetona), 1605, 1573 (C=C Ar), 1496 (N-H), 1235, 1055 (CH₂-O), 1222 (C-CO-C cetona), 818, 758 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.47-7.41 (m, 3H, ArH-*p*, 2ArH-*m*), 7.33 (m, 2H, ArH-*o*), 7.07 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 8.6 Hz, H-1), 6.53 (dd, 1H, $J_{2,1}$ = 8.6 Hz, $J_{2,4}$ = 2.7 Hz, H-2), 6.46 (d, 1H, $J_{4,2}$ = 2.7 Hz, H-4), 4.80 (s, 2H, CH₂O-3), 2.76 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.43 (dd, 1H, $J_{16a,16b}$ = 19.2Hz, $J_{16a,15}$ = 8.6 Hz, $J_{16a,15}$ \approx 0 Hz, H-16a), 2.27 (m, 1H, H-11a), 2.11 (m, 1H, H-9), 2.07 (dt, 1H,

$J_{16b,16a} = J_{16b-15a} = J_{16b,15b} = 8.7$ Hz, H-16b), 1.96 (m, 1H, H-15a), 1.91 (m, 1H, H-7a), 1.87 (m, 1H, H-12a), 1.46 (m, 1H, H-8), 1.53 (m, 1H, H-15b), 1.41 (m, 1H, H-14), 1.39 (m, 1H, H-11b), 1.37 (m, 1H, H-12b), 1.30 (m, 1H, H-7b), 1.18 (s, 1H, PhNHCSN), 0.82 (s, 3H, H-18) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 221.5 (C-17), 155.1 (PhNHCSN), 155.1 (C-3), 148.7 (NSCCH₂O-3), 138.1 (C-10), 133.6 (C-5), 133.5 (ArC-*ipso*), 130.2 (ArC-*p*), 129.7 (ArC-*m*), 127.9 (ArC-*o*), 126.5 (C-1), 115.0 (C-4), 112.5 (C-2), 60.0 (CH₂O-3), 50.3 (C-14), 48.1 (C-13), 43.9 (C-9), 38.2 (C-8), 35.9 (C-16), 31.5 (C-12), 29.6 (C-6), 26.4 (C-7), 25.9 (C-11), 21.6 (C-15), 13.9 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (m/z) calc. para C₂₇H₂₉N₃O₂S [M+H]⁺: 459.1980.

5.2.7.2. 3-[(5'-(*p*-Tolilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ono (11b)

Se utilizó isotiocianato de *p*-tolilfenilo (87.14 mg, 0.58 mmol) y la reacción tuvo lugar durante 3 h. Espuma incolora. Rendimiento 92%; $[\alpha]_D^{20} +68$ (c 1.89, CH₂Cl₂); IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3461 (N-H), 3044 (=C-H Ar), 1735 (C=O cetona), 1606, 1578 (C=C Ar), 1496 (N-H), 1232, 1053 (CH₂-O), 1191 (C-CO-C cetona), 816, 782 (=C-H oop). ^1H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.30 (m, 2H, ArH-3''), 7.23 (m, 2H, ArH-2''), 7.12 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, H-1), 6.79 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.0$ Hz, $J_{2,4} = 2.5$ Hz, H-2), 6.73 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.5$ Hz, H-4), 4.89 (s, 2H, CH₂O-3), 2.88 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.51 (dd, 1H, $J_{16a,16b} = 19.1$ Hz, $J_{16a,15} = 8.7$ Hz, $J_{16a,15} \approx 0$ Hz, H-16a), 2.38 (m, 1H, H-11a), 2.33 (4-CH₃C₆H₄NH), 2.24 (m, 1H, H-9), 2.14 (dt, 1H, $J_{16b,16a} = J_{16b,15a} = J_{16b,15b} = 9.0$ Hz, H-16b), 2.07 (m, 1H, H-15a), 2.00 (m, 1H, H-7a), 1.93 (m, 1H, H-12a), 1.63 (m, 1H, H-15b), 1.56 (m, 1H, H-8), 1.51 (m, 1H, H-14), 1.50 (m, 1H, H-11b), 1.47 (m, 1H, H-12b), 1.42 (m, 1H, H-7b), 1.25 (s, 1H, 4-CH₃C₆H₄NHCSN), 0.89 (s, 3H, H-18) ppm. ^{13}C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 221.1 (C-17), 155.2 (NHCSN), 155.2 (C-3), 149.6 (NSCCH₂O-3), 140.4 (C-10), 138.0 (C-5), 133.5 (ArC-1''), 130.2 (ArC-3''), 130.1 (ArC-4''), 127.4 (ArC-2''), 126.4 (C-1), 115.0 (C-4), 112.5 (C-2), 60.0 (CH₂O-3), 50.3 (C-14), 48.0 (C-13), 43.9 (C-9), 38.1 (C-8), 35.8 (C-16), 31.5 (C-12), 29.6 (C-6), 26.4 (C-7), 25.8 (C-11), 21.5 (C-15), 21.3 (4-CH₃C₆H₄NH), 13.8 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (m/z) calc. para C₂₈H₃₁N₃O₂S [M+H]⁺: 473.2137.

5.2.7.3. 3-[(5'-(*p*-Metoxifenilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11c)

Se utilizó isotiocianato de *p*-metoxifenilo (113 mg, 0.66 mmol) y la reacción tuvo lugar durante 3.15 h. Espuma incolora. Rendimiento 95%; $[\alpha]_D^{20} +68$ (c 0.73, CH₂Cl₂); IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3452 (N-H), 3038 (=C-H Ar), 1735 (C=O cetona), 1610, 1580 (C=C Ar), 1491 (N-H), 1247, 1017 (CH₂-O), 1167 (C-CO-

C cetona), 831, 782 (=C-H oop). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.28 (m, 2H, ArH-2''), 7.13 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.7$ Hz, H-1), 6.98 (m, 2H, ArH-3''), 6.61 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.6$ Hz, $J_{2,4} = 2.5$ Hz, H-2), 6.53 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.4$ Hz, H-4), 4.82 (s, 2H, CH_2O -3), 3.81 (s, 3H, 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{NH}$), 2.81 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.48 (dd, 1H, $J_{16a,16b} = 19.1$ Hz, $J_{16a,15} = 8.7$ Hz, $J_{16a,15} \approx 0$ Hz, H-16a), 2.33 (m, 1H, H-11a), 2.19 (m, 1H, H-9), 2.12 (dt, 1H, $J_{16b,16a} = J_{16b,15a} = J_{16b,15b} = 8.6$ Hz, H-16b), 2.02 (m, 1H, H-15a), 1.95 (m, 1H, H-7a), 1.91 (m, 1H, H-12a), 1.59 (m, 1H, H-15b), 1.53 (m, 1H, H-8), 1.48 (m, 1H, H-14), 1.47 (m, 1H, H-11b), 1.44 (m, 1H, H-12b), 1.38 (m, 1H, H-7b), 1.23 (s, 1H, 4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{NHCSN}$), 0.88 (s, 3H, H-18) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 221.1 (C-17), 160.5 (ArC-4''), 155.1 (NHCSN), 155.1 (C-3), 148.9 (NSCCH₂O-3), 137.9 (C-10), 133.5 (C-5), 128.9 (ArC-2''), 126.4 (C-1), 125.3 (ArC-1''), 114.9 (C-4), 114.6 (ArC-3''), 112.4 (C-2), 59.9 (CH_2O -3), 55.5 (4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{NH}$), 50.3 (C-14), 48.0 (C-13), 43.8 (C-9), 38.1 (C-8), 35.8 (C-16), 31.4 (C-12), 29.5 (C-6), 26.3 (C-7), 25.7 (C-11), 21.5 (C-15), 13.7 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (m/z) calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 489.2164, observado 490.2197 $[\text{M}+1]^+$.

5.2.7.4. 3-[(5'-*p*-Clorofenilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il]metoxijestra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11d)

Se utilizó isotiocianato de *p*-clorofenilo (99.07 mg, 0.58 mmol) y la reacción tuvo lugar durante 3.30 h. Espuma incolora. Rendimiento 93%; $[\alpha]_D^{20} +51$ (c 2.25, CH_2Cl_2); IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3482 (N-H), 3059 (=C-H Ar), 1737 (C=O cetona), 1610, 1575 (C=C Ar), 1496 (N-H), 1252, 1071 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 1228 (C-CO-C cetona), 814, 779 (=C-H oop). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.28 (m, 2H, ArH-2''), 7.47 (m, 2H, ArH-3''), 7.16 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, H-1), 6.61 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.6$ Hz, $J_{2,4} = 2.7$ Hz, H-2), 6.53 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.7$ Hz, H-4), 4.95 (s, 2H, CH_2O -3), 2.85 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.50 (dd, 1H, $J_{16a,16b} = 19.1$ Hz, $J_{16a,15} = 8.5$ Hz, $J_{16a,15} \approx 0$ Hz, H-16a), 2.37 (m, 1H, H-11a), 2.23 (m, 1H, H-9), 2.14 (ddd, 1H, $J_{16a,16b} = 18.9$ Hz, $J_{16b,15a} = 11.1$ Hz, $J_{16b,15b} = 6.1$ Hz, H-16b), 2.05 (m, 1H, H-15a), 1.99 (m, 1H, H-7a), 1.95 (m, 1H, H-12a), 1.63 (m, 1H, H-15b), 1.56 (m, 1H, H-8), 1.51 (m, 1H, H-14), 1.50 (m, 1H, H-11b), 1.48 (m, 1H, H-12b), 1.41 (m, 1H, H-7b), 1.26 (s, 1H, 4- $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{NHCSN}$), 0.90 (s, 3H, H-18) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 221.0 (C-17), 155.0 (NHCSN), 155.0 (C-3), 150.6 (NSCCH₂O-3), 138.1 136.4 (ArC-1''), (C-10), 133.7 (C-5), 131.2 (ArC-4''), 129.8 (ArC-3''), 129.05 (ArC-2''), 126.5 (C-1), 114.7 (C-4), 112.3 (C-2), 59.9 (CH_2O -3), 50.3 (C-14), 48.0 (C-13), 43.8 (C-9), 38.1 (C-8), 35.8 (C-16), 31.5 (C-12), 29.5 (C-6), 26.4 (C-7), 25.8 (C-11), 21.5 (C-15), 13.8 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (m/z) calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 493.1591.

5.2.7.5. 3-[(5'-(*p*-Fluorofenilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11e)

Se utilizó isotiocianato de *p*-fluorofenilo (89.45 mg, 0.58 mmol) y la reacción tuvo lugar durante 3.5 h. Espuma incolora. Rendimiento 94%; $[\alpha]_D^{20} +71$ (c 3.01, CH₂Cl₂); IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3426 (N-H), 3020 (=C-H Ar), 1726 (C=O cetona), 1597, 1567 (C=C Ar), 1508 (N-H), 1213, 1006 (CH₂-O), 1150 (C-CO-C cetona), 816, 777 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.42 (m, 2H, ArH-2''), 7.19 (m, 2H, ArH-3''), 7.15 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.7$ Hz, H-1), 6.60 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.6$ Hz, $J_{2,4} = 2.6$ Hz, H-2), 6.54 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.6$ Hz, H-4), 4.89 (s, 2H, CH₂O-3), 2.84 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.52 (dd, 1H, $J_{16a,16b} = 19.2$ Hz, $J_{16a,15} = 8.6$ Hz, $J_{16a,15} \approx 0$ Hz, H-16a), 2.34 (m, 1H, H-11a), 2.20 (m, 1H, H-9), 2.15 (dt, 1H, $J_{16b,16a} = J_{16b,15a} = J_{16b,15b} = 8.6$ Hz, H-16b), 2.04 (m, 1H, H-15a), 1.99 (m, 1H, H-7a), 1.94 (m, 1H, H-12a), 1.61 (m, 1H, H-15b), 1.55 (m, 1H, H-8), 1.50 (m, 1H, H-14), 1.48 (m, 1H, H-11b), 1.46 (m, 1H, H-12b), 1.39 (m, 1H, H-7b), 1.26 (s, 1H, 4-FC₆H₄NHCSN), 0.90 (s, 3H, H-18) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 221.3 (C-17), 163.9-161.9 (d, $J_{C,F} = 251.1$ Hz, ArC-4''), 154.9 (NHCSN), 154.9 (C-3), 148.6 (NSCCH₂O-3), 137.9 (C-10), 133.7 (C-5), 129.8-129.7 (d, $J_{C,F} = 9.0$ Hz, ArC-2''), 128.7-128.6 (d, $J_{C,F} = 3.1$ Hz, ArC-1''), 126.4 (C-1), 116.7-116.5 (d, $J_{C,F} = 23.1$ Hz, ArC-3''), 114.7 (C-4), 112.2 (C-2), 59.8 (CH₂O-3), 50.1 (C-14), 48.0 (C-13), 43.7 (C-9), 38.0 (C-8), 35.8 (C-16), 31.3 (C-12), 29.4 (C-6), 26.2 (C-7), 25.7 (C-11), 21.4 (C-15), 13.7 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (*m/z*) calc. para C₂₇H₂₈FN₃O₂S [M+H]⁺: 477.1886.

5.2.7.6. 3-[(5'-(Ciclohexilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11f)

Se utilizó isotiocianato de ciclohexilo (46.76 mg, 0.33 mmol) y la reacción tuvo lugar durante 4 h. Espuma incolora. Rendimiento 85%; $[\alpha]_D^{20} +73$ (c 1.65, CH₂Cl₂); IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3463 (N-H), 3163 (=C-H Ar), 1732 (C=O cetona), 1606, 1577 (C=C Ar), 1495 (N-H), 1234, 1004 (CH₂-O), 1150 (C-CO-C cetona), 816, 782 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.23 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, H-1), 6.78 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.6$ Hz, $J_{2,4} = 2.8$ Hz, H-2), 6.71 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.8$ Hz, H-4), 5.08 (s, 2H, CH₂O-3), 4.61 (m, 1H, CH), 2.90 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.51 (dd, 1H, $J_{16a,16b} = 19.0$ Hz, $J_{16a,15} = 8.6$ Hz, $J_{16a,15} \approx 0$ Hz, H-16a), 2.39 (m, 1H, H-11a), 2.26 (m, 2H, CH₂), 2.24 (m, 1H, H-9), 2.15 (dt, 1H, $J_{16b,16a} = J_{16b,15a} = J_{16b,15b} = 8.6$ Hz, H-16b), 2.05 (m, 1H, H-15a), 2.02 (m, 1H, H-7a), 1.96 (m, 1H, H-12a), 1.92 (m, 2H, CH₂), 1.89 (m, 2H, CH₂), 1.70 (m, 2H, CH₂), 1.62 (m, 1H, H-15b), 1.58 (m, 1H, H-8), 1.51 (m, 1H, H-14), 1.49 (m, 1H, H-11b), 1.47 (m, 1H, H-12b), 1.44 (m, 1H, H-7b), 1.42 (m, 2H, CH₂), 1.25 (s, 1H,

C₆H₁₁NHCSN), 1.21 (m, 2H, CH₂), 0.90 (s, 3H, H-18) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ: 221.1 (C-17), 154.9 (NHCSN), 154.9 (C-3), 148.1 (NSCCH₂O-3), 138.2 (C-10), 133.7 (C-5), 126.7 (C-1), 114.7 (C-4), 112.3 (C-2), 60.7 (CH₂O-3), 58.14 (CH), 50.3 (C-14), 48.0 (C-13), 43.9 (C-9), 38.1 (C-8), 35.8 (C-16), 31.5 (C-12), 29.8 (CH₂), 29.6 (C-6), 26.4 (C-7), 25.9 (C-11), 25.8 (CH₂), 25.0 (CH₂), 21.5 (C-15), 13.8 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (*m/z*) calc. para C₂₇H₃₅N₃O₂S [M+H]⁺: 365.2450.

5.2.7.7. 3-[(5'-(Butilamino)[1.3.4]tiadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11g)

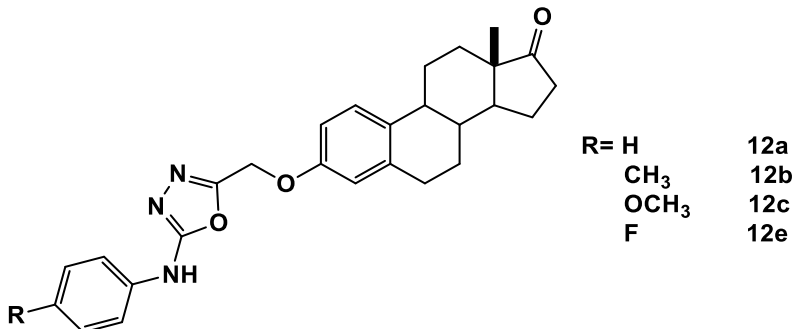
Se utilizó isotiocianato de butilo (100.92 mg, 0.88 mmol) y la reacción tuvo lugar durante 4 h. Espuma incolora. Rendimiento 86%; [α]_D²⁰ +72 (c 0.94, CH₂Cl₂); IR (*v*_{max}/cm⁻¹): 3426 (N-H), 3029 (=C-H Ar), 1732 (C=O cetona), 1603, 1573 (C=C Ar), 1489 (N-H), 1215, 1027 (CH₂-O), 1150 (C-CO-C cetona), 809, 777 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.21 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.7 Hz, H-1), 6.77 (dd, 1H, *J*_{2,1} = 8.7 Hz, *J*_{2,4} = 2.6 Hz, H-2), 6.71 (d, 1H, *J*_{4,2} = 2.6 Hz, H-4), 5.10 (s, 2H, CH₂O-3), 4.06 (m, 2H, CH₂NH), 2.88 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.50 (dd, 1H, *J*_{16a,16b} = 19.1 Hz, *J*_{16a,15} = 8.7 Hz, *J*_{16a,15} ≈ 0 Hz, H-16a), 2.36 (m, 1H, H-11a), 2.23 (td, 1H, *J*_{9,8} = *J*_{9,11} = 10.8 Hz, *J*_{9,11} = 4.5 Hz, H-9), 2.15 (ddd, 1H, *J*_{16b,16a} = 19.1 Hz, *J*_{16b,15} = 9.1 Hz, *J*_{16b,15} = 8.7 Hz, H-16b), 2.04 (m, 1H, H-15a), 2.00 (m, 1H, H-7a), 1.94 (m, 1H, H-12a), 1.62 (m, 1H, H-15b), 1.59 (m, 1H, H-8), 1.50 (m, 1H, H-14), 1.49 (m, 1H, H-11b), 1.46 (m, 1H, H-12b), 1.40 (m, 1H, H-7b), 1.38 (m, 2H, CH₂CH₂NHCSN), 1.24 (s, 1H, CH₂NHCSN), 0.94 (t, 3H, *J*_{CH₃,CH₂} = 7.2 Hz, CH₃CH₂CH₂CH₂NHCSN), 0.90 (s, 3H, H-18), 0.86 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂CH₂NHCSN) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ: 221.1 (C-17), 155.0 (NHCSN), 155.0 (C-3), 148.7 (NSCCH₂O-3), 138.2 (C-10), 133.6 (C-5), 126.6 (C-1), 114.6 (C-4), 112.1 (C-2), 60.2 (CH₂O-3), 50.2 (C-14), 47.9 (C-13), 44.6 (CH₂NHCSN), 43.8 (C-9), 38.1 (C-8), 35.8 (C-16), 31.4 (C-12), 29.5 (C-6), 26.3 (C-7), 25.7 (C-11), 21.5 (C-15), 19.9 (CH₂CH₂NHCSN), 14.0 (CH₃CH₂CH₂CH₂NHCSN), 13.7 (C-18), 13.6 (CH₃CH₂CH₂CH₂NHCSN) ppm. HRMS-FAB: (*m/z*) calc. para C₂₅H₃₃N₃O₂S [M+H]⁺: 439.2293.

5.2.7.8. 3-[5'-(Propilamino)-1,3,4-tiadiazol]metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (11h)

Se utilizó isotiocianato de propilo (59.08 mg, 0.58 mmol) y la reacción tuvo lugar durante 4.5 h. Espuma incolora. Rendimiento 88%; [α]_D²⁰ +83 (c 0.82, CH₂Cl₂); IR (*v*_{max}/cm⁻¹): 3422 (N-H), 3023 (=C-H Ar), 1729 (C=O cetona), 1605, 1573 (C=C Ar), 1491 (N-H), 1226, 1030 (CH₂-O), 1144 (C-CO-

C cetona), 803, 760 (=C-H oop). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.22 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, H-1), 6.78 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.6$ Hz, $J_{2,4} = 2.7$ Hz, H-2), 6.71 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.7$ Hz, H-4), 5.08 (s, 2H, CH_2O -3), 4.04 (m, 2H, CH_2NH), 2.88 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.51 (dd, 1H, $J_{16a,16b} = 19.1$ Hz, $J_{16a,15} = 8.6$ Hz, $J_{16a,15} \approx 0$ Hz, H-16a), 2.38 (m, 1H, H-11a), 2.24 (m, 1H, H-9), 2.15 (ddd, 1H, $J_{16b,16a} = 19.1$ Hz, $J_{16b,15} = 9.3$ Hz, $J_{16b,15} = 8.6$ Hz, H-16b), 2.02 (m, 1H, H-15a), 2.01 (m, 1H, H-7a), 1.95 (m, 1H, H-12a), 1.86 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCSN}$), 1.61 (m, 1H, H-15b), 1.54 (m, 1H, H-8), 1.50 (m, 1H, H-14), 1.49 (m, 1H, H-11b), 1.47 (m, 1H, H-12b), 1.41 (m, 1H, H-7b), 1.25 (s, 1H, CH_2NHCSN), 0.98 (t, 3H, $J_{\text{CH}_3, \text{CH}_2} = 8.4$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCSN}$), 0.90 (s, 3H, H-18) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 221.1 (C-17), 155.0 (NHCSN), 155.0 (C-3), 148.3 (NSC CH_2O -3), 138.2 (C-10), 133.7 (C-5), 126.6 (C-1), 114.6 (C-4), 112.1 (C-2), 60.2 (CH_2O -3), 50.3 (C-14), 47.9 (C-13), 46.2 (CH_2NHCSN), 43.8 (C-9), 38.1 (C-8), 35.8 (C-16), 31.4 (C-12), 29.6 (C-6), 26.3 (C-7), 25.8 (C-11), 21.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCSN}$), 21.5 (C-15), 13.8 (C-18), 11.1 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCSN}$) ppm. HRMS-FAB: (m/z) calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 439.2137.

5.2.8. Procedimiento general para la preparación de las 1,3,4-oxadiazoles esteroidales (12a-c,e)



Se añadió cloruro de *p*-tosilo (3.5 eq) a una solución de **10a-c,e** (1 eq.), y piridina (3 eq) en 5 ml de THF. La mezcla se agitó a reflujo durante el tiempo indicado en cada caso. La mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (3x15 ml), y la fase orgánica se lava con salmuera (3x15 ml), H_2O (2x15 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (85:15 Hex/AcOEt).

5.2.8.1. 3-[(5'-(Fenilamino)[1.3.4]oxadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (12a)

Se utilizó **10a** (200 mg, 0.38 mmol), cloruro de *p*-tosilo (255.76 mg, 1.34 mmol) y Py (0.1 ml, 1.15 mmol), la reacción tuvo lugar durante 3 h. Espuma incolora. Rendimiento 88%; $[\alpha]_D^{20} +72$ (c 0.82, CH₂Cl₂); IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3260 (N-H), 3098 (=C-H Ar), 1718 (C=O cetona), 1620, 157 (C=C Ar), 1489 (N-H), 1211, 1002 (CH₂-O), 1137 (C-CO-C cetona), 810, 723 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.60 (s, 1H, PhNHCSN), 7.47 (m, 2H, ArH-*o*), 7.35 (m, 2H, ArH-*m*), 7.20 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, H-1), 7.08 (m, 1H, ArH-*p*), 6.82 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.6$ Hz, $J_{2,4} = 2.6$ Hz, H-2), 6.76 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.6$ Hz, H-4), 5.15 (s, 2H, CH₂O-3), 2.89 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.51 (dd, $J_{16a,16b} = 19.1$ Hz, 1H, $J_{16a,15} = 8.7$ Hz, $J_{16a,15} \approx 0$ Hz, H-16a), 2.35 (m, 1H, H-11a), 2.21 (m, 1H, H-9), 2.15 (ddd, 1H, $J_{16b,16a} = 19.1$ Hz, $J_{16b,15} = 9.1$ Hz, $J_{16b,15} = 8.7$ Hz, H-16b), 2.04 (m, 1H, H-15a), 1.98 (m, 1H, H-7a), 1.94 (m, 1H, H-12a), 1.62 (m, 1H, H-15b), 1.55 (m, 1H, H-8), 1.50 (m, 1H, H-14), 1.48 (m, 1H, H-11b), 1.46 (m, 1H, H-12b), 1.42 (m, 1H, H-7b), 0.90 (s, 3H, H-18) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 221.1 (C-17), 161.1 (NHCON), 155.5 (C-3), 156.4 (NOCCH₂O-3), 138.1 (C-10), 137.5 (ArC-*ipso*), 133.5 (C-5), 129.4 (ArC-*m*), 126.6 (C-1), 123.2 (ArC-*p*), 117.7 (ArC-*o*), 114.9 (C-4), 112.4 (C-2), 60.0 (CH₂O-3), 50.3 (C-14), 48.0 (C-13), 43.9 (C-9), 38.2 (C-8), 35.8 (C-16), 31.5 (C-12), 29.6 (C-6), 26.4 (C-7), 25.8 (C-11), 21.5 (C-15), 13.8 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (m/z) calc. para C₂₇H₂₉N₃O₃ [M+H]⁺: 443.5470.

5.2.8.2. 3-[(5'-(*p*-Tolilamino)[1.3.4]oxadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ono (12b)

Se utilizó **10b** (200 mg, 0.37 mmol), cloruro de *p*-tosilo (249.09 mg, 1.31 mmol) y Py (0.1 ml, 1.12 mmol), la reacción tuvo lugar durante 4 h. Espuma incolora. Rendimiento 87 %; $[\alpha]_D^{20} +81$ (c 0.91, CH₂Cl₂); IR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3281 (N-H), 3021 (=C-H Ar), 1722 (C=O cetona), 1610, 1573 (C=C Ar), 1493 (N-H), 1230, 1029 (CH₂-O), 1170 (C-CO-C cetona), 814, 764 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.60 (s, 1H, 4-CH₃C₆H₄NHCSN), 7.34 (m, 2H, ArH-2''), 7.19 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, H-1), 7.13 (m, 2H, ArH-3''), 6.81 (dd, $J_{2,1} = 8.5$ Hz, $J_{2,4} = 2.9$ Hz, 1H, H-2), 6.75 (d, $J_{4,2} = 2.9$ Hz, 1H, H-4), 5.13 (s, 2H, CH₂O-3), 2.87 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.50 (dd, $J_{16a,16b} = 19.1$ Hz, $J_{16a,15} = 8.7$ Hz, $J_{16a,15} \approx 0$ Hz, 1H, H-16a), 2.35 (m, 1H, H-11a), 2.31 (4-CH₃C₆H₄NH), 2.20 (m, 1H, H-9), 2.14 (dt, $J_{16b,16a} = 19.1$ Hz, $J_{16b,15a} = J_{16b,15b} = 8.6$ Hz, 1H, H-16b), 2.03 (m, 1H, H-15a), 1.99 (m, 1H, H-7a), 1.92 (m, 1H, H-12a), 1.60 (m, 1H, H-15b), 1.54 (m, 1H, H-8), 1.49 (m, 1H, H-14), 1.47 (m, 1H, H-11b), 1.45 (m, 1H, H-12b), 1.39 (m, 1H, H-7b), 0.90 (s, 3H, H-18) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 221.2 (C-17), 16.26

(NHCON), 155.5 (C-3), 156.2 (NOCCH₂O-3), 138.1 (C-10), 134.8 (ArC-1''), 133.5 (C-5), 132.7 (ArC-4''), 129.8 (ArC-3''), 126.5 (C-1), 117.8 (ArC-2''), 114.8 (C-4), 112.4 (C-2), 60.0 (CH₂O-3), 50.3 (C-14), 48.0 (C-13), 43.9 (C-9), 38.1 (C-8), 35.8 (C-16), 31.5 (C-12), 29.5 (C-6), 26.4 (C-7), 25.8 (C-11), 21.5 (C-15), 20.7 (4-CH₃C₆H₄NH), 13.8 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (*m/z*) calc. para C₂₈H₃₁N₃O₃ [M+H]⁺: 457.2365.

5.2.8.3. 3-[(5'-(*p*-Metoxifenilamino)[1.3.4]oxadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (12c)

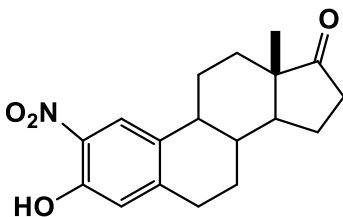
Se utilizó **10c** (300 mg, 0.54 mmol), cloruro de *p*-tosilo (362.79 mg, 1.90 mmol) y Py (0.1 ml, 1.63 mmol), la reacción tuvo lugar durante 4 h. Espuma incolora. Rendimiento 89%; [α]_D²⁰ +59 (c 0.60, CH₂Cl₂); IR (ν_{\max} /cm⁻¹): 3267 (N-H), 3038 (=C-H Ar), 1718 (C=O cetona), 1621, 1575 (C=C Ar), 1495 (N-H), 1228, 1025 (CH₂-O), 1153 (C-CO-C cetona), 820, 721 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.81 (s, 1H, 4-CH₃C₆H₄NHCSN), 7.37 (m, 2H, ArH-2''), 7.18 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.6 Hz, H-1), 6.87 (m, 2H, ArH-3''), 6.80 (dd, 1H, *J*_{2,1} = 8.6 Hz, *J*_{2,4} = 2.6 Hz, H-2), 6.74 (d, 1H, *J*_{4,2} = 2.6 Hz, H-4), 5.11 (s, 2H, CH₂O-3), 3.78 (s, 3H, 4-CH₃OC₆H₄NH), 2.87 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.50 (dd, 1H, *J*_{16a,16b} = 19.1 Hz, *J*_{16a,15} = 8.7 Hz, *J*_{16a,15} \approx 0 Hz, H-16a), 2.35 (m, 1H, H-11a), 2.20 (m, 1H, H-9), 2.14 (dt, 1H, *J*_{16b,16a} = 19.1 Hz, *J*_{16b,15a} = *J*_{16b,15b} = 8.9 Hz, H-16b), 2.04 (m, 1H, H-15a), 1.98 (m, 1H, H-7a), 1.93 (m, 1H, H-12a), 1.60 (m, 1H, H-15b), 1.55 (m, 1H, H-8), 1.48 (m, 1H, H-14), 1.47 (m, 1H, H-11b), 1.46 (m, 1H, H-12b), 1.39 (m, 1H, H-7b), 0.89 (s, 3H, H-18) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 221.2 (C-17), 161.6 (NHCON), 155.7 (ArC-4''), 155.5 (C-3), 156.1 (NOCCH₂O-3), 138.0 (C-10), 133.4 (C-5), 130.8 (ArC-1''), 126.5 (C-1), 119.8 (ArC-3''), 114.8 (C-4), 128.5 (ArC-2''), 112.4 (C-2), 59.8 (CH₂O-3), 55.5 (4-CH₃OC₆H₄NH), 50.3 (C-14), 48.0 (C-13), 43.8 (C-9), 38.1 (C-8), 35.8 (C-16), 31.4 (C-12), 29.5 (C-6), 26.3 (C-7), 25.7 (C-11), 21.5 (C-15), 13.7 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (*m/z*) calc. para C₂₈H₃₁N₃O₄ [M+H]⁺: 473.2315.

5.2.8.4. 3-[(5'-(*p*-Fluorofenilamino)[1.3.4]oxadiazol-2'-il)metoxi]estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (12e)

Se utilizó **10e** (244.7 mg, 0.45 mmol), cloruro de *p*-tosilo (302.54 mg, 1.59 mmol) y Py (0.1 ml, 1.36 mmol), la reacción tuvo lugar durante 3.5 h. Espuma incolora. Rendimiento 88%; [α]_D²⁰ +67 (c 0.80, CH₂Cl₂); IR (ν_{\max} /cm⁻¹): 3267 (N-H), 3061 (=C-H Ar), 1721 (C=O cetona), 1625, 1577 (C=C Ar), 1496 (N-H), 1211, 1030 (CH₂-O), 1159 (C-CO-C cetona), 829, 723 (=C-H oop). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃)

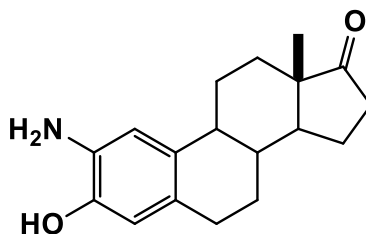
δ : 8.73 (s, 1H, 4-FC₆H₄NHCSN), 7.43 (m, 2H, ArH-2''), 7.20 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, H-1), 7.04 (m, 2H, ArH-3''), 6.81 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.6$ Hz, $J_{2,4} = 2.8$ Hz, H-2), 6.75 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.8$ Hz, H-4), 5.14 (s, 2H, CH₂O-3), 2.88 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.51 (ddd, 1H, $J_{16a,16b} = 19.2$ Hz, $J_{16a,15} = 8.8$ Hz, $J_{16a,15} = 0.7$ Hz, H-16a), 2.36 (m, 1H, H-11a), 2.21 (m, 1H, H-9), 2.15 (dt, 1H, $J_{16b,16a} = 19.2$ Hz, $J_{16b,15a} = J_{16b,15b} = 8.9$ Hz, H-16b), 2.04 (m, 1H, H-15a), 1.99 (m, 1H, H-7a), 1.93 (m, 1H, H-12a), 1.61 (m, 1H, H-15b), 1.55 (m, 1H, H-8), 1.49 (m, 1H, H-14), 1.47 (m, 1H, H-11b), 1.46 (m, 1H, H-12b), 1.40 (m, 1H, H-7b), 0.90 (s, 3H, H-18) ppm. ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 221.2 (C-17), 161.2 (NHCON), 158.8 (d, $J_{C,F} = 242.5$ Hz, ArC-4''), 156.4 (NOCCH₂O-3), 155.5 (C-3), 138.1 (C-10), 133.6 (d, $J_{C,F} = 2.2$ Hz, ArC-1''), 133.6 (C-5), 126.6 (C-1), 119.4 (d, $J_{C,F} = 7.9$ Hz, ArC-2''), 116.0 (d, $J_{C,F} = 22.8$ Hz, ArC-3''), 114.8 (C-4), 112.4 (C-2), 59.8 (CH₂O-3), 50.3 (C-14), 48.0 (C-13), 43.9 (C-9), 38.2 (C-8), 35.9 (C-16), 31.5 (C-12), 29.6 (C-6), 26.4 (C-7), 25.8 (C-11), 21.5 (C-15), 13.8 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (m/z) calc. para C₂₇H₂₈FN₃O₃ [M+H]⁺: 461.2115.

5.2.9 Obtención de 3-hidroxi-2-nitroestra-1,3,5(10)-trien-17-ona (14)



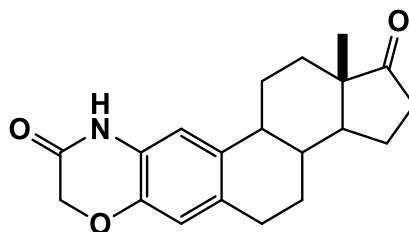
A una disolución de estrona (100 mg, 0.37 mmol, 1 eq.) en AcOH (10 ml) se añade lentamente HNO₃ (0.03 ml) en frío, finalizada la adición de deja agitar a t. a. durante 10 min. Transcurrido ese tiempo se adiciona 10 ml de NaHCO_{3(aq)} saturado y 10 ml de AcOEt se deja agitar durante 20 min. Se extrae con AcOEt (2x10 ml), la fase orgánica se lava con NaHCO_{3(aq)} saturado (3x10 ml) y H₂O (3x10 ml). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄, se filtra y el filtrado se concentra a sequedad, el residuo resultante se purifica mediante cromatografía en columna (9:1 Hex/AcOEt) se aislaron dos productos que se identificaron como 3-hidroxi-2-nitroestra-1,3,5(10)-trien-17-ona (**14**) y 3-hidroxi-2,4-dinitroestra-1,3,5(10)-trien-17-ona (**15**). Los datos espectroscópicos fueron comparados con los reportados en la literatura.³⁷ Rendimiento experimental 50 mg; 40 % de 2-nitroestra y 76 mg; 60 % de 2,4-dinitroestra.

5.2.10 Obtención de 3-metoxi-2-aminoestra-1,3,5(10)-trien-17-ona (16)



Una solución de 3-metoxi-2-nitroestrone (584 mg, 1.59 mmol) se disuelve en MeOH con un poco de CH_2Cl_2 para disolver toda la materia prima en seguida se adiciona Ra-Ni(aq) 1 ml y se coloca en una atmosfera de H_2 durante 30 min. Se filtra sobre celita y se lleva a sequedad. Los datos espectroscópicos fueron comparados con los reportados en la literatura.³⁸ Rendimiento experimental 529.8 mg; cuantitativo.

5.2.11 Obtención de la 1,4-oxazina (17).



El producto **16** (200 mg, 0.70 mmol, 1 eq.) se disolvió en DMF (5 ml) y se adiciono K_2CO_3 (154.28 mg, 1.062 mmol, 1.5 eq.) la mezcla se colocó bajo atmósfera inerte de Ar y se adición cloruro de cloroacetilo (0.1 ml, 0.70 mmol, 1 eq.). Terminada la adición se colocó a 100 °C durante 2 h, transcurrido dicho tiempo se adiciono agua (5 ml) y se extrajo con AcOEt (3x10 ml), se lavó con salmuera (3x10 ml), H_2O (3x10 ml), se secada con Na_2SO_4 y concentrada a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna (9:1 \rightarrow 85:15 Hex/AcOEt). Sólido blanco. Rendimiento 95%. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.70 (s, 1H, H-1), 6.59 (s, 1H, H-4), 4.14 (s, 2H, CH_2), 2.75 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.45 (dd, $J_{16a,16b} = 19.2$ Hz, $J_{16a,15} = 8.6$ Hz, $J_{16a,15} \approx 0$ Hz, 1H, H-16a), 2.30 (m, 1H, H-11a), 2.15 (m, 1H, H-9), 2.12 (dd, $J_{16b,16a} = 19.1$ Hz, $J_{16b,15a} = 9.1$ Hz $J_{16b,15a} \approx 0$, 1H, H-16b), 1.99 (m, 1H, H-15a), 1.92 (m, 1H, H-7a), 1.87 (m, 1H, H-12a), 1.57 (m, 1H, H-15b), 1.49 (m, 1H, H-8), 1.46 (m, 1H, H-14), 1.42 (m, 1H, H-11b), 1.40 (m, 1H, H-12b), 1.33 (m, 1H, H-7b), 0.84

(s, 3H, H-18) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ : 222.2 (C-17), 164.6 (C=O), 144.9 (C-3), 134.3 (C-10), 131.4 (C-5), 122.6 (C-2), 117.9 (C-1), 116.2 (C-4), 50.1 (C-14), 47.9 (C-13), 43.7 (C-9), 42.6 (CH_2), 38.0 (C-8), 35.8 (C-16), 31.2 (C-12), 28.8 (C-6), 26.2 (C-7), 25.7 (C-11), 21.4 (C-15), 13.6 (C-18) ppm. HRMS-FAB: (m/z) calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 325.1678.

Capítulo 1.6: Conclusiones

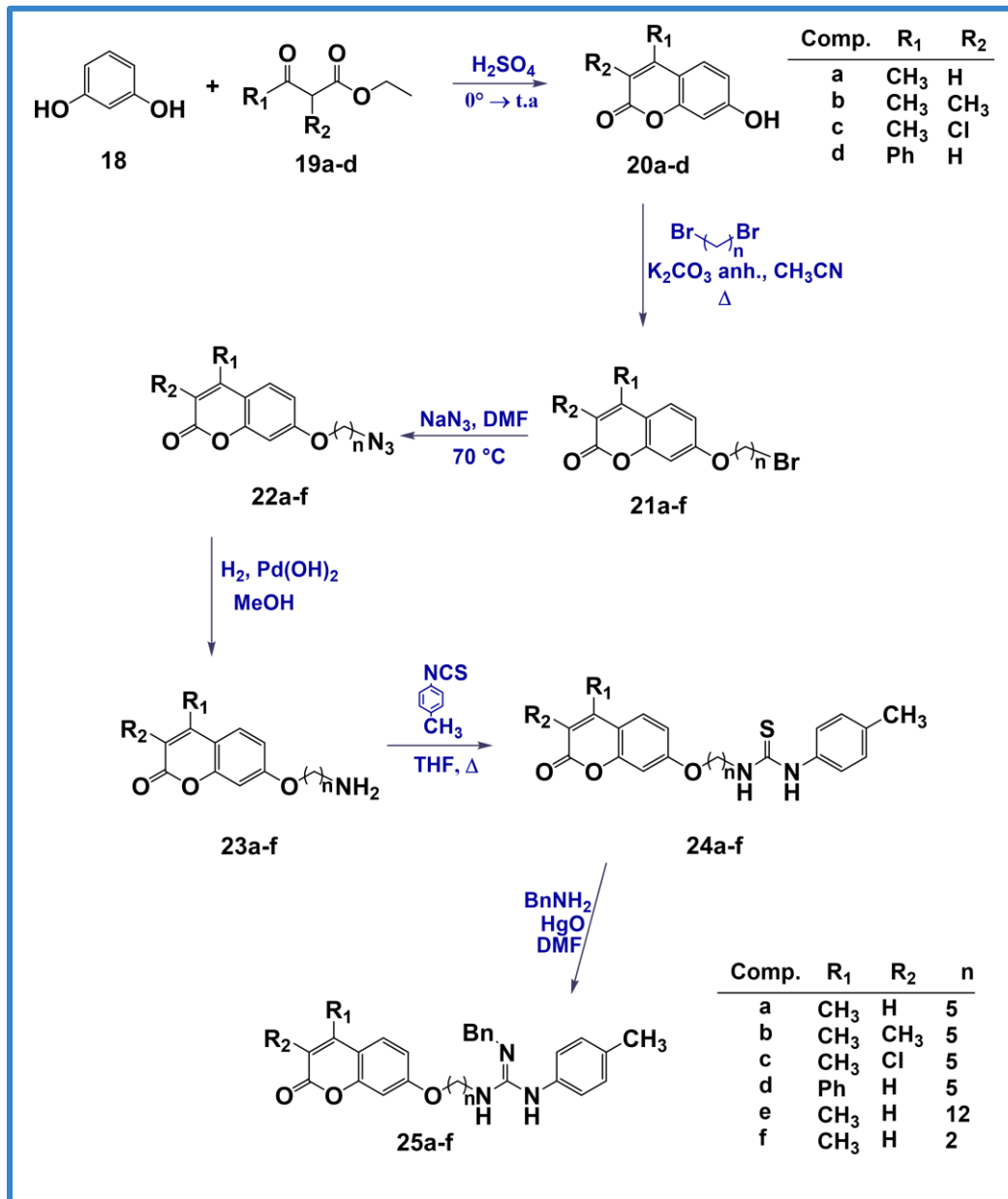
- ❖ Se desarrolló una ruta sintética de inicio que por los resultados obtenidos fue necesario su modificación.
- ❖ Modificando la ruta sintética propuesta en un inicio, se obtuvieron nuevos derivados esteroidales con heterociclos 1,3,4-tiadiazoles esteroidales (**11a-h**) en C-3 de la estrona.
- ❖ Se obtuvieron nuevos derivados 1,3,4-oxadiazoles esteroidales (**12a-c,f**) a través de los intermediarios **10a-c** y **10e** con rendimientos de 87-89 %.
- ❖ Se logró la obtención de un nuevo producto esteoidal **7** a partir de la hidrazona esteroidal en el C-17 del derivado **4**.
- ❖ Se obtuvo un nuevo derivado 1,4-oxazina esteroidal (**17**) a partir de la nitración de la estrona **1** y a su vez de la reducción del grupo nitro del derivado **14**.
- ❖ Se llevó acabo la cristalización del derivado **2** confirmando la estructura propuesta para continuar la ruta sintética que se planteó para la obtención de los derivados heterociclos 1,3,4-tiadiazoles en la posición C-3 del núcleo esteroidal.
- ❖ Se propusieron mecanismos de reacción correspondientes a los derivados obtenidos.
- ❖ La caracterización de cada compuesto se llevó a cabo debidamente utilizando técnicas espectroscópicas como RMN de ^1H , ^{13}C (DEPT, HSQC, HMBC) y espectrometría de masas; así como por métodos físicos como el punto de fusión.

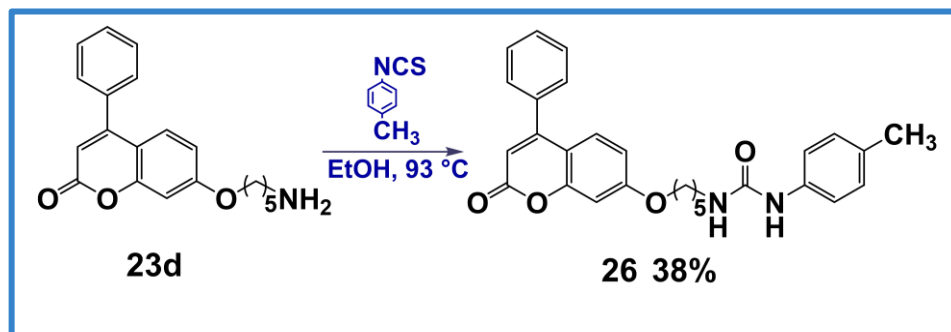
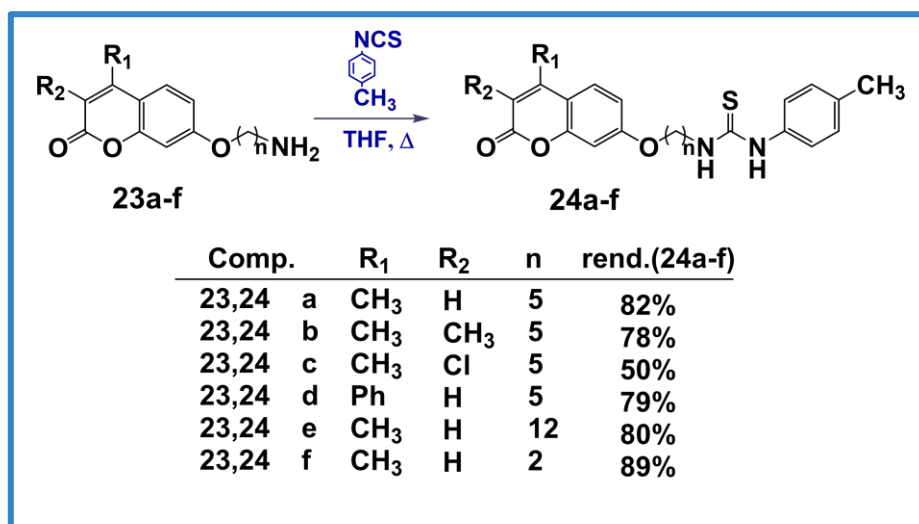
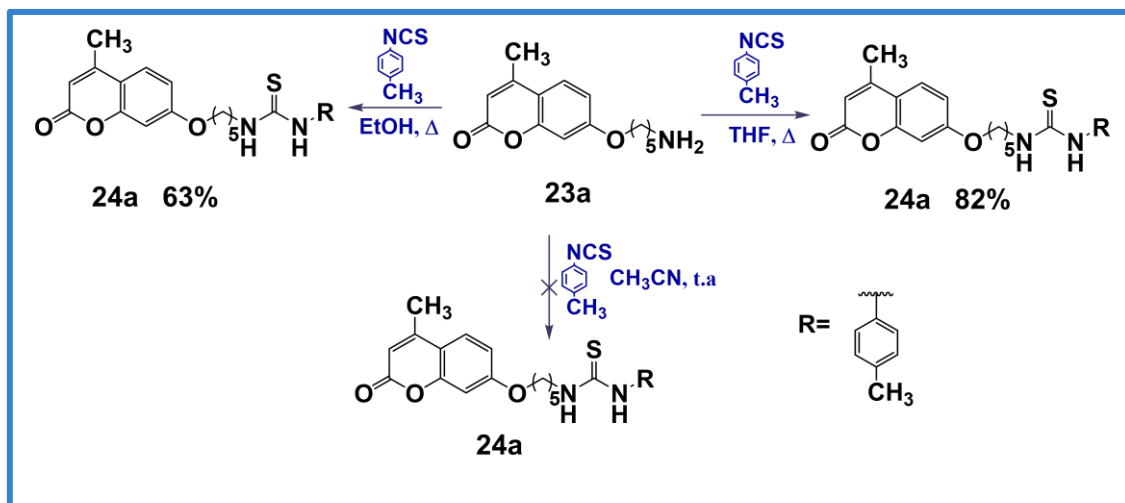


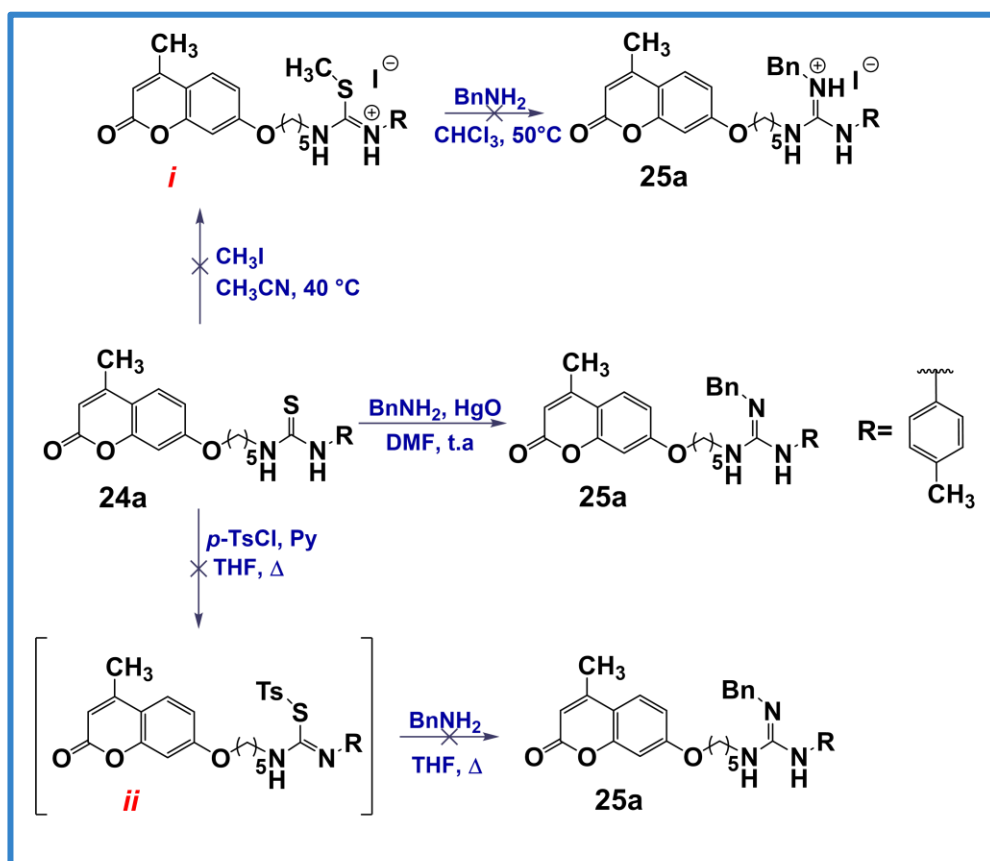
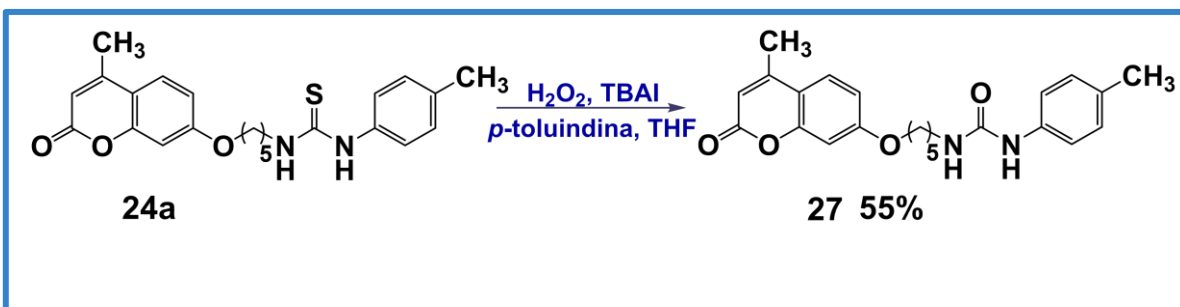
Unidad 2: Síntesis de nuevos derivados de cumarinas.

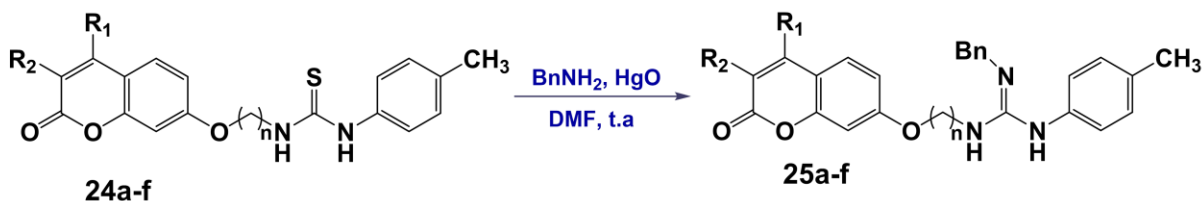


Esquemas de síntesis

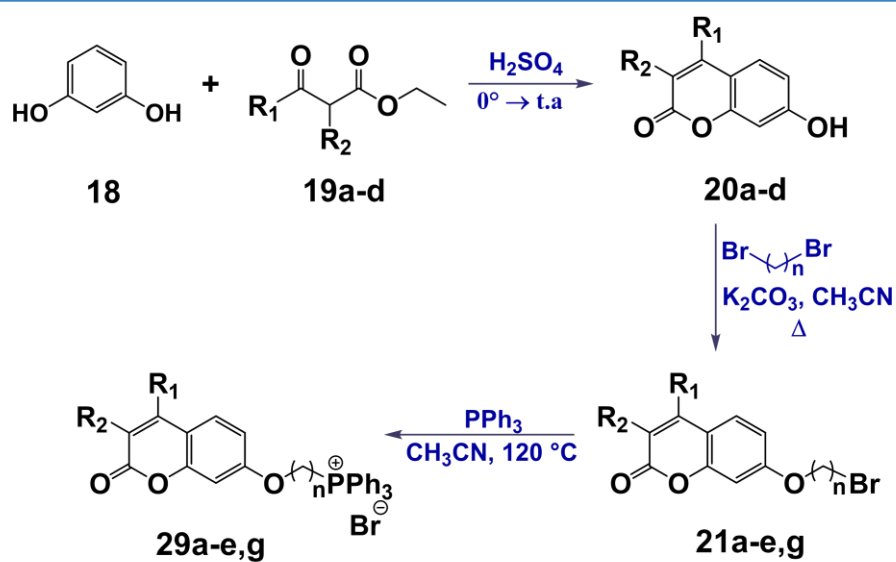




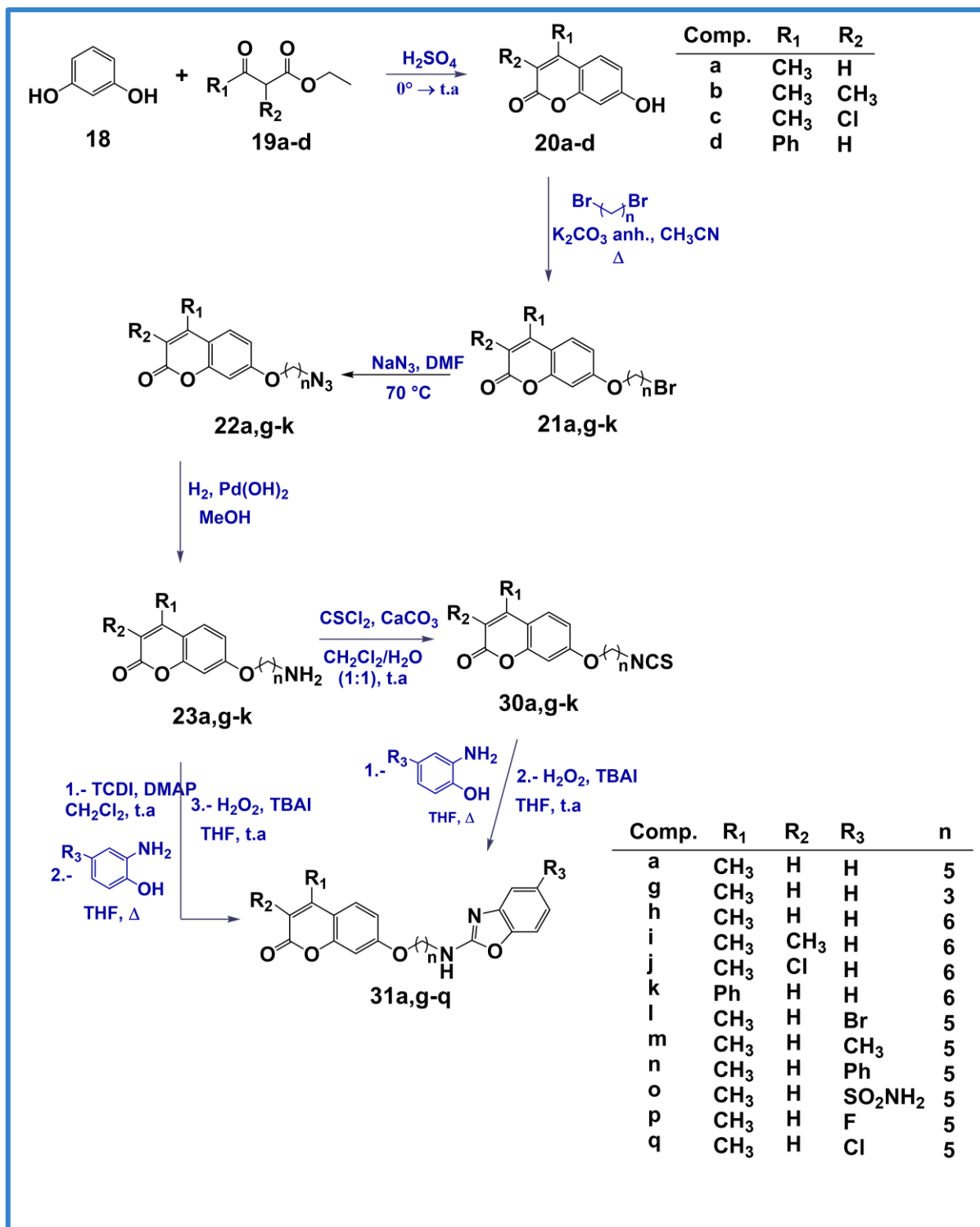


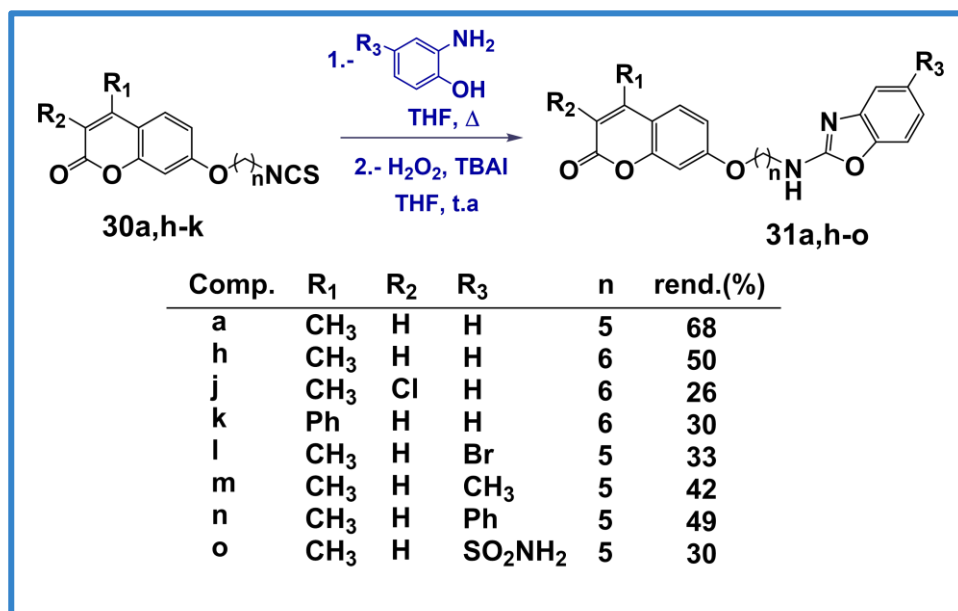
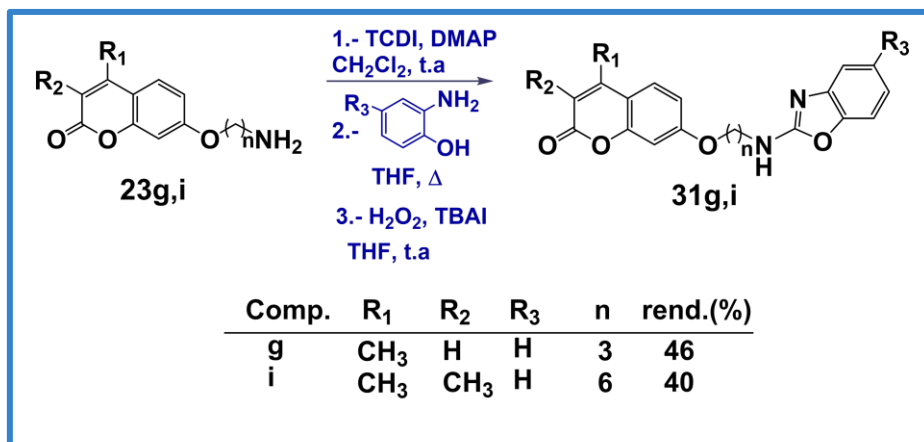


Comp.	R ₁	R ₂	n	rend.(25a-f)
24,25 a	CH ₃	H	5	83%
24,25 b	CH ₃	CH ₃	5	cuant.
24,25 c	CH ₃	Cl	5	97%
24,25 d	Ph	H	5	80%
24,25 e	CH ₃	H	12	93%
24,25 f	CH ₃	H	2	97%



Comp.	R ₁	R ₂	n	rend.(29a-e,g)
a	CH ₃	H	5	57%
b	CH ₃	CH ₃	5	98%
c	CH ₃	Cl	5	cuant.
d	Ph	H	5	92%
e	CH ₃	H	12	95%
g	CH ₃	H	3	cuant.





Capítulo 2.1: Introducción

El cáncer es un problema de salud importante en los países desarrollados donde es la segunda causa de muerte, es asociada principalmente al envejecimiento de la población y al estilo de vida. El diagnóstico temprano, el acceso universal a la atención médica y los avances en estas terapias han dado como resultado una mejora significativa de la supervivencia contra cáncer. Esta es una de las enfermedades más devastadoras en la actualidad y se caracteriza por un crecimiento incontrolado de las células.⁴⁰ El término cáncer se designa al crecimiento celular incontrolado en cualquier tejido humano y su difusión a través de los tejidos adyacentes, impidiendo su correcto funcionamiento. La complejidad de esta enfermedad es tal, que existen más de 100 tipos de cáncer distintos, dependiendo de su forma de crecimiento y propagación, así como de los síntomas que exhiben.⁴¹ Normalmente, las células siguen un proceso ordenado de división celular con el fin de formar nuevas células, sustituyendo a células normales envejecidas o dañadas. Sin embargo, en los procesos tumorales este proceso se altera, ocasionando una acumulación de células incapaces de finalizar su división, lo que puede desembocar en la formación de los denominados tumores cancerosos. Estas masas malignas, mediante un proceso conocido como metástasis, son capaces de desplazarse a distintas partes del cuerpo a través de los sistemas linfáticos y circulatorios.⁴²

La mayoría de los reportes apunta que el cáncer sigue a un proceso de varios pasos de alteraciones como: los oncogenes, los genes de microRNA y los genes supresores de tumores, son los factores esenciales para causar diferentes tipos de cáncer.⁴³ Las principales dianas terapéuticas que se pueden emplear en el diseño de agentes anticancerígenos se resumen en la Figura 2.1. Así, pueden desarrollarse fármacos que actúen sobre el metabolismo acelerado de las células tumorales, sobre mecanismos de señalización y replicación del material genético, sobre mecanismos de muerte programada (apoptosis), sistemas de vascularización (angiogénesis), sobre el transporte de nutrientes, o sobre el estrés oxidativo, entre otros.⁴⁴

⁴⁰ Urruticoechea A.; Alemany R.; Balart J.; Villanueva A.; Viñals F.; Capellá G.; *Curr. Pharm. Des.* **2010** 16, 3-10.

⁴¹ <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>. American Cancer Society. Última consulta 06/05/2021.

⁴² Narella S. G.; Shaik M. G.; Mohammed A.; Alvala M.; Angeli A; Supuran T. C.; *Bioorg Chem* **2019** 87, 765-772.

⁴³ Croce C.M.; *N. Engl. J. Med.* **2008** 358, 502-511.

⁴⁴ Franconetti A.; López Ó.; Fernandez-Bolaños J.G.; *Curr. Med. Chem.* **2018** 26, 1-34.

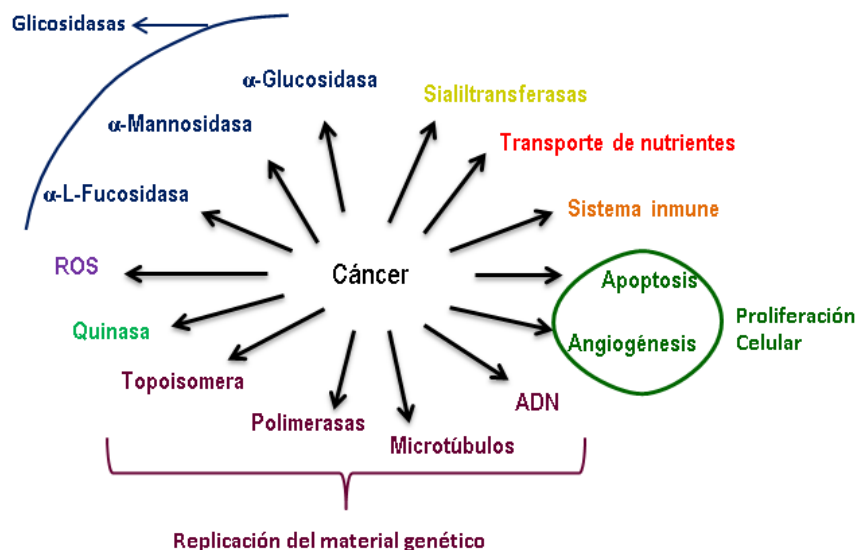


Figura 2.1. Posibles dianas terapéuticas contra el cáncer.

Las anhidrasas carbónicas (CA; EC 4.2.1.1) son metaloproteínas presentes prácticamente en todos los organismos vivos. La actividad enzimática de CA fue observada a principios de la década de 1930, cuando se realizaron experimentos con muestras de sangre hemolizada, demostrando que la tasa de liberación de dióxido de carbono de la sangre hemolizada fue mayor que lo esperado, lo que indica que la sangre podría contener un catalizador para la deshidratación de bicarbonato, que permite la formación de CO_2 .⁴⁵ Este catalizador, llamado anhidrasa carbónica, fue posteriormente extraído de los eritrocitos en 1933 por Meldrum y Roughton. Tras el descubrimiento en 1940 de que los iones de zinc son intrínsecos cofactores de la proteína, CA se convirtió en la primera metaloenzima reconocida.⁴⁶

Una reacción fisiológica crucial para la supervivencia de todos los organismos vivos, es la hidratación/deshidratación de CO_2 del metabolismo central. Es decir que la CA, son metaloenzimas esenciales que catalizan la hidratación reversible de CO_2 a iones HCO_3^- y protones.⁴⁷

Esta reacción está relacionada con numerosas vías metabólicas, como la fotosíntesis, las reacciones de carboxilación, y las vías bioquímicas, incluida la homeostasis del pH, la secreción de

⁴⁵ Akocak S.; Supuran T. C.; *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* **2019** 34, 1, 1652-1659.

⁴⁶ Meldrum N.U.; Roughton F.; *J. Physiol (Lond)* **1933** 80, 113-42.

⁴⁷ Alterio V.; Kellner M.; Esposito D.; Liesche-Starnecker F.; Bua S.; Supuran T. C.; Monti S. M.; Zeidler R.; De Simone G.; *J. Mol. Biol.* **2019** 431, 4910-4921.

electrolitos, el transporte de CO₂ y bicarbonato, la reacción biosintética (gluconeogénesis y lipogénesis), la carcinogenicidad, entre otros.⁴⁸

Las CAs, se pueden clasificar en varias familias y son enzimas que se encuentran en prácticamente en todos los organismos vivos, desde los unicelulares hasta vertebrados superiores, incluidos los humanos. Su estructura está codificada, por ocho familias de genes evolutivos no relacionados, lo que lleva a las clases α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η -, Θ - y ι -CA.⁴⁹⁻⁵¹

Los invertebrados y los organismos inferiores contienen siete miembros de las familias de genes CA y, en algunos casos, múltiples familias de genes con el mismo organismo. Por el contrario, los vertebrados y los mamíferos contienen solo α -CA (son metaloproteínas de Zn²⁺).^{52,53} Además, los miembros de cada clase poseen múltiples variantes de transcripción e isoformas de proteínas, que se caracterizan por diferentes propiedades bioquímicas y tienen localizaciones específicas de tejido/órgano y subcelular. En mamíferos, se han identificado 16 isoformas de α -CA: cinco de ellas son citosólicas (CA I, CA II, CA III, CA VII y CA XIII), cinco están unidos a la membrana (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV y CA XV), dos son mitocondriales (CA VA y CA VB), y solo una es secretada (CA VI), las últimos tres (CA VIII, CA X y CA XI) carecen de actividad catalítica y se denominan proteínas relacionadas con CA (CARPs).^{54,55}

Catalizando una reacción tan simple pero fundamental, las CAs están involucradas en muchos procesos fisiológicos; en consecuencia, sus niveles y/o actividades de expresión anormales se han asociado a diferentes enfermedades humanas, incluyendo glaucoma, ataques epilépticos, enfermedades de altitud, obesidad, dolor y cáncer.⁵ Por estas razones, las CAs representan un objetivo terapéutico interesante para el desarrollo de inhibidores o activadores con aplicaciones biomédicas.⁵⁶

⁴⁸ George R. F.; Said M. F.; Bua S.; Supuran T. C.; *Bioorg Chem* **2020** 95, 103514.

⁴⁹ Angeli A.; Pinteala M.; Maier S. S.; Del Prete S.; Capasso C.; Simionescu B. C.; Supuran T. C.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019** 34, 1, 644–650.

⁵⁰ Bilginer S.; Gonder B.; Gul H. I.; Kaya R.; Gulcin I.; Anil B.; Supuran T. C.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020** 35, 1, 325–329.

⁵¹ Supuran T. C.; *Expert Opin. Ther. Pat.* **2018** 28, 10, 709–712.

⁵² Aspatwar A.; Parvathaneni N. K.; Barker H.; Anduran E.; Supuran T. C.; Dubois L.; Lambin P.; Parkkila S.; Winum J.-Y.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020** 35, 1, 109–117.

⁵³ Supuran T. C.; *Expert Opin. Ther. Pat.* **2018** 28, 10, 713–72.

⁵⁴ Dizdaroglu Y.; Albay C.; Arslan T.; Ece A.; Turkoglu E. A.; Efe A.; Senturk M.; Supuran T. C.; Ekinci D.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020** 35, 1, 289–297.

⁵⁵ Guler O. O.; Supuran T. C.; Capasso C.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020** 35, 1, 255–260.

⁵⁶ Alterio V.; Fiore A. D.; D'Ambrosio K.; Supuran T. C.; De Simone G.; *Chem. Rev.* **2012** 112, 4421–4468.

Los inhibidores de CA (CAI) se han usado farmacológicamente durante muchas décadas como diuréticos y agentes antiglaucomas. Más recientemente, también han sido evaluados para el tratamiento de tumores hipóxicos y como agentes contra la obesidad.⁵⁷ Por lo tanto, moléculas dotadas de actividad inhibitoria específica hacia isoformas de CA se pueden usar como herramientas terapéuticas para el tratamiento de estas enfermedades.⁵⁸ Existen diferentes tipos de compuestos de inhibidores de CA (CAI), lo cuales se pueden dividir en cuatro clases principales:⁵⁹ (i) sulfonamidas y sus isómeros como sulfamatos, sulfamidas y derivados similares, (ii) fenoles, (iii) poliaminas, como espermina, espermidina y (iv) cumarinas o tiocumarinas, como los ejemplos que se muestran en la figura 2.2.⁶⁰⁻⁶²

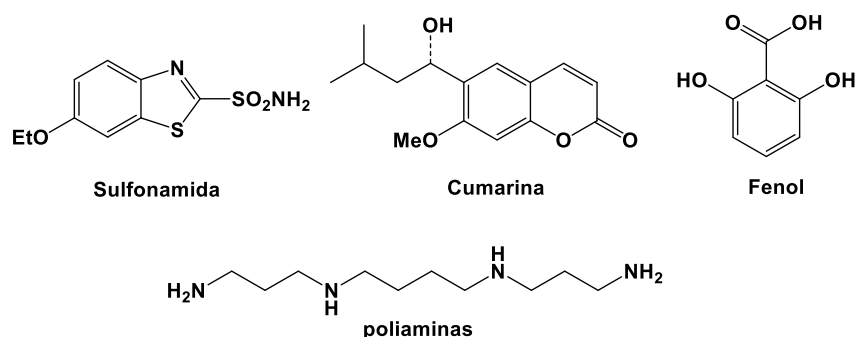


Figura 2.2. Estructuras de inhibidores de CA.

Las cumarinas tienen una variedad de efectos farmacológicos, se utilizan principalmente en el diseño y descubrimiento de nuevos fármacos contra el cáncer.⁶³ Son una clase relativamente nueva de inhibidores de la metaloenzima anhidrasa carbónica. La cumarina y sus bioisómeros (tiocumarinas, 2-tioxocumarinas) actúan como "profármacos", mientras que sus productos de hidrólisis (formados a través de la actividad esterasa mediada por CA) son los verdaderos inhibidores de CA.⁶⁴ La mayoría de los inhibidores de CA ejercen una inhibición dependiente de Zn

⁵⁷ Buran K.; Bua S.; Poli G.; Önen B. F. E.; Tuccinardi T.; Supuran T. C.; *Int. J. Mol. Sci.* **2019** 20, 1208.

⁵⁸ Poli G.; Galati S.; Martinelli A.; Supuran T. C.; Tuccinardi T.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020** 35, 1, 365–371.

⁵⁹ Karatas M. O.; Uslu H.; Sari S.; Alagöz M. A.; Karakurt A.; Alici B.; Bilen C.; Yavuz E.; Gencer N.; Arslan O.; *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **2016** 31, 5, 760–772.

⁶⁰ Supuran T. C.; *Nat Rev Drug Discov* **2008** 7, 168–181.

⁶¹ Temperini C.; Innocenti A.; Scozzafava A.; Parkkila S.; Supuran T. C.; *J. Med. Chem.* **2010** 53, 850–854.

⁶² Martin D. P.; Cohen S. M.; *Chem. Commun.* **2012** 48, 5259–5261.

⁶³ Bonardi A.; Falsini M.; Catarzi D.; Varano F.; Mannelli D. C. L.; Tenci B.; Ghelardini C.; Angeli A.; Supuran T. C.; Colotta V.; *Eur. J. Med. Chem* **2018** 146, 47-59.

⁶⁴ Kurt Z. B.; Dag A.; Doğan B.; Durdagi S.; Angeli A.; Nocentini A.; Supuran T. C.; Sonmez F.; *Bioorg Chem* **2019** 87, 838–850.

(II) porque bloquea al Zn (II) o se agregan a la red de coordinación. A diferencia de estos compuestos, las cumarinas tienen un mecanismo de inhibición que no depende de Zn (II).⁵⁹ Se observó que las CAs poseen también actividad lipolítica, por lo que pueden hidrolizar la función lactona de las cumarinas, y el producto hidrolizado (derivados de ácido cinámico), interaccionar con la entrada de la cavidad del sitio activo, bloqueando de esta manera, la entrada del sustrato; esto ha sido observado mediante difracción de rayos X.⁶⁵ Además, esa es la única región del sitio activo que es la más variable entre las 12 isoformas catalíticamente activas, lo que puede explicar por qué las cumarinas y sus derivados se encuentran entre los CAI más selectivos de isoformas conocidos hasta la fecha.⁶⁵

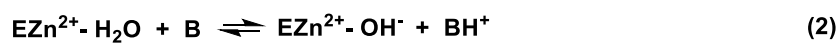
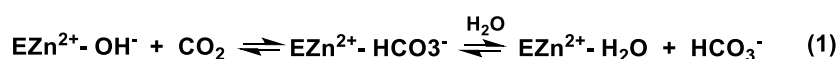
Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo de investigación está orientado a la búsqueda de nuevos derivados de cumarinas que puedan actuar como inhibidores selectivos de anhidrasas carbónicas.

⁶⁵ Peperidou A.; Bua S.; Bozdog M.; Hadjipavlou-Litina D.; Supuran T. C.; *Molecules* **2018** 23, 153.

Capítulo 2.2: Antecedentes

2.1 Anhidrasas Carbónicas (CA)

Las anhidrasas carbónicas (CA; EC 4.2.1.1) son metaloenzimas conocidas durante décadas que están involucradas en el equilibrio del CO₂ y bicarbonato, es decir, que catalizan una reacción muy simple pero importante: la hidratación reversible del dióxido de carbono (CO₂) al ion bicarbonato (HCO₃⁻) y protón (H⁺). Actúan como catalizadores altamente eficientes para esta reacción fisiológica, que ocurren en dos pasos mediante un mecanismo de ping-pong, tal y como se muestra en las ecuaciones (1) y (2).⁹²



Las CAs están codificadas en ocho familias (o clases) genéticamente distintas, nombradas con las letras griegas: α, β, γ, δ, ζ, η, Θ y ι-CA. Las últimas tres clases fueron descubiertas recientemente, estas se identificaron como se muestra en la tabla 1.^{6,16,93-95}

Tabla 1. Clasificación de las Cas, cofactores y organismos donde se encuentran.

Clases de CA	Cofactor	Organismos
α	Metaloproteínas de Zn ²⁺	Animales, vertebrados, procariontes, hongos, algas, protozoos y plantas.
β	Metaloproteínas de Zn ²⁺	Bacterias, plantas, hongos, cloroplastos de mon-/dicotiledóneas.
γ	Metaloproteínas de Zn ²⁺ o Fe, Co	En algunas plantas, hongos, bacterias y archarea.
δ	Metaloproteínas de Co	Diatomeas marinas.
ζ	Metaloproteínas Cd o Zn	En algunas diatomeas marinas.
η	Metaloproteínas de Zn	Plasmodium spp.
Θ	Metaloproteínas de Zn	Diatomeas marinas.
ι	Proteínas Mn (II).	Diatomeas y bacterias

⁹² Supuran T. C.; *Biochem.J.* **2016** 473, 2023–2032.

⁹³ Jensen E. L.; Clement R.; Kosta A.; Maberly S. C.; Gontero B.; *Isme J.* **2019** 13, 2094–106.

⁹⁴ Del Prete S.; Vullo D.; Fisher G. M.; Andrews K. T.; Poulsen S.-A.; Capsso C.; Supuran T. C.; *Bioorg Med Chem Lett* **2014** 24, 4389–96.

⁹⁵ Ferry J. G.; *Biochimica et Biophysica Acta* **2010** 1804, 374–381.

2.1.1 Mecanismo catalítico de CA

Para comprender mejor el mecanismo catalítico de las CAs perteneciente a las clases β -, δ - γ -, δ - ζ -, η -CA y Θ -CA, es importante ver si estas enzimas actúan de manera similar a las α -CA, que puede ser activada por compuestos que transportan protones entre el sitio activo y el medio ambiente. En esta revisión nos centraremos en la α -CA que están involucradas en numerosos procesos fisiológicos y patológicos en humanos.⁹⁶

Comenzando con el mecanismo catalítico de α -CA, este se inicia con una especie de hidróxido metálico presente en el sitio activo de esta enzima como un cuarto ligante, como se muestra en la figura 2.3, que pasa de A a B donde actúa como un nucleófilo fuerte (a pH fisiológico) convirtiendo el CO_2 en bicarbonato, bis-coordinado a Zn (II) en una geometría bipiramidal trigonal (C). Este aducto, muy inestable, al reaccionar con una molécula de agua conduce a la liberación de bicarbonato en solución y la generación de una forma ácida de la enzima que incorpora una especie de $\text{M}^{2+}(\text{OH}_2)$ en el centro del metal, que es catalíticamente ineficaz para comenzar de nuevo la hidratación del CO_2 (D). Para generar el nucleófilo (es decir para regenerar el hidróxido metálico presente en el sitio activo enzima), en las especies $\text{M}^{2+}(\text{OH}_2)$ se produce una reacción de transferencia de protones, que determina la velocidad el ciclo catalítico, donde esta reacción es bastante rápida.^{8,16,97}

⁹⁶ Maresca A.; Temperini C.; Vu H.; Pham N. B.; Poulsen S.-A.; Scozzafava A.; Quinn R. J.; Supuran T. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **2009** 131, 3057–3062.

⁹⁷ Briganti F.; Mangani S.; Orioli P.; Scozzafava A.; Vernagione G.; Supuran T. C.; *Biochemistry* **1997** 36, 10384-1039.

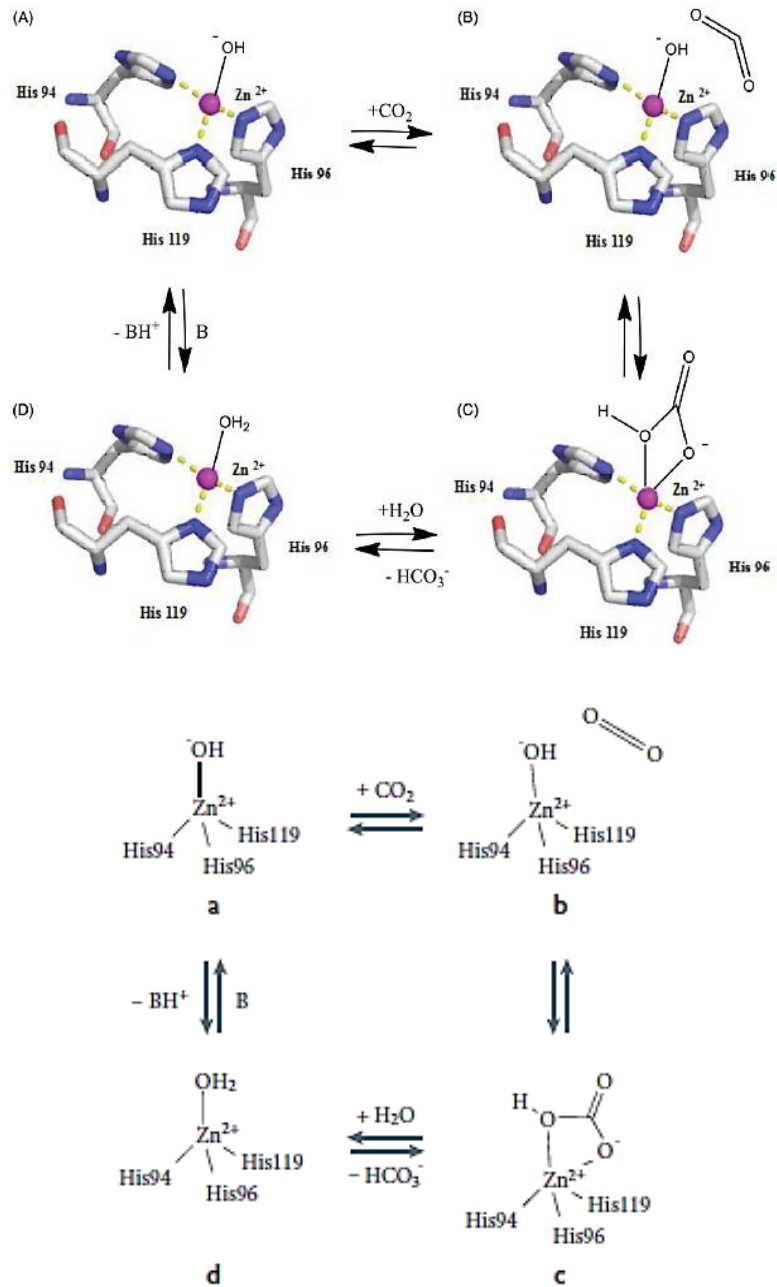


Figura 2.3. Mecanismo catalítico de α -CA.

Las enzimas CA generalmente usan un ion metálico (Zn^{2+} en α -, β - y en las γ -CAs, puede encontrarse Fe^{2+} / Co^{2+} / Zn^{2+}) que favorece la reducción de pKa del H_2O de 14 a 7.⁸ Las CA humanas (es decir las α -CA) usan un ion Zn^{2+} para disminuir el pKa del H_2O unido al ion Zn^{2+} que también se une a los residuos de histidina (His94, His96 y His119).⁹⁶ Para muchas α -CA, este paso es asistido por un residuo His64, colocado en la parte central de la cavidad del sitio activo, ayuda en

este paso actuando como donador de protones.⁶ En efecto, His64 se observa generalmente en dos conformaciones diferentes, denominado *in* (dentro) y *out* (exterior). En la conformación *in*, esta histidina está orientada hacia el interior del sitio activo, para aceptar un protón desde una red de moléculas de agua que conecta la His64 a la molécula de agua unida al zinc. Mientras que en la conformación *out*, es orientada hacia el exterior del sitio activo para donar el protón al disolvente. Varios estudios sugieren que la movilidad conformacional de la His64 al sitio activo, es por el resto de imidazol de esta histidina, con un pKa de 6.0–7.5, es un residuo apropiado para la transferencia de protones y es de vital importancia para todo el ciclo catalítico.⁹⁸

2.1.2 Isoformas de la α -CA

Dentro de la α -CA se aislaron dieciséis isoformas o isoenzimas diferentes de la CA humanas (hCA), que actúan en funciones fisiológicas cruciales. Algunas de ellas son citosólicas (CA I, CA II, CA III, CA VII, CA XIII), otras están unidas a la membrana (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV y CA XV), CA VA y CA VB se ubican en las mitocondrias, y CA VI se secreta en la saliva y la leche. Se ha demostrado que estas isoformas de CA desempeñan un papel activo en el mecanismo de muchas enfermedades.^{99,100}

Las isoformas de CA presentes en varios tejidos del citoplasma, la membrana celular y las mitocondrias en humanos están involucradas en muchos procesos fisiológicos y patológicos que incluyen la respiración y el transporte de CO₂/bicarbonato entre tejidos y pulmones que metabolizan, la homeostasis del pH y el CO₂, la secreción de electrolitos en una variedad de tejidos/órganos, reacciones biosintéticas (como gluconeogénesis, lipogénesis y ureagénesis), resorción ósea, calcificación, tumorigenicidad.¹⁰¹

De las dieciséis isoformas de CA humanas (hCA) que se han identificado, algunas se asocian a diferentes enfermedades como: la isoforma hCA I está involucrada en el edema cerebral y retiniano, su inhibición puede ser una herramienta valiosa para combatir estas afecciones. La hCA II está involucrada en el glaucoma, el edema y la epilepsia, entre otros.¹⁰¹ Su actividad desregulada de la hCA IV se asocia con glaucoma, retinitis pigmentosa y accidente cerebrovascular. La isoforma

⁹⁸ Supuran T. C.; *Future Med Chem* **2018** 10, 561–73.

⁹⁹ Kurt B. Z.; Sonmez F.; Ozturk D.; Akdemir A.; Angeli A.; Supuran T. C.; *Eur. J. Med. Chem.* **2019** 183, 111702.

¹⁰⁰ Abdelrahman M. A.; Eldehna W. M.; Nocentini A.; Ibrahim H. S.; Almahli H.; Abdel-Aziz H. A.; Abou-Seri S. M.; Supuran T. C.; *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **2020** 35, 1, 298–305.

¹⁰¹ Kucukoglu K.; Gul H. I.; Taslimi P.; Gulcin I.; Supuran T. C.; *Bioorg Chem* **2019** 86, 316–321.

mitocondrial hCA VA se considera un objetivo potencial para el tratamiento de la obesidad, la diabetes y las enfermedades relacionadas.¹⁹ La hCA VII es predominantemente presente en el sistema nervioso central y, por lo tanto, los inhibidores selectivos de hCA VII pueden usarse para la modulación y el tratamiento del dolor neuropático. Las hCA IX y XII se sobreexpresan en las células cancerosas, ya que son enzimas asociadas al tumor unidas a la transmembrana, principalmente tumores hipóxicos, con una baja expresión en las células normales. La sobreexpresión contribuye aún más al crecimiento tumoral, la proliferación, la angiogénesis y la metástasis de una variedad de células cancerosas.^{3,102,103}

2.1.3 Inhibidores de la CA

La inhibición selectiva de algunas isoformas sobre otras es un reto en Química Medicinal para obtener nuevos fármacos con efectos secundarios reducidos. Aunque existen varios inhibidores de la CA (CAI) disponibles comercialmente, como acetazolamida (AAZ), etoxzolamida, dorzolamida, bien conocidos por sus actividades anticonvulsivas, anti-glaucoma y antiinfecciosas, ninguno de ellos muestra selectividad por una isoenzima específica, y por lo tanto, causan efectos secundarios (Figura 2.4).^{21,92,104}

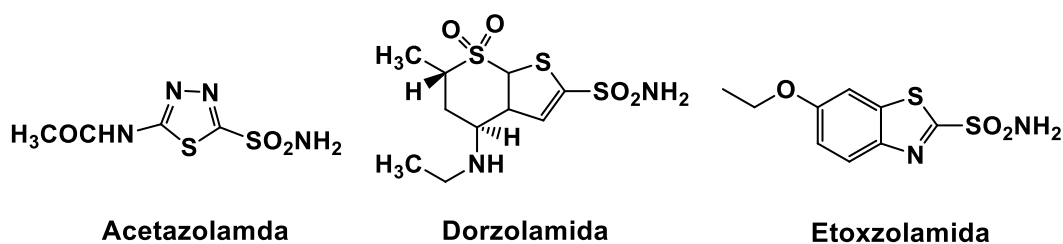


Figura 2.4. Inhibidores de CA en uso clínico.

Por este motivo, las investigaciones en esta área se encuentran encaminadas al desarrollo de nuevos inhibidores selectivos de una determinada isoforma de interés terapéutico.¹⁰⁵

¹⁰² Logozzi M.; Mizzone D.; Capasso C.; Del Prete S.; Di Raimo R.; Falchi M.; Angelini D. F.; Sciarra A.; Maggi M.; Supuran T. C.; Fais S.; *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **2020** 35, 1, 280–288.

¹⁰³ Vats L.; Sharma V.; Angeli A.; Kumar R.; Supuran T. C.; Sharma P. K.; *Eur. J. Med. Chem.* **2018** 150, 678-686.

¹⁰⁴ Neri D.; Supuran T. C.; *Nat Rev Drug Discov.* **2011** 10, 767–777.

¹⁰⁵ Swain B.; Digwal C. S.; Angeli A.; Alvala M.; Singh P.; Supuran T. C.; Arifuddin M.; *Bioorg. Med. Chem.* **2019** 27, 115090.

Hasta la fecha se han identificado cinco mecanismos de inhibición de la CA, pero los datos completos por difracción de rayos X solo están disponibles para cuatro de ellos, estos son: (i) aglutinantes de zinc, (ii) inhibidores de anclaje al ion de agua/hidróxido unido a zinc, (iii) inhibidores que ocluyen la entrada al sitio activo, (iv) inhibidores que se unen fuera del sitio activo y (v) compuestos con mecanismo de inhibición desconocido.¹⁰⁶

En este contexto los CAI pueden pertenecer a 5 clases principales de compuestos:¹⁰⁷⁻¹¹⁰

1.- Sulfonamidas (y sus isómeros, como sulfamatos, sulfamidas y derivados similares) y complejos aniónicos metálicos (aniones inorgánicos), que se coordinan con el ion Zn (II) con geometría tetraédrica o de bipirámide trigonal, como se muestra en la figura 2.5; A:sulfonamidas y B: aniones inorgánicos.

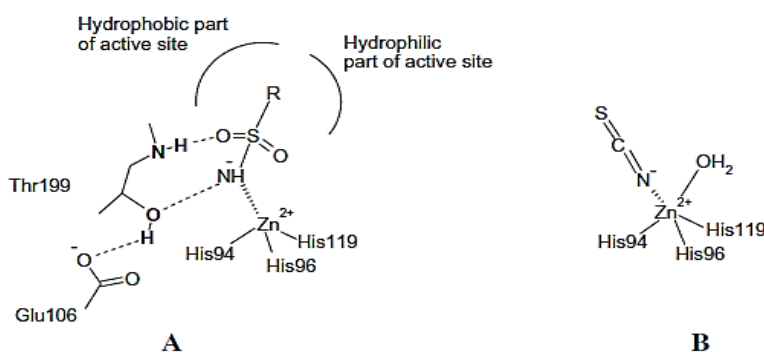


Figura 2.5. Representación esquemática de interacciones de CAI con el sitio activo de la CA: A) Sulfonamidas y B) Aniones inorgánicos.¹⁰⁷

2.- Fenoles que se unen a la molécula de agua coordinada con el zinc/ion hidróxido desde el sitio activo, a través de una red de dos enlaces de hidrógeno, como se observa en la figura 2.6 para fenoles.

¹⁰⁶ Kartsev V.; Geronikaki A.; Bua S.; Nocentini A.; Petrou A.; Lichitsky B.; Frasinuk M.; Leitans J.; Kazaks A.; Tars K.; Supuran T. C.; *Molecules* **2019** 24, 3580.

¹⁰⁷ Durdagi S.; Sentürk M.; Ekinci D.; Balaydin H. T.; Göksu S.; Küfrevioğlu Ö. I.; Innocenti A.; Scozzafava A.; Supuran T. C.; *Bioorg. Med. Chem.* **2011** 19, 1381–1389.

¹⁰⁸ Supuran T. C.; *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **2016** 31, 3, 345–360.

¹⁰⁹ Innocenti A.; Vullo D.; Scozzafava A.; Supuran T. C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008** 18, 1583-1587.

¹¹⁰ D'Ambrosio K.; Carradori S.; Monti S. M.; Buonanno M.; Secci D.; Vullo D.; Supuran T. C.; De Simone G.; *J. Name.* **2012** 00, 1-4.

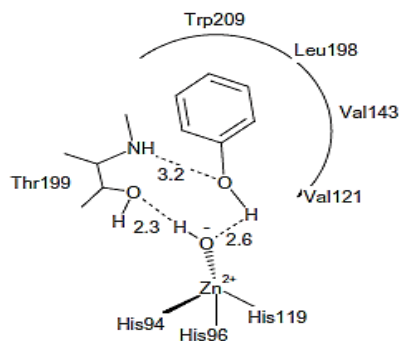


Figura 2.6. Representación esquemática de interacciones de fenoles con CA.¹⁰⁹

3.- Las poliaminas, como la espermina, la espermidina y los congéneres, que se unen de manera bastante similar, es decir, al anclarse a la molécula de agua/ion hidróxido coordinado a Zn (II), tal como se ve en la figura 2.7 para la espermina.

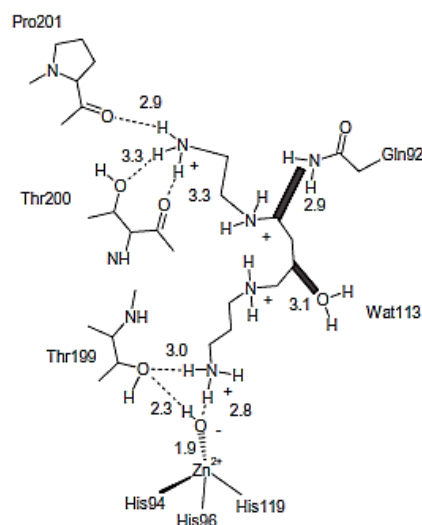


Figura 2.7. Representación esquemática de interacciones de CAI en la CA de espermina.¹⁰⁸

4.- Las cumarinas y tiocumarinas constituyen una familia de inhibidores de CA más recientes, que tienen un mecanismo de inhibición no dependiente de Zn (II), y se unen (en forma hidrolizada) en la misma región del sitio activo como activadores, ocluyendo la entrada al sitio activo, como se muestra en la figura 2.8 para cumarinas hidrolizadas; ello es debido a que las CA también tienen actividad esterasa y son capaces de hidrolizar la función de tipo lactona de las cumarinas, dando lugar a derivados de ácido cinámico, que son los que realmente bloquean a la enzima. Por ello, las cumarinas y análogos actúan realmente como profármacos. Los fulerenos y lacosamida se unen de

manera similar a las cumarinas hidrolizadas mencionadas, es decir, al ocluir la entrada a la cavidad del sitio activo de la enzima.

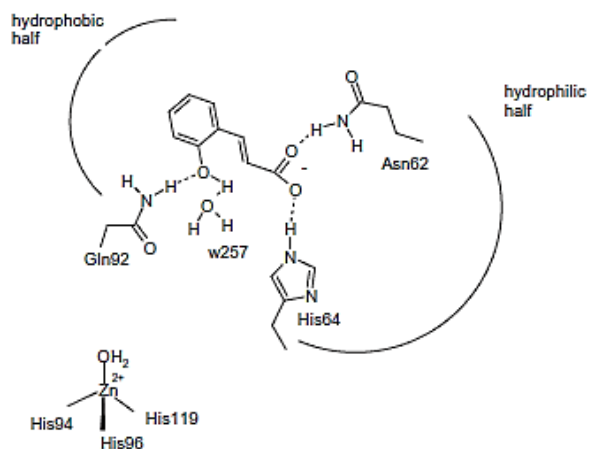


Figura 2.8. Representación esquemática de interacciones de CAI en el sitio activo de CA para cumarinas hidrolizadas.¹⁰⁷

5.- El ácido 2-(bencilsulfonil)benzoico, es un inhibidor que actúa fuera del sitio activo de la CA, donde nunca antes se observaron otros inhibidores. Este bloquea la donación de protones de la enzima, His64 en su conformación *out*, lo que interfiere con el paso determinante de la velocidad de todo el ciclo catalítico, como se ve en la figura 2.9.

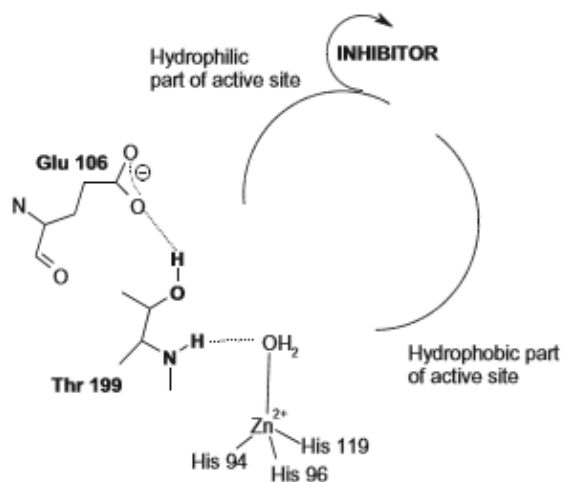


Figura 2.9. Representación esquemática de interacciones de CAI en el sitio activo de CA para el ácido 2-(bencilsulfonil)benzoico.¹¹⁰

2.2 Cumarinas

La cumarina (*2H*-chromen-2-ona) fue aislada por primera vez en 1820 por Vogel a partir de frijoles tonka (*Dipteryx odorata* Wild; familia Fabaceae) y su nombre procede del francés *Coumarou*. Desde entonces, se ha descrito el aislamiento, caracterización estructural, síntesis y actividad biológica de miles de cumarinas naturales de plantas, bacterias, hongos y síntesis química.¹¹¹ Las cumarinas se producen como metabolitos secundarios en las semillas, raíces y hojas de muchas especies de plantas, especialmente en altas concentraciones en el frijol tonka. Las cumarinas son abundantes metabolitos secundarios en las plantas donde actúan como fitoalexinas (compuestos de defensa producidos cuando la planta está amenazada por otros organismos); otra función destacable es la regulación del crecimiento de las plantas o como productos de desecho.¹¹² La cumarina, cuya estructura y esquema de numeración se ilustran en la figura 2.10, se caracteriza por un esqueleto de benzopirano, presente en muchos agentes biológicamente activos.¹¹¹

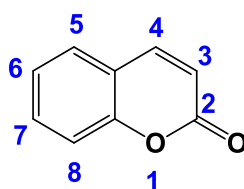


Figura 2.10. Estructura y numeración del esqueleto de la cumarina.

Las cumarinas se han descrito en alrededor de 150 especies diferentes distribuidas en casi 30 familias diferentes, de las cuales algunas importantes son Rutaceae, Umbelliferae, Clusiaceae, Guttiferae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Nyctagnaceae, Apiaceae, Escopoletina y Esculetín.^{113,114} Mientras que se han sintetizado cumarinas sustituidas de forma variable utilizando una serie de rutas sintéticas, los métodos clásicos emplean las reacciones de Perkin, Pechmann o Knoevenagel, mientras que los enfoques más recientes han empleado las reacciones de Wittig, Kostanecki-Robinson y Reformatsky.¹¹⁵

¹¹¹ Stefanachi A.; Leonetti F.; Pisani L.; Catto M.; Carotti A.; *Molecules* **2018** 23, 250.

¹¹² Musa M.; A.; Cooperwood J. S.; Khan M. O. F.; *Curr Med Chem.* **2008** 15, 26, 2664–2679.

¹¹³ Venugopala K. N.; Rashmi V.; Odhav B.; *Biomed Res. Int.* **2013**, 963248, 14.

¹¹⁴ De Luca L.; Mancuso F.; Ferro S.; Buemi M. R.; Angeli A.; Del Prete S.; Capasso C.; Supuran T. C.; Gitto R.; *Eur. J. Med. Chem* **2018** 143, 276-282.

¹¹⁵ Poulsen S.-A.; *Future Science Book Series: Targeting Carbonic Anhydrases* **2014** capítulo 7, 98-112.

Medicamentos comercializados a base de cumarina, entre los cuales, los agentes anticoagulantes warfarina y dicoumarol son ejemplos relevantes. Estos antagonistas de la vitamina K son efectivos en la prevención de la trombosis, pero también están frecuentemente implicados en reacciones adversas a los medicamentos, entre las cuales el sangrado amenaza la vida de los pacientes tratados.¹¹⁶ Se ha demostrado que la alquilación en las posiciones C-3 y/o C-4 de la cumarina reduce fuertemente la hepatotoxicidad del compuesto, probablemente por ralentización en la formación del epóxido de 3,4 en la metabolización de la cumarina.¹¹⁷

La cumarina es plana, aromática y lipofílica, por lo tanto, puede interactuar con sus análogos biológicos, principalmente sitios de unión lipofílica, estableciendo fuertes interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, coordinación de metales y, más a menudo, de apilamiento de π - π con aminoácidos aromáticos, es decir, Phe, Tyr y Trp. Los aminoácidos cargados positivamente pueden interactuar con cumarinas a través de fuertes interacciones catiónicas- π . Además, el grupo lactona de la cumarina confiere a la molécula la capacidad de producir una fuerte interacción polar, como enlaces de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo, y, a veces, acilar proteínas objetivo, como se afirma por el mecanismo covalente de inhibición de algunas enzimas. En realidad, las enzimas con actividad esterasa también pueden abrir el anillo de lactona, y los compuestos resultantes de esta hidrólisis pueden ser los responsables de la actividad biológica observada.^{111,118}

La cumarina es un farmacóforo multidiana con una amplia variedad de actividades biológicas y, por lo tanto, atrae el interés de la comunidad científica. De hecho, se demostró que los derivados de cumarina actúan como anticoagulantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antimicóticos, antidiabéticos, anti-viral, anti-Alzheimer, inhibidor de la MAO, antioxidante, antihiperlipidémico y otras actividades biológicas también identificadas, además que una gran cantidad de publicaciones se refiere a la actividad inhibitoria de la anhidrasa carbónica (CA, EC 4.2.1.1) de los derivados de cumarina.^{3,106}

¹¹⁶ Lake B.G.; Evans J.G.; Lewis D.F.V.; Price R.J.; *Food. Chem. Toxicol.* **1994** 32, 357-363.

¹¹⁷ Lagunes I.; Begines P.; Silva A.; Galán A. R.; Puerta A.; Fernandes M. X.; Maya I.; Fernández-Bolaños J. G.; López Ó.; Padrón J. M.; *Eur. J. Med. Chem* **2019** 179, 493-501.

¹¹⁸ Peng X.-M.; Damu G. L.V.; Zhou C.-H.; *Curr. Pharm. Des.* **2013** 19, 3884-3930.

2.2.1 Cumarinas como inhibidores de la CA

El esqueleto de cumarina se encuentra en varios productos naturales y compuestos bioactivos que pueden traducirse en potenciales terapéuticos para múltiples enfermedades. Por esta razón, es una estructura biológicamente importante y altamente privilegiada también en el campo farmacéutico.¹¹⁹

Se identificó un nuevo inhibidor de la anhidrasa carbónica (CA, EC 4.2.1.1) de un gran número de extractos de productos naturales, este inhibidor de CA (CAI) aislado de la planta Australiana *Leionema ellipticum*, era un derivado de la cumarina, es decir, 6-(1S-hidroxi-3-metilbutil)-7-metoxi-2H-cromen-2-ona (figura 2.11). Mediante cristalografía de rayos X de su aducto con la isoforma humana hCA II, se evidenció la presencia de un ácido 2-hidroxicinámico sustituido en el sitio activo de la enzima, que es el producto de hidrólisis (mediado por el CA) de la cumarina original.⁹⁶

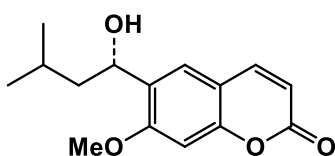


Figura 2.11. 6-(1S-hidroxi-3-metilbutil)-7-metoxi-2H-cromen-2-ona, cumarina aislada de la planta Australina *Leionema ellipticum*.

El mecanismo de inhibición general que se da, tanto para el producto asilado del extracto que dio pauta a conocer el mecanismo, como cumarias o tiocumarinas es: las cumarinas pueden poseer diversas formas tautoméricas, como los fenoxóxidos de benzopirilio zwitteriónico, que pueden unirse dentro del sitio activo de CA de manera similar a los fenoles (figura 2.12, paso **A**), es decir, mediante el anclaje al zinc(II)-molécula de agua/ion hidroxilo. Las cumarinas entonces se unen inicialmente a la CA con afinidad micromolar, estas tienen algunas características estructurales en común con la forma zwitteriónica que se muestra en **A**, puede entonces someterse a hidrólisis por la molécula de agua activada por zinc(II)/ion hidróxido de la cavidad enzimática, que actúa como un nucleófilo muy potente.¹²⁰ Por lo tanto, es probable que un ácido *cis*-2-hidroxicinámico intermedio se forme (paso **B**), que no puede unirse de manera efectiva en el espacio restringido cerca del ion Zn (II) (donde se unen los fenoles y sulfonamidas simples), debido a sus sustituyentes voluminosos se reorienta hacia la salida de la cavidad del sitio activo. Entonces puede ocurrir una reordenación del

¹¹⁹ Peng X.-M.; Damu G. L.V.; Zhou C.-H.; *Curr. Pharm. Des.* **2013** 19, 3884-3930.

¹²⁰ Maresca A.; Temperini C.; Pochet L.; Masereel B.; Scozzafava A.; Supuran T. C.; *J. Med. Chem.* **2010** 53, 335-344.

aducto inhibidor de la enzima, lo que conduce a los ácidos *trans*-hidroxi/mercapto-cinámico, paso **C**, siempre que los sustituyentes R y R' de la cumarina inicial no sean demasiado voluminosos para interferir con la unión al sitio activo de la enzima. De hecho, el ácido *trans*-2-hidroxicinámico fue el que se evidenció unido al sitio activo de CA, y no se observó el isómero *cis*, como para el caso de la cumarina natural aislada.¹²⁰

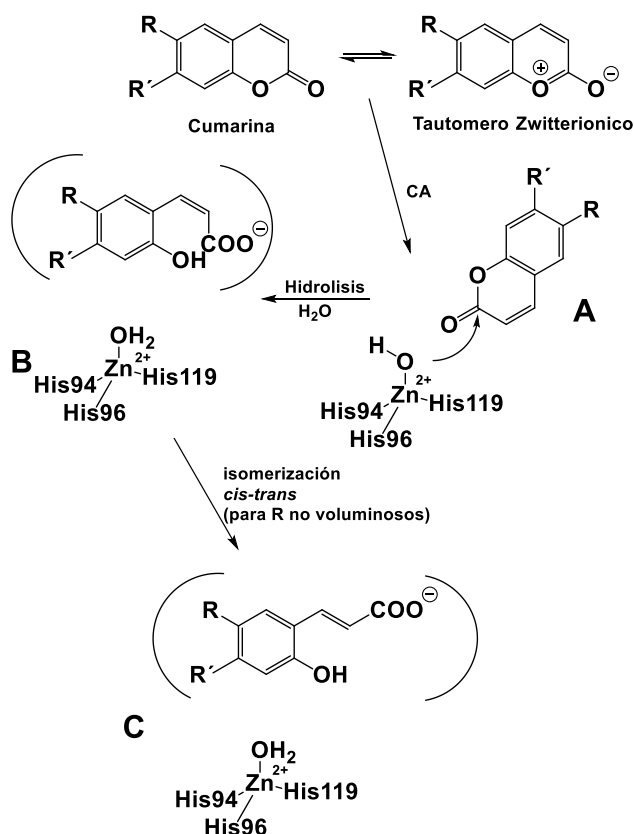


Figura 2.12. Mecanismo de inhibición propuesto de CA por cumarinas/tiocumarinas.

Varias observaciones surgieron durante los estudios del mecanismo de cumarinas o tiocumarinas como CAI: (i) se unen en forma hidrolizada y no interactúan con el ión metálico catalíticamente crucial de la cavidad del sitio activo, constituyendo una nueva categoría de inhibidores (actúan como profármacos); (ii) los ácidos 2-hidroxicinámicos sustituidos formados a partir de la cumarina por hidrólisis se observaron unidos dentro del sitio activo como el isómero *cis*, así como los isómeros *trans* (mediante cristalografía de rayos X de aductos inhibidores enzimáticos), dependiendo en el patrón de sustitución en el profármaco original de la cumarina; (iii) estos inhibidores se observaron unidos a la entrada del sitio activo de la enzima, bloqueando su entrada y

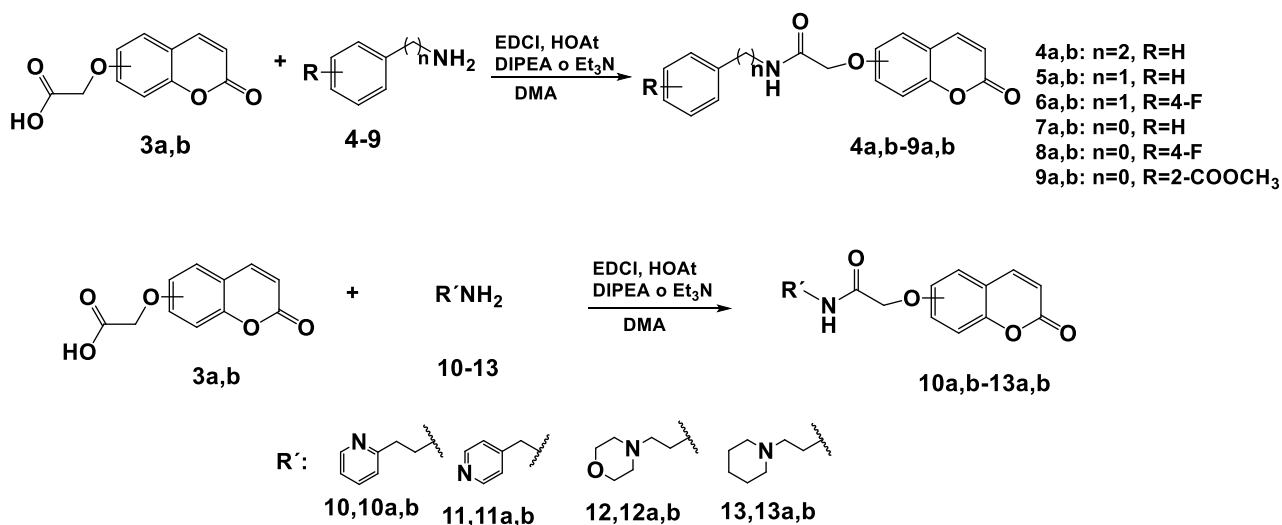
bloqueando así la actividad catalítica de la enzima. Una observación importante también fue que esta región del sitio activo de CA es la más variable entre las 16 isoformas de CA presentes en mamíferos y esto puede explicar por qué muchos derivados de cumarina muestran una alta relación de selectividad para inhibir diversas isoformas de CA (por ejemplo, CA VA, VII, IX, XII, XIII y XIV).¹²¹ Se ha demostrado que varios derivados de cumarina constituyen una nueva clase de inhibidores selectivos contra las isoformas de la anhidrasa carbónica asociada a tumores humanos (CA, EC 4.2.1.1) hCA IX y hCA XII. Estas dos isoformas son enzimas extracelulares involucradas en el metabolismo del CO₂, y han sido implicadas en la acidificación del microambiente extracelular y, al mismo tiempo, en la protección de las células cancerosas de la acidosis.¹²² Teniendo en cuenta el patrón de sustitución y la naturaleza (y el número) de restos presentes en las diversas posiciones del anillo de cumarina son los principales factores que influyen en las propiedades inhibitorias de la CA así como en el perfil de selectividad en esta clase de inhibidores de las isoformas.¹²³

Existen muchos estudios de cumarinas como CAI, uno de ellos es el reportado por Peperidou A. y colaboradores,²⁶ donde se preparó una serie de carboxamidas derivadas de cumarinas sustituidas en las posiciones 6 y 7. Estos compuestos se investigaron como inhibidores de dos enzimas, las anhidrasas carbónicas humanas (hCA) y la lipoxigenasa de soja (LOX). Destacaron especialmente los compuestos **4a** y **4b**, que fueron potentes inhibidores de LOX, pero en este estudio se detectaron muchos inhibidores efectivos de hCA IX. Estas cumarinas no inhibieron significativamente las isoformas citosólicas hCA I y II, mientras que fueron inhibidores débiles de hCA IV, lo que los convirtió en inhibidores selectivos de hCA IX (esquema 2.1).²⁶

¹²¹ Carta F.; Maresca A.; Scozzafava A.; Supuran T. C.; *Bioorgan. Med. Chem.* **2012** 20, 2266-2273.

¹²² Angeli A.; Trallori E.; Carta F.; Mannelli L. D. C.; Ghelardini C.; Supuran T. C.; *ACS Med. Chem. Lett.* **2018** 9, 947-951.

¹²³ Maresca A.; Scozzafava A.; Supuran T. C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010** 20, 7255-7258.



Esquema 2.1. Derivados de cumarinas.

Otra investigación es la reportada por Maresca,¹²⁴ en la cual se investigaron una serie de cumarinas que incorporan grupos hidroxilo, cloro y clorometilo en las posiciones 3, 4, 6 y 7 del anillo heterocíclico para la inhibición de la carbónica (CA, EC 4.2.1.1). Las cumarinas resultaron muy débiles o ineficaces como inhibidores de las isoformas CA I y II, pero mostraron una inhibición submicromolar efectiva de las isoformas transmembrana asociadas a tumores CA IX y XII. Este estudio demostró que depende la naturaleza y la posición de los grupos que sustituyen el anillo de cumarina, influyeron mucho en las propiedades inhibitoras de CA (figura 2.13).¹²⁴

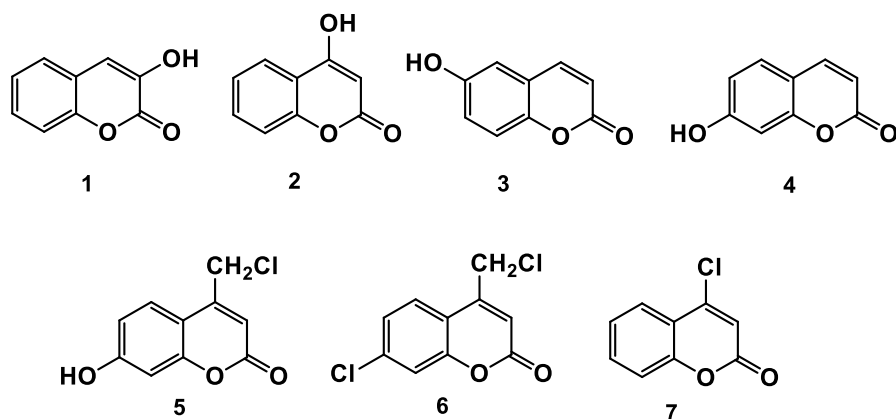


Figura 2.13. Serie de cumarinas.

¹²⁴ Maresca A.; Supuran T. C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010** 20, 4511-4514.

Narella³ y colaboradores diseñaron una serie de cumarina-1,3,4-oxadiazoles, y se evaluaron su actividad inhibitoria contra las cuatro isoformas de anhidrasa carbónica humana fisiológicamente relevantes (hCA) CA I, CA II, CA IX y CA XII. Los resultados indicaron que los derivados de cumarina-1,3,4-oxadiazol exhibieron una inhibición selectiva de las isoformas asociadas a tumores, CA IX y CA XII sobre las isoformas de CA I y II. De esta serie, el compuesto **7b** exhibió una inhibición significativa contra hCA XII junto el compuesto **7n** contra hCA IX (figura 2.14).³

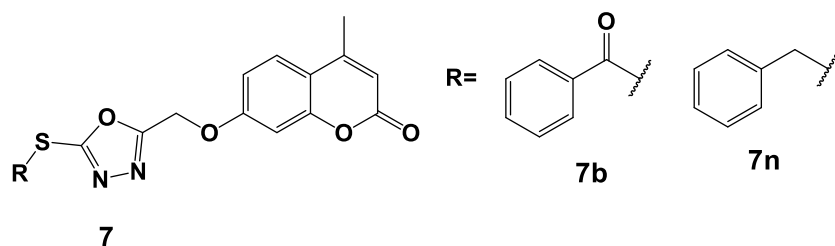


Figura 2.14. 1,3,4-Oxadiazoles derivados de cumarina.

2.3 Guanidinas

La guanidina se sintetizó por primera vez en 1861 mediante la degradación oxidativa de un producto aromático natural, la guanina, aislado del guano peruano.¹²⁵ Las guanidinas, son análogos del ácido carbónico, estas representan un grupo fascinante de moléculas con propiedades químicas y físicas únicas. Al igual que las conocidas amidinas, las guanidinas son bases extremadamente fuertes y, por lo tanto, se conocen como "superbases".¹²⁶ Esta capacidad, además de formar enlaces de hidrógeno y su planaridad son algunas de sus características predominantes que hacen que este grupo funcional sea muy versátil para compuestos con actividad biológica. La alta basicidad de la guanidina (el pK_a del catión de guanidinio en el agua es 13.6) indica que a pH fisiológico, la guanidina se protonará formando el catión de guanidinio.^{126,127}

Al estar protonado a pH fisiológico, el resto de guanidina será catiónico y plano, pudiendo interactuar con otras moléculas a través de interacciones más débiles, como las interacciones

¹²⁵ Yamada T.; Liu X.; Englert U.; Yamane H.; Dronskowski R.; *Chem. Eur. J.* **2009** 15, 5651-5655.

¹²⁶ Maes B.; Cossy J.; Polanc S.; Guanidines as Reagents and Catalysts I; Philipp Selig Ed.; *Springer International Publishing AG: Linz, Austria* **2017**, pag. 3.

¹²⁷ Manimala J. C.; Anslyn E. V.; *Tetrahedron Lett.* **2002** 43, 565-567.

cación- π .¹²⁸ Esto le da al ion guanidinio un tipo de deslocalización de electrones que en algunos casos se denomina "aromaticidad Y", lo que permite interacciones con compuestos planos ricos en electrones como los anillos de fenilo, teniendo en cuenta que estas propiedades la convierten en un grupo funcional importante.¹²⁶

La síntesis típica de guanidina implica la reacción entre una amina y agentes guanilantes como las isotioureas, carbodiimida, amidina, cianamida, pirrazol, trifilguanidinas y tiourea; entre ellos, la tiourea es el agente de guanilación más prometedor debido a su estabilidad y facilidad de preparación.¹²⁹ Las tioureas reaccionan principalmente con aminas primarias unidas a carbonos primarios debido al volumen de los sustituyentes. La eficiencia de la guanilación también depende de si el sustituyente que está unido a la amina actúa como grupo atractor o donador de electrones. Las aminas unidas a un grupo atractor de electrones, tienden a dar rendimientos más bajos en guanilación. Generalmente, se requiere una tiourea que tenga uno o más grupos de atractor de electrones para que la reacción proceda.^{127,128}

Se han descrito varios agentes de desulfuración para la generación de guanidinas a partir de tioureas, incluyendo cloruro de mercurio (II), óxido de mercurio (II), sulfato de cobre (II), gel de sílice, cloruro de cobre (II), cloruro cianúrico, clorhidrato de etil-3-aminopropil carbodiimida (EDCI), I_2/PPh_3 , IBX y el reactivo de Mukaiyama.^{129,130,131} Debido a esta amplia gama de formas de sintetizarla, se observa su presencia en moléculas farmacológicamente activas con diferentes acciones biológicas como antibacteriana, antidiabética, antihistamínica, antiinflamatoria, cardiovascular y anticancer, por lo que se estudia intensamente como un objetivo sintético para desarrollado compuestos nuevos con actividades específicas.¹³² Un ejemplo sería la inhibición de la isoforma CA IX que implicada en procesos de tumorigénesis, donde el nivel de expresión de CA IX es elevado en respuesta a la hipoxia, que es una consecuencia del rápido crecimiento de muchos tumores y un regulador importante por una activación transcripcional directa del gen CA9 por el factor inducible por hipoxia (HIF-1).¹³³ El resultado general de la sobreexpresión de CA IX en tumores es una disminución del pH en el microambiente extracelular de pH~7.4 (tejido normal) a pH~6.8 (tumor hipóxico) que promueve

¹²⁸ Kelly B.; Rozas I.; *Tetrahedron Lett.* **2013** 54, 3982-3984.

¹²⁹ Srisa J.; Tankam T.; Sukwattanasinitt M.; Wacharasindhu S.; *Chem. Asian J.* **2019** 14, 3335-3343.

¹³⁰ Wangngae S.; Pattarawarapan M.; Phakhodee W.; *J. Org. Chem.* **2017** 82, 10331-10340.

¹³¹ Márquez J.; M.; López Ó.; Maya I.; Fuentes J.; Fernández-Bolaños J. G.; *Tetrahedron Lett.* **2008** 49, 3912-3915.

¹³² Cunha S.; Costa M. B.; Napolitano H. B.; Lariucci C.; Vencato I.; *Tetrahedron* **2001** 57, 1671-1675.

¹³³ Zolnowska B.; Slawinski J.; Pogorzelska A.; Chojnacki J.; Vullo D.; Supuran T. C.; *Eur. J. Med. Chem.* **2014** 71, 135-147.

la supervivencia e invasión de las células tumorales. Teniendo en cuenta la expresión anormalmente alta de CA IX en muchos tumores hipóxicos y su papel demostrado en los procesos de acidificación tumoral y la oncogénesis, esta isoforma constituye un objetivo atractivo para la terapia contra el cáncer.¹⁰⁴

Zolnowska¹³³ y colaboradores reportaron una serie de nuevas guanidinas *N*-sustituidas (9-41) como se muestra en la figura 2.15, que fueron evaluadas como inhibidores de cuatro isoformas la citosólica CA I y II, y las isoenzimas asociadas al cáncer CA IX y XII. Los compuestos **10**, **12-14**, **16,18-20**, **24-26**, **31** y **32** exhibieron una potente actividad inhibitoria hacia hCA IX, pero el compuesto **32** fue el más prometedor teniendo una selectividad más alta hacia hCA IX. El compuesto **14** fue el inhibidor más potente de hCA I ($K_i=87$ nM), hCA IX ($K_i=4.7$ nM) y hCA XII ($K_i=0.96$ nM), mientras que **26** fue el inhibidor más efectivo de hCA II ($K_i=7.8$ nM).¹³³

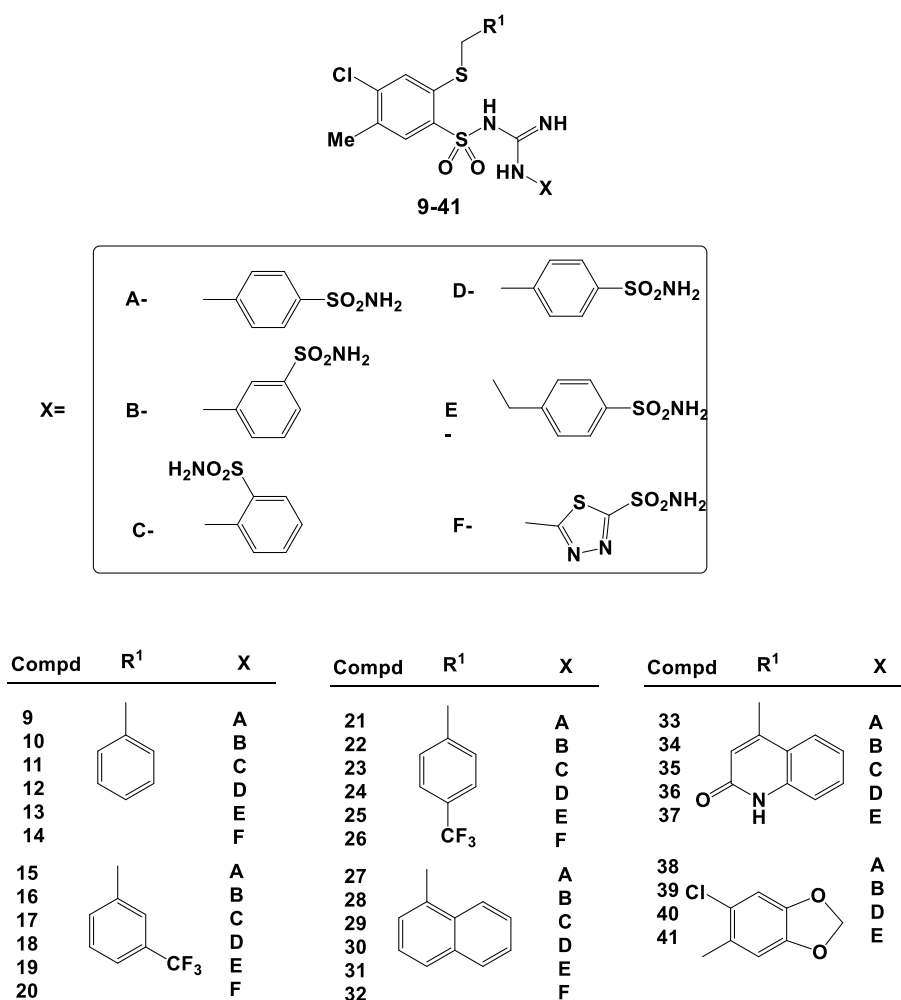


Figura 2.15. Serie de guanidinas *N*-sustituidas.

Otro ejemplo es el reportado por Żolnowska y colaboradores,¹³⁴ ellos sintetizaron una serie de nuevos derivados de guaidinas *N*-sustituidas (**9-20**), todos los compuestos sintetizados fueron evaluados para actividad inhibitoria hacia hCA I, II, IX y XII, así como la actividad anticancerígena contra líneas celulares tumorales humanas HeLa, HCT-116 y MCF-7. Los compuestos investigados mostraron una débil potencia inhibitoria contra la CA I humano, mientras que la actividad hacia hCA II se diferenciaba y dependía de la estructura del inhibidor. El compuesto **12** fue el más prometedor, mostró la mayor selectividad hacia hCA IX frente a hCA I y hCA II y mostró un efecto citotóxico prominente selectivamente hacia las células de cáncer HeLa y no exhibió toxicidad para las células no cancerosas HaCaT (figura 2.16).¹³⁴

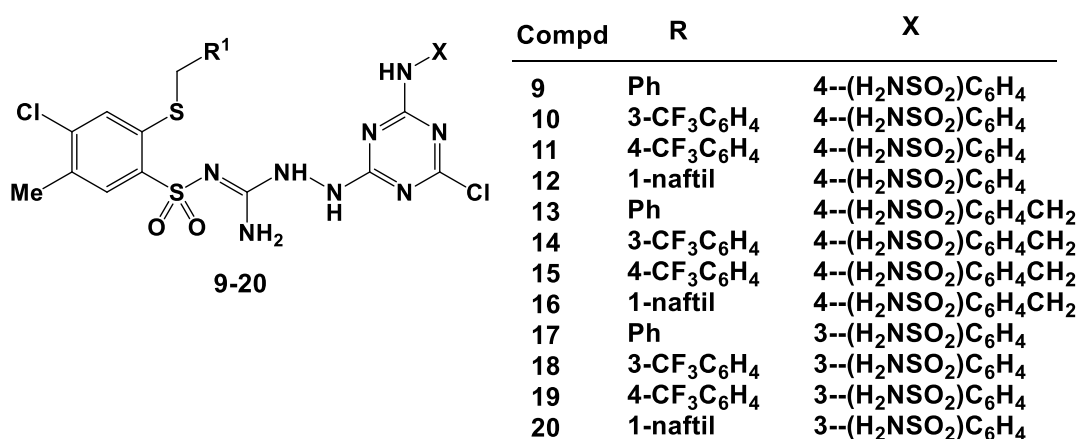


Figura 2.16. Derivados de guaidinas *N*-sustituidas.

2.4 Tioureas

La tiourea es el bioisómero clásico de la función urea, en el que el oxígeno es reemplazado por un átomo de azufre y representa una de las estructuras centrales más importantes incorporadas en la química medicinal,¹³⁵ es decir su estructura está formada por dos aminas unidas por una función tiocarbonilo.¹³⁶

Debido a su reactividad única, la tiourea es un grupo funcional importante en la química orgánica sintética. Las tioureas son precursores útiles en la síntesis de heterociclos

¹³⁴ Żolnowska B.; Sławiński J.; Szafranski K.; Angeli A.; Supuran T. C.; Kawiak A.; Wieczór M.; Zielińska J.; Bączek T.; Bartoszewska S.; *Eur. J. Med. Chem.* **2018** 143, 1931-1941.

¹³⁵ Dogan S. D.; Gündüz M. G.; Dogan H.; Krishna V. S.; Lherbet C.; Sriram D.; *Eur. J. Med. Chem.* **2020** 199, 112402.

¹³⁶ Gomez L.; Gellibert F.; Wagner A.; Mioskowski C.; *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 75-79.

farmacéuticamente importantes y *N*-alquil o *N*-aril imidas. Las tioureas también son intermediarios importantes para la síntesis de muchos compuestos biológicamente activos. Aparte de eso, las tioureas son compuestos importantes como building blocks en la síntesis de heterociclos. Por ejemplo, las tioureas se condensan con compuestos de tipo α -halocarbonilo para producir 2-amino-1,3-tiazoles.¹³⁷

Se pueden sintetizar por numerosos procedimientos pueden dividirse en tres grupos: (i) reacción de aminas primarias principalmente con tiofosgeno o sus sustitutos menos tóxicos y menos peligrosos; (ii) reacción de aminas primarias o secundarias con isotiocianatos que normalmente se preparan a partir de tiofosgeno; (iii) reacción de aminas primarias con disulfuro de carbono en presencia de acetato de mercurio (aunque a veces con o sin catalizador se puede llevar la reacción) y reacción de tioureas no sustituidas con alquilaminas primarias a alta temperatura.^{138,139}

Cabe señalar que los rendimientos de la obtención de la tiurea pueden variar, en casos en donde se utilizan altas temperaturas fueron típicamente más bajos que los obtenidos a temperaturas más suaves. Se sabe que calentando una mezcla de tioureas con ácidos por encima de 130 °C o calentando tioureas puros por encima de 200 °C, se pueden obtener isotiocianatos; por lo que una vez obtenidas las tioureas en la reacción y seguir calentando por encima de esas temperaturas se degradan de nuevo.¹⁴⁰

Muchos derivados de tiourea mostraron varias propiedades biológicas, como actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales. Además de las diversas propiedades biológicas de los derivados de tiourea, se encuentran entre los agentes anticancerosos más prometedores. Su actividad anticancerígena puede deberse a su capacidad para inhibir algunas enzimas como las proteínas tirosina quinasas (PTK), la topoisomerasa II, las proteínas de tipo sirtuína humana, así como la síntesis de reparación del ADN. Algunos de los derivados de tiourea *N*-sustituida se han descrito como inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El EGFR tiene un papel fundamental en el desarrollo de muchos tumores sólidos humanos.¹⁴¹

¹³⁷ Seelam M.; Shaikh B. V.; Tamminana R.; Kammela P. R.; *Tetrahedron Lett.* **2016** 57, 5297-5300.

¹³⁸ Naz S.; Zahoor M.; Umar M. N.; Ali B.; Ullah R.; Shahat A. A.; Mahmood H. M.; Umar M., Sahibzada K., *Drug Des Dev Ther* **2019** 13, 3485-3495.

¹³⁹ Halimehjani A. Z.; Farahbakhsh F.; *J. Sulfur. Chem.* **2013** 34, 3, 284-288.

¹⁴⁰ Vlatkovic M.; Feringa B. L.; *Tetrahedron* **2019** 75, 2188-2192.

¹⁴¹ Abbas S. Y.; Al-Harbi R. A.K.; Sh El-Sharief M. A.M.; *Eur. J. Med. Chem.* **2020** 198, 112363.

Hay muchos ejemplos comerciales (figura 2.17) que llevan el grupo tiourea integrado en sus estructuras, como tiocarluro o ISOXYL (antituberculoso), tioacetazona (antituberculoso), noxitiolina (antibacteriano) y tiopental (anestésico general).^{135,142}

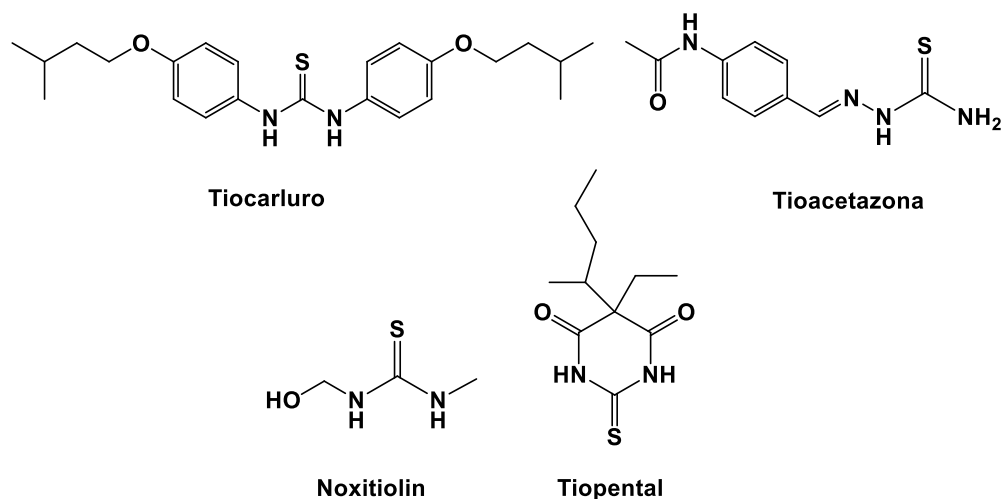


Figura 2.17. Ejemplo de las drogas que contienen tiourea.

Otros ejemplos reportados de tioureas que presentan diversas propiedades biológicas es la *N*-ariltiourea 4 (figura 2.18), que muestra la mayor potencia contra las cepas estándar y resistentes a la metilina de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* a través de su efecto inhibitorio sobre la topoisomerasa IV. Se demostró que la tiourea 5 era 2,7 veces más activa que el control positivo metotrexato como inhibidor de la dihidrofolato reductasa (DHFR).¹⁴³

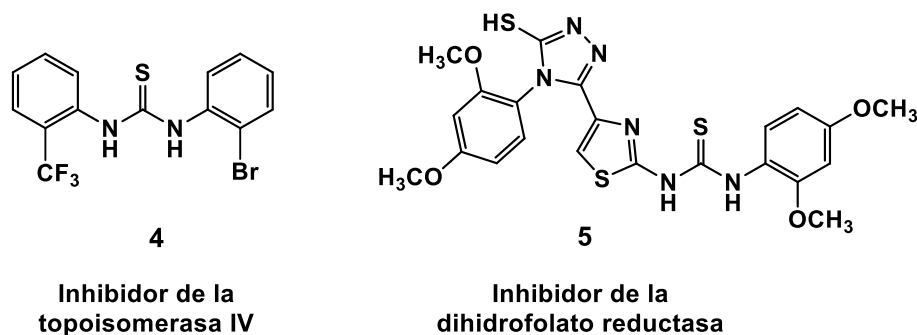


Figura 2.18. Ejemplo de compuestos que actúan como inhibidores que contienen tiourea.

¹⁴² Shakeel A.; Altaf A. A.; Qureshi A. M.; Badshah A.; *J. Drug Des. Med. Chem.* **2016** 2, 1, 10-20.

¹⁴³ Hashem H. E.; Amr A. E.-G. E.; Nossier E. S.; Elsayed E. A.; Azmy E. M.; *Molecules* **2020** 25, 2766.

2.5 Sales de fosfonio

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares comúnmente reconocidos como la fuente de energía de la célula; sin embargo, además de su función en el metabolismo energético, se ha hecho cada vez más evidente que las mitocondrias desempeñan funciones importantes en una gran variedad de procesos que incluyen apoptosis, diferenciación celular, detección de oxígeno y metabolismo del calcio. Estas, son fundamentales para la vida y muerte celular; por lo tanto, no es sorprendente que el daño mitocondrial contribuya a una amplia gama de enfermedades que incluyen enfermedad de Parkinson, diabetes, enfermedad de Huntington, trastornos asociados con mutaciones del ADN mitocondrial, la apoptosis defectuosa en el cáncer, las enfermedades degenerativas y la fisiopatología del envejecimiento.¹⁴⁴ Son las centrales eléctricas de las células que mantienen la homeostasis celular proporcionando energía celular, almacenada en trifosfato de adenosina (ATP), a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Durante el metabolismo oxidativo mitocondrial, se generan las especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante un proceso rédox endógeno. Cuando las ROS se generan sin protección antioxidante regulada al alza, se produce una disfunción mitocondrial, una deficiencia relacionada con una variedad de trastornos relacionados con el estrés oxidativo, como enfermedades neurodegenerativas, daño por isquemia-reperusión y cáncer.¹⁴⁵

Además desde la década de los 2000, han sugerido que las células cancerosas, en comparación con sus contrapartes no tumorales, se caracterizan por una alteración de la homeostasis redox y una membrana mitocondrial interna hiperpolarizada. La producción permanente de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de las mitocondrias puede predisponer a carcinogénesis, crecimiento tumoral y metástasis, pero por otro lado, un aumento repentino, notable y dirigido de ROS puede activar la señalización proapoptótica e inducir la transición de la permeabilidad mitocondrial que resulta en la muerte celular.¹⁴⁶

En la última década, el desarrollo de mitocans experimentó un progreso relevante. "Mitocan" es una abreviatura de fusión que significa "mitocondrias" y "cáncer" para reflejar los efectos anticancerosos mediados por compuestos que actúan sobre las mitocondrias. Los mitocans son

¹⁴⁴ Guzman V. D.; Weissig V.; *Handb Exp Pharmacol.* **2016** 240, 423-438.

¹⁴⁵ Fernandes C.; Benfeito S.; Amorim R.; Teixeira J.; Oliveira P. J.; Remião F.; Borges F.; *Bioconjugate Chem.* **2018** 29, 2723-2733.

¹⁴⁶ Bavo F.; Pucci S.; Fasoli F.; Lammi C.; Moretti M.; Mucchiello V.; Lattuada D.; Viani P.; De Palma C.; Budriesi R.; Corradini I.; Dowell C.; McIntosh J. M.; Clementi F.; Bolchi C.; Gotti C.; Pallavicini M.; *J. Med. Chem.* **2018** 61, 10531-10544.

agentes anticancerígenos que se dirigen específicamente a las células tumorales mitocondrias.¹⁴⁷ Los mitocanos se clasifican actualmente en ocho categorías según las diferentes dianas mitocondriales: incluidos los inhibidores de la hexoquinasa, los fármacos dirigidos a las proteínas de la familia Bcl-2, los inhibidores redox de tiol, fármacos dirigidos a canales aniónicos dependientes de voltaje/translocasas de nucleótidos de adenina (VDAC/ANT), fármacos dirigidos a la cadena de transporte de electrones, cationes lipofílicos dirigidos a la membrana interna mitocondrial, fármacos dirigidos al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y fármacos dirigidos al ADNmt. Estos mitocans se han estudiado en diferentes ensayos clínicos, lo que indica que son fármacos potencialmente relevantes.¹⁴⁷ Sin embargo, un inconveniente importante del uso de mitocans es su escasa selectividad en la mayoría de los casos, lo que podría causar graves daños también en células sanas. Algunos otros como los antioxidantes han tenido un éxito limitado en la prevención de la progresión de enfermedades que involucran daño oxidativo mitocondrial. Una posible razón de esto puede ser que la mayoría de los antioxidantes de moléculas pequeñas se distribuyen por el cuerpo y las mitocondrias solo absorben una pequeña fracción. Por lo tanto, se requieren antioxidantes de molécula pequeña estables y farmacéuticamente tratables que sean absorbidos selectivamente por las mitocondrias dentro de los órganos más afectados por el daño oxidativo mitocondrial donde bloquean el daño oxidativo.¹⁴⁸

En consecuencia, el diseño de fármacos citotóxicos dirigidos a las mitocondrias se ha formulado como una estrategia novedosa para superar la resistencia apoptótica en las células tumorales, lo que, curiosamente abre una vía completamente nueva para la terapia del cáncer al engañar a las células cancerosas para que se suiciden.¹⁴⁹ Una alternativa son los cationes lipofílicos, donde la carga positiva deslocalizada de estos les permite penetrar fácilmente las bicapas lipídicas. Su naturaleza catiónica atrae estas moléculas a las paredes celulares o bicapas lipídicas con potenciales de energía negativos. La naturaleza lipofílica permite un fácil transporte a través de la membrana, el resultado neto es una rápida acumulación de esta familia de compuestos en el interior de las células o compartimentos celulares, debido al gran potencial de la membrana.¹⁵⁰ La capacidad de las mitocondrias para acumular cationes lipofílicos ha adquirido particular interés como objetivo para la interrupción de las fuentes de alimentación celular. El enfoque más extendido de estos cationes es el uso para destruir selectivamente las células cancerosas, esto es posible porque

¹⁴⁷ Wang J.; Li J.; Xiao Y.; Fu B.; Qin Z.; *RSC Med. Chem.* **2020**, 11, 858-87.

¹⁴⁸ Murphy P. M.; *BBA-Gen Subjects* **2008** 1777, 1028-1031.

¹⁴⁹ Horobin R. W.; Trapp S.; Weissig V.; *J. Control Release* **2007** 121, 125-136.

muchas células cancerosas tienen un mayor potencial de membrana mitocondrial que las células no transformadas; lo que conduce a una mayor acumulación de cationes lipofílicos que causan muerte celular por alteración inespecífica de la función mitocondrial. Esto se ha ampliado para utilizar cationes lipofílicos seleccionados debido a su toxicidad intrínseca, además los cationes lipofílicos se han diseñado para ayudar a eliminar selectivamente las células cancerosas usándolos como sensibilizantes junto con tratamientos como la fototerapia o la radioterapia.¹⁵⁰

Uno de ellos son las sales de arilfosfonio sustituidas (APS) son una clase de compuestos catiónicos lipofílicos cargados positivamente que se acumulan en las mitocondrias. La acumulación de compuestos APS en las mitocondrias de las células cancerosas se incrementa aún más como se ha mencionado anteriormente, haciéndolas posibles agentes de formación de imágenes tumorales y/o dianas para quimioterapias. Los compuestos APS penetran selectivamente en células tan diversas como el glioma de rata, el cáncer de mama humano, el melanoma y el cáncer de cuello uterino sobre las células epiteliales no cancerosas (normales) para acumularse en el entorno más negativo dentro de las mitocondrias.¹⁵⁰

Las sales de trifenilfosfonio (TPP⁺) también es un catión lipofílico deslocalizado, un grupo relevante de arilfosfonio sustituidas.¹⁵¹ La carga positiva de los cationes TPP⁺ facilita que sean absorbidos por las mitocondrias impulsados por el gran potencial de membrana mitocondrial.¹⁵² A menudo se asume que la fracción TPP⁺ en sí misma no exhibe ninguna actividad biológica significativa, sin embargo, su alta afinidad por las membranas de fosfolípidos hace que sea probable que altere la integridad de la membrana, especialmente en las mitocondrias donde se acumulan dichos compuestos, lo que podría también alterar la función de las proteínas de la membrana mitocondrial, como los complejos de la cadena respiratoria.¹⁵³ Los cationes TPP⁺ se han utilizado ampliamente en el estudio de las mitocondrias, particularmente como sondas en la medición del potencial de membrana mitocondrial (principalmente sales de metiltrifenilfosfonio, TPMP). En la última década, se han preparado y utilizado varios derivados de TPP⁺ con actividades químicas y biológicas significativas con fines diagnósticos y terapéuticos.¹⁵⁴

¹⁵⁰ a) Bergeron K. L.; Murphy E. L.; Majofodun O.; Muñoz L. D.; Williams Jr. J. C.; Almeida K. H.; *Mutat. Res.* **2009** 673, 141-148. b) Murphy M. P.; Smith R. A.J.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2000** 41, 235-250.

¹⁵¹ Kyriazopoulos A.; Alexiou A.-L.; Miliotou A.; Papadopoulou L.; Hatzidimitriou A.; Papagiannopoulou D.; *Inorganica Chim. Acta* **2020** 511, 119807.

¹⁵² Finichiu P. G.; James A. M.; Larsen L.; Smith R. A. J.; Murphy M. P.; *J. Bioenerg. Biomembr.* **2013** 45,165-173.

¹⁵³ Trnka J.; Elkalaf M.; Andel M.; *Plos One* **2015** 10, 4, e0121837..

¹⁵⁴ Elkalaf M.; Tůma P.; Weiszenstein M.; Polák J.; Trnka J.; *Plos One* **2016** 11, 8, e0161413.

Por otro lado, existen reportes de que los cationes TPP⁺ han mostrado ser antibacterianos y un ejemplo es la serie de cationes basados en derivados de alquilo de trifenilfosfonio (C_n-TPP⁺) que contienen cadenas de hidrocarburos lineales (butilo, octilo, decilo y dodecilo) en sistemas de mitocondrias aisladas, bacterias y liposomas; en donde, los C_n-TPP tuvieron un efecto estimulante sobre la respiración mitocondrial aumentaba constantemente con la longitud de la cadena. Los experimentos con bacterias demostraron que dodecil-TPP⁺, decil-TPP⁺ y octil-TPP⁺ de manera similar al análogo que contiene quinonas (SkQ1) inhibieron el crecimiento de la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis*, en la que el efecto inhibitor se incrementó con la lipofilidad creciente. Estos cationes no mostraron efectos tóxicos sobre el crecimiento de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* (figura 2.19).¹⁵⁵

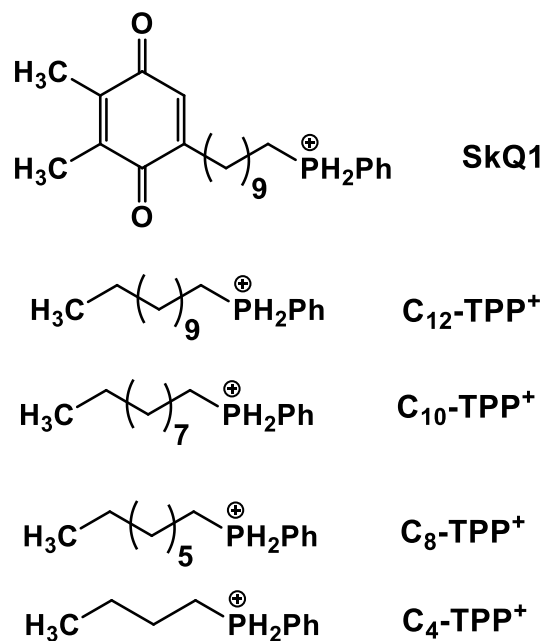


Figura 2.19. Estructuras de cationes SkQ1 y C_n-TPP⁺.

En otro estudio de cationes trifenilfosfonio (TPP) del diterpenoide isosteviol (ácido 1,16-oxo-ent-beyeran-19-oico) se evaluaron como agentes antimitóticos. El resto de TPP se empleó como vehículo para proporcionar una acumulación selectiva en las mitocondrias; el estudio de la relación estructura-actividad reveló el papel esencial del grupo TPP que tiene al estar unido al isosteviol,

¹⁵⁵ Khailova L. S.; Nazarov P. A.; Sumbatyan N. V.; Korshunova G. A.; Rokitskaya T. I.; Dedukhova V. I.; Antonenko Yu. N.; Skulachev V. P.; *Biochemistry* **2015** 80, 2, 1589-1597.

mostrando una fuerte relación entre ellos en acumulación en las mitocondrias, mientras que la estructura química y la longitud del enlazador solo influyeron ligeramente en la potencia antimitótica. (Figura 2.20).¹⁵⁶

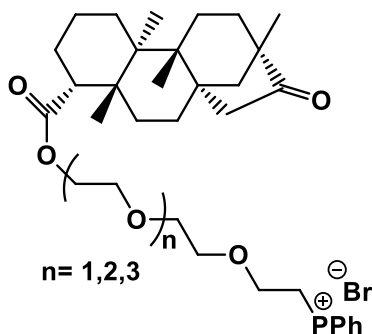


Figura 2.20. Estructuras cationes trifenílfosfonio (TPP) del isosteviol diterpenoide (ácido 1,16-oxo-ent-beyeran-19-oico).

2.6 Benzoxazoles

Los benzoheterociclos como los benzoxazoles son heterociclos prominentes, porque desde el punto de vista de la química medicinal estos compuestos exhiben diferentes tipos de propiedades medicinales, cabe destacar que, dentro de los 200 fármacos más relevantes, cerca de 10 productos están relacionados con el benzoxazol.¹⁵⁷ Los benzoxazoles son los isómeros estructurales de las bases nucleicas adenina y guanina que les permiten interactuar fácilmente con los receptores biológicos.¹⁵⁸ Estudios recientes dan una idea clara de que los benzoxazoles y sus análogos relacionados tienen una amplia gama de aplicaciones farmacológicas como antiinflamatorios, antitumorales, hipoglucémicos, antivirales, antimicrobianos, herbicidas, H₂-antagonistas, anticonvulsivos, inhibidores de elastasa y agentes antituberculosos. Además, el núcleo de benzoxazol también se encuentra en muchas moléculas biológicamente activas de origen natural como antibacterianos gram-positivos.¹⁵⁹

¹⁵⁶ Strobrykina I. Yu.; Belenok M. G.; Semenova M. N.; Semenov V. V.; Babaev V. M.; Rizvanov II. Kh.; Mironov V. F.; Kataev V. E.; *J. Nat. Prod.* **2015** 78, 1300-1308.

¹⁵⁷ Reddy G. M.; Kumari A. K.; Reddy V. H.; Garcia J. R.; *Bioorg. Chem.* **2020** 100, 103908.

¹⁵⁸ Erol M.; Celik I.; Temiz-Arpaci O.; Kaynak-Onurdag F.; Okten S.; *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**.

¹⁵⁹ Angajala G.; Subashini R.; *Struct Chem* **2020** 31, 263-273.

Es por ello que el desarrollo de nuevas metodologías para la construcción de derivados del benzoxazol ha sido investigado y reportado continuamente (figura 2.21).¹⁶⁰ Entre los métodos para la síntesis de estos heterociclos, se encuentran: la condensación de *o*-aminobencenetiolo, *o*-aminofenol u *o*-fenilendiamina con cloruros de ácido, ácidos carboxílicos, ésteres, aldehídos, óxido de nitrilo, dibromometilarenos y ortoésteres en presencia de un ácido fuerte. También se ha informado de la ciclación catalizada por cobre o paladio de *o*-halobenzanilidas y la ciclación por radicales de tioformanilidas sustituidas con triacetato de manganeso.¹⁶¹

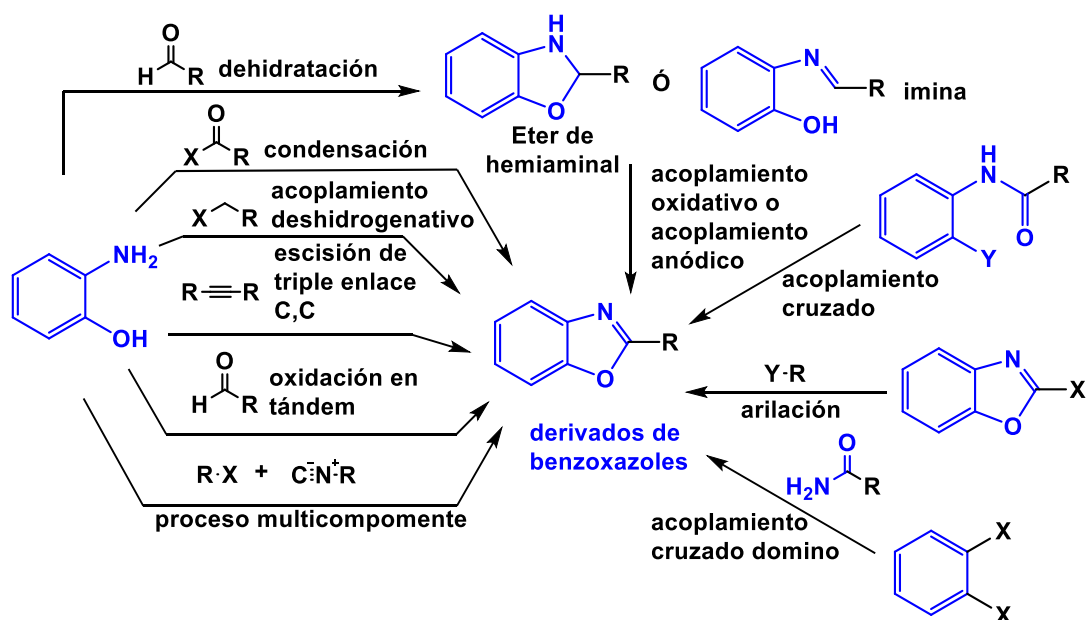


Figura 2.21. Métodos reportados para la obtención de los anillo benzoxazoles.

La importancia biológica de los benzoxazoles se está expandiendo, ya que se descubrió que tienen actividades anticancerígenas, como el derivado benzoxazol carboxamida **7** (figura 2.22) mostró la mayor potencia contra la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 y el derivado de 4-clorofenil benzoxazol sustituido **8**, reveló una actividad potente contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 donde su actividad se explica por su potente inhibición de las enzimas EGFR, HER-2 y VEGFR que se sobreexpresan en el cáncer de mama.¹⁶²

¹⁶⁰ Chang W.; Sun Y.; Huang Y.; *Heteroat. Chem.* **2017** 28, 21360.

¹⁶¹ Shirini F.; Mamaghani M.; Seddighi M.; *Res. Chem. Intermed.* **2015** 41, 5611-5619.

¹⁶² Omar A.- M. M.E.; AboulWafa O. M.; El-Shoukrofy M. S.; Amr M. E.; *Bioor. Chem.* **2020** 96, 103593.

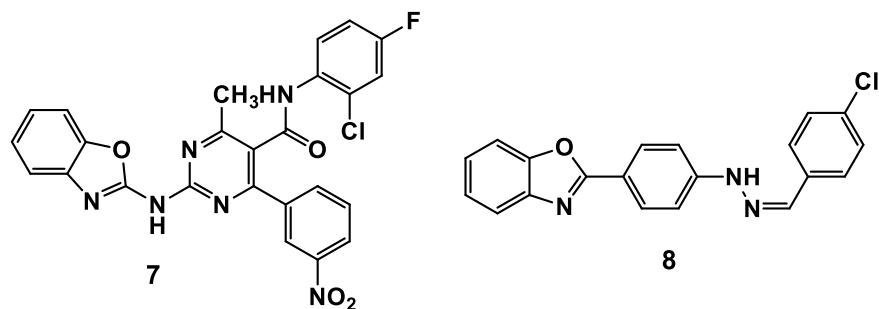


Figura 2.22. Derivados de benzoxazoles.

Por otro lado, benzoxazoles 2-sustituidos se estudiaron como una nueva familia de inhibidores de la anhidrasa carbónica II y la capacidad de eliminación de radicales libres. Donde se encontró que los compuestos **3f** y **3j** eran los compuestos con actividad inhibitoria más potentes, con valores de IC_{50} de 5.64 y 5.96 nM, respectivamente, que son varias veces mejores que los del estándar, acetazolamida (valor de IC_{50} 997 ± 58.6 nM). En los resultados de un ensayo de captación de radicales DPPH mostraron que el perfil antioxidante del compuesto **3i** es superior al de otros derivados (figura 2.23).¹⁶³

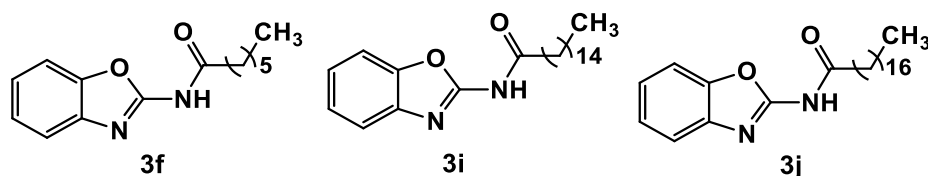


Figura 2.23. Estructuras de algunos derivados de benzoxazoles con actividad inhibitoria frente a CA II y antioxidante.

En base a todo lo anteriormente expuesto, en la presente unidad de la Tesis Doctoral se llevará a cabo la descripción de una amplia variedad de cumarinas con fragmentos de tipo urea/tiourea, guanidina, fosfonio, o benzoxazoles, así como la evaluación de su actividad antiproliferativa e inhibitoria de CA de interés terapéutico.

¹⁶³ Saeed A.; Channar P. A.; Arshad M.; El-Seedi H. R.; Abbas Q.; Hassan M.; Raza H.; Seo S.-Y.; *J. Heterocycl. Chem.* **2020** 57, 2831-2843.

Capítulo 2.3: Objetivos

Objetivo General:

Llevar acabo la síntesis de nuevos derivados de cumarinas con el objeto de evaluarlos como agentes antiproliferativos donde uno de los posibles mecanismos de acción sea la inhibición de CAs relacionadas con procesos tumorales (CA IX, XII).

Objetivos Particulares:

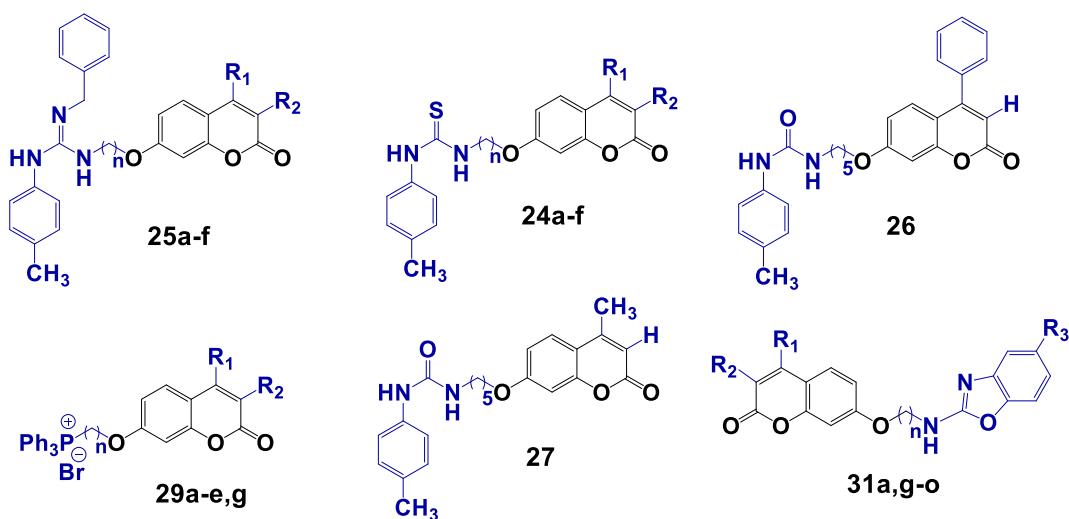
- Desarrollar rutas sintéticas para obtener nuevos derivados de cumarinas utilizando resorcinol y diferentes β -ceto-ésteres como materia de partida.
- Modificar el espaciador así como los sustituyentes en las posiciones C-3 y C-4 de las cumarinas que permita la obtención de una variedad de derivados para establecer la relación estructura-actividad y así encontrar el derivado cabeza de serie.
- Caracterizar adecuadamente los productos obtenidos, empleando para ello los diferentes métodos físicos y espectroscópicos habituales en síntesis orgánica.
- Realizar pruebas de actividad inhibitoria contra las cuatro isoformas de anhidrasa carbónica humana fisiológicamente relevantes (hCA, EC 4.2.1.1) CA I, CA II, CA IX y CA XII; de esta manera se evaluará la posible implicación de estas enzimas (CA IX, XII) en la actividad antitumoral, así como la selectividad frente a CA que no deben ser inhibidas para evitar efectos secundarios (e.g. CA I).
- Realizar pruebas de actividad antiproliferativa frente a distintas líneas celulares cancerosas, así como la selectividad frente a líneas no tumorales.

Capítulo 2.4: Discusión de Resultados

Sabiendo la importancia farmacología de los derivados de cumarina, principalmente en el diseño y descubrimiento de nuevos fármacos contra el cáncer, y actualmente que son una clase relativamente nueva de inhibidores de la metaloenzima anhidrasa carbónica (CA). Se realizó la síntesis de nuevas estructuras de cumarinas con grupos de tiurea, guanidinas, sales de fosfonio o bicíclidos de benzaxazoles a través de un espaciador en el grupo hidroxilo de la posición 7 del núcleo de cumarina con diversos sustituyentes (**20a-d**) que a continuación se describe.

4.1 Estructuras de los derivados de cumarina obtenidos

A continuación, se presentan los nuevos derivados de diferentes cumarinas que se obtuvieron (Figura 2.24).



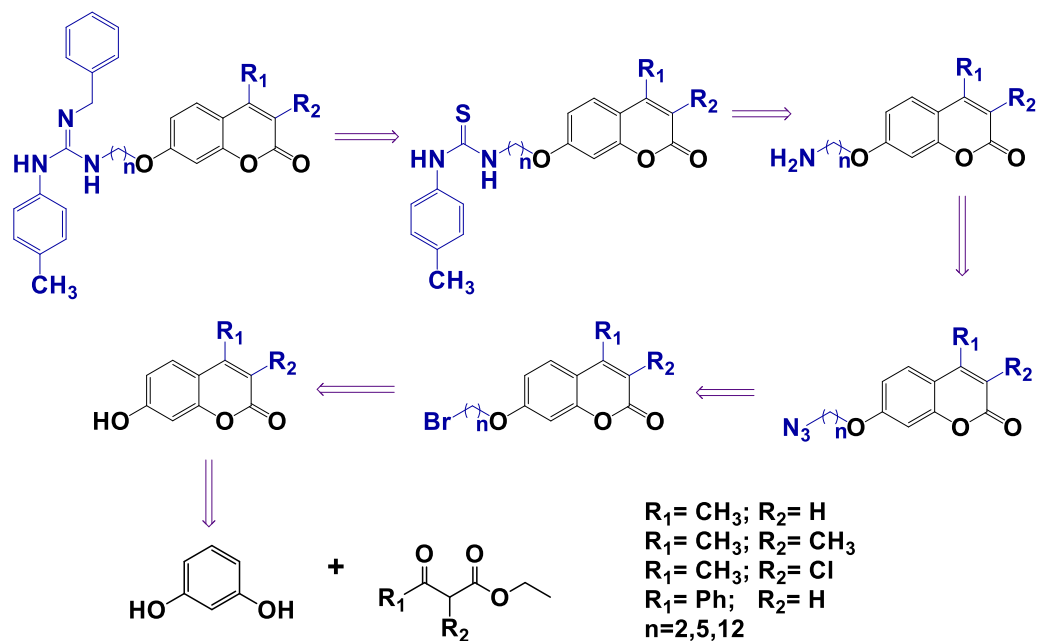
Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	n
a	CH ₃	H	H	5
b	CH ₃	CH ₃	-	5
c	CH ₃	Cl	-	5
d	Ph	H	-	5
e	CH ₃	H	-	12
f	CH ₃	H	-	2
g	CH ₃	H	H	3
h	CH ₃	H	H	6
i	CH ₃	CH ₃	H	6
j	CH ₃	Cl	H	6
k	Ph	H	H	6
l	CH ₃	H	Br	5
m	CH ₃	H	CH ₃	5
n	CH ₃	H	Ph	5
o	CH ₃	H	SO ₂ NH ₂	5

Figura 2.24.

Todos los compuestos sintetizados fueron caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H , ^{13}C y espectrometría de masas; para los compuestos sólidos se midió también el punto de fusión.

4.2. Retrosíntesis de derivados de cumarina

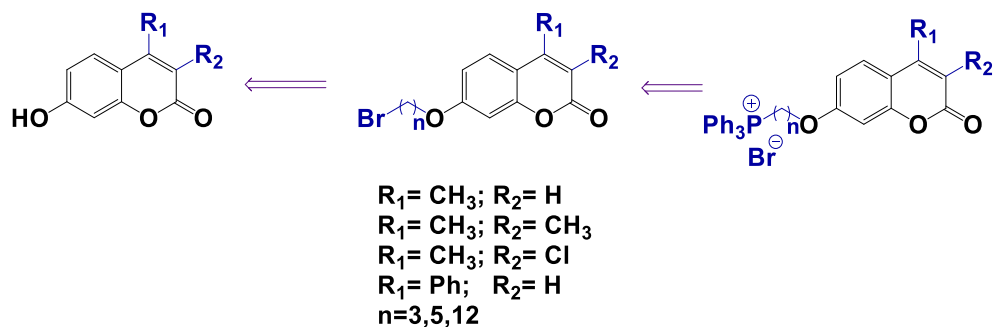
En el esquema 2.2 se muestra la retrosíntesis que se planteó para obtener varios derivados de guanidinas procedentes de diferentes cumarinas a través de 6 pasos de síntesis. Por medio de la obtención de los intermediarios de tioureas, que se aislaron a partir de diferentes aminas. Las cuales son procedentes de la reducción del grupo azido y que estas a su vez por la incorporación de un espaciador en el grupo hidroxilo del C-7 de la cumarina. Estas cumarinas sustituidas en las posiciones C-3 y/o C-4, fueron obtenidas con resorcinol y diferentes β -ceto-ésteres.



Esquema 2.2. Retrosíntesis de los derivados de guanidina.

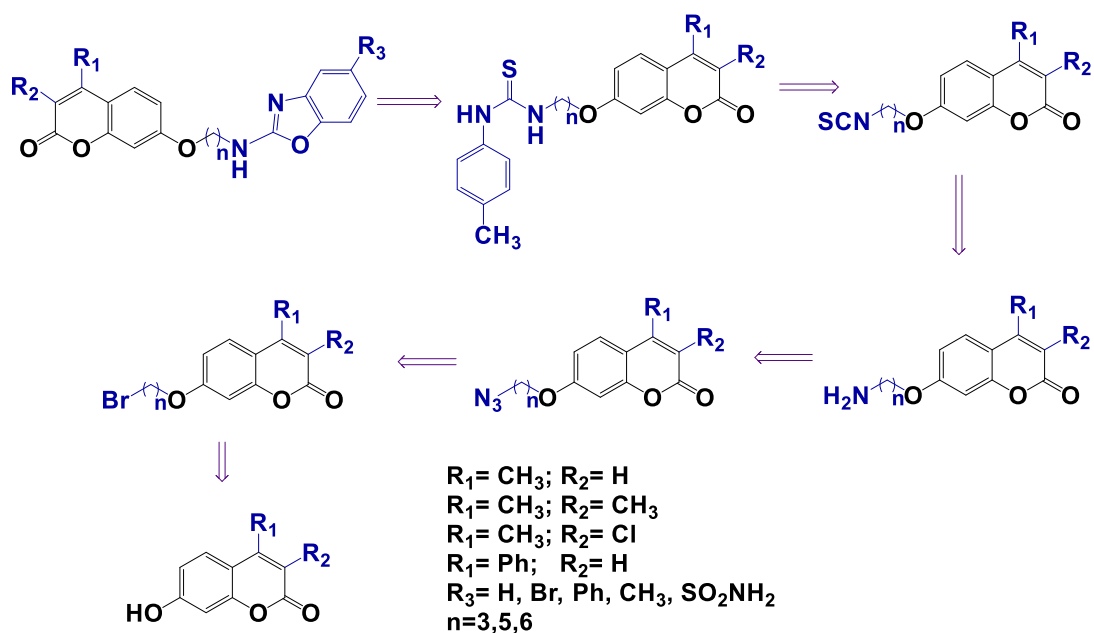
Otra retrosíntesis que se planteó es la que se muestra en el esquema 2.3, que son derivados de sales de fosonio procedentes de diferentes cumarinas sustituidas. Estos derivados se

obtienen por el asilamiento previo de los derivados alquilados en la ruta paletada anteriormente y que después se sustituyen con trifenil fosfina.



Esquema 2.3. Retrosíntesis de los derivados de sales de fosonio.

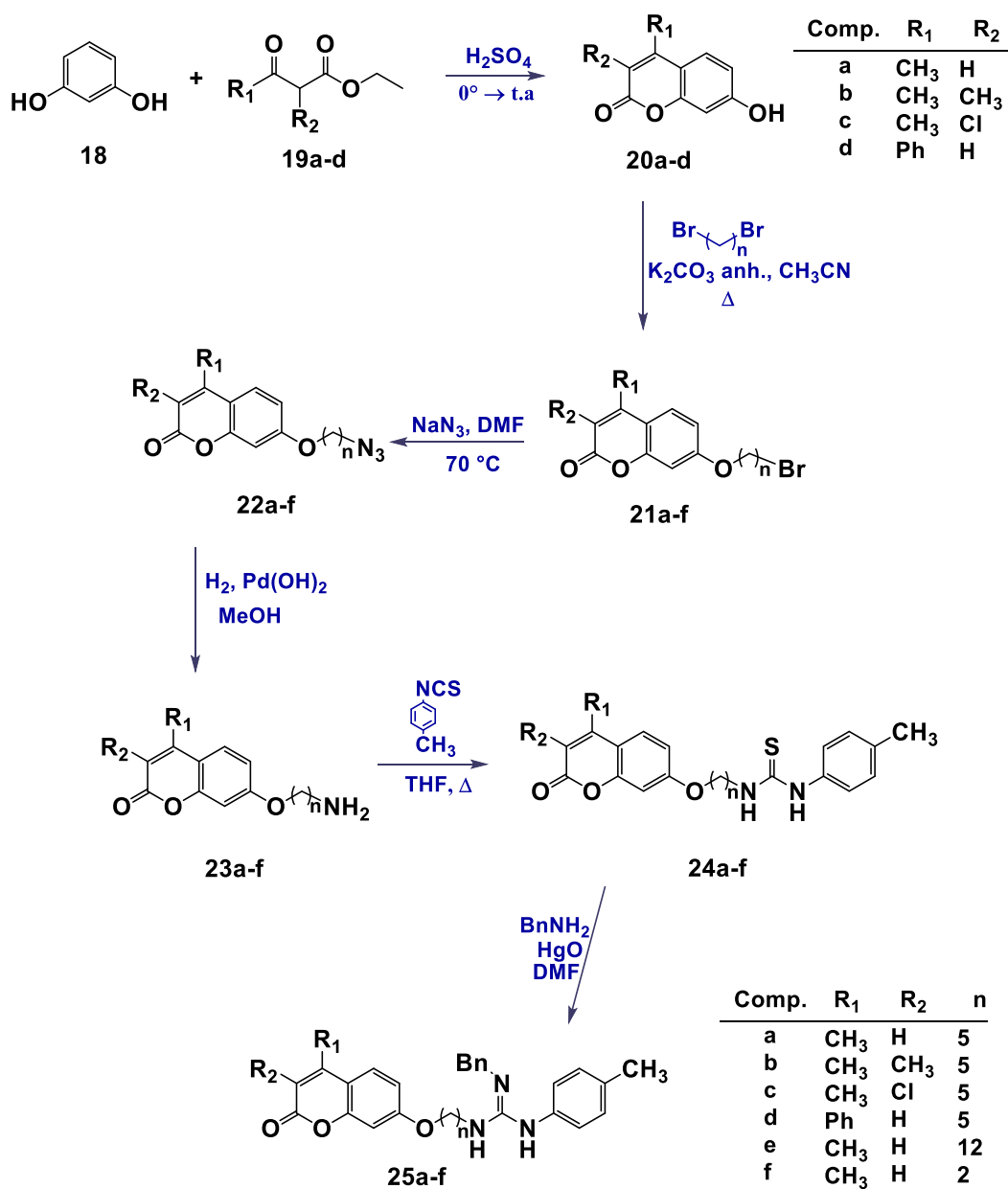
Una última retrosíntesis es la que se muestra en el esquema 2.4, donde se planteó la combinación de cumarinas con un sistema heterocíclico de tipo benzoxazol a través de 6 pasos de síntesis. Por medio de la obtención de diferentes tioureas, que se aislaron por la reacción de los derivados de isotiocianatos previamente obtenidos con *p*-toluidina. El resto de intermediarios son obtenidos previamente de otras rutas sintéticas planteadas anteriormente.



Esquema 2.4. Retrosíntesis de benzoxazoles derivados de cumarinas.

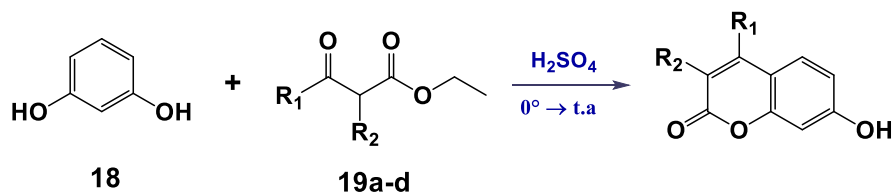
4.2.1. Obtención de los derivados de guanidina.

En el esquema 2.5 se muestra la ruta sintética que se llevó a cabo para la obtención de los derivados de guanidina de diferentes cumarinas.



Esquema 2.5. Ruta sintética de los derivados de guanidina.

Se inició la síntesis con la obtención de cuatro cumarinas (**20a-d**) como se muestra en el esquema 2.6. Dentro de esta síntesis, se utilizaron las metodologías ya reportadas para su obtención,¹³⁸⁻¹⁴² pero con una variación. Este es uno de los métodos clásicos emplean para la síntesis de las cumarinas por una reacción de Pechmann,⁵⁰ se utiliza H₂SO₄ concentrado al cual se le adiciona una mezcla de resorcinol (**18**) y diferentes β-ceto-ésteres (**19a-d**), se deja reaccionar por un tiempo de 4 h a temperatura ambiente. La variación que se utilizó en comparación a las metodologías reportadas es el tratamiento de la reacción; una vez terminada la reacción se vierte en un baño de hielo, después se neutraliza con Na₂CO₃ y se extrae con AcOEt. Ya que las metodologías reportan el aislamiento de la cumarina es a través de precipitaciones, las cuales se realizaron en primera instancia para la obtención de la materia prima pero se observó una pérdida considerable de producto. Por lo que se optó por ese tratamiento ya antes mencionado con rendimiento de 50-56%.



Comp.	R ₁	R ₂	Rend. (%)
19,20 a	CH ₃	H	56
19,20 b	CH ₃	CH ₃	52
19,20 c	CH ₃	Cl	51
19,20 d	Ph	H	50

Esquema 2.6. Síntesis de las cumarinas **20a-d**.

¹³⁸ Chauhan N. B.; Patel N. B.; Mistry B. M.; *J. Chem. Pharm. Res.* **2017** 9, 7, 171-178.

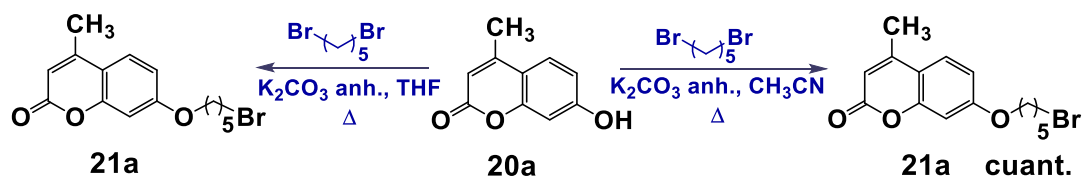
¹³⁹ Najjar R.; Bigdeli E.; *Eur. Polym. J.* **2018** 104, 136–146.

¹⁴⁰ Kathuria A.; Gupta A.; Priya N.; Singh P.; Raj H. G.; Prasad A. K.; Parmar V. S.; Sharma S. K.; *Bioorg. Med. Chem.* **2009** 17, 1550–1556.

¹⁴¹ Chauhan N. B.; Patel N. B.; Mistry B. M.; *IJPSR* **2018** 9,6, 2595-2603.

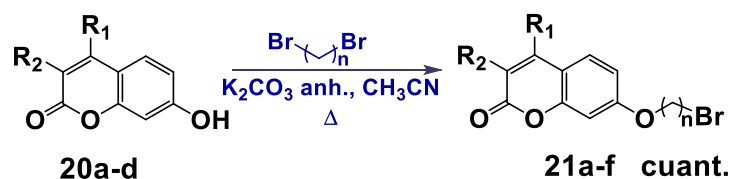
¹⁴² El-Haggag R.; Al-Wabli R. I.; *Molecules* **2015** 20, 5374- 539.

La optimización del proceso de alquilación se llevó a cabo sobre la cumarina **20a**, las primeras condiciones que se probaron fueron con 1,5-dibromopentano y usando como base K_2CO_3 anh. en THF a reflujo; dentro de estas condiciones se varió los equivalentes del 1,5-dibromopentano comenzando con 2 eq. hasta terminar con 10 eq. para consumir toda la cumarina; además de la base se adicionaron 2 eq. hasta 4 eq. Los tiempos de reacción en estas condiciones fueron largos hasta 30 h y siendo una reacción limpia dando como único producto de alquilación **21a**, sin mostrar que se haya llevado acabo la dimerización de la cumarina; esto debido al exceso que se adiciona del dibromoalcano. Tratando de disminuir el tiempo de reacción se decidió cambiar el disolvente por MeCN manteniendo los 10 y 4 eq. del dibromoalcano y de la base, respectivamente, dando como resultado un tiempo de reacción más corto de 4 h. En donde el derivado **21a** mostro el mismo comportamiento que las condiciones anteriores, aislándolo como único producto en un rendimiento cuantitativo como se observa en el esquema 2.7.



Esquema 2.7. Optimización de condiciones de reacción para la obtención del derivado **21a**.

Una vez que se establecieron las condiciones de reacción optimizadas para la alquilación, se aplicaron estas condiciones a las cumarina **20b-d** con el mismo dibromoalcano de 5 carbonos y variando el espaciador en la cumarina **20a** para dar así los derivados **21b-f** con rendimientos cuantitativos para todos ellos como en muestra en el esquema 2.8.



Comp.	R ₁	R ₂	n
20,21 a	CH ₃	H	5
20,21 b	CH ₃	CH ₃	5
20,21 c	CH ₃	Cl	5
20,21 d	Ph	H	5
21 e	CH ₃	H	12
21 f	CH ₃	H	2

Esquema 2.8. Alquilación de las cumarinas 20a-d.

Los compuestos **21a-d** y **21f** se encuentran descritos en la bibliografía:¹⁴³⁻¹⁴⁷ por ello, el único compuesto que se caracterizo fue le derivado **21e**. En el espectro de RMN de ¹H se observan las señales 4.01 ppm y 3.41 ppm como tripletes que pertenecen a los protones del grupo metilo que están el vecinal al átomo de oxígeno y al átomo de Br. Otras señales destacables son las que se encuentran en el rango 1.95-1.72 ppm y 1.52-1.23 ppm que pertenecen a el resto de los CH₂ de la cadena hidrocarbonada, confirmando que se ha llevado a cabo con éxito la alquilación de la cumarina **20a** (figura 2.25). Otras señales que se muestran son de la cumarina, que no mostro que con estas condiciones se pudiera a ver abierto, estas son: el H-3 en 6.13 ppm como un cuarteto, el grupo metileno en 2.39 ppm como una señal doble, para las señales del anillo aromático en 7.48 ppm para H-5 como una señal doble, en 6.85 ppm para H-6 como una señal doble de doble y en 6.80 ppm para H-8 como una señal doble.

¹⁴³ Rullo M.; Niso M.; Pisani L.; Carrieri A.; Colabufo N. A.; Cellamare S.; Altomare C. D.; *Eur. J. Med. Chem.* **2019** 161, 433-444.

¹⁴⁴ He Q.; Liu J.; Lan J.-S.; Ding J.; Sun Y.; Fang Y.; Jiang N.; Yang Z.; Sun L.; Jin Y.; Xie S.-S.; *Bioorg. Chem.* **2018** 81, 512-528.

¹⁴⁵ Jiang N.; Huang Q.; Liu J.; Liang N.; Li Q.; Li Q.; Xie S.-S.; *Eur. J. Med. Chem.* **2018** 146, 287-298.

¹⁴⁶ Xie S.-S.; Wang X.-B.; Li J.-Y.; Yang L.; Kong L.-Y.; *Eur. J. Med. Chem.* **2013** 64, 540-553.

¹⁴⁷ Pan L.; Lei D.; Jin L.; He Y.; Yang Q.; *Molecules* **2018** 23, 3002.

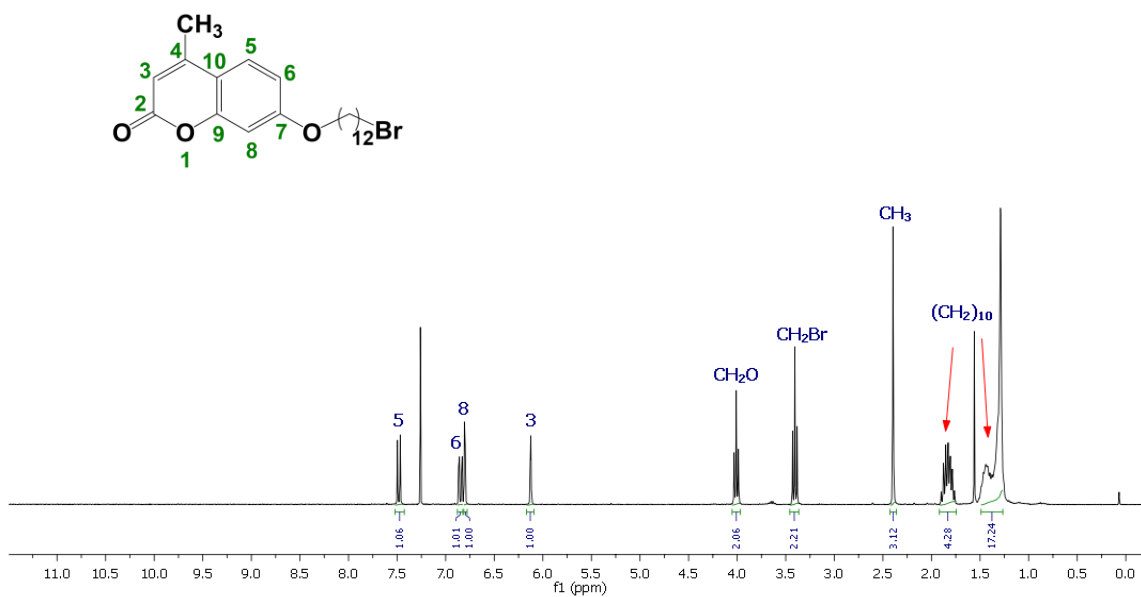


Figura 2.25. Espectro de RMN del derivado **21e**.

En el espectro de RMN de ^{13}C que se muestra en el figura 2.26, se observan las señales de los carbonos del grupo metilo que están enlazados uno al átomo de oxígeno del C-7 en 68.6 ppm y la otra al átomo de Br en 34.0 ppm. Además del resto de señales de la cadena hidrocarbonada que se adiciono entre 32.8-25.9 ppm, confirmando que se ha realizado la alquilación del grupo hidroxilo del C-7 de la cumarina **20a**. Otra señales que se observas son las que conforman el núcleo de la cumarina como por ejemplo: el grupo carbonilo de este núcleo en 161.4 ppm, la señal de C-3 se muestra en 111.8 ppm y las señales del anillo aromático en 125.4 ppm del C-5, para el C-6 en 112.7 ppm, el C-8 en 101.3 ppm y para el C-7 se desplaza más por la presencia del átomo de oxígeno en 162.2 ppm.

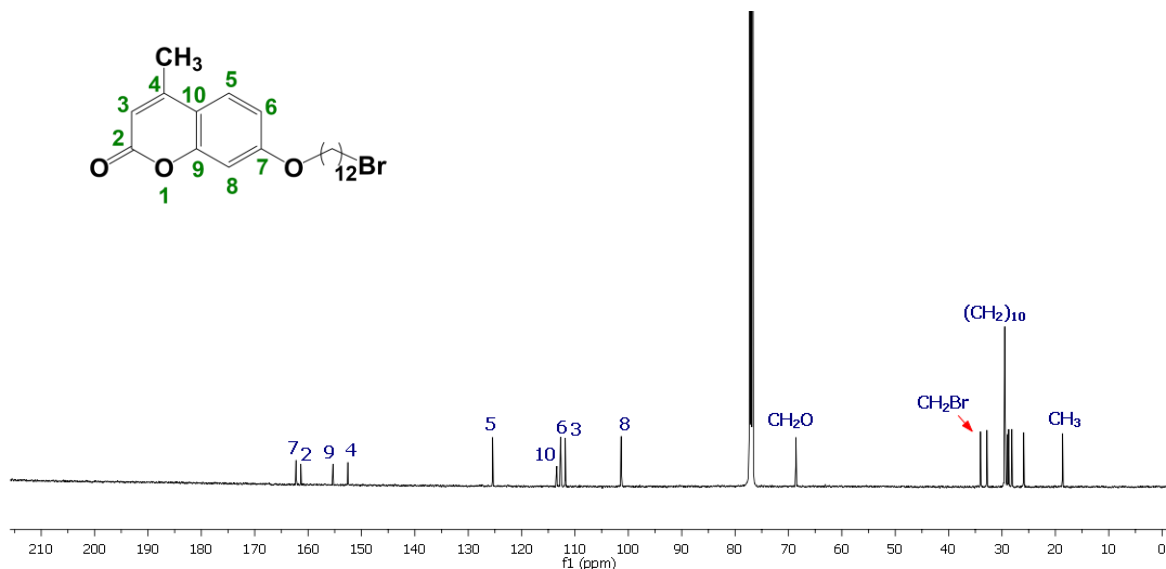
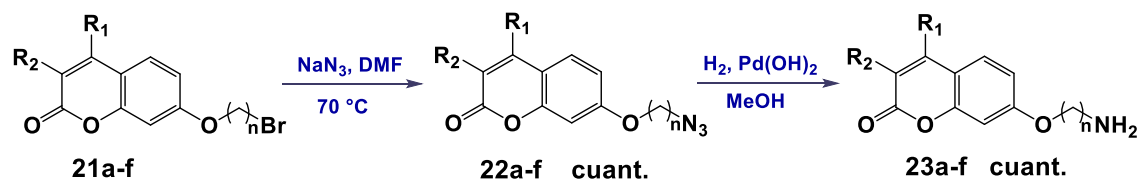


Figura 2.26. Espectro de RMN de ^{13}C de la cumarina **21e**.

Una vez obtenidos los derivados alquilados se llevó a cabo una reacción de sustitución nucleofílica sobre el átomo de bromo terminal, empleando NaN_3 y DMF como disolvente, calentando a $70\text{ }^\circ\text{C}$ con tiempos de reacción cortos de 3-4 h dando así los derivados **22a-f**. Estos derivados se obtuvieron con rendimientos cuantitativos y se usaron para la siguiente reacción sin purificación previa, solo se llevó una extracción, lavados con salmuera y H_2O . Posteriormente **22a-f** se sometieron a una reacción de hidrogenólisis con hidróxido de paladio como catalizador, utilizando como disolvente MeOH en una atmósfera de H_2 y en un tiempo de reacción de 4 h. Obteniendo a **23a-f** con rendimientos cuantitativos y sin ninguna purificación adicional, se utilizan para siguiente reacción (esquema 2.9).



Comp.	R ₁	R ₂	n
21,22,23 a	CH ₃	H	5
21,22,23 b	CH ₃	CH ₃	5
21,22,23 c	CH ₃	Cl	5
21,22,23 d	Ph	H	5
21,22,23 e	CH ₃	H	12
21,22,23 f	CH ₃	H	2

Esquema 2.9. Obtención de los derivados **22a-f** y **23a-f**.

Los compuestos **22a** y **22e-f** ya se encuentran reportados, por lo que se solo se caracterizaron los derivados **22b-d**. En la figura 2.27 se muestra, a modo de ejemplo, el espectro de RMN de ^1H de **22b**, en la cual se observan dos tripletes a frecuencias altas para los hidrógenos del CH_2 unido al átomo de oxígeno vecinal del C-7 a 4.00 ppm y otro a 3.31 ppm perteneciente a los protones del CH_2 unido al grupo azido. El resto de la cadena hidrocarbonada resuena entre 1.84-1.53 ppm y las demás señales pertenecen al esqueleto de la cumarina, la cual contiene dos grupos CH_3 en las posiciones de C-3 y C-4 desplazándose en 15.0 ppm y 13.1 ppm, todas estas señales no sufren cambio significativo.

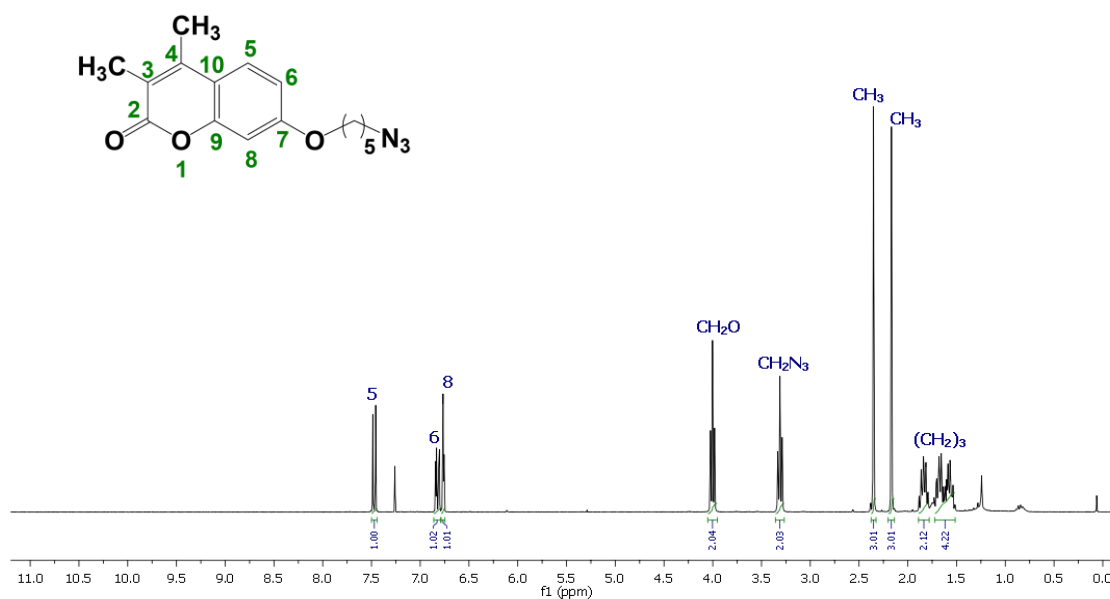


Figura 2.27. Espectro de RMN de ^1H de **22b**.

Dentro del espectro de RMN de ^{13}C del derivado **22b** se observa la señal del carbono del grupo CH_2 enlazado al átomo de oxígeno del C-7 en 68.0 ppm, mientras que para el carbono del CH_2 unido al grupo azido está en 51.3 ppm desplazados hacia frecuencias altas en el espectro. Los demás CH_2 del espaciador se observan entre 28.6-23.3 ppm, el resto de señales que se muestren corresponden a la cumarina utilizada (figura 2.28). Los espectros de los otros dos derivados (**22c-d**) se encuentran en el anexo, aquí solo se muestra, a modo de ejemplo uno de ellos para observar cambios de desplazamiento químico que provoca la sustitución nucleofílica del bromo por el grupo azido.

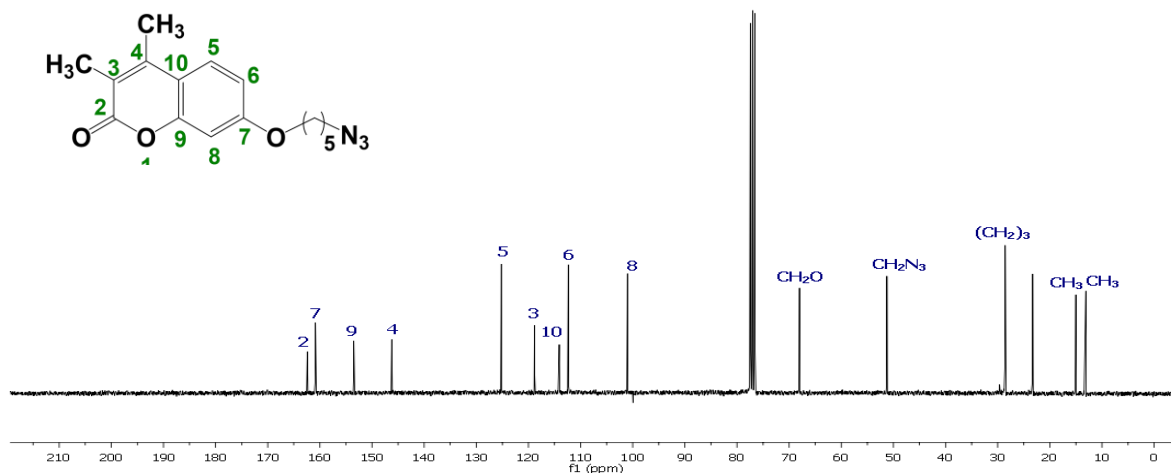
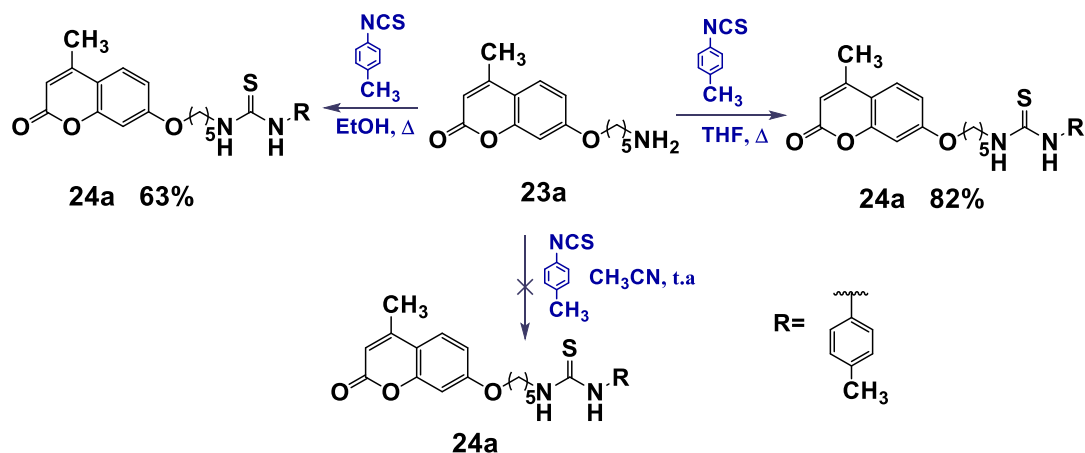


Figura 2.28. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **22b**.

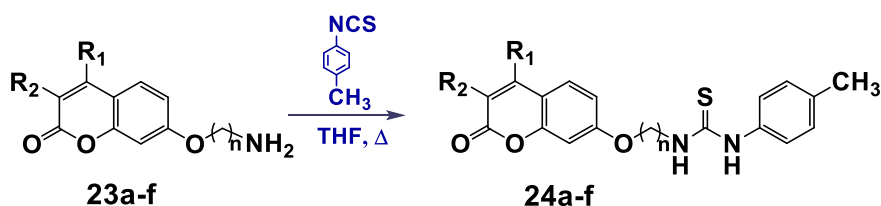
En la optimización de las condiciones adecuadas para llevar a cabo la reacción de la amina **23a** sobre el isotiocianato de *p*-tolilo y así la obtención de la tiurea **24a**, como se muestra en el esquema 2.10 se probaron tres condiciones diferentes sobre este derivado, para así extenderlas a los derivados **23b-f**. El uso del isotiocianato de *p*-tolilo como primer derivado de acoplamiento para la obtención de la tiourea, es para analizar su comportamiento, con un fragmento aromático sencillo y sin tanto impedimento estérico para la inhibición de la enzima CA, para la cual van dirigidos estas estructuras.



Esquema 2.10. Optimización de las condiciones para la tiourea.

Las primeras condiciones que se probaron en la cumarina **23a** fueron utilizando EtOH como disolvente a reflujo con el isotiocianato, en esta reacción el derivado **24a** tuvo un rendimiento de 63% pero el tiempo de reacción fue largo de 18 h, con la formación de pequeñas cantidades de subproductos de degradación del isotiocianato y formación de tiocabamato que se forman por que el EtOH no solo actúa como disolvente sino que también como un nucleófilo y reacciona con el isotiocianato. En las segundas condiciones que se probaron, la reacción se mantuvo a temperatura ambiente con isotiocianato pero ahora se cambió en disolvente de uno prótico como el etanol por uno aprótico como MeCN, en las cuales no se consumió **23a** sino hubo degradación de todo el isotiocianato que se colocó y además observo un precipitado blanco que se formó después de dos hora de la adición del isotiocianato.

Al ver el resultado de estas dos condiciones anteriores se decidió seguir utilizando disolventes apróticos para evitar reacciones secundarias, esta vez por THF, con una polaridad relativamente menor que el MeCN y la reacción se colocó a reflujo, en donde, esta trascurrió favorablemente y dio como resultado la obtención de la tiourea **24a** con incrementó del rendimiento de un 82% y con un tiempo de reacción corto de 3 h. Ya establecidas las condiciones de reacción, que son: la amina se disuelve en THF, se adiciona el isotiocianato de *p*-tolilo y esta mezcla se coloca a reflujo durante un tiempo de reacción de 3 h; se aplicaron a los demás derivados (**23b-f**) tal como se muestra en el esquema 2.11, siendo reproducibles estas condiciones para todos ellos con variaciones de tiempos de reacción entre 2-3 h y con rendimientos de buenos a moderados de 50-89%.



Comp.	R_1	R_2	n	rend.(24a-f)
23,24 a	CH_3	H	5	82%
23,24 b	CH_3	CH_3	5	78%
23,24 c	CH_3	Cl	5	50%
23,24 d	Ph	H	5	79%
23,24 e	CH_3	H	12	80%
23,24 f	CH_3	H	2	89%

Esquema 2.11. Síntesis de las tioureas **24a-f**.

Se caracterizaron todos los derivados de tiourea, pero a continuación se muestra el espectro del derivado **24a** a modo de ejemplo, los espectros de RMN del resto de los derivados se encuentran en el anexo. En la figura 2.29 se muestra el espectro de RMN de ^1H del derivado **24a**, en el cual se puede observar las señales de los protones aromáticos entre 7.18-7.06 ppm del fragmento aromático de la tiourea confiando que se ha llevado a cabo a reacción de acoplamiento de este derivado con el isotiocianato; otra señal que confirma que se adicionado el isotiocianato y que se ha llevado acabo la reacción son los hidrógenos del grupo CH_3 del anillo aromático en 2.31 ppm. El resto de señales corresponden a la cumarina que no sufrieron cambios significativos.

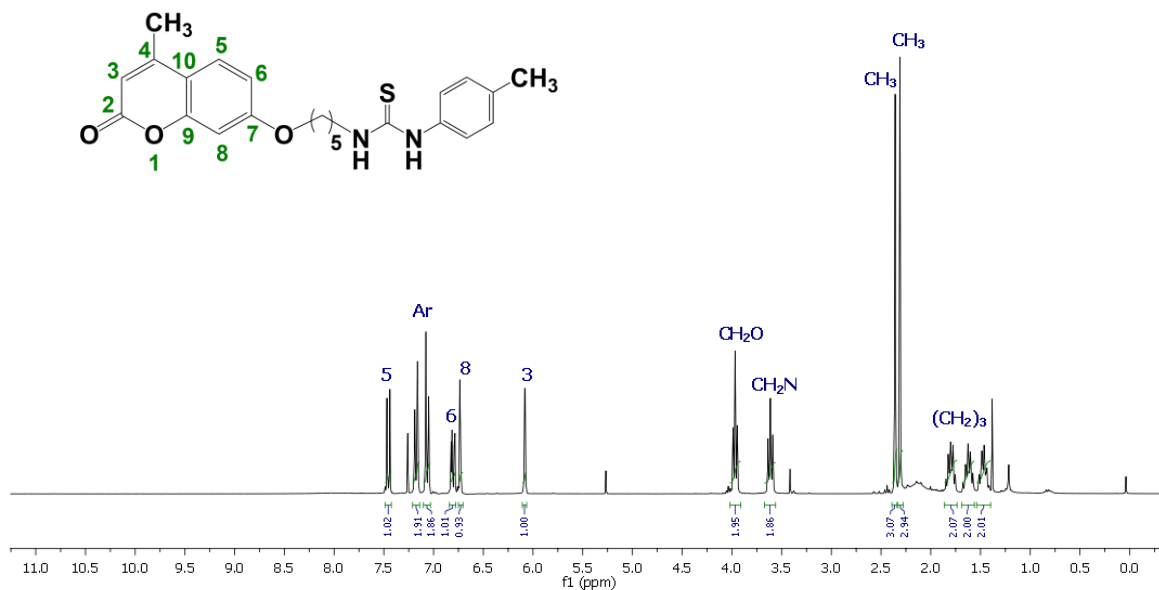


Figura 2.29. Espectro de RMN de ^1H del derivado **24a**.

Mientras que en RMN de ^{13}C en la figura 2.30 se termina de confirmar la formación de la tiourea esperada **24a** con la señal de $\text{C}=\text{S}$ en 180.4 ppm una señal típica del grupo tiourido, además de las señales de los carbonos del anillo aromático entre 137.4-125.4 ppm. La señal del carbono del grupo CH_3 que está unido anillo aromático se observa en 20.9 ppm y el resto de señales corresponden a la cumarina que no sufrieron cambios significativos. Otras señales que se observan son los carbonos de los CH_2 que están unidos; uno de ellos en 68.1 ppm que esta enlazado al átomo

de oxígeno del C-7 de la cumarina y el otro en 44.9 ppm correspondiente al otro CH₂ unido al NH de la tiourea que se observan a frecuencias altas.

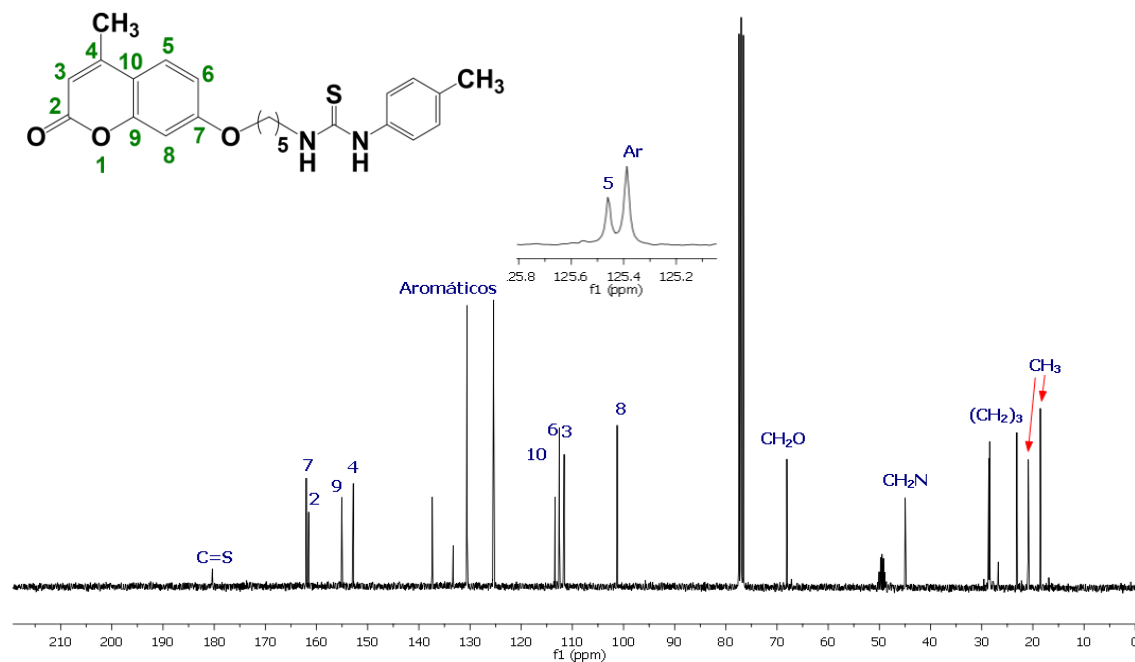
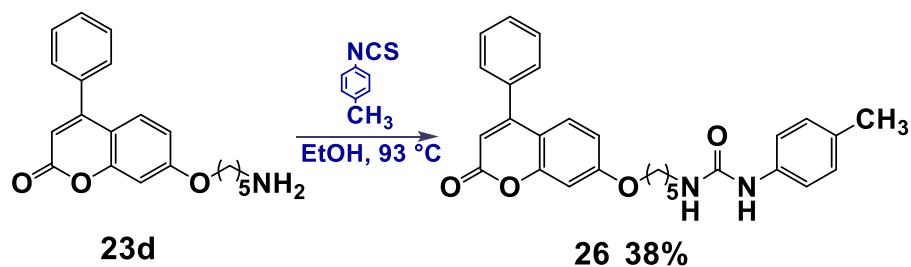


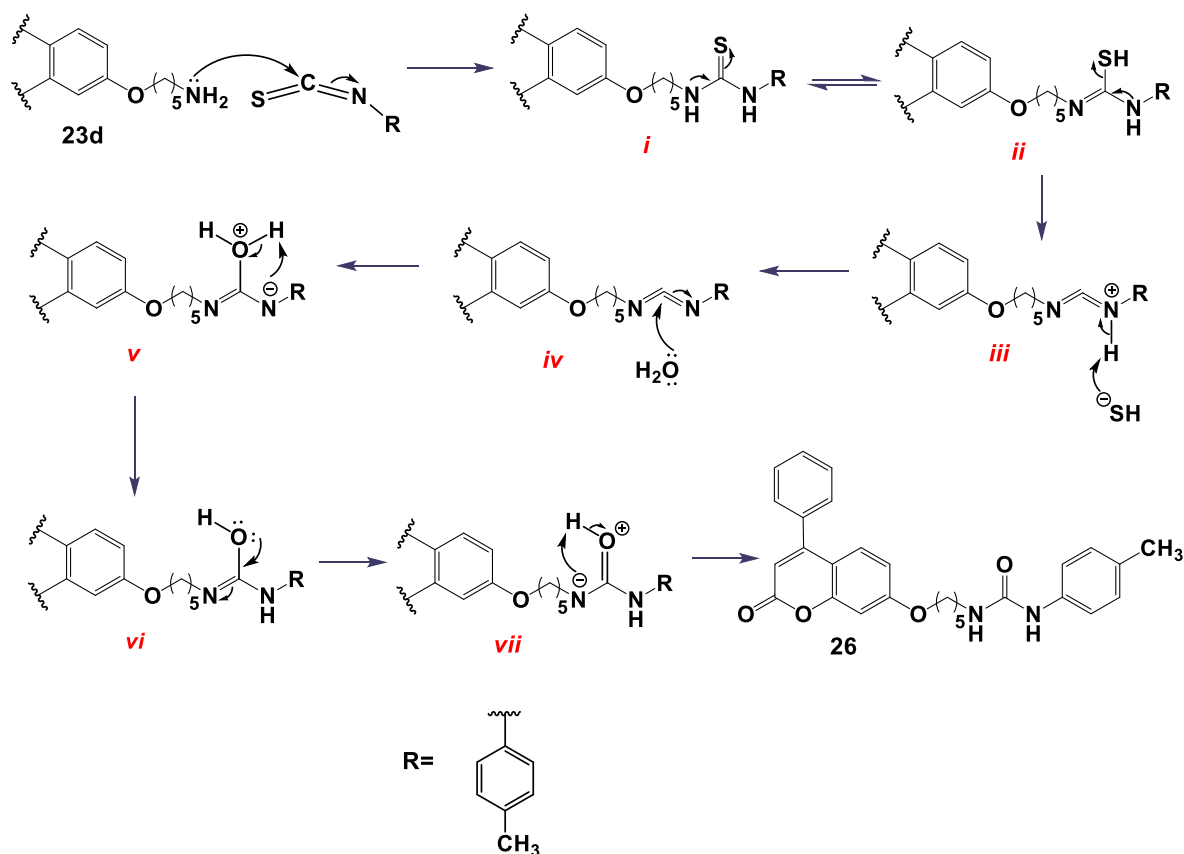
Figura 2.30. Espectro de RMN de ¹³C de la tiourea **24a**.

Por otro lado, el derivado **23d** se sometió a condiciones similares a las probadas para el derivado **23a**, en donde se buscaba disminuir el tiempo de reacción mostrado para la obtención de **24a** en las primeras condiciones; donde se colocó esta vez a **23d** en un tubo Fischer-Porter disuelto en EtOH con el isotiocianato y calentándolo a 93 °C como se muestra en el esquema 2.12. En esta reacción se observó la obtención de un nuevo producto; inesperadamente el compuesto que se obtuvo fue la urea **26** con un rendimiento del 38%; además del compuesto **26**, la reacción mostró degradaciones del isotiocianato y un subproducto más apolar que **26**, y que muy probablemente se trate del tiocarbamato obtenido por reacción con EtOH.



Esquema 2.12. Obtención del derivado 26.

La obtención del derivado **26** se puede atribuir a que al calentar 15 grados más por arriba del punto de ebullición que es lo que se hace al utilizar este tipo de tubo, se pudo favorecer más la tautomería en el compuesto hacia la forma tiólica *ii* como se muestra en el esquema 2.13; en donde el mecanismo de reacción comienza primero con la formación de tiourea, por el ataque de la amina al isotiocianato y seguido de una protonación del compuesto para dar *i*. Al estar utilizado condiciones más forzadas podrían favorecer la eliminación del SH por medio del átomo de nitrógeno adyacente y seguida de una desprotonación (*iii*) para así dar la carbodiimida *iv*, la cual reacciona con una molécula de agua que proviene de disolvente dando el intermediario *v*, por desplazamiento electrones en dicho intermediario. Posteriormente, en este intermediario ocurre una desprotonación, seguido de la formación del doble enlace (*vi*) y por ultimo una protonación (*vii*), dando así la urea **26**.



Esquema 2.13. Mecanismo de reacción para la obtención del derivado 26.

En el espectro de RMN de ^1H del derivado **26** (figura 2.31) es muy semejante al de la tiourea, en la que se pueden destacar algunas señales como: los protones del anillo aromático entre 7.19-7.05 ppm, además de las señal de los hidrogenes del grupo CH_3 que está unido al anillo aromático en la posición *para* en 2.26 ppm, que nos confirma que se adicionado el fragmentó aromático que contiene el isotiocianato y el resto de señales corresponden a la cumarina de partida que no sufren un cambio significativo.

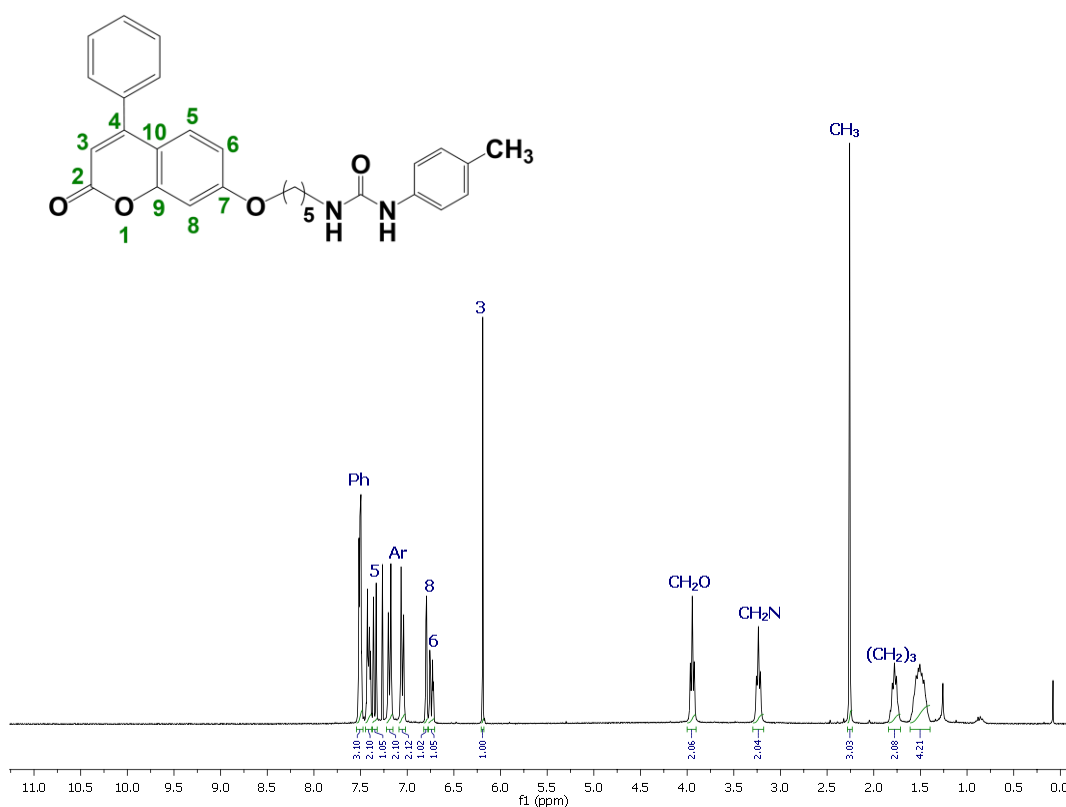


Figura 2.31. Espectro de RMN de ^1H de la urea **26**.

En la figura 2.32 se muestra el espectro de RMN de ^{13}C , en la cual destaca señal del grupo carbonilo en 156.6 ppm confirmando que sea formó una urea y no una tiourea que era lo que se esperaba al colocar a reacción. Otras señales que se observan son los carbonos del anillo aromático entre 135.5-128.3 ppm, también se ve la señal del carbono del CH_3 que está unido a este anillo aromático en la posición *para* en 20.7 ppm confirmando que se adicionado el fragmentó aromático y el resto de señales pertenecen al núcleo de la cumarina y el linker, que no sufren cambio significativo.

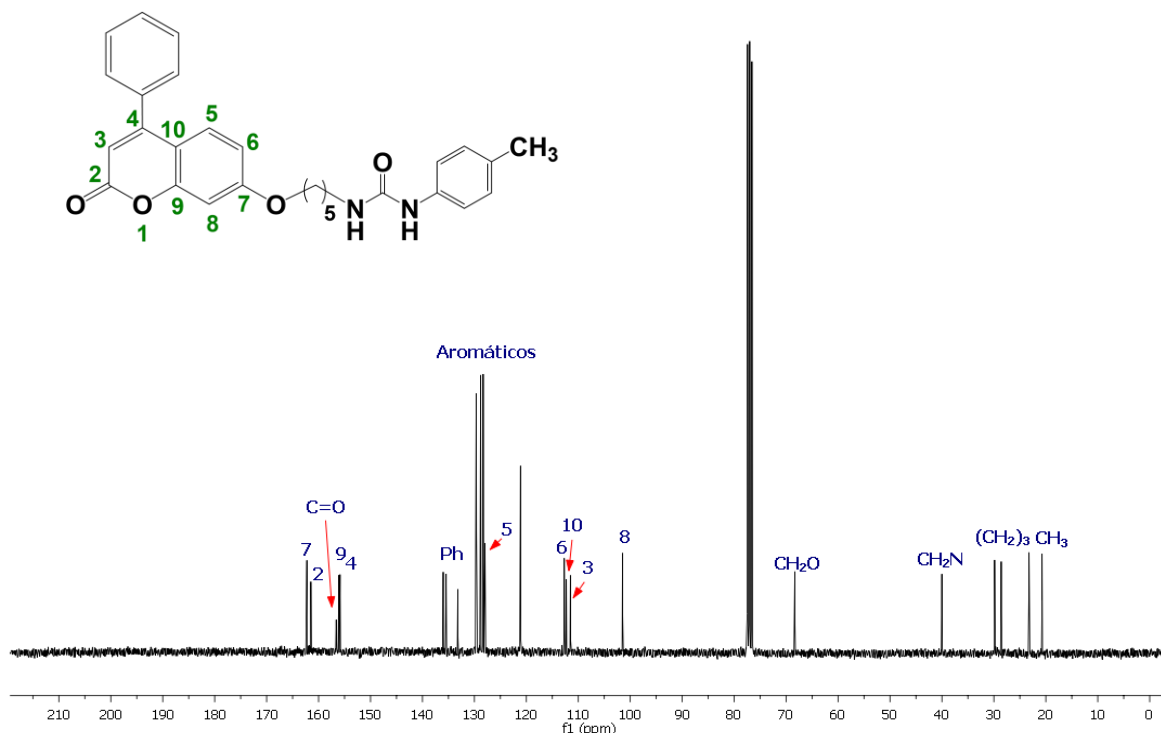
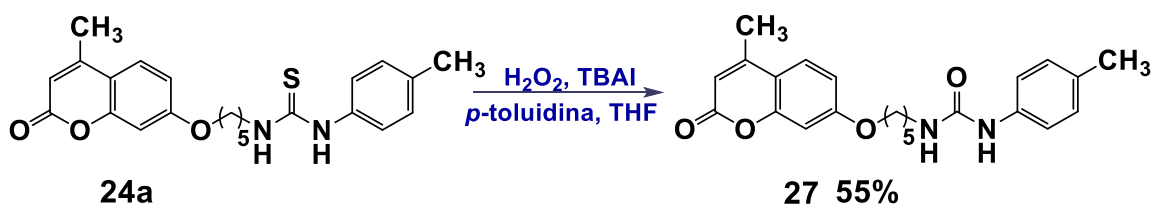


Figura 2.32. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **26**.

Una vez obtenidas las tioureas **24a-f** que constituyen el agente de guanilación más prometedor debido a su estabilidad y facilidad de preparación, se comenzó a buscar condiciones y agentes de desulfuración para la generación de guanidinas a partir de tioureas. Nuevamente con el derivado que se comenzó hacer las pruebas para establecer las condiciones adecuadas para la obtención de estos derivados, es con la cumarina que contiene un CH_3 en la posición C-4 que en este caso es **24a**, las primeras condiciones que se probaron son las reportadas por Vinod K. Yadav y colaboradores¹⁴⁸ cómo se muestran en el esquema 2.14.

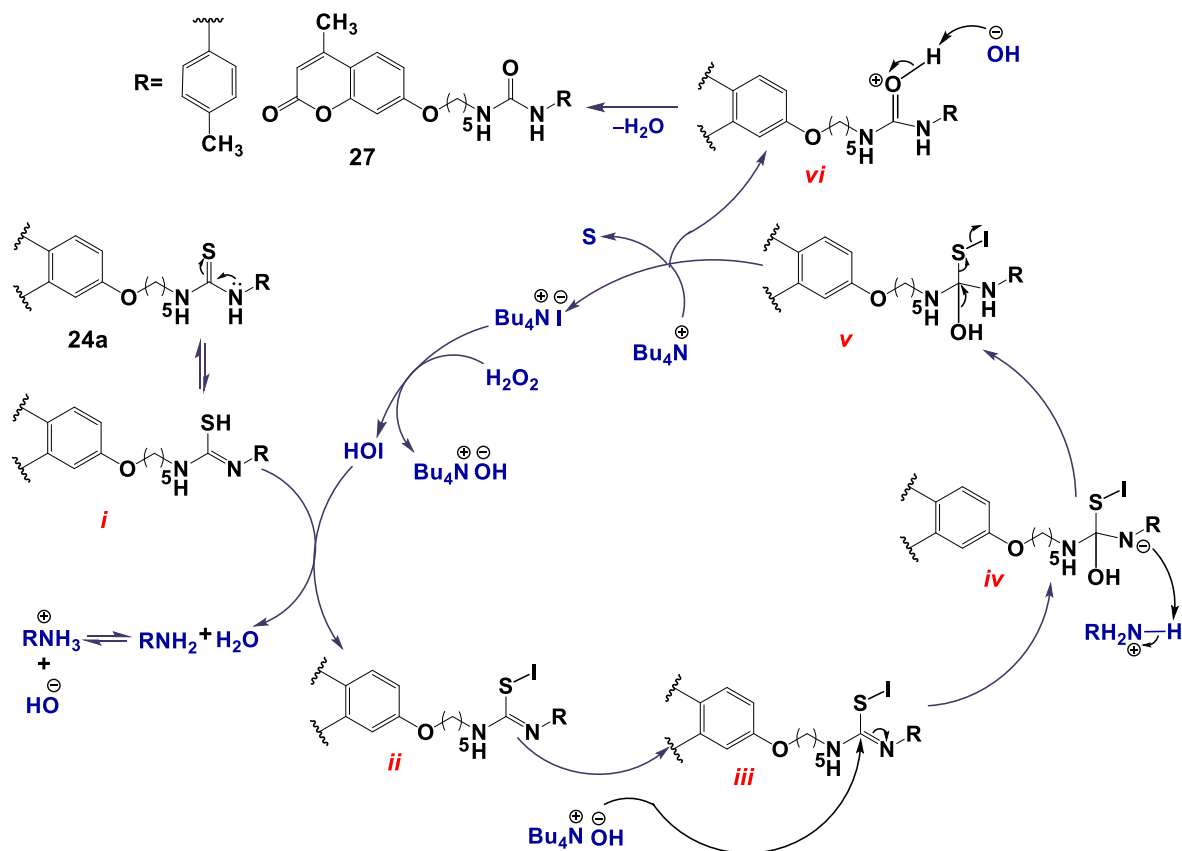


Esquema 2.14. Obtención del derivado **27**.

¹⁴⁸ Yadav V. K.; Srivastava V. P.; Yadav L. D.S.; *Tetrahedron Lett.* **2018** 59, 252-255.

En estas condiciones, se lleva a cabo una reacción oxidativa de ciclodesulfuración que Vinod¹⁴⁸ y colaboradores utilizan para desulfurar a derivados de tipo 2-hidroxifeniltioureas, en la que ocurre una ciclación intramolecularmente de estos derivados con la eliminación de azufre. Considerando esto, se decidió que el ataque nucleófilo final lo llevara a cabo la *p*-toluidina, lo cual, tras el proceso de desulfuración, originaría la guanidina. Pero al llevar a cabo la reacción, en donde se colocó **24a** en presencia de H₂O₂, TBAI y *p*-toluidina en THF a temperatura ambiente durante 2 h, se obtuvo inesperadamente la urea **27** con un rendimiento de 55%.

Esto se puede explicar con el siguiente mecanismo que es igual al que propone Vinod¹⁴⁸ pero con una variación como se muestra en el esquema 2.15, este comienza con la reacción del yoduro de tetrabutilamonio con el peróxido de hidrógeno para dar hipoyodito e hidróxido de tetrabutilamonio, después el hipoyodito reacciona con la forma tiónica (*i*) de la tiourea **24a** que se encuentra en equilibrio tautomérico para formar el intermedio *ii*, este posteriormente reacciona con el ion hidróxido del hidróxido de tetrabutilamonio (*iii*) para dar el intermediario *iv* y al mismo tiempo protonándose. Posteriormente ocurre la eliminación de azufre elemental (*v*), junto con regeneración del catalizador TBAI y la pérdida de una molécula de H₂O (*vi*) dando el producto **27**.



Esquema 2.15. Mecanismo de formación del derivado 27.

La figura 2.33 muestra el espectro de RMN de ^1H del derivado 27, en el cual se observan las señales de los protones de anillo aromático entre 7.07-6.93 ppm y la señal de los hidrogenes del CH_3 que está unido al anillo aromático en la posición *para* en 2.14 ppm, confirmando la existencia de un solo fragmento aromático y no de dos como se esperaba tras reacción con la *p*-toluidina. Otras señales características son los grupos metilenos unidos, tanto al oxígeno de la posición C-7, como la NH, que aparecen en forma de tripletes a 3.90 y 3.10 ppm, respectivamente.

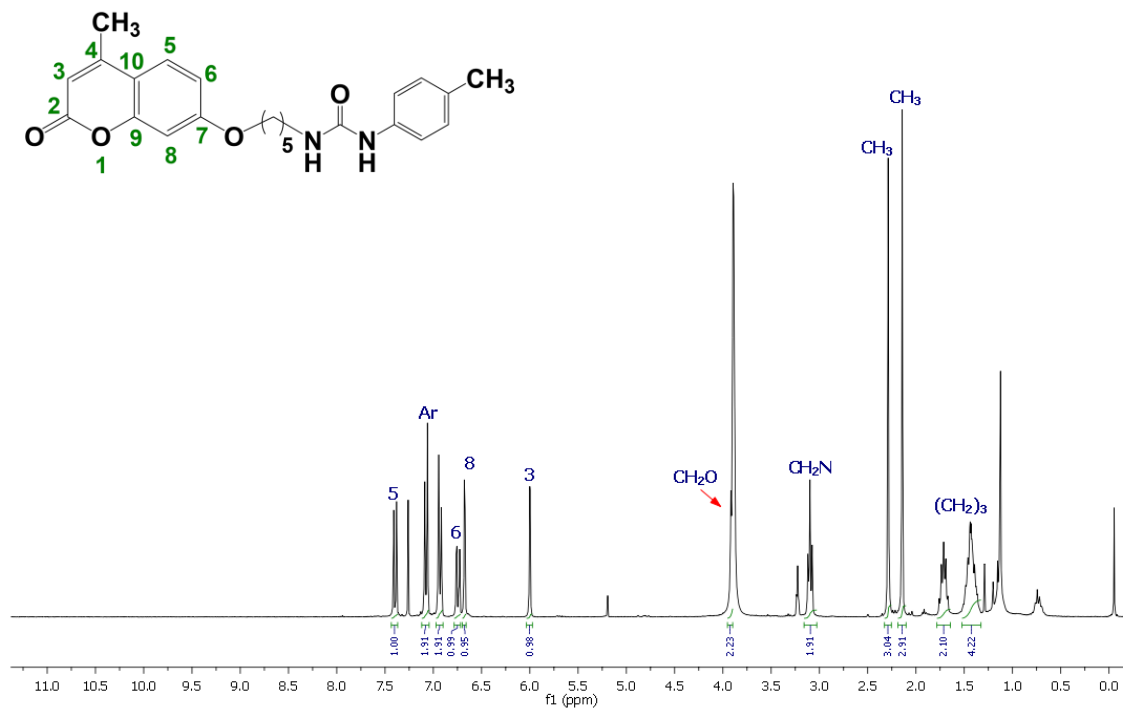


Figura 2.33. Espectro de RMN de ^1H del derivado **27**.

En el espectro de RMN de ^{13}C que se muestra en la figura 2.34 se observa una señal en 156.7 ppm que corresponde a $\text{C}=\text{O}$ que pertenece a una urea y no a un grupo imino que es lo que se esperaría si la *p*-toluidina hubiera sustituido al azufre. Otras señales que demuestran que se obtuvo la urea y no la guanidina son las señales de los carbonos del anillo aromático que están entre 132.1-119.6 ppm demostrando que no se adicionó un segundo fragmento aromático, además de mostrar sólo una señal de carbono de CH_3 unido a arilo.

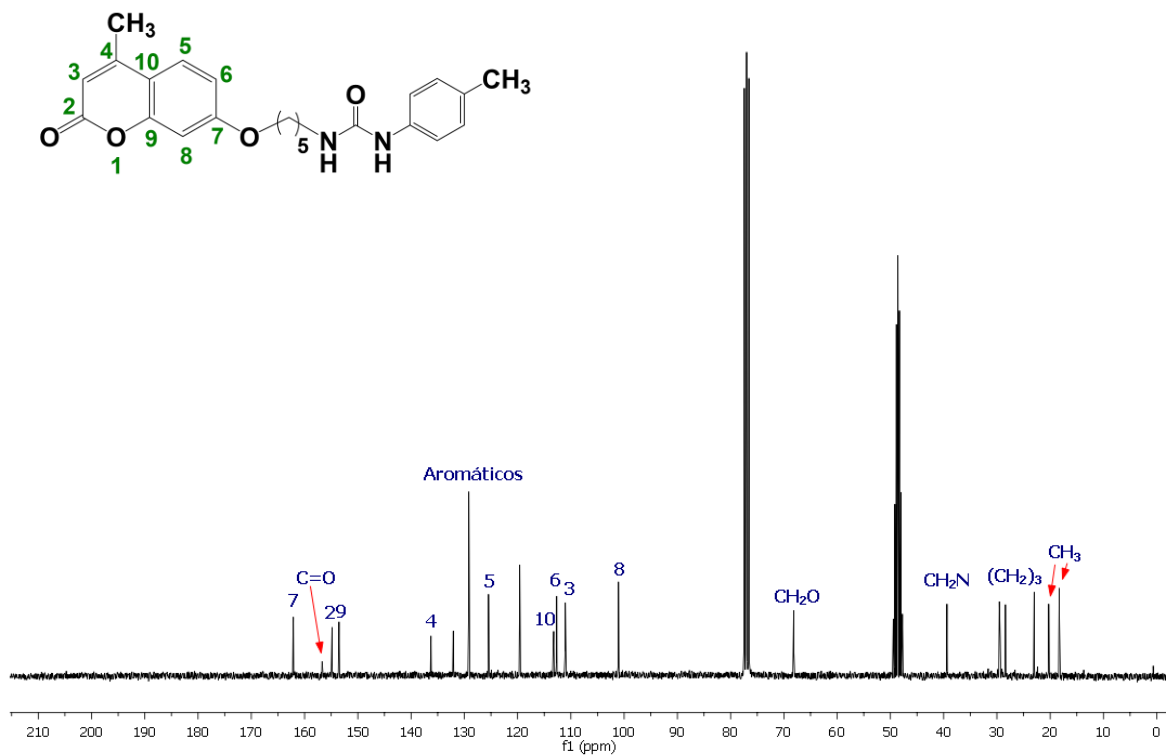
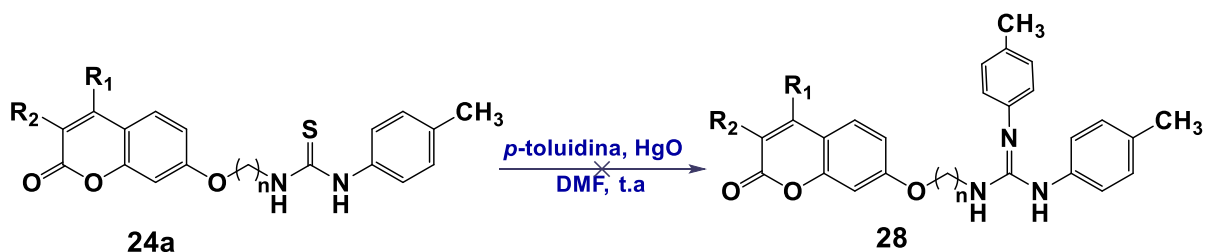


Figura 2.34. Espectro de RMN de ^{13}C de la urea **27**.

Tras el intento fallido de obtención de la guanidina por tratamiento de la tiourea con $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TBAI}$, se decidió aplicar las condiciones clásicas por medio de un agente desulfurante como es el HgO (II), esta metodología ya se había utilizado dentro del grupo de investigación donde se ha desarrollado el presente capítulo de la Tesis Doctoral.⁶⁶ En dichas condiciones, se utilizó óxido de mercurio (II), la correspondiente amina, que en este caso fue *p*-toluidina, junto con la tiourea **24a** todo esto disuelto en DMF a temperatura ambiente como se representa en el esquema 2.16. Transcurrido un cierto tiempo de reacción, la c.c.f. mostró la formación de un producto de menor polaridad que la tiourea de partida, presumiblemente la carbodiimida intermedia, obtenida por desulfuración promovida por el HgO . La reacción se dejó durante 72 h más, en ese tiempo de reacción se consumió toda la materia (**24a**), tras lo cual se observó la formación de un compuesto más polar, pero que se obtuvo en poco rendimiento, y no puro, por lo que no fue posible su caracterización, ni su elucidación inequívoca.



Esquema 2.16. Representación de la síntesis de **28**.

En este punto se decidió sustituir la *p*-toluidina por una amina más nucleófila, como la bencilamina, que pudiera reaccionar más fácilmente con la carbodiimida intermedia. Debido que en este tipo de reacciones para obtener guanidinas, se prefiere que las aminas sean primarias unidas a carbonos primarios, debido al volumen de los sustituyentes a los que estén unidas o a los grupos que la misma tiourea contenga y reactividad de la amina para que la reacción proceda.

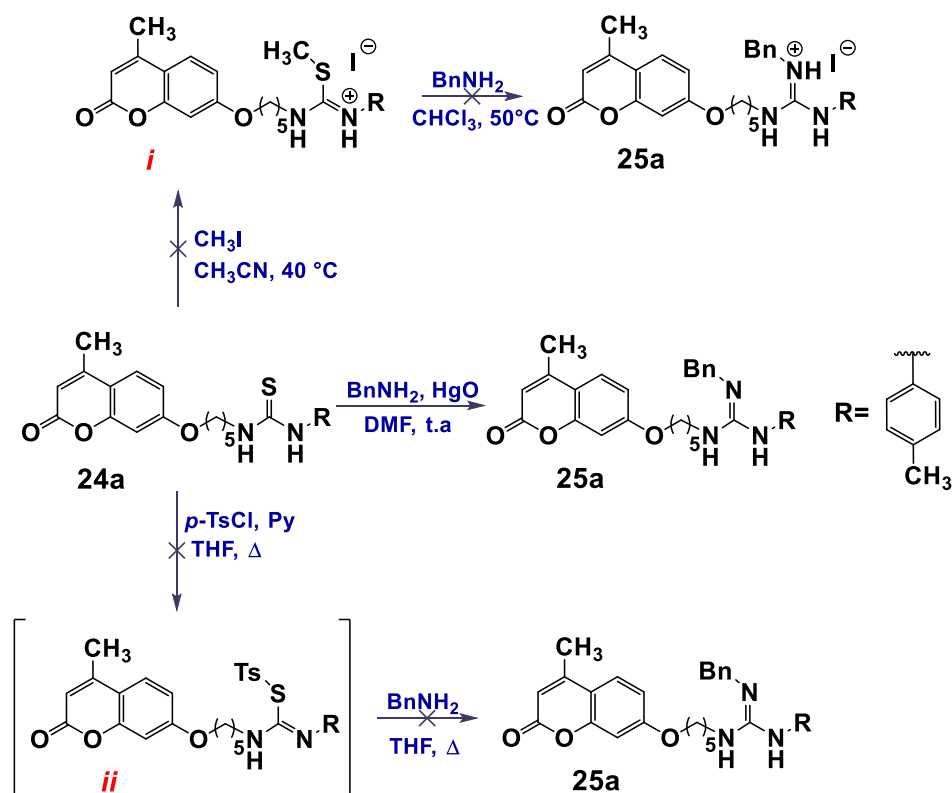
Nuevamente se probaron las condiciones de HgO con **24a** y la bencilamina todo disuelto en DMF como se muestra en el esquema 2.17; esta mezcla se colocó a temperatura ambiente bajo oscuridad ya que el óxido de mercurio (II) es fotosensible. La reacción procedió sin ningún inconveniente, obteniéndose el compuesto **25a** con un rendimiento de 83% tras purificación cromatográfica, en un tiempo de reacción 66 h. Se probaron otras dos condiciones diferentes para intentar acortar el tiempo de reacción, la primera es la reportada por Taori y colaboradores,¹⁴⁹ donde ocurre la metilación del átomo de azufre de la tiourea para dar una sal de *S*-metil tiouronio (i) y este compuesto se aísla evaporando solo el disolvente. Se pasa a la siguiente etapa haciéndolo reaccionar con bencilamina, realizando variaciones de temperaturas de 40 °C-50 °C en tiempos de reacción de 3-5 h en CHCl₃ sin presentar reacción, por lo que se cambió el disolvente por THF con un tiempo de reacción de 5 h sin haber reacción alguna y por último se cambió al tubo Fischer-Porter a 100 °C con 48 h sin consumo de *i*.

Otra metodología utilizada es la reportada por Liu y colaboradores,¹⁵⁰ en la cual obtiene 1,3,4-oxadiazoles a través de los intermedios de acitiosemicarbazidas, los cuales en condiciones básicas y en presencia de *p*-TsCl ocurre una ciclación intramolecular por parte del oxígeno con desprendimiento de azufre. Por lo que se intentó la tosilación (ii) de la tiourea **24a**, aplicando estas

¹⁴⁹ Taori V. P.; Lu H.; Reineke T. M.; *Biomacromolecules* **2011** 12, 2055-2063.

¹⁵⁰ Liu W.; Li Q.; Cheng F.; Shi D.; Cao Z.; *Heterocycl. Commun.* **2014** 20, 6, 333-338.

condiciones se obtuvo del derivado **ii**, con modificación de equivalentes de 3-7 con un tiempo de reacción de 7 h consumiéndose toda la tiourea. Cuando se adiciono la bencilamina se formó un precipitado que al principio se creía que era el compuesto, pero al seguir monitoreando la reacción el intermediario **ii** que se mostraba antes de añadir la amina seguía presente. Se dejó que procediera la reacción de 5-15 h, al ver que no había disminución el intermediario **ii** se dio por terminada la reacción. El precipitado podría ser, que al estar en exceso el *p*-TsCl pudo reaccionar con la bencilamina, por lo que precipito siendo no soluble en el disolvente y el intermediario **ii** que nunca reacciona con la amina.



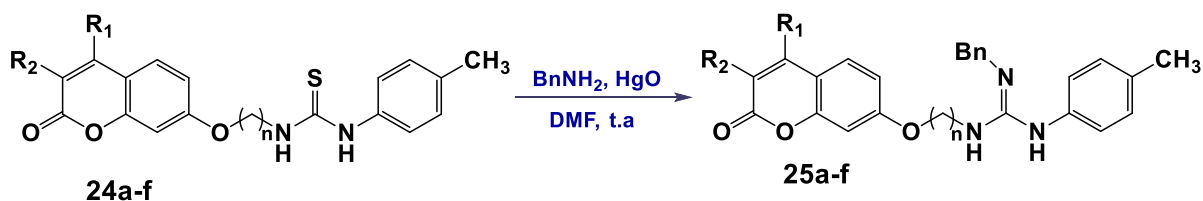
Esquema 2.17. Síntesis probadas para dar el derivado **25a**.

En la tabla 2 se resumen las diferentes condiciones ensayadas para la obtención de **25a**. Los mejores resultados se obtuvieron con el uso del HgO amarillo.

Tabla 2 Optimización de las condiciones para obtener del compuesto **25a**.

Condiciones	Equivalentes	Rendimiento
HgO / BnNH ₂ en DMF	1 / 5	83%
1.- CH ₃ I en CH ₃ CN a 40 °C 2.- BnNH ₂ en CHCl ₃ a 50 °C	1 / 10 1	No hubo reacción
2.- BnNH ₂ en THF a reflujo	1	No hubo reacción
2.- BnNH ₂ en THF a 100 °C	2	No hubo reacción
1.- <i>p</i> -TsCl / Py en THF a reflujo 2.- BnNH ₂ en THF a reflujo	3 → 7 / 3 → 7 5 → 8	No hubo reacción

Una vez optimizado el proceso, se aplicó a los derivados **24b-f** como se representa en el esquema 2.18; así pues, el tratamiento de las tioureas **24b-f** con bencilamina y HgO en DMF (t.a., 14-66 h) condujo a las guanidinas buscadas **25** con rendimientos excelentes (80%-cuantitativos).



Comp.	R ₁	R ₂	n	rend.(25a-f)
24,25 a	CH ₃	H	5	83%
24,25 b	CH ₃	CH ₃	5	cuant.
24,25 c	CH ₃	Cl	5	97%
24,25 d	Ph	H	5	80%
24,25 e	CH ₃	H	12	93%
24,25 f	CH ₃	H	2	97%

Esquema 2.18. Síntesis de los derivados **25a-f**.

En la figura 2.35 se muestra, a modo de ejemplo, el espectro de RMN de ¹H del **25a**, donde puede observarse la aparición de nuevas señales, como el metileno del grupo bencilo en 4.29 ppm además de las señales del grupo fenilo entre 7.28-7.14 ppm confirmando que se ha incorporado la

bencilamina y desulfurado la tiurea de partida, una de las señales del anillo aromático se desplaza así frecuencias bajas solapándose las señal del hidrogeno del C-6 en 6.75 ppm anteriormente mostrándose en 7.06 ppm y el resto de las señales que se ven corresponden a la materia de partida que no sufrieron un cambio significativo.

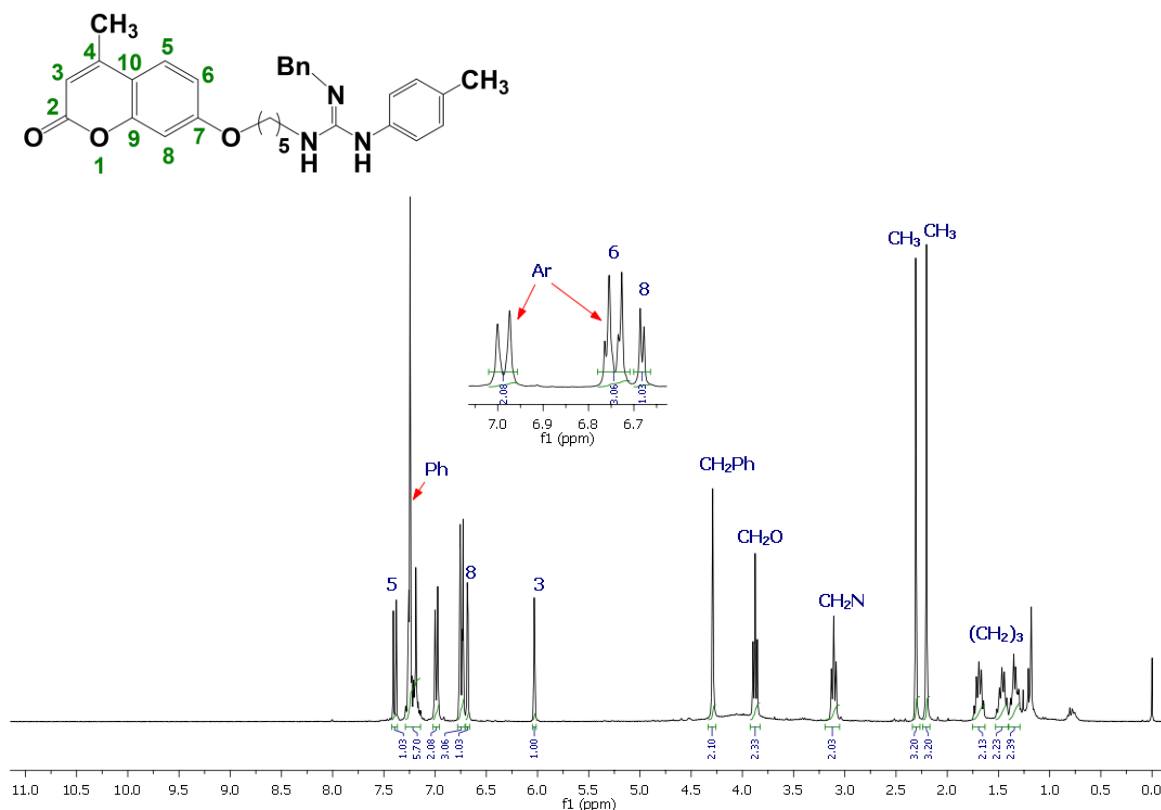


Figura 2.35. Espectro de RMN de ^1H de **25a**.

En RMN de ^{13}C de la guanidina **25a** que se ve en la figura 2.36, podemos observar un cambio de desplazamiento de la señal del carbono cuaternario del grupo $\text{C}=\text{S}$ de la tiurea que estaba en 180.4 ppm y que ahora se encuentra en 151.8 ppm, confirmando la formación del grupo guanidinio. Además de esta señal que confirma que se ha llevado cabo la reacción y se obtuvo el derivado **25a** son las señales de los carbonos que pertenecen al grupo fenilo entre 138.7-127.2 ppm y la señal del carbono del CH_2 del grupo bencilo en 46.0 ppm. La señal del carbono del CH_2 unido al grupo NH que se encontraba en 44.9 ppm se ve desplazada a frecuencias bajas 41.8 ppm y el resto de señales corresponden a los carbonos de la materia prima utilizada que no sufren un cambio destacable.

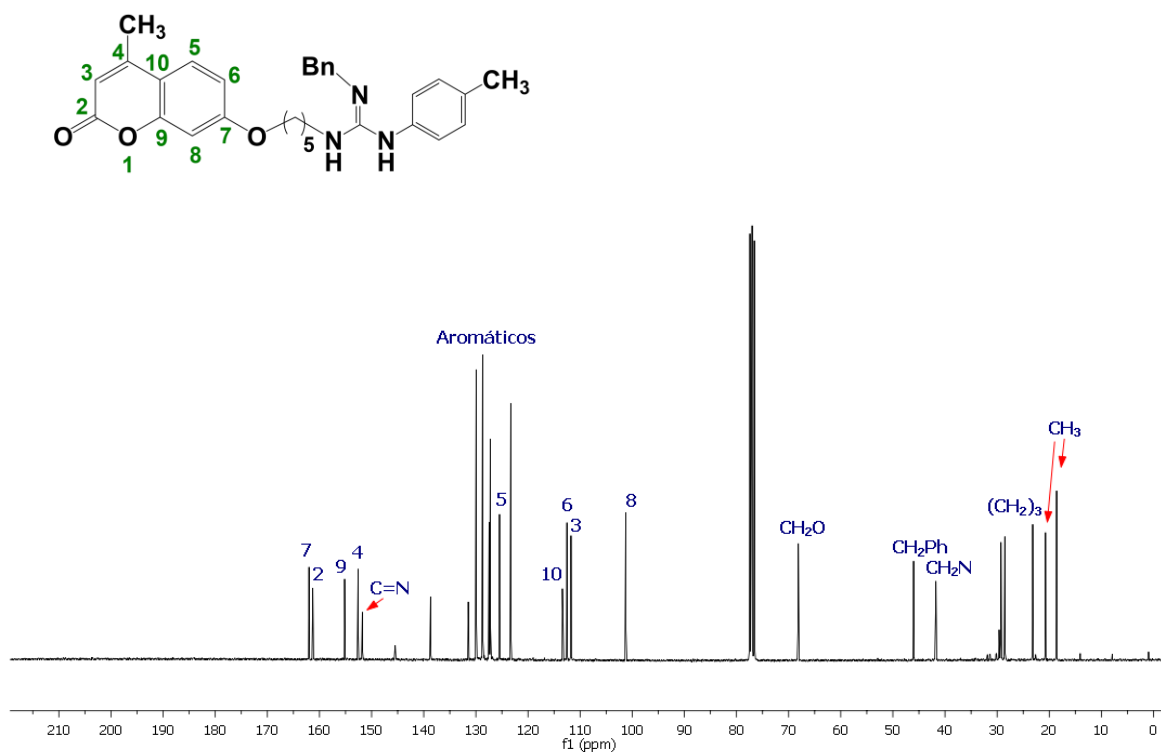
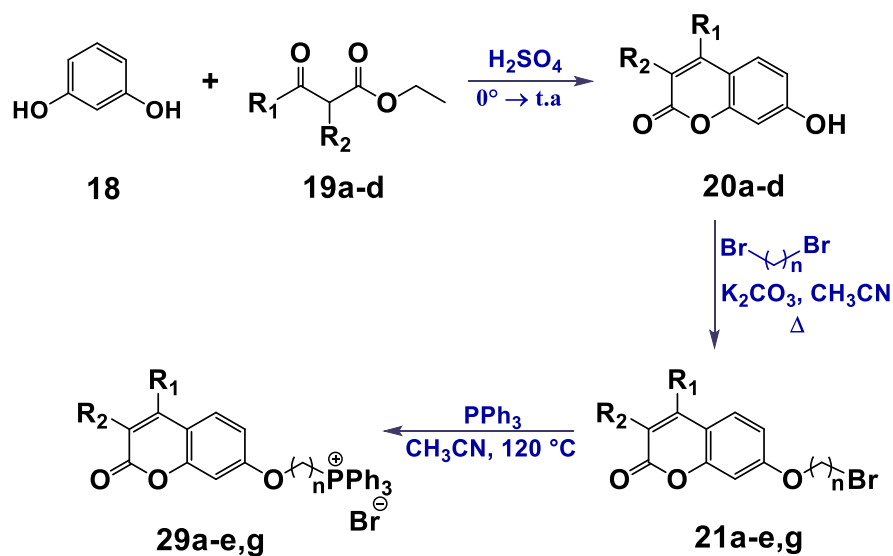


Figura 2.36. Espectro de RMN de ^{13}C de la guanidina **25a**.

4.2.2. Obtención de las sales de fosfonio derivadas de cumarinas.

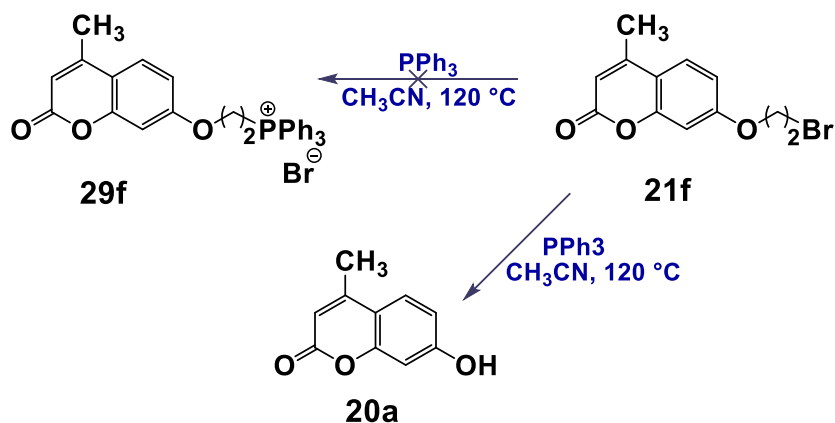
Por otro lado como se muestra en el esquema 2.19, también se obtuvieron sales de fosfonio derivadas de cumarinas (**29a-e,g**); para ello, mediante condensación de Pechman a partir de resorcinol y diversos β -ceto ésteres se prepararon una serie de 7-hidroxycumarinas, que fueron alquiladas con α,ω -dibromoalcanos de diferente longitud, el bromo terminal fue desplazado nucleofílicamente con PPh_3 (esquema 2.19). Para la formación de las sales de fosfonio en la última etapa se usaron condiciones análogas a las empleadas por el grupo de investigación para la preparación de sales de fosfonio de derivados de polifenoles y de triterpenoides, en donde la reacción transcurre en un tubo Fischer-Porter, a $120\text{ }^\circ\text{C}$ en acetonitrilo; los productos finales fueron obtenidos con rendimientos de moderados a cuantitativos tras purificación cromatográfica.



Comp.	R ₁	R ₂	n	rend.(29a-e,g)
a	CH ₃	H	5	57%
b	CH ₃	CH ₃	5	98%
c	CH ₃	Cl	5	cuant.
d	Ph	H	5	92%
e	CH ₃	H	12	95%
g	CH ₃	H	3	cuant.

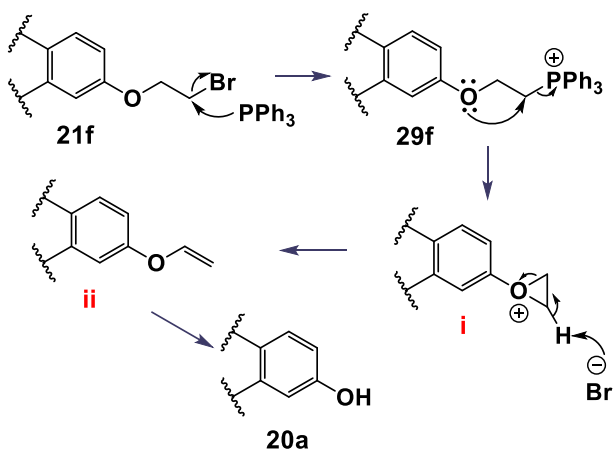
Esquema 2.19. Síntesis de los derivados de fosfonio **29a-e,g**.

Como se ha mencionado anteriormente, se abordó la síntesis de sales de fosfonio con espaciadores hidrocarbonados de distinta longitud. Todos los productos se obtuvieron de manera exitosa, salvo cuando se intentó emplear un espaciador de dos carbonos, donde en el paso del bromo derivado **21f** a **29f**, en lugar de ello se obtuvo la cumarina de partida **20a**, tras pérdida de la cadena hidrocarbonada (esquema 2.20) y por este motivo se decidió cambiar el espaciador de 2 carbonos por el de 3.



Esquema 2.20. Síntesis aplicada para el derivado **29f**.

La eliminación de la cadena se puede explicar por el mecanismo propuesto a continuación en el esquema 2.21, en donde lo primero que ocurre es la formación del derivado de fosfina **29f** que posteriormente podría experimentar un ataque nucleofílico intramolecular del átomo de oxígeno en C-7, para originar el epóxido intermedio **i**. La abstracción por parte del ion bromuro de un átomo de hidrógeno del epóxido (**i**), provocaría su apertura formando así un éter vinílico (**ii**) que podría ser hidrolizado con relativa facilidad porque en el medio existe liberación de bromuro de hidrogeno.



Esquema 2.21. Mecanismo propuesto para la eliminación y obtención del derivado **20a**.

A continuación se describe los espectros de RMN de uno de los derivados obtenidos (**29a-e,g**) y el resto de ellos se encuentra en el anexo. Se observa en la figura 2.37 el espectro de RMN de ^1H del derivado **29a**, en el cual se observan las señales de los hidrógenos aromáticos entre 7.43-7.20 ppm de los tres anillos aromáticos que se adicionaron de la trifenil fosfina confirmando que se ha obtenido el compuesto esperado. Las señales del núcleo de la cumarina no sufrieron un cambio significativo, en cambio se pueden ver una señal en 2.94 ppm para CH_2 que está unido al átomo de fósforo y otra señal de CH_2 en 3.53 ppm mostrándose como un triplete que corresponde al que unido al átomo de oxígeno, estas dos señales son las que se ven afectadas al estar unidas a átomos electronegativos.

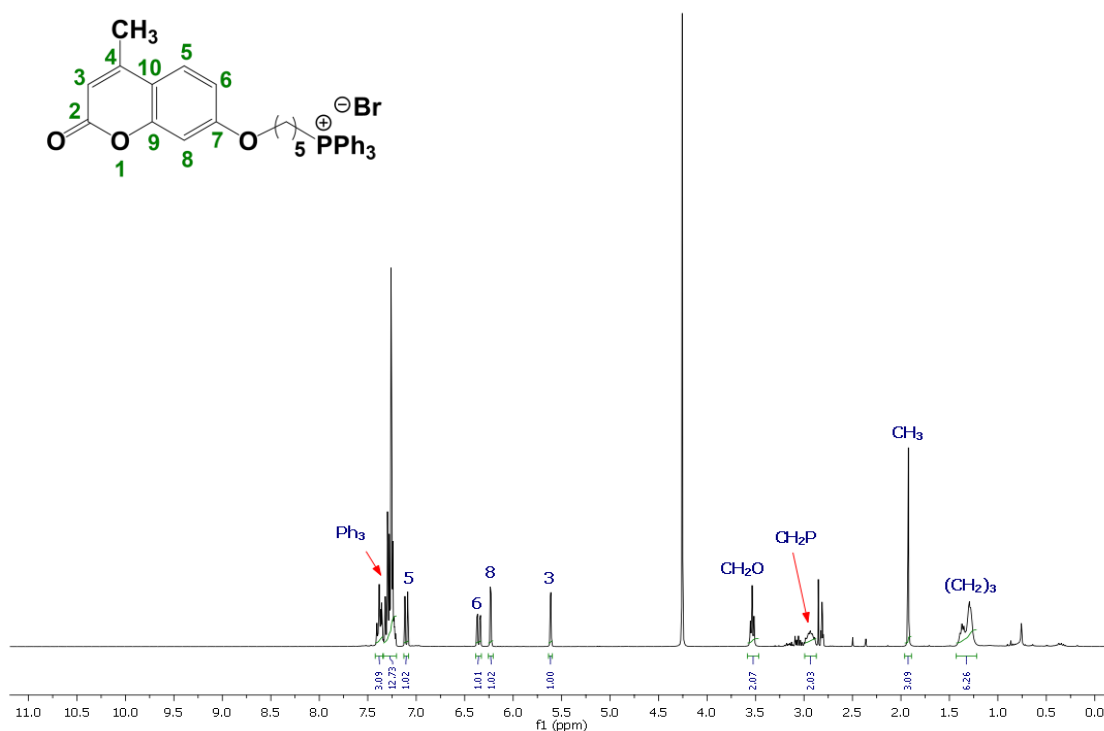


Figura 2.37. Espectro de RMN de ^1H del derivado **29a**.

En la figura 2.38 se muestra el espectro de RMN de ^{13}C del derivado **29a**, se pueden ver las señales de los carbonos del anillo aromático en 134.4-118.1 ppm la cuales se desdoblán en dos partes para que se adicionado la trifenil fosfina y ha sustituido al átomo de bromo. Además de estas señales se ven afectadas los CH_2 que está enlazados al átomo de fósforo desdoblándose en dobletes por acoplamiento con éste ($I = 1/2$).

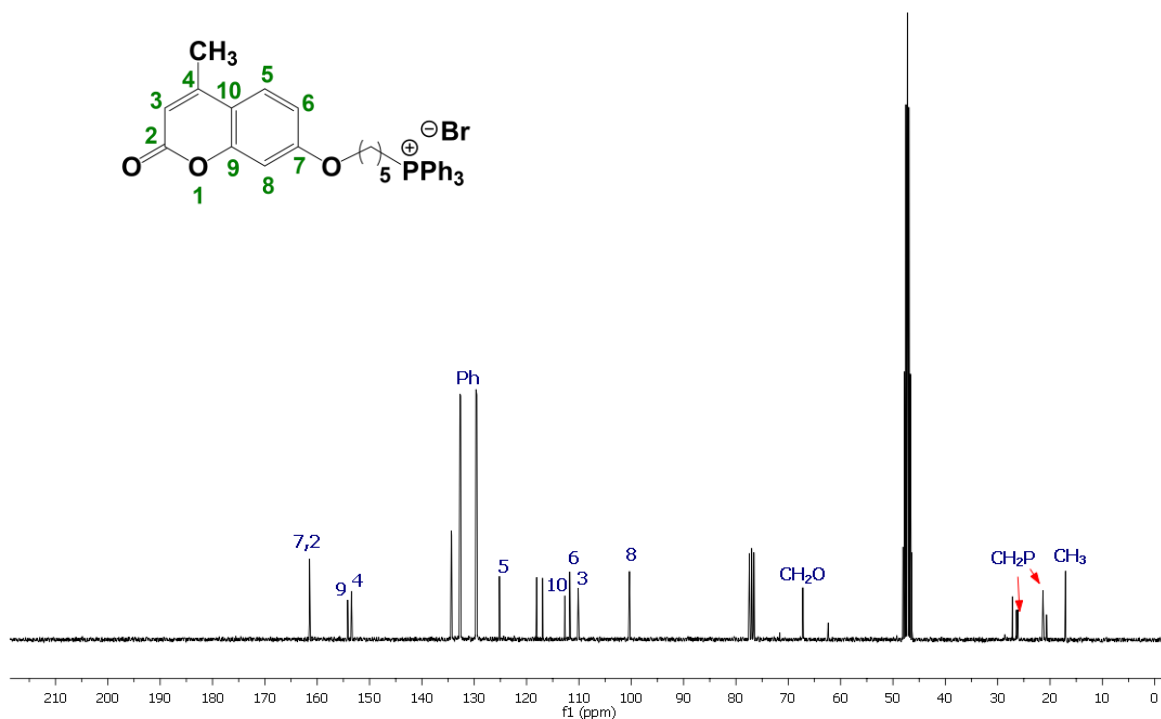
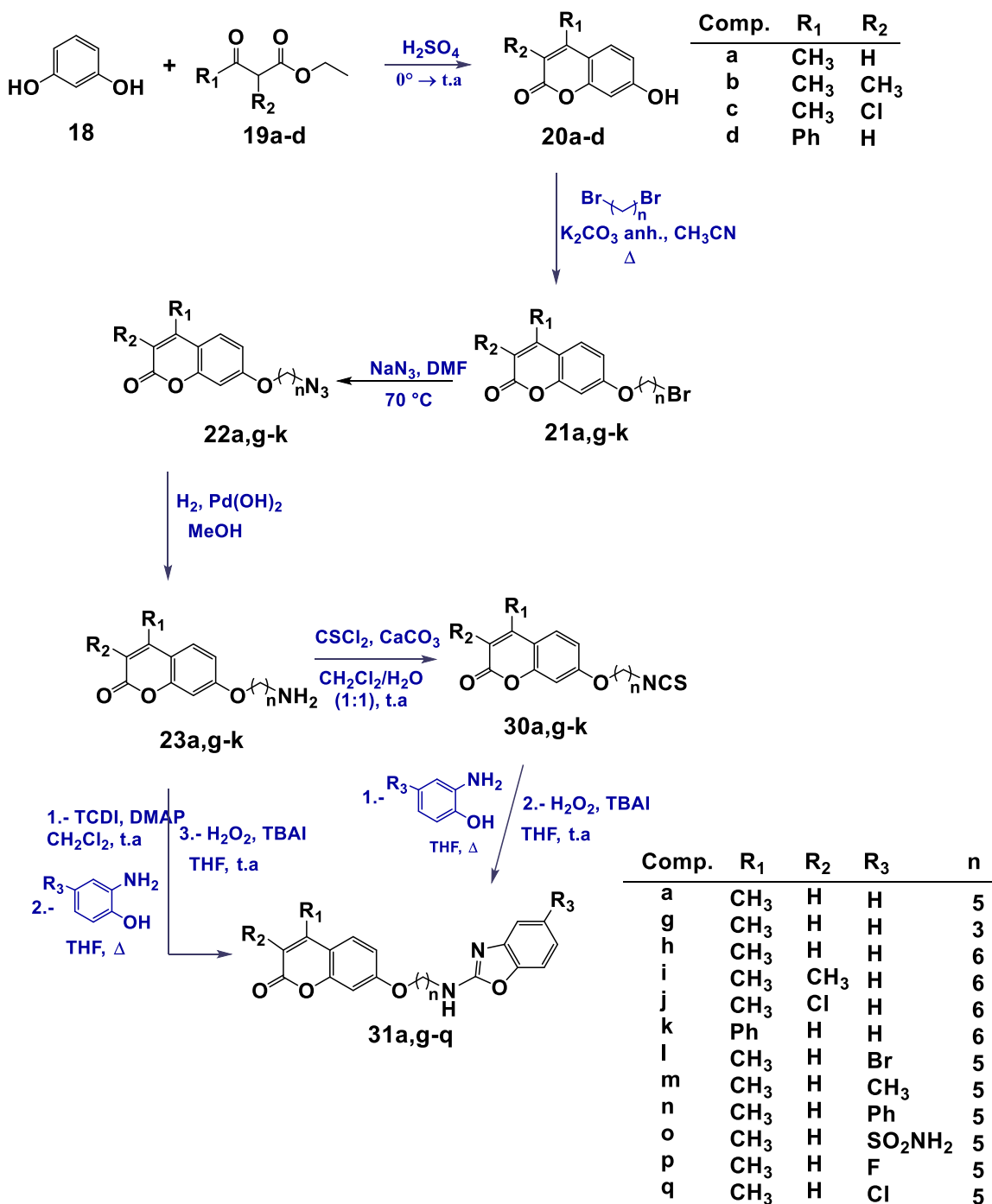


Figura 2.38. Espectro de RMN de ^{13}C de la sal de fosfina del derivado **29a**.

La elección de solo modificar el espaciador para dar los derivados **25e-f** junto con **29e-g** y mantener la cumarina **20a** se tomó por resultados preliminares de estudios biológicos que se realizaron a los compuestos **25a-d** y **29a-d** que a continuación se mostraran.

4.2.3. Obtención de benzoxazoles bicíclicos derivados de cumarinas.

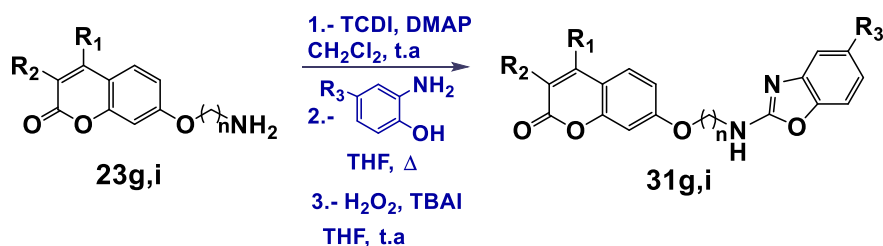
También se sintetizaron una nueva de familia de benzoxazoles bicíclicos como se muestra en el esquema 2.22; estos se realizaron a partir de cuatro cumarinas diferentes y espaciadores alquílicos de distinta longitud.



Esquema 2.22. Ruta sintética para la obtención de los derivados 31a,g-o.

Debido a la falta de stock de tiofosgeno en el proveedor, no se utilizó la metodología clásica para la formación de isotiocyanatos, sino otra reportada por Richard J. Perner,¹⁵¹ consistente en el uso de tiocarbonildiimidazol (TCDI) como agente tionante. La amina previamente obtenida **23g**, se utilizó en estas condiciones, reaccionando con un exceso de TCDI y DMAP catalíticamente a temperatura ambiente duración de 2 h. Purificando el isotiocianato intermediario, el rendimiento no fue el esperado, si no se obtuvo en un 17%. Esto se le atribuye a que se pudo quedar en el intermediario donde la amina solo sustituye a un imidazol y no logra desplazar el segundo. Teniendo esto en mente, se plantea un tiempo de reacción más largo para llevar la eliminación del segundo imidazol, pero arriesgando que se pueda degradar el isotiocianato ya formado o evaporar el disolvente y pasar el crudo de reacción a la siguiente reacción.

Comprobado lo planteado, se dejó reaccionar el derivado **23g** por 8 h mostró la degradación del isotiocianato formado, por lo que se optó por la segunda opción; como se muestra en el esquema 2.23, se llevó el acoplamiento del 2-aminofenol adicionándolo al crudo de reacción, pero ahora en THF y a reflujo por 17 h.



Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	n	rend.(%)
g	CH ₃	H	H	3	46
i	CH ₃	CH ₃	H	6	40

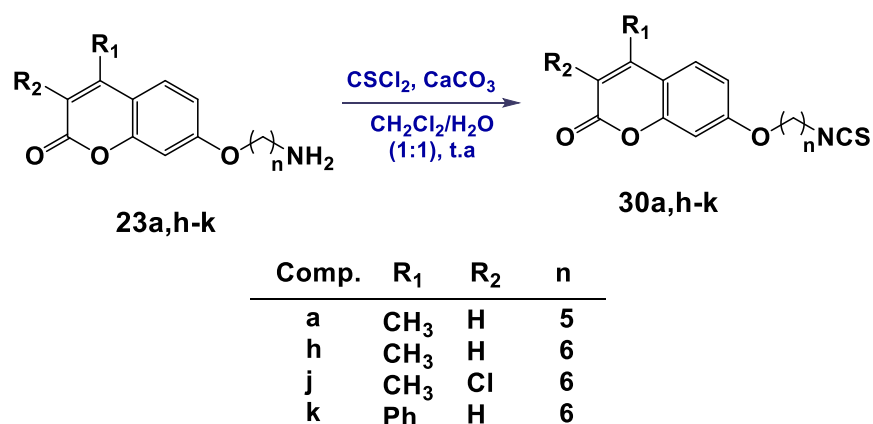
Esquema 2.23. Síntesis de los derivados **31g,i**.

Para obtener los heterociclos de tipo benzoxazol, una vez que se consumió el isotiocianato y se ha formado la tiourea *o*-fenólica como intermediario, se utilizaron las condiciones reportadas por Yadav,¹⁴⁸ las que implican la utilización de H₂O₂ al 30% y TBAI catalíticamente a temperatura

¹⁵¹ Perner R. J.; Koenig J. R.; DiDomenico S.; Gomtsyan A.; Schmidt R. G.; Lee C.-H.; Hsu M. C.; McDonald H. A.; Gauvin D. M.; Joshi S.; Turner T. M.; Reilly R. M.; Kym P. R.; Kort M. E.; *Bioorg. Med. Chem.* **2010** 18, 4821-4829.

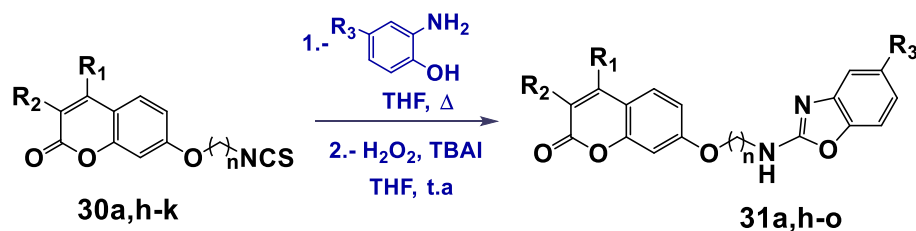
ambiente por un lapso de un hora de reacción, donde se lleva una oxidación intramolecular en un cíclicodesulfuración de la tiourea *o*-fenólica que se forma, estas condiciones se utilizaron para la obtención de dos heterociclos de tipo benzoxazol **31g,i** con rendimientos de 40 y 46%.

Cuando se dispuso de tiofosgeno se formaron los isotiocianatos **30a,h-k**, evitándose los problemas en el uso de TCDI mencionados anteriormente. Previamente obtenidas las aminas **23a,g-k** como se ve en el esquema 2.24, se hicieron reaccionar con tiofosgeno en una mezcla bifásica de CH₂Cl₂/H₂O en presencia de CaCO₃ a temperatura ambiente en un tiempo de reacción de 30 min dando como resultado los derivados **30a,h-k** en rendimientos cuantitativos.



Esquema 2.24. Síntesis de los isotiocianatos **30a,h-k**.

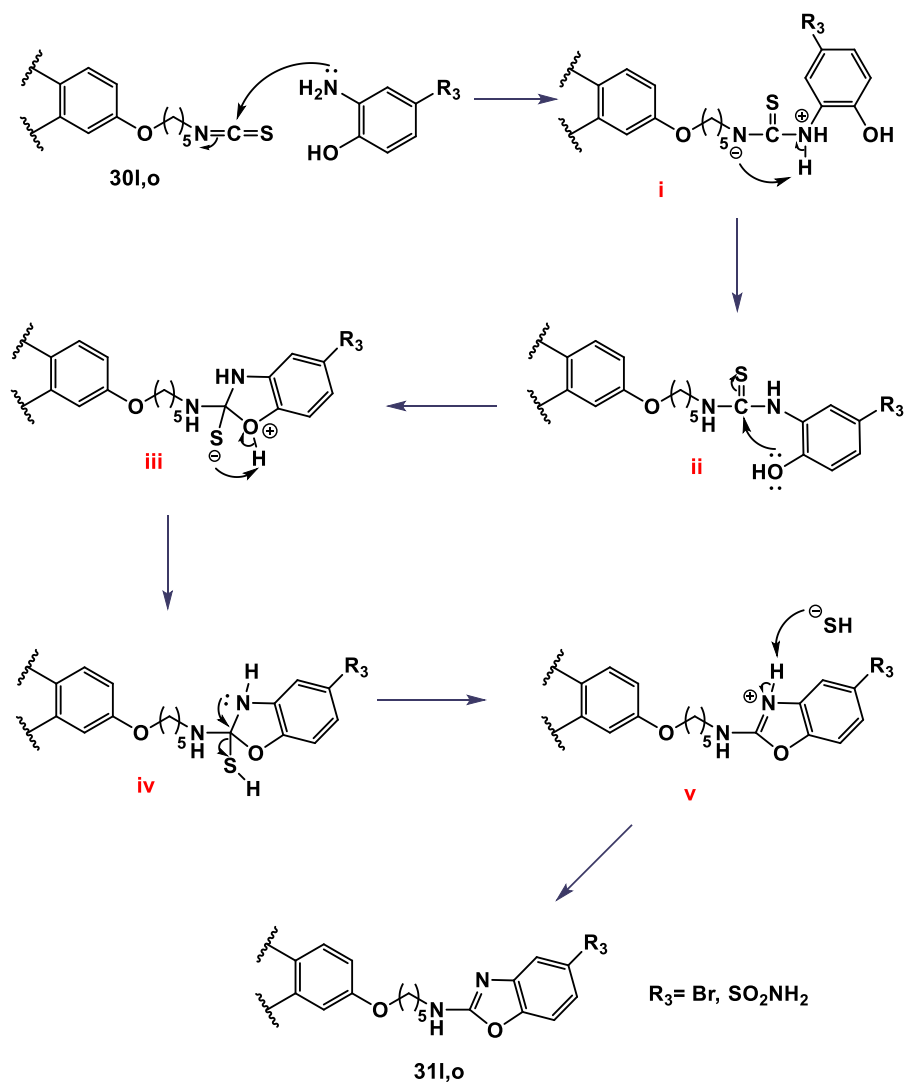
Como se muestra en el esquema 2.25, los derivados **31a,h-o** se sintetizaron con las condiciones ya establecidas anteriormente, con la excepción de los derivados **31i,o** que se tuvo que modificar las condiciones; ahora colocando el derivado **30a** y el correspondiente 2-aminofenol tubo en el Fischer-Porter calentando a 115 °C durante de 32-41 h. Se debe a que los sustituyentes que se encuentran en *para* al fenol, son grupos electrón-atrayente que hacen que la amina se vuelva menos nucleófila por lo que le cuesta reaccionar con el isotiocianato. Las segundas condiciones se llevaron cabo sin ningún problema a temperatura ambiente de 1-2 h dando los productos **31a,h-o** con rendimientos desde 26 a 68%.



Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	n	rend.(%)
a	CH ₃	H	H	5	68
h	CH ₃	H	H	6	50
j	CH ₃	Cl	H	6	26
k	Ph	H	H	6	30
l	CH ₃	H	Br	5	33
m	CH ₃	H	CH ₃	5	42
n	CH ₃	H	Ph	5	49
o	CH ₃	H	SO ₂ NH ₂	5	30

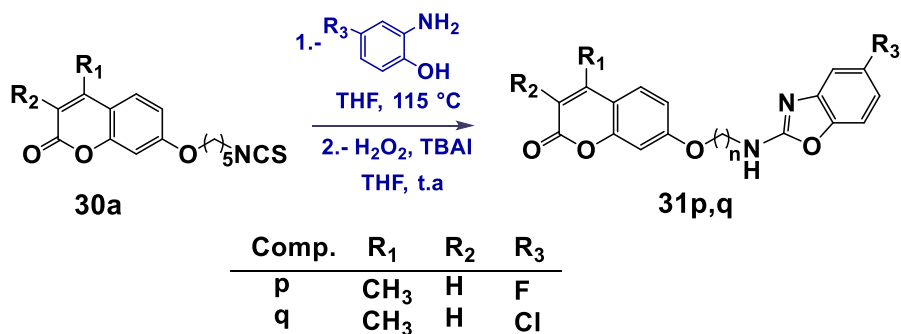
Esquema 2.25. Síntesis de los derivados benzoxazoles **31a,h-o**.

Dentro de la reacción de formación de la tiourea *o*-fenólica se observó que al incrementar el calentamiento como en los casos de los derivados **31l,o**, se formaba un poco de biciclo de benzoxazol, es decir, que en C.C.F se observaba la presencia de dos compuestos: uno se atribuía a la tiourea *o*-fenólica y el otro al biciclo de benzoxazol. Al incrementar la temperatura ocurría una desulfuración de la tiourea forzando por parte del fenol, atacando al carbono unido al azufre y así eliminación para formar el biciclo como se muestra en el mecanismo del esquema 2.26. Comienza con el ataque de la amina del 2-aminofenol al isotiocianato formando el intermediario **i**. Después ocurre una desprotonación y protonación formando así la tiourea *o*-fenólica (**ii**), una vez formada dicha tiourea el grupo hidroxilo ataca al carbono de esta (**iii**). Nuevamente ocurre una desprotonación y protonación para dar el intermediario **iv**, en seguida ocurre la eliminación de SH (**iv**) y desprotonación del intermediario **v** dando los biciclos de benzoxazoles (**31a,h-o**).



Esquema 2.26. Mecanismo propuesto para la obtención del derivado **31I,o**.

También se trató de obtener los derivados **31p,q** tal como se muestra en el esquema 2.27, en las mismas condiciones que se logró obtener los derivados **31I,o**. Por cromatografía en capa fina se mostraban muchas impurezas provenientes del 2-aminofenol que se degrada al utilizar las condiciones de desulfuración, por lo que se trató de purificar. Al llevar los a RMN se observó que los compuestos estaban presentes pero con diversas impurezas, lo cual se buscó otro tipo de sistemas para purificarlo pero no se logró su purificación.



Esquema 2.27. Síntesis de los derivados benzoxazoles **31p,q**.

A continuación se presenta los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C para el derivado **31a**, los demás espectros de los derivados **31h-o** se encuentran en el anexo de esta tesis.

En el espectro de RMN de ^1H para el derivado **31a** como se muestra en la figura 2.39 se puede observar las señales de los protones aromáticos entre 7.36-7.02 ppm pertenecientes al anillo aromático del 2-aminofenol confirmando que se acoplo al isotiocianato de partida además de la señal del NH en 5.05 ppm. El resto de señales no sufren algún cambio representativo mostrándose por ejemplo los dos tripletes de los CH_2 que están unidos a los átomos de oxígeno y nitrógeno en 4.02 ppm y 3.53 ppm, respectivamente.

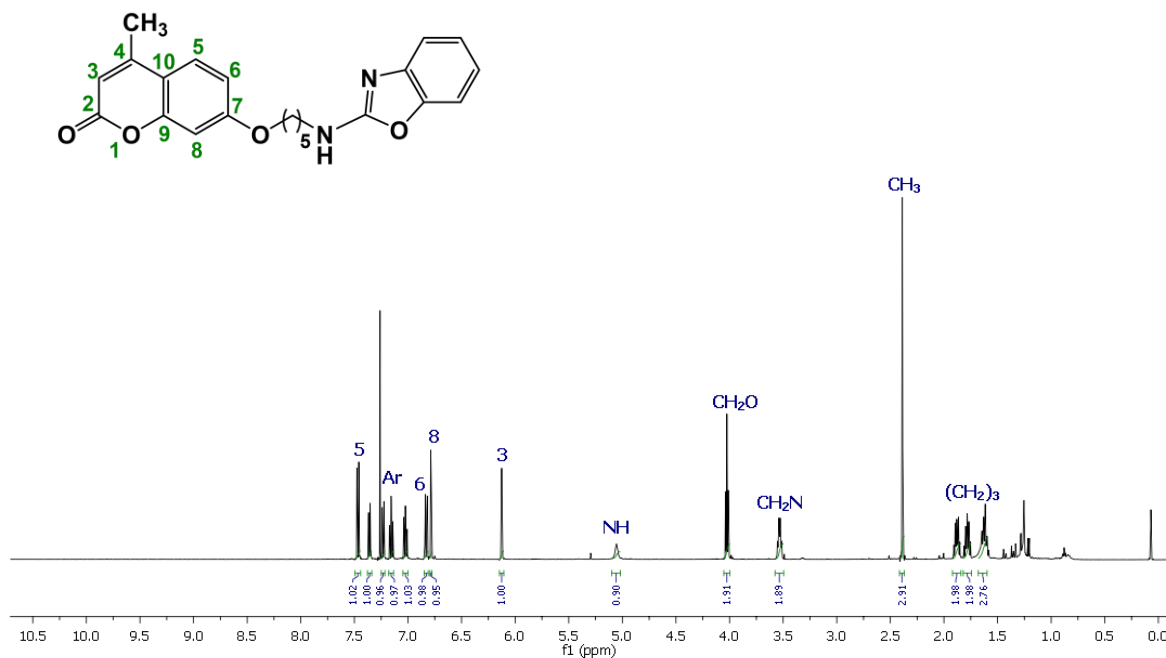


Figura 2.39. Espectro de RMN de ^{13}C del biciclo benzoxazol **31a**.

En la figura 2.40 se muestra el espectro de RMN ^{13}C del derivado **31a**, observando las señales del carbono que está unido a los átomos de nitrógeno y oxígeno perteneciente al biciclo de benzoxazol en 161.3 ppm afirmando que se ha llevado a cabo la ciclación debido a que si solo tuviéramos la tiourea *o*-fenólica tendríamos una señal aproximadamente en 180 ppm. Otras señales que se observan son las de los carbonos aromáticos pertenecientes al 2-aminofenol que se encuentran entre 148.5-108.7 ppm, el resto de señales pertenecen a la cumarina y a la cadena hidrocarbonada las cuales no sufrieron cambios significativos.

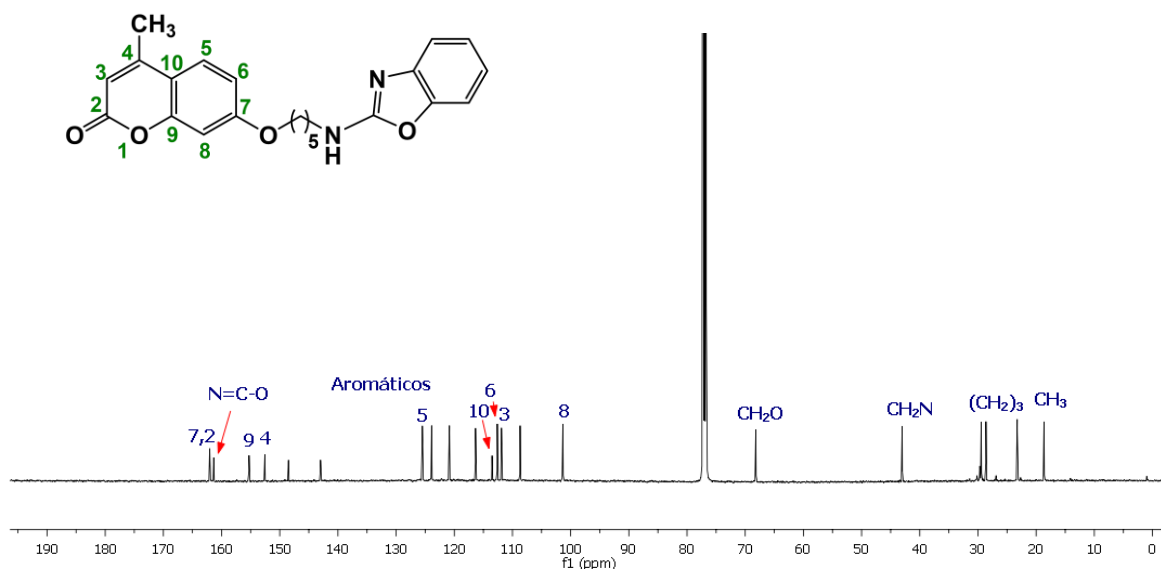


Figura 2.40. Espectro de RMN de ^{13}C del biciclo de benzoxazol **31a**.

Capítulo 2.5: Desarrollo Experimental

5.1 Equipos y técnicas utilizadas

Puntos de fusión

Los puntos de fusión fueron determinados por la técnica de capilar abierto en un aparato electrotérmico modelo Electrothermal, utilizando la escala de grados Celsius y no fueron corregidos.

Cromatografía

Para la cromatografía analítica en capa fina (c.c.f.) se utilizaron placas comerciales de gel de sílice ALUGRAM[®] SIL G/UV254 y como fase móvil sistemas de elución acetato de etilo-ciclohexano, cloruro de metileno-metanol o cloruro de metileno-hexano. Como revelador se utilizó indicador de fluorescencia, una lámpara de luz ultravioleta de onda corta (254 nm, lámpara UV-G-54) y el revelado por calcinación de las placas con vainillina (0.6 g de vainillina en 100 ml EtOH con 2 ml de H₂SO₄), ácido fosfomolibdico (1 g en 100 ml de EtOH), ninhidrina (0.6g en 200 ml EtOH) o ácido sulfúrico (5 ml de H₂SO₄ en 95 ml de EtOH).

Para la cromatografía en columna, se empleó gel de sílice Davisil[™] grado 633 (malla 200–425) de acuerdo a la técnica de cromatografía tipo flash utilizando sistemas de eluyentes de acetato de etilo-ciclohexano o diclometano-metanol en diversas proporciones.

Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética fueron obtenidos con un equipo de Bruker UltraShield 300 MHz para espectros de ¹H y 75 MHz para los espectros de ¹³C, también fueron obtenidos Bruker Ascend 500 MHz para espectros de ¹H y 125 MHz donde el equipo tenía instalado una criosonda para los espectros de ¹³C; se utilizó cloroformo deuterado (CDCl₃) o metanol deuterado (MeOD) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento se expresan en hertzios (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; “t” para una señal triple; “dd” para una señal doble de doble; “ddd” para una señal doble de doble de doble; “dc” para una señal doble de cuartetos, “a” para una señal ancha y “m” para una señal múltiple.

Masas

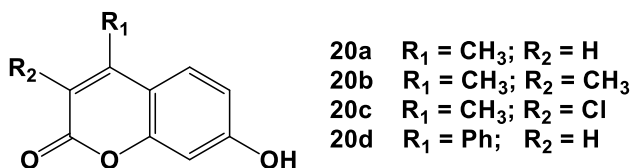
Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrómetro QExactive mass Spectromer, por electrospray y las fragmentaciones están referidas como m/z .

Disolventes y materias primas

Las materias primas comerciales se emplearon sin purificación previa. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y no requirieron purificación. Los disolventes utilizados fueron grado analítico y no requirieron purificación.

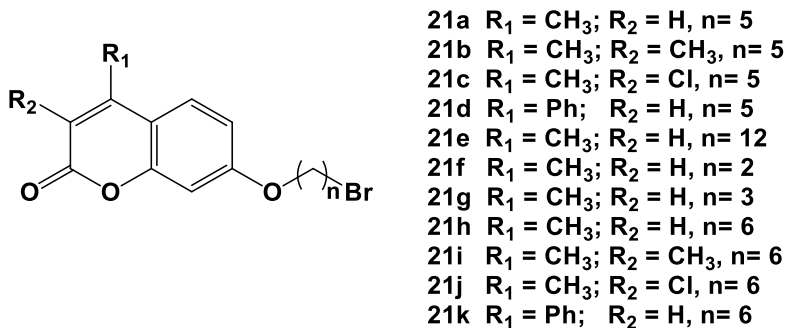
5.2 Síntesis de nuevos derivados de cumarina.

5.2.1. Procedimiento general para la preparación de las cumarinas (20a-d).



Se utilizó las metodologías ya reportadas en la literatura, con pequeñas modificaciones. Sobre H₂SO₄ (12 ml) enfriado a 10 ° C se adicionó gota a gota una disolución del resorcinol (500 mg, 4.54 mmol, 1 eq.) y diferentes β-ceto-ésteres (1 eq.). Una vez terminada la adición se dejó agitar a temperatura ambiente durante 4 h; posteriormente se vertió sobre hielo y se neutralizó con Na₂CO₃. A continuación se extrajo con AcOEt (3x30 ml), y la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H₂O (3x20 ml); se secó con Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad; los productos **20a-d** se obtuvieron con suficiente pureza, sin requerir purificación adicional, con rendimientos comprendidos entre 50-56%. Los datos espectroscópicos de **20a-d** fueron coinciden con los reportados en la bibliografía.⁹⁹⁻¹⁰³

5.2.2. Procedimiento general para la preparación de los derivados 21a-k.



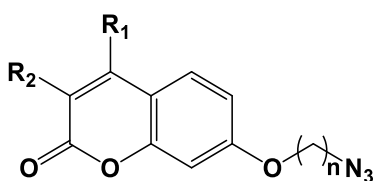
A una solución de la correspondiente cumarina **20a-d** (1eq.) en CH₃CN (5 ml) se adicionó K₂CO₃ anh. (4 eq.) y el correspondiente dibromoalcano (10 eq.); esta mezcla se reflujo durante 3-4 h; una vez transcurrido ese tiempo se extrajo con AcOEt (3x30 mL), y la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H₂O (3x20 ml); se secó con Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El

residuo se purificó mediante cromatografía en columna (Ciclohexano→8:2 Ciclohex/AcOEt) teniendo rendimientos cuantitativos. Los datos espectroscópicos de los derivados **21a-d** y **21f-k** coinciden con los descritos en la bibliografía.¹⁰⁴⁻¹⁰⁸

5.2.2.1 7-[(12-Bromododecil)oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona (**21e**).

Se adicionó **20a** (70 mg, 0.39 mmol, 1 eq.), K₂CO₃ anh. (219.6 mg, 1.59 mmol, 4 eq.) y 1,12-dibromododecano (1.30 g, 3.97 mmol, 10 eq.), obteniéndose **21e** como un sólido de color marrón. Rendimiento: 179.9 mg (cuantitativo); *R_f* 0.63 (Ciclohexano/AcOEt 7:3). p.f = 59-62 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.48 (d, *J*_{5,6} = 8.8 Hz, 1H, H-5), 6.85 (dd, *J*_{6,5} = 8.7 Hz, *J*_{6,8} = 2.5 Hz, 1H, H-6), 6.80 (d, *J*_{8,6} = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.13 (q, *J*_{3,H} = 1.1 Hz, 1H, H-3), 4.01 (t, *J*_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂O), 3.41 (t, *J*_{H,H} = 6.9 Hz, 2H, CH₂Br), 2.39 (d, *J*_{H,3} = 1.1 Hz, 3H, CH₃), 1.95 – 1.72 (m, 4H, CH₂), 1.52 – 1.23 (m, 16H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 162.2 (C-7), 161.4 (C-2), 155.3 (C-9), 152.5 (C-4), 125.4 (C-5), 113.4 (C-10), 112.7 (C-6), 111.8 (C-3), 101.3 (C-8), 68.6 (CH₂O), 34.0 (CH₂Br), 32.8 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 28.9 (CH₂), 28.7 (CH₂), 28.2 (CH₂), 25.9 (CH₂), 18.6 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₂H₃₁⁷⁹BrNaO₃ ([M+Na]⁺): 451.1349, observado: 445.1343; calc. para C₂₂H₃₁⁸¹BrNaO₃ ([M+Na]⁺): 447.1328, observado: 447.1322.

5.2.3. Procedimiento general para la preparación de las azidas (**22a-k**).



- 22a** R₁ = CH₃; R₂ = H, n = 5
- 22b** R₁ = CH₃; R₂ = CH₃, n = 5
- 22c** R₁ = CH₃; R₂ = Cl, n = 5
- 22d** R₁ = Ph; R₂ = H, n = 5
- 22e** R₁ = CH₃; R₂ = H, n = 12
- 22f** R₁ = CH₃; R₂ = H, n = 2
- 22g** R₁ = CH₃; R₂ = H, n = 3
- 22h** R₁ = CH₃; R₂ = H, n = 6
- 22i** R₁ = CH₃; R₂ = CH₃, n = 6
- 22j** R₁ = CH₃; R₂ = Cl, n = 6
- 22k** R₁ = Ph; R₂ = H, n = 6

A una solución del correspondiente derivado **21a-k** en DMF (5 ml) se adicionó NaN₃ (3 eq.), y se calentó a 70 °C durante 3-4 h. Terminada la reacción se extrajo con AcOEt (3x30 ml), se lavó con salmuera (3x20 ml), H₂O (3x0 ml); se secó con N₂SO₄, se filtró y el filtrado fue concentrado a sequedad para dar **22a-k**, sin ninguna purificación adicional y con rendimientos cuantitativos. Los

datos espectroscópicos de los derivados **22a** y **22e-k** fueron comparados con los reportados en la bibliografía.¹⁵²⁻¹⁵⁵

5.2.3.1 7-[(5-Azidopentil)oxi]-3,4-dimetil-2H-cromen-2-ona (**22b**).

Se adicionó **21b** (248.4 mg, 0.73 mmol, 1 eq.) y NaN_3 (142.8 mg, 2.19 mmol, 3 eq.) obteniéndose **22b** como un aceite de color marrón. Rendimiento: 134 mg (cuantitativo); R_f 0.75 (Ciclohexano/AcOEt 7:3). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.47 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.8$ Hz, H-5), 6.82 (dd, 1H, $J_{6,5} = 8.8$ Hz, $J_{6,8} = 2.6$ Hz, H-6), 6.77 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.5$ Hz, H-8), 4.00 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, CH_2O), 3.31 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, CH_2N), 2.35 (s, 3H, CH_3), 2.17 (s, 3H, CH_3), 1.84 (m, 2H, CH_2), 1.73-1.53 (m, 4H, CH_2) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 162.4 (C-2), 160.9 (C-7), 153.5 (C-9), 146.2 (C-4), 125.2 (C-5), 118.8 (C-3), 114.1 (C-10), 112.3 (C-6), 100.9 (C-8), 68.0 (CH_2O), 51.3 (CH_2N), 28.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 28.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 23.3 (CH_2), 15.0 (CH_3), 13.1 (CH_3) ppm. HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{NaO}_3$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 324.1319, observado: 324.1316.

5.2.3.1 7-[(5-Azidopentil)oxi]-3-cloro-4-metil-2H-cromen-2-ona (**22c**).

Se adicionó **21c** (200 mg, 0.55 mmol, 1 eq.) y NaN_3 (108.45 mg, 1.66 mmol, 3 eq.) obteniéndose **22c** como un aceite de color marrón. Rendimiento: 229 mg (cuantitativo); R_f 0.3 (Ciclohexano/AcOEt 8:2). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.50 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.9$ Hz, H-5), 6.88 (dd, 1H, $J_{6,5} = 8.9$ Hz, $J_{6,8} = 2.5$ Hz, H-6), 6.79 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.5$ Hz, H-8), 4.02 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, CH_2O), 3.32 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, CH_2N), 2.54 (s, 3H, CH_3), 1.85 (m, 2H, CH_2), 1.72-1.53 (m, 4H, CH_2) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 161.9 (C-7), 157.5 (C-2), 153.1 (C-9), 148.0 (C-4), 125.9 (C-5), 117.7 (C-3), 113.3 (C-10), 113.2 (C-6), 101.2 (C-8), 68.3 (C- CH_2O), 51.3 (CH_2N), 28.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 28.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 23.3 (CH_2), 16.2 (CH_3) ppm. HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{NaO}_3$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 344.0772, observado: 344.0769.

¹⁵² Yu H.; Hou Z.; Tian Y.; Mou Y.; Guo C.; *Eur. J. Med. Chem.* **2018** 151, 434-449.

¹⁵³ Roy A.; Valderrama M. A. M.; Daujat V.; Ferji K.; Leonard M.; Alain Durand, Babin J.; Six J.-L.; *J. Mater. Chem. B.* **2018** 6, 5130-5143.

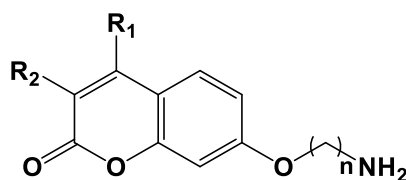
¹⁵⁴ Tian Y.; Liang Z.; Xu H.; Mou Y.; Guo C.; *Molecules* **2016** 21, 758.

¹⁵⁵ Najafi Z.; Mahdavi M.; Saeedi M.; Karimpour-Razkenari E.; Edraki N.; Sharifzadeh M.; Khanavi M.; Akbarzadeh T.; *Bioorg. Chem.* **2019** 83, 303-316.

5.2.3.1 7-[(5-Azidopentil)oxi]-4-fenil-2H-cromen-2-ona (22d).

Se adicionó **21d** (300 mg, 0.77 mmol, 1 eq.) y NaN_3 (151.1 mg, 2.32 mmol, 3 eq.) obteniéndose **22d** como un aceite de color marrón. Rendimiento: 269.5 mg (cuantitativo); R_f 0.38 (Ciclohexano/AcOEt 8:2). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.54-7.48 (m, 3H, Ph), 7.43 (m, 2H, Ph), 7.36 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.8$ Hz, H-5), 6.86 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.5$ Hz, H-8), 6.22 (dd, 1H, $J_{6,5} = 8.9$ Hz, $J_{6,8} = 2.5$ Hz, H-6), 6.20 (s, 1H, H-3), 4.03 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, CH_2O), 3.32 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, CH_2N), 1.86 (m, 2H, CH_2), 1.72-1.54 (m, 4H, CH_2) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 161.3 (C-7), 161.1 (C-2), 156.0 (C-9), 155.8 (C-4), 135.6 (Ph-*ipso*), 129.6 (Ph-*p*), 128.8 (Ph-*m*), 128.4 (Ph-*o*), 127.9 (C-5), 112.7 (C-6), 112.5 (C-10), 111.8 (C-3), 101.6 (C-8), 68.3 (CH_2O), 51.3 (CH_2N), 28.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 28.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 23.3 (CH_2) ppm. HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{NaO}_3$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 372.1319, observado: 372.1315.

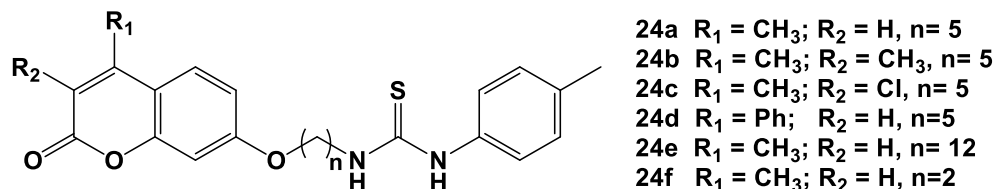
5.2.4. Procedimiento general para la preparación de las aminas (23a-k).



- 23a $\text{R}_1 = \text{CH}_3$; $\text{R}_2 = \text{H}$, $n = 5$
- 23b $\text{R}_1 = \text{CH}_3$; $\text{R}_2 = \text{CH}_3$, $n = 5$
- 23c $\text{R}_1 = \text{CH}_3$; $\text{R}_2 = \text{Cl}$, $n = 5$
- 23d $\text{R}_1 = \text{Ph}$; $\text{R}_2 = \text{H}$, $n = 5$
- 23e $\text{R}_1 = \text{CH}_3$; $\text{R}_2 = \text{H}$, $n = 12$
- 23f $\text{R}_1 = \text{CH}_3$; $\text{R}_2 = \text{H}$, $n = 2$
- 23g $\text{R}_1 = \text{CH}_3$; $\text{R}_2 = \text{H}$, $n = 3$
- 23h $\text{R}_1 = \text{CH}_3$; $\text{R}_2 = \text{H}$, $n = 6$
- 23i $\text{R}_1 = \text{CH}_3$; $\text{R}_2 = \text{CH}_3$, $n = 6$
- 23j $\text{R}_1 = \text{CH}_3$; $\text{R}_2 = \text{Cl}$, $n = 6$
- 23k $\text{R}_1 = \text{Ph}$; $\text{R}_2 = \text{H}$, $n = 6$

Una solución de las correspondientes azidas **22a-k** (106-240 mg) en MeOH (5 ml) se añadió $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (10-20 mg). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente bajo una atmosfera de hidrogeno durante 4 h. Se elimina el catalizador por filtración con Celita y el filtrado fue concentrado a sequedad para dar **23a-k**, sin ninguna purificación adicional con rendimientos cuantitativos.

5.2.5. Procedimiento general para la preparación de las tioureas (24a-f).



A una solución de la correspondiente amina **23a-f** en THF (5 ml) se adicionó isotiocianato de *p*-tolilo (1.5 eq.), esta mezcla se colocó a reflujo durante 2-3 h. Una vez terminada la reacción se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna como se indica en cada caso.

5.2.5.1 N-{5-[(4'-Metil-2'-oxo-2H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(*p*-tolil)tiourea (24a).

Se adicionó **23a** (88.90 mg, 0.34 mmol, 1 eq.) e isotiocianato de *p*-tolilo (0.06 ml, 0.51 mmol, 1.5 eq.). El residuo se purificó por cromatografía en columna (7:3 CicloHex/AcOEt) obteniéndose **24a** como un sólido de color marrón. Rendimiento: 114.7 mg, 82%; R_f 0.50 (Ciclohexano/AcOEt 1:1). p.f = 100-103 °C. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 0.5:0.1) δ : 7.46 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.8$ Hz, H-5'), 7.18 (m, 2H, Ar-o), 7.06 (m, 2H, Ar-m), 6.81 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.8$ Hz, $J_{6',8'} = 2.5$ Hz, H-6'), 6.73 (d, 1H, $J_{8',6'} = 2.4$ Hz, H-8'), 6.08 (q, 1H, $J_{3',\text{H}} = 1.1$ Hz, H-3'), 3.97 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, CH_2O), 3.61 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, CH_2N), 2.36 (d, 3H, $J_{\text{H},3'} = 1.1$ Hz, CH_3), 2.31 (s, 3H, CH_3), 1.80 (m, 2H, CH_2), 1.63 (m, 2H, CH_2), 1.46 (m, 2H, CH_2) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 0.5:0.1) δ : 180.4 (C=S), 162.0 (C-7'), 161.5 (C-2'), 155.1 (C-9'), 152.8 (C-4'), 137.4 (Ar-*p*), 133.3 (Ar-*ipso*), 130.6 (Ar-*m*), 125.5 (C-5'), 125.4 (Ar-o), 113.4 (C-10'), 112.6 (C-6'), 111.6 (C-3'), 101.3 (C-8'), 68.1 (CH_2O), 44.9 (CH_2N), 28.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 28.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 23.1 (CH_2), 20.9 (CH_3), 18.5 (CH_3) ppm. HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{N}_2\text{NaS}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 433.1556, observado: 433.1552.

5.2.5.2 N-{5-[(3',4'-Dimetil-2'-oxo-2H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(*p*-tolil)tiourea (24b).

Se adicionó **23b** (159.2 mg, 0.57 mmol, 1 eq.) e isotiocianato de *p*-tolilo (0.1 ml, 0.86 mmol, 1.5 eq.) obteniéndose **24b** como un sólido de color blanco. El residuo se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2). Rendimiento: 192.2 mg, 78%; R_f 0.62 (Ciclohexano/AcOEt 1:1). p.f = 172-174 °C. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 0.5:0.1) δ : 7.44 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.9$ Hz, H-5'), 7.09 (m, 2H, Ar-o),

7.05 (m, 2H, Ar-*m*), 6.77 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.9$ Hz, $J_{6',8'} = 2.5$ Hz, H-6'), 6.68 (d, 1H, $J_{8',6'} = 2.5$ Hz, H-8'), 3.93 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.3$ Hz, CH₂O), 3.54 (t, 2H, $J_{H,H} = 7.1$ Hz, CH₂N), 2.29 (s, 3H, CH₃), 2.24 (s, 3H, CH₃), 2.06 (s, 3H, CH₃), 1.76 (m, 2H, CH₂), 1.59 (m, 2H, CH₂), 1.43 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃/CD₃OD, 0.5:0.1) δ: 180.1 (C=S), 162.9 (C-2'), 160.8 (C-7'), 152.9 (C-9'), 147.1 (C-4'), 136.4 (Ar-*p*), 133.8 (Ar-*ipso*), 129.8 (Ar-*m*), 125.1 (Ar-*o*), 124.9 (C-5'), 117.9 (C-3'), 113.7 (C-10'), 112.2 (C-6'), 100.6 (C-8'), 67.8 (CH₂O), 44.4 (CH₂N), 28.2 (CH₂CH₂O), 28.1 (CH₂CH₂N), 22.8 (CH₂), 20.3 (CH₃), 14.5 (CH₃), 12.6 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₄H₂₈N₂NaO₃S ([M+Na]⁺): 447.1713, observado: 447.1707.

5.2.5.3 N-{5-[(3'-Cloro-4'-metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(*p*-tolil)tiourea (24c).

Se adicionó **23c** (199.8 mg, 0.67 mmol, 1 eq.) e isotiocianato de *p*-tolilo (0.1 ml, 1.01 mmol, 1.5 eq.) obteniéndose **24b** como un sólido de color amarillo. El residuo se purificó por cromatografía en columna (9:1 Tolueno/AcOEt). Rendimiento: 151.4 mg, 50%; *R_f* 0.69 (Ciclohexano/AcOEt 1:1). p.f = 163-165 °C. ¹H-RMN (300 MHz, MeOD) δ: 7.84 (s, 1H, NH), 7.70 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.9$ Hz, H-5'), 7.17 (m, 4H, Ar-H), 6.99 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.9$ Hz, $J_{6',8'} = 2.5$ Hz, H-6'), 6.90 (d, 1H, $J_{8',6'} = 2.5$ Hz, H-8'), 4.11 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.3$ Hz, CH₂O), 3.60 (t, 2H, $J_{H,H} = 7.1$ Hz, CH₂N), 2.58 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 1.87 (m, 2H, CH₂), 1.69 (m, 2H, CH₂), 1.55 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 180.4 (C=S), 161.9 (C-7'), 156.6 (C-2'), 152.8 (C-9'), 149.0 (C-4'), 136.5 (Ar-*ipso*), 133.6 (Ar-*p*), 129.2 (C-5'), 127.1 (Ar-*m*), 123.6 (C-3'), 116.2 (C-10'), 113.2 (Ar-*o*), 112.8 (C-6'), 101.2 (C-8'), 67.4 (CH₂O), 43.8 (CH₂N), 28.3 (CH₂CH₂O), 28.2 (CH₂CH₂N), 22.9 (CH₂), 20.5 (CH₃), 16.2 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₃H₂₅ClN₂NaO₃S ([M+Na]⁺): 467.1167, observado: 467.1162.

5.2.5.4 N-{5-[(4'-Fenil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(*p*-tolil)tiourea (24d).

Se adicionó **23d** (240.4 mg, 0.74 mmol, 1 eq.) e isotiocianato de *p*-tolilo (0.1 ml, 1.12 mmol, 1.5 eq.) obteniéndose **24d** como una espuma de color marrón. El residuo se purificó por cromatografía en columna (8:2 Ciclohex/AcOEt). Rendimiento: 276.8 mg, 79%; *R_f* 0.69 (Ciclohexano/AcOEt 1:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.09 (s, 1H, NH), 7.53-7.45 (m, 3H, Ph-*m,p*), 7.44-7.37 (m, 2H, Ph-*o*), 7.34 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.9$ Hz, H-5'), 7.17 (m, 2H, Ar-*o*), 7.08 (m, 2H, Ar-*m*), 6.80 (d, 1H, $J_{8',6'} = 2.4$ Hz, H-8'), 6.73 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.9$ Hz, $J_{6',8'} = 2.5$ Hz, H-6'), 6.15 (s, 1H, H-3'), 6.09 (s, 1H, NH), 3.99 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.3$ Hz, CH₂O), 3.64 (t, 2H, $J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH₂N), 2.30 (s, 3H, CH₃), 1.81 (m, 2H, CH₂),

1.64 (m, 2H, CH₂), 1.48 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 180.4 (C=S), 162.1 (C-7'), 161.1 (C-2'), 155.8 (C-9'), 155.7 (C-4'), 137.2 (Ph-*ipso*), 135.4 (Ar-*p*), 133.4 (Ar-*ipso*), 130.5 (Ar-*m*), 129.5 (Ph-*p*), 128.7 (Ph-*m*), 128.2 (Ph-*o*), 127.8 (C-5'), 125.3 (Ar-*o*), 112.5 (C-6'), 112.2 (C-10'), 111.5 (C-3'), 101.5 (C-8'), 68.1 (CH₂O), 45.0 (CH₂N), 28.6 (CH₂CH₂O), 28.4 (CH₂CH₂N), 23.1 (CH₂), 20.9 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₈H₂₈N₂NaO₃S ([M+Na]⁺): 495.1713, observado: 495.1706.

5.2.5.5 N-{12-[(4'-Metil-2'-oxo-2 H-cromen-7'-il)oxi]dodecyl}-N'-(*p*-tolil)tiourea (24e).

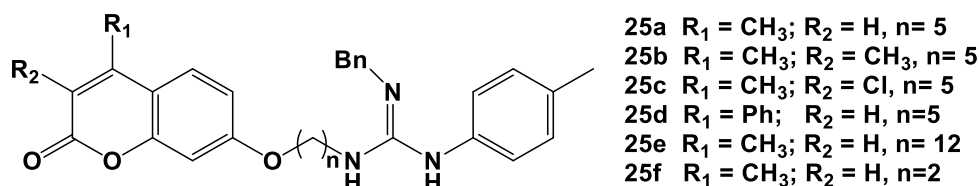
Se adicionó **23e** (111.0 mg, 0.31 mmol, 1 eq.) e isotiocianato de *p*-tolilo (0.06 ml, 0.46 mmol, 1.5 eq.) obteniéndose **24e** como un sólido de color marrón. El residuo se purificó por cromatografía en columna (4:6 Ciclohex/CH₂Cl₂). Rendimiento: 126.1 mg, 80%; *R_f* 0.78 (Ciclohexano/AcOEt 1:1). p.f = 120-123 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: (d, *J*_{5',6'} = 8.8 Hz, 2H, H-5', NH), 7.23 (m, 2H, Ar-H), 7.08 (m, 2H, Ar-H), 6.85 (dd, *J*_{6',5'} = 8.8 Hz, *J*_{6',8'} = 2.5 Hz, 1H, H-6'), 6.80 (d, *J*_{6',8'} = 2.4 Hz, 1H, H-8'), 6.12 (q, *J*_{3',H} = 1.0 Hz, 1H, H-3'), 5.92 (s, 1H, NH), 4.01 (t, *J*_{H,H} = 6.5 Hz, 2H, CH₂O), 3.60 (dd, *J*_{H,H} = 12.9, 7.0 Hz, 2H, CH₂N), 2.39 (d, *J*_{H,3'} = 1.0 Hz, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃), 1.81 (m, 2H, CH₂), 1.62-1.22 (m, 18H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 180.8 (C=S), 162.2 (C-7'), 161.4 (C-2'), 155.3 (C-9'), 152.6 (C-4'), 137.6 (Ar-*p*), 133.3 (Ar-*ipso*), 130.8 (Ar-*m*), 125.6 (Ar-*o*), 125.4 (C-5'), 113.4 (C-10'), 112.7 (C-6'), 111.8 (C-3'), 101.4 (C-8'), 68.6 (CH₂O), 44.6 (CH₂N), 29.5 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 28.9 (CH₂), 26.8 (CH₂), 25.9 (CH₂), 21.0 (CH₃), 18.6 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₃₀H₄₀N₂NaO₃S ([M+Na]⁺): 531.2652, observado: 531.2646.

5.2.5.6 N-{2-[(4'-Metil-2'-oxo-2 H-cromen-7'-il)oxi]etil}-N'-(*p*-tolil)tiourea (24f).

Se adicionó **23f** (142.6 mg, 0.65 mmol, 1 eq.) e isotiocianato de *p*-tolilo (0.1 ml, 0.98 mmol, 1.5 eq.) obteniéndose **24f** como un sólido de color blanco. El residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂). Rendimiento: 213.1 mg, 89%; *R_f* 0.50 (Ciclohexano/AcOEt 1:1). p.f = 179-180 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.49 (d, *J*_{5',6'} = 8.7 Hz, 1H, H-5'), 7.20 (m, 2H, Ar-H), 7.06 (m, 2H, Ar-H), 6.80 (dd, *J*_{6',5'} = 8.7 Hz, *J*_{6',8'} = 2.5 Hz, 1H, H-6'), 6.75 (d, *J*_{8',6'} = 2.4 Hz, 1H, H-8'), 6.13 (q, *J*_{3',H} = 1.1 Hz, 1H, H-3'), 4.22 (t, *J*_{H,H} = 5.1 Hz, 2H, CH₂O), 4.06 (t, *J*_{H,H} = 5.0 Hz, 2H, CH₂N), 2.38 (d, *J*_{H,3'} = 1.1 Hz, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 180.9 (C=S), 161.3 (C-7'), 161.3 (C-2'), 155.0 (C-9'), 152.6 (C-4'), 137.7 (Ar-*p*), 133.1 (Ar-*ipso*), 130.7 (Ar-*m*), 125.7 (C-5'),

125.3 (Ar-o), 114.1 (C-10'), 112.2 (C-6'), 111.6 (C-3'), 102.2 (C-8'), 66.8 (CH₂O), 44.1 (CH₂N), 20.9 (CH₃), 18.5 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₀H₂₀N₂NaO₃S ([M+Na]⁺): 391.1087, observado: 391.1081.

5.2.6. Procedimiento general para la preparación de las guanidinas (25a-f).



A una solución de la correspondiente tiourea **24a-f** en DMF (5 ml) se adicionó bencilamina (5 eq.) y HgO amarillo ((4 eq.), esta mezcla se colocó a temperatura ambiente bajo oscuridad durante 14-66 h.¹⁰⁷ Una vez terminada la reacción se eliminó el HgO mediante filtración sobre Celita®, se evaporó el filtrado y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (2:1:1 Acetona/CH₂Cl₂/AcOEt → 2:1:1:0.5 Acetona/CH₂Cl₂/AcOEt/Et₃N).

5.2.6.1 N'-Bencil-N'-[5-[(4'-Metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil]-N'-(p-tolil)guanidina (25a).

Se adicionó **24a** (31 mg, 0.08 mmol, 1 eq.), bencilamina (0.04 ml, 0.38 mmol, 5 eq.) y HgO (65.41 mg, 0.30 mmol, 4 eq.) obteniéndose **25a** como un aceite de color marrón. Rendimiento: 30.5 mg, 83%; *R_f* 0.15 (CH₂Cl₂/MeOH 5:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.39 (d, 1H, *J*_{5',6'} = 8.8 Hz, H-5'), 7.28-7.14 (m, 5H, Ar-H, Ph), 6.99 (m, 2H, Ar-o), 6.75 (m, 3H, H-6', Ar-m), 6.68 (d, 1H, *J*_{8',6'} = 2.4 Hz, H-8'), 6.03 (q, 1H, *J*_{3',H} = 1.1 Hz, H-3'), 4.29 (s, 2H, CH₂Ph), 3.87 (t, 2H, *J*_{H,H} = 6.3 Hz, CH₂O), 3.11 (t, 2H, *J*_{H,H} = 6.9 Hz, CH₂N), 2.31 (d, 3H, *J*_{H,3'} = 1.1 Hz, CH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃), 1.69 (m, 2H, CH₂), 1.47 (m, 2H, CH₂), 1.32 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 162.0 (C-7'), 161.3 (C-2'), 155.2 (C-9'), 152.3 (C-4'), 151.8 (C=N), 145.48 (Ar-*ipso*), 138.7 (Ph-*ipso*), 131.5 (Ar-*p*), 129.9 (Ar-o), 128.7 (Ph-o), 127.5 (Ph-*p*), 127.2 (Ph-*m*), 125.5 (C-5'), 123.3 (C-Ar-*m*), 113.4 (C-10'), 112.5 (C-6'), 111.7 (C-3'), 101.2 (C-8'), 68.2 (CH₂O), 46.0 (CH₂Ph), 41.8 (CH₂N), 29.3 (CH₂CH₂O), 28.5 (CH₂CH₂N), 23.2 (CH₂), 20.7 (CH₃), 18.6 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₃₀H₃₄N₃O₃ ([M+H]⁺): 484.2595, observado: 484.2591.

5.2.6.2 *N''-Bencil-N-{5-[(3',4'-dimetil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)guanidina (25b).*

Se adicionó **24b** (138.2 mg, 0.33 mmol, 1 eq.), bencilamina (0.2 ml, 1.63 mmol, 5 eq.) y HgO (282.0 mg, 0.30 mmol, 4 eq.) obteniéndose **25b** como un aceite de color marrón. Rendimiento: 168.7 mg (cuantitativo); R_f 0.12 (CH₂Cl₂/MeOH 5:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.41 (d, 1H, $J_{5',6'}$ = 8.8 Hz, H-5'), 7.31-7.18 (m, 5H, Ar-H, Ph), 7.01 (m, 2H, Ar-o), 6.76 (m, 3H, H-6', Ar-m), 6.68 (d, 1H, $J_{8',6'}$ = 2.5 Hz, H-8'), 4.33 (s, 2H, CH₂Ph), 3.87 (t, 2H, $J_{H,H}$ = 6.3 Hz, CH₂O), 3.13 (t, 2H, $J_{H,H}$ = 6.9 Hz, CH₂N), 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.22 (s, 3H, CH₃), 2.11 (s, 3H, CH₃), 1.69 (m, 2H, CH₂), 1.47 (m, 2H, CH₂), 1.35 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ= 162.2 (C-2'), 160.7 (C-7'), 153.3 (C-9'), 151.4 (C-4'), 146.4 (C=N), 146.2 (Ar-*ipso*), 138.8 (Ph-*ipso*), 130.8 (Ar-*p*), 129.7 (Ar-*o*), 128.5 (Ph-*o*), 127.2 (Ph-*p*), 127.1 (Ph-*m*), 125.0 (C-5'), 123.2 (Ar-*m*), 118.5 (C-10'), 113.8 (C-3'), 112.1 (C-6'), 100.8 (C-8'), 67.9 (CH₂O), 45.8 (CH₂Ph), 41.5 (CH₂N), 29.2 (CH₂CH₂O), 28.4 (CH₂CH₂N), 23.1 (CH₂), 20.6 (CH₃), 14.8 (CH₃), 12.9 (CH₃) ppm. HRESI-MS m/z calc. para C₃₁H₃₆N₃O₃ ([M+H]⁺): 498.2751, observado: 498.2742.

5.2.6.3 *N''-Bencil-N-{5-[(3'-cloro-4'-metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)guanidina (25c).*

Se adicionó **24c** (71.9 mg, 0.16 mmol, 1 eq.), bencilamina (0.09 ml, 0.81 mmol, 5 eq.) y HgO (139.9 mg, 0.65 mmol, 4 eq.) obteniéndose **25c** como un aceite de color marrón. Rendimiento: 81.5 mg, 97%; R_f 0.12 (CH₂Cl₂/MeOH 5:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.44 (d, 1H, $J_{5',6'}$ = 9.0 Hz, H-5'), 7.29-7.18 (m, 5H, Ar-H, Ph), 7.01 (m, 2H, Ar-*o*), 6.80 (m, 3H, H-6', Ar-*m*), 6.70 (d, 1H, $J_{8',6'}$ = 2.4 Hz, H-8'), 4.33 (s, 2H, CH₂Ph), 3.87 (t, 2H, $J_{H,H}$ = 6.3 Hz, CH₂O), 3.14 (t, 2H, $J_{H,H}$ = 7.0 Hz, CH₂N), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.22 (s, 3H, CH₃), 1.71 (m, 2H, CH₂), 1.48 (m, 2H, CH₂), 1.38 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 161.9 (C-7'), 157.3 (C-2'), 152.9 (C-9'), 151.4 (C-4'), 147.9 (C=N), 146.6 (Ar-*ipso*), 138.9 (Ph-*ipso*), 130.9 (Ar-*p*), 129.8 (Ar-*o*), 128.6 (Ph-*o*), 127.3 (Ph-*p*), 127.1 (Ph-*m*), 125.8 (C-5'), 123.2 (Ar-*m*), 117.4 (C-3'), 113.1 (C-6'), 112.9 (C-10'), 101.1 (C-8'), 68.2 (CH₂O), 45.9 (CH₂Ph), 41.5 (CH₂N), 29.3 (CH₂CH₂O), 28.4 (CH₂CH₂N), 23.1 (CH₂), 20.7 (CH₃), 16.0 (CH₃) ppm. HRESI-MS m/z calc. para C₃₀H₃₃ClN₃O₃ ([M+H]⁺): 518.2205, observado: 518.2199.

5.2.6.4 N''-Bencil-N-{5-[(4'-Fenil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)guanidina (25d).

Se adicionó **24d** (133.7 mg, 0.28 mmol, 1 eq.), bencilamina (0.2 ml, 1.41 mmol, 5 eq.) y HgO (245.59 mg, 1.13 mmol, 4 eq.) obteniéndose **25d** como un aceite de color marrón. Rendimiento: 123.0 mg, 80%; R_f 0.12 (CH₂Cl₂/MeOH 5:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.44 (m, 3H, Ph-*m,p*), 7.37 (m, 2H, Ph-*o*), 7.32-7.18 (m, 6H, H-5', Ar-H, Ph), 7.01 (m, 2H, Ar-*o*), 6.78 (m, 3H, H-8', Ar-*m*), 6.69 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.9$ Hz, $J_{6,8} = 2.5$ Hz, H-6'), 6.14 (s, 1H, H-3'), 4.32 (s, 2H, CH₂Ph), 3.90 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.3$ Hz, CH₂O), 3.13 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.9$ Hz, CH₂N), 2.22 (s, 3H, CH₃), 1.70 (m, 2H, CH₂), 1.49 (m, 2H, CH₂), 1.35 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 162.0 (C-7'), 161.0 (C-2'), 155.8 (C-9'), 155.6 (C-4'), 151.3 (C=N), 146.7 (Ar-*ipso*), 138.9 (Ph-*ipso*), 135.3 (Ph-*ipso*), 130.7 (Ar-*p*), 129.7 (Ar-*o*), 129.4 (Ph-*p*), 128.6 (Ph-*o*), 128.5 (Ph-*o*), 128.2 (Ph-*m*), 127.7 (Ph-*p*), 127.2 (C-5'), 127.1 (Ph-*m*), 123.2 (Ar-*m*), 112.4 (C-6'), 112.2 (C-10'), 111.5 (C-3'), 101.4 (C-8'), 68.1 (CH₂O), 45.8 (CH₂Ph), 41.5 (CH₂N), 29.2 (CH₂CH₂O), 28.4 (CH₂CH₂N), 23.1 (CH₂), 20.6 (CH₃) ppm. HRESI-MS m/z calc. para C₃₅H₃₆N₃O₃ ([M+H]⁺): 546.2751, observado: 546.2746.

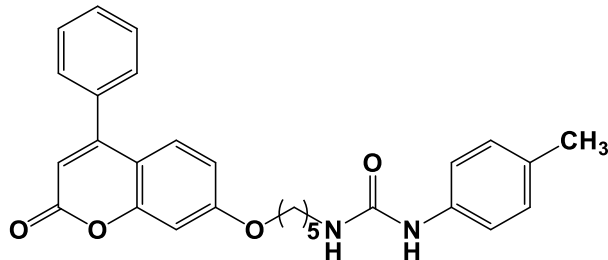
5.2.6.5 N''-Bencil-N-{12-[(4'-metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]dodecil}-N'-(p-tolil)guanidina (25e).

Se adicionó **24e** (31 mg, 0.08 mmol, 1 eq.), bencilamina (0.04 ml, 0.38 mmol, 5 eq.) y HgO (65.41 mg, 0.30 mmol, 4 eq.) obteniéndose **25e** como un aceite de color marrón. Rendimiento: 88.8 mg, 93%; R_f 0.12 (CH₂Cl₂/MeOH 5:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.37 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.8$ Hz, H-5'), 7.29-7.14 (m, 5H, Ar-H, Ph), 6.95 (m, 2H, Ar-*o*), 6.80-6.65 (m, 4H, H-6', H-8', Ar-*m*), 5.99 (q, 1H, $J_{3',H} = 1.1$ Hz, H-3'), 4.29 (s, 2H, CH₂Ph), 3.90 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.5$ Hz, CH₂O), 3.01 (t, 2H, $J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH₂N), 2.28 (d, 3H, $J_{H,3'} = 1.1$ Hz, CH₃), 2.19 (s, 3H, CH₃), 1.71 (m, 2H, CH₂), 1.46-1.06 (m, 18H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 162.1 (C-7'), 161.2 (C-2'), 155.1 (C-9'), 152.5 (C-4'), 151.5 (C=N), 146.7 (Ar-*ipso*), 138.9 (Ph-*ipso*), 130.8 (Ar-*p*), 129.8 (Ar-*o*), 128.5 (Ph-*o*), 127.2 (Ph-*p*), 127.2 (Ph-*m*), 125.3 (C-5'), 123.3 (Ar-*m*), 113.2 (C-10'), 112.5 (C-6'), 111.6 (C-3'), 101.2 (C-8'), 68.4 (CH₂O), 45.9 (CH₂Ph), 41.8 (CH₂N), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 28.8 (CH₂), 26.7 (CH₂), 25.8 (CH₂), 20.6 (CH₃), 18.5 (CH₃) ppm. HRESI-MS m/z calc. para C₃₇H₄₈N₃O₃ ([M+H]⁺): 582.3690, observado: 582.3699.

4.2.6.6 N'-Bencil-N-{2-[(4'-metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]etil}-N'-(p-tolil)guanidina (25f).

Se adicionó **24f** (31 mg, 0.08 mmol, 1 eq.), bencilamina (0.04 ml, 0.38 mmol, 5 eq.) y HgO (65.41 mg, 0.30 mmol, 4 eq.) obteniéndose **25f** como un aceite de color marrón. Rendimiento: 102.8 mg, 97%; R_f 0.12 (CH₂Cl₂/MeOH 5:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.43 (d, 1H, $J_{5,6'} = 8.8$ Hz, H-5'), 7.29 (m, 5H, Ar-H, Ph), 7.07 (m, 2H, Ar-o), 6.81 (m, 2H, Ar-m), 6.70-6.62 (m, 2H, H-6', H-8'), 6.08 (q, 1H, $J_{3',H} = 1.1$ Hz, H-3'), 4.32 (s, 2H, CH₂Ph), 4.08 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.5$ Hz, CH₂O), 3.60 (t, 2H, $J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH₂N), 2.36 (d, 3H, $J_{H,3'} = 1.1$ Hz, CH₃), 2.28 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ : 161.3 (C-7'), 161.0 (C-2'), 154.8 (C-9'), 152.4 (C-4'), 151.2 (C=N), 146.4 (Ar-*ipso*), 138.6 (Ph-*ipso*), 130.9 (Ar-*p*), 129.8 (Ar-*o*), 128.6 (Ph-*o*), 127.3 (Ph-*p*), 126.9 (Ph-*m*), 125.4 (C-5'), 123.1 (Ar-*m*), 113.6 (C-10'), 111.9 (C-6'), 111.8 (C-3'), 101.5 (C-8'), 67.7 (CH₂O), 45.9 (CH₂Ph), 40.9 (CH₂N), 20.6 (CH₃), 18.4 (CH₃) ppm. HRESI-MS m/z calc. para C₂₇H₂₈N₃O₃ ([M+H]⁺): 442.2125, observado: 442.2120.

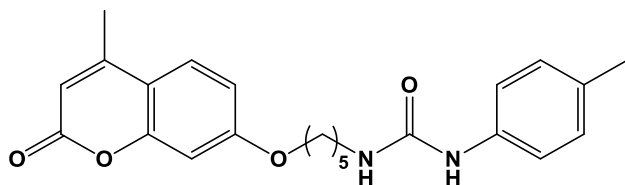
5.2.7. N-{5-[(4'-Fenil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]pentil}-N'-(p-tolil)urea (26).



A una solución de **23d** (95.6 mg, 0.29 mmol, 1 eq.) en EtOH (5 ml) se adicionó isotiocianato de *p*-tolilo (0.05 ml, 0.38 mmol, 1.3 eq.), esta mezcla se colocó en un tubo tipo Fisher-Porter calentando a 93 °C durante 3 h. Una vez terminada la reacción se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (7:3 CicloHex/AcOEt) obteniéndose **26** como un sólido de color marrón. Rendimiento: 51.5 mg, 38%; R_f 0.44 (Ciclohex/AcOEt 1:1). p.f = 156-158 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.50 (m, 3H, Ph-*m,p*), 7.41 (m, 2H, Ph-*o*), 7.35 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.8$ Hz, H-5'), 7.19 (m, 2H, Ar-*o*), 7.05 (m, 2H, Ar-*m*), 6.80 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.3$ Hz, H-8'), 6.70 (dd, 1H, $J_{6,5} = 8.9$ Hz, $J_{6,8} = 2.4$ Hz, H-6'), 6.19 (s, 1H, H-3'), 3.94 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.3$ Hz, CH₂O), 3.24 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.4$ Hz, CH₂N), 2.26 (s, 3H, CH₃), 1.85-1.72 (m, 2H, CH₂), 1.61-1.41 (m, 4H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ :

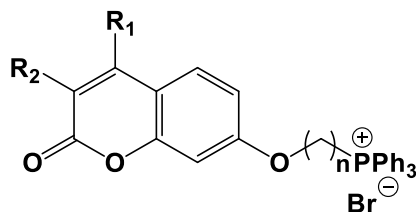
162.3 (C-7'), 161.5 (C-2'), 156.6 (C=O), 156.1 (C-9'), 155.9 (C-4'), 136.0 (Ph-*ipso*), 135.5 (Ar-*ipso*), 133.2 (Ar-*p*), 129.7 (Ar-*m*), 129.6 (Ph-*p*), 128.8 (Ph-*m*), 128.3 (Ph-*o*), 127.9 (C-5'), 121.1 (Ar-*o*), 112.7 (C-6'), 112.3 (C-10'), 111.5 (C-3'), 101.5 (C-8'), 68.3 (CH₂O), 40.0 (CH₂N), 29.9 (CH₂CH₂O), 28.6 (CH₂CH₂N), 23.2 (CH₂), 20.7 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₈H₂₈O₄N₂Na ([M+Na]⁺): 475.1941, observado: 479.1934.

5.2.8. *N*-{5-[(4'-Metil-2'-oxo-2'*H*-cromen-7'-il)oxi]pentil}-*N'*-(*p*-tolil)urea (**27**).



El derivado **27** se preparó siguiendo el método descrito por Yadav,¹⁰⁹ a una solución de **24a** (30 mg, 0.07 mmol, 1 eq.) en THF (5 ml), se adicionó TBAI (2.6% mol, 4 mg) y H₂O₂ al 30% (33 µl, 0.15 mmol, 2 eq.) se dejó agitar por 10 min y se adiciono la *p*-toluidina (7.86 mg, 0.07 mmol, 1 eq.), después esta mezcla se colocó en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Una vez terminada la reacción se colocó H₂O (2 ml) y se extrajo con AcOEt (3x30 ml), se lavó con H₂O (2x20 ml); se secó con Na₂SO₄, se concentró a fase orgánica y el residuo se purificó por cromatografía en columna (7:3 CicloHex/AcOEt → 1:1 Ciclohex/AcOEt) obteniéndose **27** como un sólido de color marrón. Rendimiento: 16 mg, 55%; *R_f* 0.53 (Ciclohex/AcOEt 1:1). p.f = 145-148 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD, 0.5:0.1) δ: 7.40 (d, 1H, *J*_{5',6'} = 8.8 Hz, H-5'), 7.07 (m, 2H, Ar-*o*), 6.93 (m, 2H, Ar-*m*), 6.75 (dd, 1H, *J*_{6',5'} = 8.8 Hz, *J*_{6,8} = 2.4 Hz, H-6'), 6.67 (d, 1H, *J*_{8',6'} = 2.4 Hz, H-8'), 6.00 (q, 1H, *J*_{3',H} = 0.9 Hz, H-3'), 3.90 (t, 2H, *J*_{H,H} = 3.9 Hz, CH₂O), 3.10 (t, 2H, *J*_{H,H} = 6.6 Hz, CH₂N), 2.29 (d, 3H, *J*_{H,3} = 0.9 Hz, CH₃), 2.14 (s, 3H, CH₃), 1.78-1.66 (m, 2H, CH₂), 1.53-1.34 (m, 4H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃/CD₃OD 0.5:0.1) δ: 162.1 (C-7'), 156.7 (C=O), 154.8 (C-2'), 153.5 (C-9'), 136.3 (C-4'), 132.1 (Ar-*p*), 129.2 (Ar-*ipso,m*), 125.5 (C-5'), 119.6 (Ar-*o*), 113.2 (C-10'), 112.7 (C-6'), 111.1 (C-3'), 101.1 (C-8'), 68.2 (CH₂O), 39.4 (CH₂N), 29.6 (CH₂CH₂O), 28.4 (CH₂CH₂N), 23.0 (CH₂), 20.3 (CH₃), 18.3 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₃H₂₆N₂NaO₄ ([M+Na]⁺): 417.1785, observado: 417.1779.

5.2.9. Procedimiento general para la preparación de las sales de fosfonio (29a-g).



- 29a** $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$, $n = 5$
29b $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{CH}_3$, $n = 5$
29c $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{Cl}$, $n = 5$
29d $R_1 = \text{Ph}$; $R_2 = \text{H}$, $n = 5$
29e $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$, $n = 12$
29g $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$, $n = 3$

A una solución del correspondiente bromoderivado **21a-e** y **21g** en CH_3CN (10 ml) se adicionó Ph_3P , esta mezcla se colocó en un tubo tipo Fisher-Porter calentando a $120\text{ }^\circ\text{C}$ durante 22-67 h. Una vez terminada la reacción se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (40:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ \rightarrow 20:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$).

5.2.9.1 Bromuro de {5-[(4-Metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]pentil}trifenilfosfonio (29a).

Se adiciono **21a** (50 mg, 0.1537 mmol, 1 eq.) y Ph_3P (201.6 mg, 0.7687 mmol, 5 eq.) obteniéndose **29a** como una espuma de color marrón. Rendimiento: 51.8 mg, 57%; R_f 0.23 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$, 0.5:0.1) δ : 7.43-7.34 (m, 3H, Ar-H, Ph), 7.33-7.20 (m, 12H, Ar-H, Ph), 7.10 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.9$ Hz, H-5), 6.36 (dd, 1H, $J_{6,5} = 8.8$ Hz, $J_{6,8} = 2.5$ Hz, H-6), 6.23 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.4$ Hz, H-8), 5.61 (q, 1H, $J_{3,H} = 1.1$ Hz, H-3), 3.53 (t, 2H, $J_{H,H} = 5.7$ Hz, CH_2O), 2.94 (m, 2H, CH_2P), 1.92 (d, 3H, $J_{H,3} = 1.1$ Hz, CH_3), 1.43-1.23 (m, 6H, CH_2) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$, 0.5:0.1) δ : 161.5 (C-7), 161.5 (C-2), 154.2 (C-9), 153.5 (C-4), 134.4-134.3 (d, $J_{C,P} = 3.0$ Hz, Ar-*p*), 132.7-132.6 (d, $J_{C,P} = 9.9$ Hz, Ar-*o*), 129.7-129.5 (d, $J_{C,P} = 12.6$ Hz, Ar-*m*), 125.2 (C-5), 118.1-116.9 (d, $J_{C,P} = 86.3$ Hz, Ar-*ipso*), 112.7 (C-10), 111.8 (C-6), 110.1 (C-3), 100.3 (C-8), 68.2 (CH_2O), 27.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 26.4-26.2 (d, $J_{C,P} = 16.7$ Hz, CH_2P), 21.4-21.3 (d, $J_{C,P} = 3.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 20.7 (CH_2), 17.1 (CH_3) ppm. HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{P}$ ($[\text{M}]^+$): 507.2084, observado: 507.2075.

5.2.9.2 Bromuro de {5-[(3,4-Dimetil-2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]pentil}trifenilfosfonio (29b).

Se adicionó **21b** (50 mg, 0.15 mmol, 1 eq.) y Ph_3P (199.1 mg, 0.76 mmol, 5 eq.) obteniéndose **29b** como una espuma de color blanco. Rendimiento: 89.2 mg, 98%; R_f 0.23 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.76-7.64 (m, 9H, Ar-H, Ph), 7.62-7.54 (m, 6H, Ar-H, Ph), 7.33 (d, 1H, $J_{5,6}$

= 8.9 Hz, H-5), 6.63 (dd, 1H, $J_{6,5} = 8.9$ Hz, $J_{6,8} = 2.4$ Hz, H-6), 6.46 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.4$ Hz, H-8), 3.83 (t, 2H, $J_{H,H} = 5.4$ Hz, CH₂O), 3.64 (m, 2H, CH₂P), 2.21 (s, 3H, CH₃), 2.00 (s, 3H, CH₃), 1.81-1.54 (m, 6H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 161.2 (C-2), 160.5 (C-7), 153.0 (C-9), 146.3 (C-4), 134.9-134.8 (d, $J_{C,P} = 2.9$ Hz, Ar-*p*), 133.4-133.3 (d, $J_{C,P} = 10.0$ Hz, Ar-*o*), 130.4-130.2 (d, $J_{C,P} = 12.5$ Hz, Ar-*m*), 125.2 (C-5), 118.4-117.3 (d, $J_{C,P} = 86.0$ Hz, Ar-*ipso*), 118.3 (C-3), 113.8 (C-10), 111.8 (C-6), 100.9 (C-8), 67.7 (CH₂O), 28.1 (CH₂CH₂O), 26.9-26.7 (d, $J_{C,P} = 16.5$ Hz, CH₂P), 22.8 (CH₂), 22.2-22.1 (d, $J_{C,P} = 3.9$ Hz, CH₂CH₂P), 14.9 (CH₃), 12.9 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₃₄H₃₄O₃P ([M]⁺): 521.2240, observado: 521.2233.

5.2.9.3 Bromuro de {5-[(3-Cloro-4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]pentil}trifenilfosfonio (29c).

Se adicionó **21c** (50 mg, 0.14 mmol, 1 eq.) y Ph₃P (182.3 mg, 0.69 mmol, 5 eq.) obteniéndose **29c** como una espuma de color marrón. Rendimiento: 94.3 mg (cuantitativo); *R_f* 0.23 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.85-7.70 (m, 9H, Ar-H, Ph), 7.69-7.60 (m, 6H, Ar-H, Ph), 7.45 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.9$ Hz, H-5), 6.80 (dd, 1H, $J_{6,5} = 8.9$ Hz, $J_{6,8} = 2.3$ Hz, H-6), 6.58 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.3$ Hz, H-8), 3.91 (m, 2H, CH₂O), 3.72 (m, 2H, CH₂P), 2.46 (s, 3H, CH₃), 1.90-1.61 (m, 6H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 161.7 (C-7), 157.3 (C-2), 152.7 (C-9), 148.1 (C-4), 135.0-134.9 (d, $J_{C,P} = 2.9$ Hz, Ar-*p*), 133.5-133.4 (d, $J_{C,P} = 10.0$ Hz, Ar-*o*), 130.5-130.3 (d, $J_{C,P} = 12.5$ Hz, Ar-*m*), 125.9 (C-5), 118.5-117.4 (d, $J_{C,P} = 86.0$ Hz, Ar-*ipso*), 117.2 (C-3), 112.9 (C-10), 112.8 (C-6), 101.3 (C-8), 68.1 (CH₂O), 28.2 (CH₂CH₂O), 26.9-26.7 (d, $J_{C,P} = 16.6$ Hz, CH₂P), 22.9 (CH₂), 22.3-22.2 (d, $J_{C,P} = 4.4$ Hz, CH₂CH₂P), 16.1 (CH₃), 12.9 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₃₃H₃₁ClO₃P ([M]⁺): 541.1694, observado: 541.1692.

5.2.9.4 Bromuro de {5-[(2-Oxo-4-fenil-2H-cromen-7-il)oxi]pentil}trifenilfosfonio (29d).

Se adicionó **21d** (80 mg, 0.21 mmol, 1 eq.) y Ph₃P (270.9 mg, 1.03 mmol, 5 eq.) obteniéndose **29d** como una espuma de color blanca. Rendimiento: 123.1 mg, 92%; *R_f* 0.17 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.82-7.57 (m, 15H, Ar-H, Ph), 7.44-7.38 (m, 3H, Ar-*m,p*), 7.35-7.28 (m, 2H, Ar-*o*), 7.24 (d, 1H, $J_{5,6} = 12.0$ Hz, H-5), 6.64-6.61 (m, 2H, H-6, H-8), 6.03 (s, 1H, H-3), 3.91 (m, 2H, CH₂O), 2.02 (m, 2H, CH₂P), 1.86-1.60 (m, 6H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 162.1 (C-7), 161.2 (C-2), 155.9 (C-9), 155.7 (C-4), 135.6 (Ph-*ipso*), 135.1-135.0 (d, $J_{C,P} = 2.8$ Hz, Ar-*p*), 133.7-133.5 (d, $J_{C,P} = 10.0$ Hz, Ar-*o*), 130.6-130.5 (d, $J_{C,P} = 12.5$ Hz, Ar-*m*), 129.6 (Ph-*p*), 128.8 (Ph-*m*),

128.3 (Ph-o), 127.9 (C-5), 118.7-117.5 (d, $J_{C,P} = 85.9$ Hz, Ar-*ipso*), 112.4 (C-6), 112.2 (C-10), 111.4 (C-3), 101.7 (C-8), 68.2 (CH₂O), 28.3 (CH₂CH₂O), 27.0-26.8 (d, $J_{C,P} = 16.6$ Hz, CH₂P), 22.9 (CH₂), 22.4-22.3 (d, $J_{C,P} = 4.4$ Hz, CH₂CH₂P) ppm. HRESI-MS m/z calc. para C₃₈H₃₄O₃P ([M]⁺): 569.2240, observado: 569.2235.

5.2.9.5 Bromuro de {12-[(4-Metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]dodecil}trifenilfosfonio (29e).

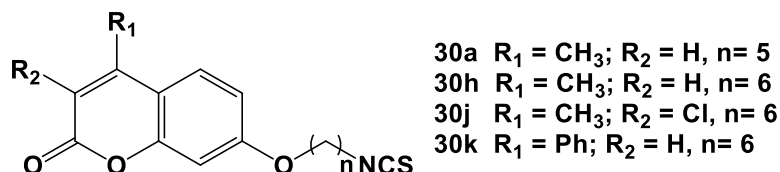
Se adicionó **21e** (50 mg, 0.12 mmol, 1 eq.) y Ph₃P (154.8 mg, 0.59 mmol, 5 eq.) obteniéndose **29e** como un aceite de color marrón. Rendimiento: 77.2 mg, 95%; R_f 0.31 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.79-7.58 (m, 15H, Ar-H, Ph), 7.42 (d, $J_{5,6} = 8.8$ Hz, 1H, H-5), 6.77 (dd, $J_{6,5} = 8.8$ Hz, $J_{6,8} = 2.5$ Hz, 1H, H-6), 6.66 (d, $J_{8,6} = 2.4$ Hz, 1H, H-8), 5.98 (q, $J_{3,H} = 1.1$ Hz, 1H, H-3), 3.90 (t, $J_{H,H} = 6.5$ Hz, 2H, CH₂O), 3.56 (m, 2H, CH₂P), 2.30 (d, $J_{H,3} = 1.1$ Hz, 3H, CH₃), 1.75-1.46 (m, 6H, CH₂), 1.41 – 1.13 (m, 14H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 161.9 (C-7), 161.1 (C-2), 154.9 (C-9), 152.6 (C-4), 134.8-134.7 (d, $J_{C,P} = 2.7$ Hz, Ar-*p*), 133.4-133.3 (d, $J_{C,P} = 9.9$ Hz, Ar-*o*), 130.2-130.2 (d, $J_{C,P} = 12.5$ Hz, Ar-*m*), 125.4 (C-5), 118.5-117.4 (d, $J_{C,P} = 85.8$ Hz, Ar-*ipso*), 113.1 (C-10), 112.2 (C-6), 111.3 (C-3), 101.1 (C-8), 68.3 (CH₂O), 30.3-30.1 (d, $J_{C,P} = 15.6$ Hz, CH₂P), 29.3 (CH₂), 29.1 (CH₂), 28.9 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.6 (CH₂), 25.6 (CH₂), 22.4 (CH₂), 22.3-22.2 (d, $J_{C,P} = 4.0$ Hz, CH₂CH₂P), 22.2 (CH₂), 18.5 (CH₃) ppm. HRESI-MS m/z calc. para C₄₀H₄₆O₃P ([M]⁺): 605.3179, observado: 605.3168.

5.2.9.6 Bromuro de {3-[(4-Metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi]propil}trifenilfosfonio (29g).

Se adicionó **21g** (50 mg, 0.18 mmol, 1 eq.) y Ph₃P (233.2 mg, 0.89 mmol, 5 eq.) obteniéndose **29g** como una espuma de color marrón. Rendimiento: 107.8 mg, rendimiento cuantitativo; $R_f = 0.20$ (20:1 CH₂Cl₂/MeOH). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.81 – 7.53 (m, 15H, Ar-H, Ph), 7.30 (d, $J_{5,6} = 8.9$ Hz, 1H, H-5), 6.75 (dd, $J_{6,5} = 8.8$ Hz, $J_{6,8} = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.57 (d, $J_{8,6} = 2.4$ Hz, 1H, H-8), 5.90 (q, $J_{3,H} = 1.0$ Hz, 1H, H-3), 4.31 (t, $J_{H,H} = 5.7$ Hz, 2H, CH₂O), 3.90 (m, 2H, CH₂P), 2.21 (d, $J_{H,3} = 0.8$ Hz, 3H, CH₃), 2.11 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 160.9 (C-7), 160.7 (C-2), 154.3 (C-9), 152.4 (C-4), 134.8-134.7 (d, $J_{C,P} = 2.5$ Hz, Ar-*p*), 133.3-133.1 (d, $J_{C,P} = 10.0$ Hz, Ar-*o*), 130.2-130.0 (d, $J_{C,P} = 12.6$ Hz, Ar-*m*), 125.3 (C-5), 118.0-116.9 (d, $J_{C,P} = 86.4$ Hz, Ar-*ipso*), 113.2 (C-10), 111.8 (C-6), 111.2 (C-3), 101.4 (C-8), 67.0-66.8 (d, $J_{C,P} = 17.6$ Hz, CH₂O), 22.2 (CH₂), 19.5-18.8 (d, $J_{C,P} =$

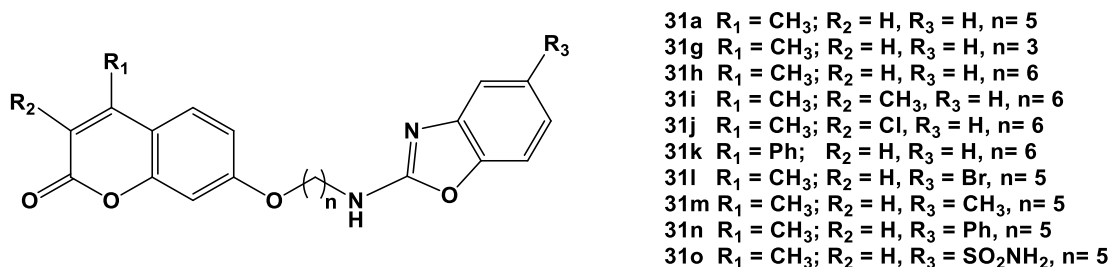
53.3 Hz, CH₂P), 18.3 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₃₁H₂₈O₃P ([M]⁺): 479.1771, observado: 479.1764.

5.2.10. Procedimiento general para la preparación los isotiocyanatos (30a,h,j,k).



A una solución de las correspondiente aminas **23a,h,j,k** (1 eq.) en una mezcla 1:1 de CH₂Cl₂/H₂O (20 ml) se adicionó CaCO₃ (3 eq.) y esta mezcla se colocó en agitación a t.a.; posteriormente se adiciona tiofosgeno (1.5 eq.) y se dejó agitar durante 30 min. Una vez terminada la reacción, se filtró con Celita® para eliminar el CaCO₃ y el filtrado se extrajo con CH₂Cl₂ (3x30 ml), la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H₂O (3x20 ml), se secó con Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad para dar **30a,h,j,k**, que se emplearon directamente, sin ninguna purificación adicional.

5.2.11. Procedimientos generales para la preparación de los benzoxazoles (31a,g-o).



A una solución de los correspondiente isotiocyanatos **30a,h,j,k** (1 eq.) en THF (5 ml) se adicionó el correspondiente 2-aminofenol (1 eq.) y se reflujo durante 17-40 h. Una vez terminada la reacción se enfrió, se adiciono H₂O₂ al 30% (2 eq.) y TBAI al 1 mol%, y la solución resultante se mantuvo con agitación a t.a. durante 1-2 h. Transcurrido ese tiempo se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (7:3 Ciclohex/AcOEt) dando los derivados **31a,h,j-n**.

Los derivados **31l,o** se sintetizaron utilizando un tubo tipo Fisher-Porter donde se adicionó el isotiocyanato **30a** (1 eq.), el correspondiente 2-aminofenol (1 eq.) y se disolvió en THF (5 ml); esta

mezcla se calentó a 110 °C durante 32-41 h. Una vez terminada la reacción se enfrió y se colocó en agitación a t.a, se adiciono H₂O₂ al 30% (2 eq.) y TBAI al 1 mol%, donde se agito durante 2 h, transcurrido ese tiempo se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (7:3 Ciclohex/AcOEt) dando los derivados **31i,o**.

En el caso de las aminas **23g,i** estas se disolvieron en CH₂Cl₂ (5 ml), se añadió TCDI (1.5 eq) y DMAP (1 eq.); esta mezcla se colocó en una atmósfera de Ar a t.a durante 2 h y 15 min.¹¹² Una vez terminada la reacción se evapora el disolvente y se redisuelve en THF (5 ml), se añade el 2-aminofenol (1 eq.) y se coloca a reflujo durante 17-40 h. La mezcla se deja enfriar y se adiciona TBAI al 1mol%, H₂O₂ al 30% (2 eq.) y se deja agitar a t.a por 1-2 h. Transcurrido ese tiempo se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (7:3 Ciclohex/AcOEt) dando los derivados **31g,i**.

5.2.11.1 7-[[5-(Benzo[d]oxazol-2-ilamino)pentil]oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona (**31a**).

Se adicionó **30a** (126.6 mg, 0.42 mmol, 1 eq.), 2-aminofenol (45.5 mg, 0.42 mmol, 1 eq.), H₂O₂ al 30% (85 µl, 0.83 mmol, 2 eq.) y TBAI (2.6 mol%, 4 mg) obteniéndose **31a** como una espuma de color rojiza. Rendimiento: 107 mg, 68% en dos etapas; *R_f* 0.33 (Ciclohex/AcOEt 1:1). Espuma color rojizo. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.46 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.8 Hz, H-5), 7.36 (m, 1H, Ar-H), 7.23 (m, 1H, Ar-H), 7.15 (td, 1H, *J*_{H,H} = 7.7 Hz, *J*_{H,H} = 1.1 Hz, Ar-H), 7.02 (td, 1H, *J*_{H,H} = 7.8 Hz, *J*_{H,H} = 1.2 Hz, Ar-H), 6.83 (dd, *J*_{6,5} = 8.8 Hz, *J*_{6,8} = 2.5 Hz, 1H, H-6), 6.79 (d, 1H, *J*_{8,6} = 2.5 Hz, H-8), 6.13 (q, 1H, *J*_{3,H} = 1.2 Hz, H-3), 5.05 (s, 1H, NH), 4.02 (t, 2H, *J*_{H,H} = 6.3 Hz, CH₂O), 3.53 (q, 2H, *J*_{H,H} = *J*_{H,NH} = 6.8 Hz, H-CH₂N), 2.39 (d, 3H, *J*_{H,3} = 1.2 Hz, CH₃), 1.88 (m, 2H, CH₂), 1.78 (m, 2H, CH₂), 1.62 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ= 162.0 (C-7), 162.0 (C-2), 161.5 (C=N), 155.4 (C-9), 152.7 (C-4), 148.7 (Ar-C), 1423.1 (Ar-C), 125.6 (C-5), 123.9 (Ar-C), 120.8 (Ar-C), 116.4 (Ar-C), 113.7 (C-10), 112.8 (C-6), 112.0 (C-3), 108.8 (Ar-C), 101.5 (C-8), 68.3 (CH₂O), 43.2 (CH₂N), 29.6 (CH₂CH₂O), 28.8 (CH₂CH₂N), 23.4 (CH₂), 18.8 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₂H₂₃N₂O₄ ([M+H]⁺): 379.1652, observado: 379.1646.

5.2.11.2 7-[[3-(benzo[d]oxazol-2-ilamino)propil]oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona (**31g**).

Se adicionó **23g** (74.2 mg, 0.32 mmol, 1 eq.), TCDI (85.03 mg, 0.48 mmol, 1.5 eq.), DMAP (38.85 mg, 0.32 mmol, 1 eq.), 2-aminofenol (34.71 mg, 0.32 mmol, 1 eq.), H₂O₂ al 30% (65 µl, 0.64 mmol, 2

eq.) y TBAI (2.6 mol%, 3 mg) obteniéndose **31g** como una espuma de color marrón. Rendimiento: 51 mg, 45% de dos etapas; R_f 0.33 (Ciclohex/AcOEt 1:1). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.42 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.8$ Hz, H-5), 7.32 (d, 1H, $J_{H,H} = 7.7$ Hz, Ar-H), 7.21 (d, 1H, $J_{H,H} = 7.7$ Hz, Ar-H), 7.12 (td, 1H, $J_{H,H} = 7.6$ Hz, $J_{H,H} = 0.9$ Hz, Ar-H), 7.00 (td, 1H, $J_{H,H} = 7.9$ Hz, $J_{H,H} = 1.1$ Hz, Ar-H), 6.82 (dd, $J_{6,5} = 8.8$ Hz, $J_{6,8} = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.75 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.3$ Hz, H-8), 6.10 (q, 1H, $J_{3,H} = 0.9$ Hz, H-3), 5.95 (s, 1H, NH), 4.14 (t, 2H, $J_{H,H} = 5.7$ Hz, CH_2O), 3.72 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.4$ Hz, CH_2N), 2.35 (d, 3H, $J_{H,3} = 0.9$ Hz, CH_3), 2.22 (m, 2H, CH_2) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 162.2 (C-7), 161.8 (C-2), 161.4 (C=N), 155.2 (C-9), 152.7 (C-4), 148.6 (Ar-C), 142.9 (Ar-C), 125.6 (C-5), 124.0 (Ar-C), 121.8 (Ar-C), 116.3 (Ar-C), 113.8 (C-10), 112.5 (C-6), 112.1 (C-3), 108.8 (Ar-C), 101.5 (C-8), 66.2 (CH_2O), 40.4 (CH_2N), 29.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 18.7 (CH_3) ppm. HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 351.1339, observado: 351.1336.

5.2.11.3 7-[[6-(benzo[d]oxazol-2-ilamino)hexil]oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona (31h).

Se adicionó **30h** (106.3 mg, 0.34 mmol, 1 eq.), 2-aminofenol (36.5 mg, 0.34 mmol, 1 eq.), H_2O_2 al 30% (68 μl , 0.67 mmol, 2 eq.) y TBAI (2.6 mol%, 3 mg) obteniéndose **31h** como una espuma de color rojizo. Rendimiento: 65.7 mg, 49% de dos etapas; R_f 0.40 (Ciclohex/AcOEt 1:1). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.47 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.7$ Hz, H-5), 7.36 (d, 1H, $J_{H,H} = 6.1$ Hz, Ar-H), 7.26 (m, 1H, Ar-H), 7.17 (t, 1H, $J_{H,H} = 7.6$ Hz, Ar-H), 7.03 (t, 1H, $J_{H,H} = 7.7$ Hz, Ar-H), 6.83 (dd, $J_{6,5} = 8.7$ Hz, $J_{6,8} = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.79 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.3$ Hz, H-8), 6.13 (q, 1H, $J_{3,H} = 1.0$ Hz, H-3), 5.27 (s, 1H, NH), 4.01 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.3$ Hz, CH_2O), 3.52 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.6$ Hz, CH_2N), 2.39 (d, 3H, $J_{H,3} = 1.0$ Hz, CH_3), 1.83 (quint, 2H, $J_{H,H} = 6.6$ Hz, CH_2), 1.74 (quint, $J_{H,H} = 7.1$ Hz, CH_2), 1.52 (m, 4H, 2CH_2) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 162.3 (C-7, C-2), 161.5 (C=N), 155.5 (C-9), 152.8 (C-4), 125.6 (Ar-C, Ar-C, C-5), 124.2 (Ar-C), 121.2 (Ar-C), 116.4 (Ar-C), 113.6 (C-10), 112.8 (C-6), 112.0 (C-3), 109.0 (Ar-C), 101.5 (C-8), 68.5 (CH_2O), 43.3 (CH_2N), 29.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 29. ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 26.6 (CH_2), 25.8 (CH_2), 18.8 (CH_3) ppm. HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 393.1809, observado: 393.1804.

5.2.11.4 7-[[6-(benzo[d]oxazol-2-ilamino)hexil]oxi]-3,4-dimetil-2H-cromen-2-ona (31i).

Se adicionó **23i** (168.7 mg, 0.58 mmol, 1 eq.), TCDI (136.1 mg, 0.76 mmol, 1.3 eq.), DMAP (70.8 mg, 0.81 mmol, 1 eq.), 2-aminofenol (63.2 mg, 0.51 mmol, 1 eq.), H_2O_2 al 30% (118 μl , 1.16 mmol, 2 eq.) y TBAI (1.4 mol%, 3 mg) obteniéndose **31i** como una espuma de color rojizo. Rendimiento: 80.5 mg, 40% de dos etapas; R_f 0.40 (Ciclohex/AcOEt 1:1). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.46 (d, 1H, $J_{5,6} =$

8.8 Hz, H-5), 7.35 (d, 1H, $J_{H,H} = 7.6$ Hz, Ar-H), 7.25 (d, 1H, $J_{H,H} = 8.2$ Hz, Ar-H), 7.16 (t, 1H, $J_{H,H} = 7.5$ Hz, Ar-H), 7.02 (t, 1H, $J_{H,H} = 7.5$ Hz, Ar-H), 6.83 (dd, 1H, $J_{6,5} = 8.8$ Hz, $J_{6,8} = 2.5$ Hz, H-6), 6.77 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.5$ Hz, H-8), 5.23 (s, 1H, NH), 4.00 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.4$ Hz, CH₂O), 3.51 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.6$ Hz, CH₂N), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.18 (s, 3H, CH₃), 1.82 (m, 2H, CH₂), 1.73 (m, 2H, CH₂), 1.53 (m, 4H, 2CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 162.6 (C-7, C-2), 161.1 (C=N), 153.7 (C-9), 146.5 (C-4), 125.3 (Ar-C, Ar-C, C-5), 124.1 (Ar-C), 121.1 (Ar-C), 119.0 (C-10), 116.4 (Ar-C), 114.2 (C-3), 112.6 (C-6), 108.9 (Ar-C), 101.2 (C-8), 68.4 (CH₂O), 43.2 (CH₂N), 29.8 (CH₂CH₂O), 29.1 (CH₂CH₂N), 26.6 (CH₂), 25.8 (CH₂), 15.2 (CH₃), 13.3 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₄H₂₇N₂O₄ ([M+H]⁺): 407.1965, observado: 407.1958.

5.2.11.5 7-[[6-(benzo[d]oxazol-2-ilamino)hexil]oxi]-3-cloro-4-metil-2H-cromen-2-ona (31j).

Se adicionó **30j** (149.4 mg, 0.43 mmol, 1 eq.), 2-aminofenol (46.4 mg, 0.43 mmol, 1 eq.), H₂O₂ al 30% (88 µl, 0.85 mmol, 2 eq.) y TBAI (1.9 mol%, 3 mg) obteniéndose **31j** como una espuma de color rojizo. Rendimiento: 45.1 mg, 26%, de dos etapas; *R_f* 0.41 (Ciclohex/AcOEt 1:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.49 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.9$ Hz, H-5), 7.36 (d, 1H, $J_{H,H} = 7.9$ Hz, Ar-H), 7.23 (d, 1H, $J_{H,H} = 7.7$ Hz, Ar-H), 7.16 (td, 1H, $J_{H,H} = 7.8$ Hz, $J_{H,H} = 1.1$ Hz, Ar-H), 7.03 (td, 1H, $J_{H,H} = 7.8$ Hz, $J_{H,H} = 1.2$ Hz, Ar-H), 6.87 (dd, $J_{6,5} = 8.9$ Hz, $J_{6,8} = 2.5$ Hz, 1H, H-6), 6.80 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.5$ Hz, H-8), 4.97 (s, 1H, NH), 4.02 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.3$ Hz, CH₂O), 3.51 (t, 2H, $J_{H,H} = J_{H,NH} = 6.8$ Hz, CH₂N), 2.54 (s, 3H, CH₃), 1.84 (m, 2H, CH₂), 1.74 (m, 2H, CH₂), 1.54 (m, 4H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 162.2 (C-7, C-2), 157.6 (C=N), 153.3 (C-9), 148.6 (C-4), 148.1 (Ar-C), 143.1 (Ar-C), 126.0 (C-5), 124.0 (Ar-C), 121.0 (Ar-C), 117.8 (Ar-C), 116.5 (C-3), 113.5 (C-6), 113.3 (C-10), 108.8 (Ar-C), 101.4 (C-8), 68.6 (CH₂O), 43.2 (CH₂N), 29.0 (CH₂CH₂O), 29.0 (CH₂CH₂N), 26.6 (CH₂), 25.8 (CH₂), 16.3 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₃H₂₄ClN₂O₄ ([M+H]⁺): 427.1419, observado: 427.1412.

4.2.11.6 7-[[6-(benzo[d]oxazol-2-ilamino)hexil]oxi]-3-metil-4-fenil-2H-cromen-2-ona (31k).

Se adicionó **30k** (147.5 mg, 0.39 mmol, 1 eq.), 2-aminofenol (42.4 mg, 0.39 mmol, 1 eq.), H₂O₂ al 30% (80 µl, 0.78 mmol, 2 eq.) y TBAI (2 mol%, 3 mg) obteniéndose **31k** como una espuma de color rojizo. Rendimiento: 52.8 mg, 30%, de dos etapas; *R_f* 0.41 (Ciclohex/AcOEt 1:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.53-7.49 (m, 3H, Ph), 7.45-7.42 (m, 2H, Ph), 7.36 (d, 2H, $J_{5,6} = 8.9$ Hz, H-5, Ar-H), 7.23 (dd, 1H, $J_{H,H} = 8.2$ Hz, $J_{H,H} = 0.9$ Hz, Ar-H), 7.16 (td, 1H, $J_{H,H} = 7.8$ Hz, $J_{H,H} = 1.0$ Hz, Ar-H), (td, 1H,

$J_{H,H} = 8.0$ Hz, $J_{H,H} = 1.0$ Hz, Ar-H), 6.87 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.3$ Hz, H-8), 6.77 (dd, $J_{6,5} = 8.9$ Hz, $J_{6,8} = 2.3$ Hz, 1H, H-6), 6.21 (s, 1H, H-3), 5.00 (s, 1H, NH), 4.03 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.4$ Hz, CH₂O), 3.51 (q, 2H, $J_{H,H} = J_{H,NH} = 6.9$ Hz, CH₂N), 1.84 (m, 2H, CH₂), 1.74 (m, 2H, CH₂), 1.53 (m, 4H, 2CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 162.4 (C-7), 162.1 (C-2), 161.4 (C=N), 156.2 (C-9), 156.0 (C-4), 148.6 (Ar-C), 143.1 (Ar-C), 135.8 (Ph), 129.7 (Ph), 129.0 (Ph), 128.5 (C-Ph), 128.1 (C-5), 124.0 (Ar-C), 121.0 (Ar-C), 116.5 (Ar-C), 112.8 (C-6), 112.6 (C-10), 111.9 (C-3), 108.8 (Ar-C), 101.7 (C-8), 68.5 (CH₂O), 43.2 (CH₂N), 29.8 (CH₂CH₂O), 29.0 (CH₂CH₂N), 26.6 (CH₂), 2587 (CH₂) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₈H₂₇N₂O₄ ([M+H]⁺): 455.1965, observado: 455.1959.

5.2.11.7 7-[[5-((5-bromobenzo[d]oxazol-2-il)amino)pentil]oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona (31l).

Se adicionó **30a** (104 mg, 0.34 mmol, 1 eq.), 2-aminofenol (64.4 mg, 0.59 mmol, 1.7 eq.), H₂O₂ al 30% (70 µl, 0.69 mmol, 2 eq.) y TBAI (3 mol%, 4 mg) obteniéndose **31l** como una espuma de color rojizo. Rendimiento 52.2 mg, 34%, de dos etapas; *R_f* 0.60 (Ciclohex/AcOEt 1:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.46 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.8$ Hz, H-5), 7.45 (d, 1H, $J_{H,H} = 1.9$ Hz, Ar-H), 7.12 (dd, 1H, $J_{H,H} = 8.4$ Hz, Ar-H), 7.08 (d, 1H, Ar-H), 6.82 (dd, 1H, $J_{6,5} = 8.8$ Hz, $J_{6,8} = 2.5$ Hz, 1H, H-6), 6.77 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.5$ Hz, H-8), 6.12 (q, 1H, $J_{3,H} = 1.2$ Hz, H-3), 5.29 (s, 1H, NH), 4.02 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.3$ Hz, CH₂O), 3.52 (q, 2H, $J_{H,H} = J_{H,NH} = 6.7$ Hz, CH₂N), 2.39 (d, 3H, $J_{H,3} = 1.2$ Hz, CH₃), 1.88 (m, 2H, CH₂), 1.77 (m, 2H, CH₂), 1.61 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 162.9 (C-7), 162.2 (C-2), 161.5 (C=N), 155.4 (C-9), 152.7 (C-4), 147.7 (Ar-C), 144.9 (Ar-C), 125.6 (C-5), 123.6 (Ar-C), 119.5 (Ar-C), 116.7 (Ar-C), 113.7 (C-10), 112.7 (C-6), 112.0 (C-3), 109.9 (Ar-C), 101.5 (C-8), 68.3 (CH₂O), 43.2 (CH₂N), 29.5 (CH₂CH₂O), 28.7 (CH₂CH₂N), 23.4 (CH₂), 18.8 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₂H₂₂BrN₂O₄ ([M+H]⁺): 457.0757, observaoa: 457.0753.

5.2.11.8 7-[[5-((5-metilbenzo[d]oxazol-2-il)amino)pentil]oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona (31m).

Se adicionó **30a** (104 mg, 0.34 mmol, 1 eq.), 2-aminofenol (37.1 mg, 0.39 mmol, 1 eq.), H₂O₂ al 30% (70 µl, 0.69 mmol, 2 eq.) y TBAI (3 mol%, 4 mg) obteniéndose **31m** como una espuma de color rojizo. Rendimiento: 57 mg, 43%, en dos etapas; *R_f* 0.36 (Ciclohex/AcOEt 1:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.46 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.8$ Hz, H-5), 7.14 (s, 1H, Ar-H), 7.09 (d, 1H, $J_{H,H} = 7.8$ Hz, Ar-H), 6.82 (dd, 2H, $J_{6,5} = 8.8$ Hz, $J_{6,8} = 2.5$ Hz, 2H, H-6, Ar-H), 6.77 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.5$ Hz, H-8), 6.12 (s, 1H, H-3), 5.27 (s, 1H, NH), 4.01 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.3$ Hz, CH₂O), 3.51 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.7$ Hz, CH₂N), 2.38 (s, 6H,

CH₃), 1.87 (quint, 2H, $J_{H,H}$ = 6.7 Hz, CH₂), (quint, 2H, $J_{H,H}$ = 7.2 Hz, CH₂), 1.60 (quint, 2H, $J_{H,H}$ = 6.7 Hz, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 162.4 (C-7), 162.2 (C-2), 161.5 (C=N), 155.4 (C-9), 152.7 (C-4), 146.7 (Ar-C), 143.2 (Ar-C), 133.7 (Ar-C), 125.6 (C-5), 121.5 (Ar-C), 116.8 (Ar-C), 113.6 (C-10), 112.7 (C-6), 112.0 (C-3), 108.2 (Ar-C), 101.4 (C-8), 68.4 (CH₂O), 43.1 (CH₂N), 29.6 (CH₂CH₂O), 28.8 (CH₂CH₂N), 23.4 (CH₂), 21.6 (CH₃) 18.8 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₃H₂₅N₂O₄ ([M+H]⁺): 393.1809, observado: 393.1805.

5.2.11.9 7-[[5-((5-fenilbenzo[d]oxazol-2-il)amino)pentil]oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona (31n).

Se adicionó **30a** (97 mg, 0.32 mmol, 1 eq.), 2-aminofenol (59.2 mg, 0.54 mmol, 1.7 eq.), H₂O₂ al 30% (65 µl, 0.64 mmol, 2 eq.) y TBAI (3.4 mol%, 4 mg) obteniéndose **31n** como una espuma de color verde. Rendimiento: 71.9 mg, 49%, en dos etapas; *R_f* 0.40 (Ciclohex/AcOEt 1:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃/MeOD, 0.3:0.3) δ: 7.57 (m, 3H, Ph), 7.47 (d, 1H, $J_{5,6}$ = 8.8 Hz, H-5), 7.42 (m, 2H, Ph), 7.33 (tt, 1H, $J_{H,H}$ = 7.4 Hz, $J_{H,H}$ = 1.2 Hz, Ar-H), 7.27 (dd, 1H, $J_{H,H}$ = 8.4 Hz, $J_{H,H}$ = 0.5 Hz, Ar-H), 7.24 (dd, 1H, $J_{H,H}$ = 1.8 Hz, Ar-H), 6.84 (dd, 1H, $J_{6,5}$ = 8.8 Hz, $J_{6,8}$ = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.80 (d, 1H, $J_{8,6}$ = 2.54 Hz, H-8), 6.12 (q, 1H, $J_{3,H}$ = 1.2 Hz, H-3), 4.03 (t, 2H, $J_{H,H}$ = 6.3 Hz, CH₂O), 3.53 (t, 2H, $J_{H,H}$ = 7.0 Hz, CH₂N), 2.38 (d, 3H, $J_{H,3}$ = 1.2 Hz, CH₃), 1.89 (quint, 2H, $J_{H,H}$ = 6.7 Hz, CH₂), 1.79 (quint, 2H, $J_{H,H}$ = 6.7 Hz, CH₂), 1.63 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃/MeOD, 0.3:0.3) δ: 162.6 (C-7), 162.2 (C-2), 161.7 (C=N), 155.4 (C-9), 152.9 (C-4), 148.2 (Ar-C), 143.5 (Ar-C), 141.7 (Ph), 137.9 (Ph), 128.8 (Ph), 127.4 (Ph), 127.0 (Ar-C), 125.6 (C-5), 120.4 (Ar-C), 115.0 (Ar-C), 113.6 (C-10), 112.8 (C-6), 111.9 (C-3), 108.8 (Ar-C), 101.5 (C-8), 68.3 (CH₂O), 43.0 (CH₂N), 29.8 (CH₂CH₂O), 28.7 (CH₂CH₂N), 23.4 (CH₂), 18.8 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₈H₂₇N₂O₄ ([M+H]⁺): 455.1965, observado: 455.1957.

5.2.11.10 7-[[5-((5-sulfonamidobenzo[d]oxazol-2-il)amino)pentil]oxi]-4-metil-2H-cromen-2-ona (31o).

Se adicionó **30a** (100 mg, 0.33 mmol, 1 eq.), 2-aminofenol (62.0 mg, 0.57 mmol, 1.7 eq.), H₂O₂ al 30% (67 µl, 0.66 mmol, 2 eq.) y TBAI (3.3 mol%, 4 mg) obteniéndose **31o** como una espuma de color rojizo. Rendimiento: 43.9 mg, 30%, en dos etapas; *R_f* 0.40 (Ciclohex/AcOEt 1:1). ¹H-RMN (300 MHz, MeOD/CDCl₃, 0.5:0.1) δ: 7.76 (d, 1H, $J_{H,H}$ = 1.9 Hz, Ar-H), 7.59 (dd, 1H, $J_{H,h}$ = 8.3 Hz, Ar-H), 7.57 (d, 1H, $J_{5,6}$ = 8.9 Hz, H-5), 7.30 (d, 1H, Ar-H), 6.88 (dd, 1H, $J_{6,5}$ = 8.8 Hz, $J_{6,8}$ = 2.5 Hz, 1H, H-6),

6.81 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.5$ Hz, H-8), 6.12 (q, 1H, $J_{3,H} = 1.2$ Hz, H-3), 4.07 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.3$ Hz, CH₂O), 3.44 (t, 2H, $J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH₂N), 2.42 (d, 3H, $J_{H,3} = 1.2$ Hz, CH₃), 1.88 (quint, 2H, $J_{H,H} = 6.4$ Hz, CH₂), 1.76 (quint, 2H, $J_{H,H} = 7.2$ Hz, CH₂), 1.62 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, MeOD/CDCl₃, 0.5:0.1) δ: 164.8 (C-7), 163.4 (C-2), 163.3 (C=N), 155.8 (C-9), 155.1 (C-4), 151.3 (Ar-C), 144.0 (Ar-C), 140.0 (Ar-C), 126.6 (C-5), 120.0 (Ar-C), 114.3 (Ar-C), 114.0 (C-10), 113.6 (C-6), 111.7 (C-3), 109.2 (Ar-C), 102.0 (C-8), 69.0 (CH₂O), 43.3 (CH₂N), 29.6 (CH₂CH₂O), 29.3 (CH₂CH₂N), 23.8 (CH₂), 18.8 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₂H₂₄N₃O₆S ([M+H]⁺): 458.1380, observado: 458.1371.

Capítulo 2.6: Conclusiones

- ❖ Se logró la obtención de una nueva familia de guanidinas derivadas de cumarinas (**20a-f**) mediante el empleo de tioureas (**24a-f**) intermedias como agentes de guanilación con rendimientos de 83% a cuantitativos, utilizando condiciones ya reportadas dentro del grupo de investigación (HgO, BnNH₂ en DFM a t.a por 14-66 h).
- ❖ Durante la optimización de la metodología para la obtención de las tioureas **24a-f**, se obtuvo accidentalmente un derivado de urea **26** por la desulfuración inesperada de la tiourea durante el calentamiento en el transcurso de la reacción.
- ❖ Se aisló otra urea **27** con las condiciones reportadas por Vinod K. y colaboradores (TBAI, H₂O₂, *p*-toluidina en THF a t.a por 2 h) en la búsqueda de las condiciones adecuadas para la síntesis de la familia de guanidinas con un rendimiento de 55%.
- ❖ Se obtuvo una nueva familia de sales de fosfonio derivadas de cumarinas funcionalizadas en C-7 (**29a-e,g**) con rendimientos de 57% a cuantitativos, modificándose el tamaño de la cadena del espaciador y los sustituyentes en las posiciones C-3 y/o C-4 del núcleo de cumarina. El paso clave fue el desplazamiento nucleofílico de un átomo de bromo terminar del espaciador con Ph₃P. Es importante destacar que el espaciador de 2 carbonos no pudo ser empleado, ya que se observó su eliminación en la etapa del tratamiento con Ph₃P.
- ❖ La nueva familia de benzoxazoles derivados de cumarina (**31a,g-o**) se lograron sintetizar con rendimientos de 30 a 68%, con dos variaciones de condiciones: por los isotiocianatos **30a,h,j,k** y 2-aminofenol en THF calentando por 17-40 h o las aminas **23g,i**, TCDI y DMAP a t.a durante 2 h, para evaporar el disolvente añadir 2-aminofenol y se redissuelve en THF a reflujo durante 17-40 h; estas dos etapas seguidas de H₂O₂ al 30% y TBAI al 1 mol% a t.a. por 1-2 h. En algunos de los casos fue necesario llevar a cabo la formación de la tiourea por calentamiento en un tubo Fisher-Porter

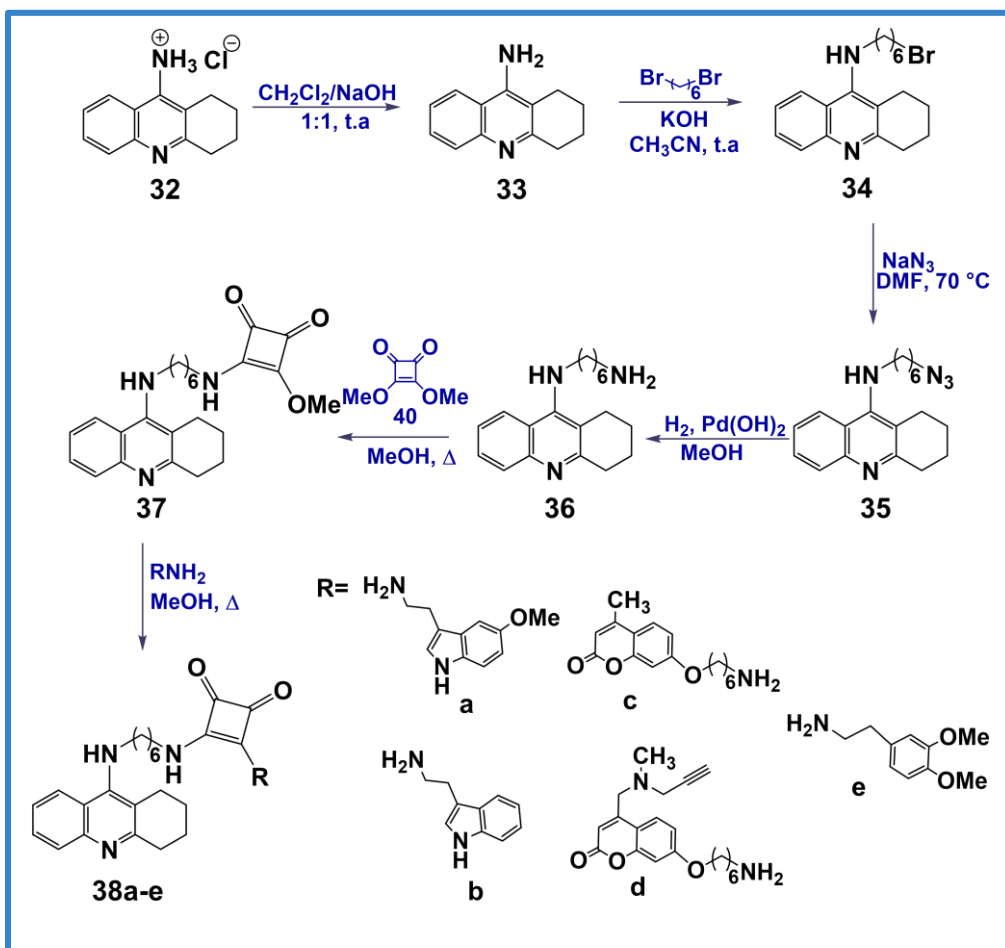
- ❖ No se lograron aislar dos biclos de benzoxazoles (**31p,q**) totalmente puros debido a que al utilizar las condiciones desulfuración se degradaba el 2-aminofenol y fue imposible purificarlos.
- ❖ La caracterización de cada compuesto se llevó a cabo debidamente utilizando técnicas espectroscópicas como RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, HSQC, HMBC, y espectrometría de masas.

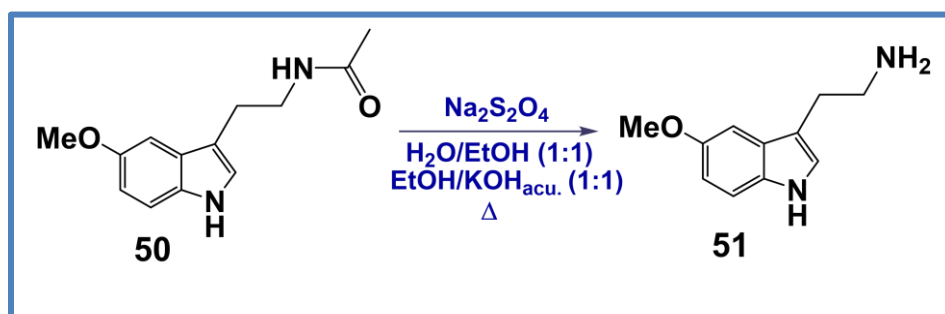
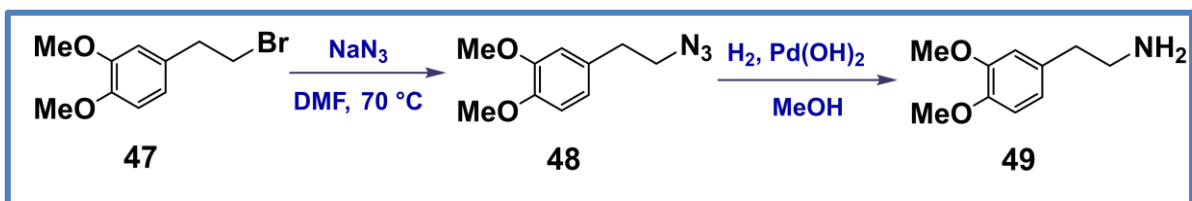
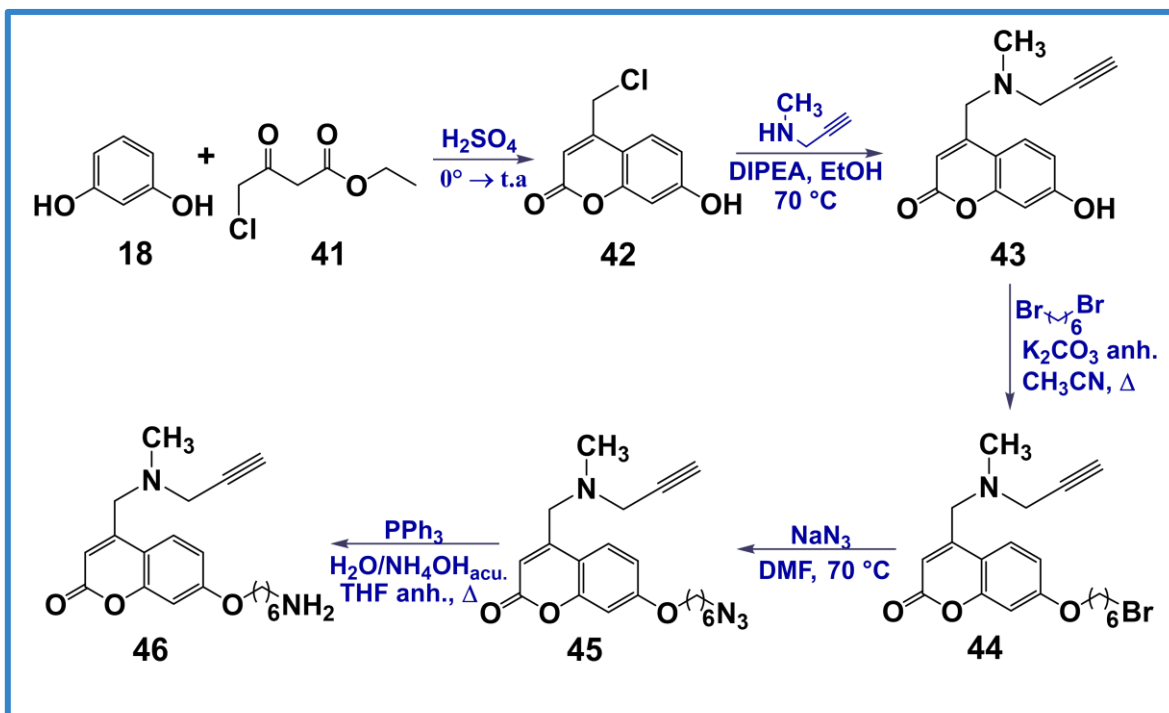


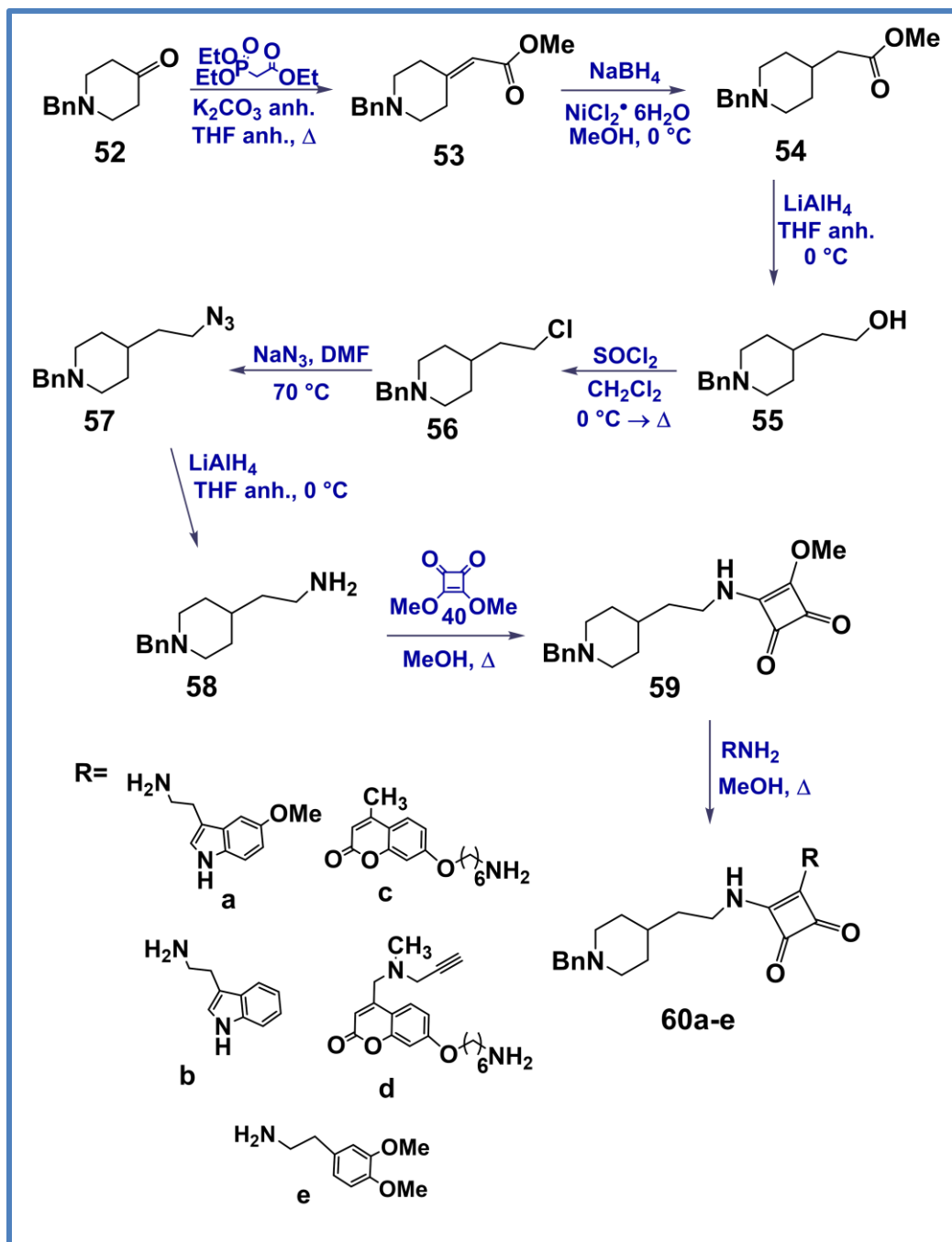
Unidad 3: Síntesis de nuevos derivados de escuaramidas.



Esquemas de síntesis







Capítulo 3.1: Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un problema de salud creciente a nivel mundial; así pues, cabe destacar que si bien en los últimos años las muertes resultantes de accidente cerebrovascular, enfermedad cardíaca y cáncer de próstata disminuyeron significativamente, las muertes por la enfermedad Alzheimer aumentaron en un 71%.¹⁵⁶ La EA es incurable y las personas mayores de edad son las poblaciones más vulnerables; se estima que para 2050 el número de personas mayores de 60 años incrementara a 1.250 millones, lo que representa el 22% de la población mundial, con un 79% viviendo en las regiones menos desarrolladas del mundo (Prince y col. 2013).¹⁵⁷

A medida que aumenta el envejecimiento de la población a nivel mundial, la EA se está convirtiendo en un problema social notable; como causa principal de demencia, la EA provoca una disminución progresiva en función cognitiva y en particular, de la memoria (Leifer 2003).¹⁵⁸ El diagnóstico de EA se basa en el desarrollo de déficits cognitivos múltiples y el deterioro de la memoria (American Psychiatric Association 2000).^{159,160} Se ha demostrado que el aprendizaje y la memoria, que se ve afectada negativamente por el ciclo de sueño-vigilia, tienen fluctuaciones en un día (Schmidt et al. 2007; Gerstner y Yin 2010).¹⁶¹

Actualmente, no hay cura para la EA en la cual el nivel del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en el cerebro ha sido disminuido; la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), y/o butirilcolinesterasa (BuChE), las enzimas que catalizan la hidrólisis de la acetilcolina, sigue siendo el enfoque terapéutico más efectivo para el tratamiento de EA (hipótesis colinérgica). La acetilcolinesterasa (AChE) es una hidrolasa involucrada en la terminación de la transmisión de impulsos en las sinapsis colinérgicas por hidrólisis rápida del neurotransmisor ACh en el centro y periférico del sistema nervioso.¹⁶² Los inhibidores de AChE (AChEI) inhiben la hidrólisis de ACh mejorando tanto el nivel como la duración del neurotransmisor. Otra colinesterasa, butirilcolinesterasa (BuChE), principalmente localizada en plasma, hígado y tejidos musculares, capaz llevar a cabo la hidrólisis de ACh y otras acilcolinas difiere de AChE en la distribución de

¹⁵⁶ Xuepei L.; Junwen G.; Tong S.; Jingguo Y.; Hang Y.; Junjie Y.; Zhengrong W.; *Metab. Brain. Dis.* **2020** 35, 463-471.

¹⁵⁷ Prince M.; Bryce R.; Albanese E.; *Alzheimers Dement* **2013** 9, 63-75.

¹⁵⁸ Leifer B.P.; *J. Am. Geriatr. Soc.* **2003** 51, S281-S288.

¹⁵⁹ American Psychiatric Association (2000) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Ed., Text Revision. American Psychiatric Association, Washington, DC.

¹⁶⁰ Reppert S.M.; Weaver D.R.; *Nature* **2002** 418, 935-941.

¹⁶¹ a) Schmidt C.; Collette F.; Cajochen C.; *Cogn Neuropsychol* **2007**, 27, 755-789. b) Gerstner J.R.; Yin J.C.; *Nat. Rev. Neurosci.* **2010** 11, 8, 577-588.

¹⁶² Sonmez F.; Kurt B. Z.; Gazioglu I.; Basile L.; Dag A.; Cappello V.; Ginex T.; Kucukislamoglu M.; Guccione S.; *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **2017** 32, 1, 285-297.

tejidos y la sensibilidad a sustratos e inhibidores. Los inhibidores de la AChE, como la galantamina, la rivastigmina y el donepecilo, son los principales medicamentos de suspensión para el tratamiento clínico de la EA en el período temprano a moderado, por lo que la búsqueda de nuevos derivados que puedan mostrar actividad biológica sobre esta enfermedad es un objetivo primordial en la industria farmacéutica.¹⁶²

Tomando en cuenta lo anterior el presente trabajo de investigación está orientado a la búsqueda de nuevos derivados de escuaramidas que puedan tener actividad anti-Alzheimer.

Capítulo 3.2: Antecedentes

2.1 Alzheimer

La demencia es un término general que puede caracterizarse como una pérdida de la función cerebral que ocurre con o debido a ciertas enfermedades. Por lo general, el primer síntoma aparece como olvido. Los síntomas posteriores incluyen dificultad en áreas de la función mental como el lenguaje, disfunción de la memoria, percepción, comportamiento emocional o personalidad y habilidades cognitivas.¹⁶³ Una de las causas de demencia más estudiadas es la enfermedad de Alzheimer (EA). La EA es un trastorno neurodegenerativo multifacético caracterizado por agregación y plegamiento incorrecto de proteínas, estrés oxidativo, anomalías mitocondriales y procesos neuroinflamatorios a nivel molecular.¹⁶⁴

La EA lleva el nombre de un médico alemán, Alois Alzheimer, quien la describió por primera vez a principios el 4 de noviembre de 1906 en Tubinga. En 1901, Alois Alzheimer, médico del manicomio estatal de Frankfurt, estudió a una paciente Auguste D., mujer de 51 años con síntomas de deficiencias cognitivas y de lenguaje, alucinaciones auditivas, delirios, paranoia y comportamiento agresivo. Después de la muerte de la paciente en 1906, Alois Alzheimer, trabajando con Emil Kraepelin, realizó la autopsia del cerebro y comprobó que presentaba cambios arterioescleróticos, placas seniles y ovillos neurofibrilares, publicando dichas observaciones en 1907.¹⁶³ En 1910, Kraepelin acuñó el término "enfermedad de Alzheimer", un término que todavía se usa para referirse a la causa más común de demencia senil. En 1959, se aceptó ampliamente que la EA era exclusivamente un trastorno presenil raro. En 1963, Terry estudió el patrón histológico de los ovillos y la placa β -amiloide.^{165,166} Las placas se interpretaron como: núcleo fibrilar amiloide, rodeado por axones distróficos amielínicos y dendritas que contienen filamentos, cuerpos densos y filamentos helicoidales emparejados (PHF). En 1976, el Dr. Robert Katzman revisó la frecuencia y la mortalidad de la EA, y destacó la necesidad de una investigación centrada en esta área que hasta la fecha se sigue estudiando.¹⁶⁷

La detección de la EA se basa en hallazgos clínicos incluyendo pérdida de memoria, deterioro del lenguaje y una disminución en el reconocimiento de objetos, personas y lugares

¹⁶³ Singh M.; Kaur M.; Kukreja H.; Chugh R.; Silakari O.; Singh D.; *Eur. J. Med. Chem.* **2013** 70, 165-188.

¹⁶⁴ van Greunen D. G.; Cordier W.; Nell M.; van der Westhuyzen C.; Steenkamp V.; Panayides J.-L.; Riley D. L.; *Eur. J. Med. Chem.* **2017** 127, 671-690.

¹⁶⁵ Wisniewski H.M.; Narang H.K.; Terry R.D.; *J. Neurol. Sci.* **1976** 27, 173-181.

¹⁶⁶ Terry R.D.; *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1963** 22, 629-642.

¹⁶⁷ Katzman R.; *Arch. Neurol.* **1976** 33, 299-308.

familiares. Actualmente, la tecnología no permite el diagnóstico de esta enfermedad basándose únicamente en pruebas de laboratorio o neuroimagen.¹⁶⁸ Aunque la EA es la enfermedad neurodegenerativa crónica más común, la etiología del trastorno sigue siendo poco conocida. Se han identificado varias características de la patología de la enfermedad. Por lo tanto, actualmente se teoriza que una combinación de factores puede ser responsable de la progresión de la enfermedad, pero se desconoce la causa inicial exacta y puede ser de origen variado.¹⁶⁹ También se han identificado en los últimos años factores que influyen en el riesgo de desarrollar la enfermedad, incluidos factores genéticos o de salud y de estilo de vida, como diabetes, cardiopatía, hipertensión, activo mental y físicamente, dieta, envejecimiento, abuso de alcohol y fumar, traumas en la cabeza, contaminación del aire, exposición a metales pesados, síndrome de Down, APP (proteína precursora amiloide), ApoE4 (proteína apolipoproteína E4) y PSEN (presenilina) 1 y 2. Sin embargo, el principal factor de riesgo es la edad, con un aumento en la probabilidad de desarrollar la enfermedad a medida que aumenta la edad.¹⁶⁹

La EA ha sido reconocida por el depósito de dos tipos de proteínas, la proteína amiloide (A) acumulada extracelularmente debido al procesamiento anormal de la proteína precursora amiloide (APP) y los ovillos neurofibrilares intracelulares compuestos por la proteína tau hiperfosforilada. También se han encontrado otras anomalías neuroquímicas que contribuyen a la progresión de la EA, como el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, el desequilibrio de los biometales o la neuroinflamación.¹⁷⁰ Desafortunadamente, hasta la fecha todavía no existe un consenso definitivo sobre la causa de la EA, sin embargo, se han propuesto varias hipótesis. La más significativa de ellas es la hipótesis colinérgica, que postula que el deterioro cognitivo puede estar relacionado con una disminución de la cantidad del neurotransmisor acetilcolina (ACh).¹⁷¹ La hipótesis amiloide relaciona la EA con el depósito de placas de β -amiloide ($A\beta$) en el cerebro. La regulación de los niveles de ACh en el cerebro está mediada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que cataliza la degradación del neurotransmisor ACh. La ACh también es degradada por la enzima butirilcolinestesa (BuChE) en menor grado y a un ritmo más lento. Además, también se ha demostrado que la AChE se une a $A\beta$ y desempeña un papel en la formación de placas de $A\beta$, que más adelante se explican con mayor detalle.¹⁶⁴

¹⁶⁸ Lane C.; Hardy J.; Schott J.; *Eur. J. Neurol.* **2018** 25, 59–70.

¹⁶⁹ Fish P. V.; Steadman D.; Bayle E. D.; Whiting P.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019** 29, 125–133.

¹⁷⁰ Svobodova B.; Mezeiova E.; Hepnarova V.; Hrabnova M.; Muckova L.; Kobrlova T.; Jun D.; Soukup O.; Jimeno M. L.; Marco-Contelles J.; Korabecny J.; *Biomolecules* **2019** 9, 379.

¹⁷¹ Terry A. V.; Buccafusco J. J.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003** 306, 821-827.

A nivel histopatológico, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la formación masiva de dos tipos de agregados proteicos: los ovillos neurofibrilares (ONFs) y las placas seniles (PS).¹⁷²

*Los ONFs resultan de la agregación de pequeñas fibrillas, en el interior de la neurona, formadas por proteína tau hiperfosforilada.

*Las PS son depósitos de A β , que se localiza en el espacio extracelular, y que distorsionan progresivamente los elementos estructurales de las neuronas, afectando su función.

Además, en la EA hay una disminución importante de los niveles de ciertos neurotransmisores, como acetilcolina (ACh), lo que se ha relacionado con la pérdida de neuronas colinérgicas en regiones del cerebro, como hipocampo y córtex, que están implicadas en los procesos de aprendizaje y memoria.¹⁷³

En la patogenia de la enfermedad de Alzheimer resaltan dos hipótesis:

1. Disfunción colinérgica o hipótesis colinérgica

La disfunción colinérgica, identificada hace más de 30 años, postula que el proceso degenerativo inicial daña selectivamente grupos de neuronas colinérgicas en todo el cerebro. Específicamente, las neuronas colinérgicas del hipocampo, la corteza frontal, la amígdala, el núcleo basal y las regiones del tabique medial, que desempeñan un papel crucial en la conciencia, la atención, el aprendizaje y la memoria, las cuales están dañadas. Los cambios esenciales en las neuronas colinérgicas son: captación de colina, liberación de acetilcolina destruida y deficiencia en la expresión de los receptores muscarínicos y nicotínicos.¹⁷⁴ Debido a la hipótesis colinérgica de la EA, en la que la pérdida de neuronas de acetilcolina en el prosencéfalo basal y la pérdida de actividad enzimática para la síntesis de acetilcolina se atribuyen al deterioro cognitivo, se propuso que los inhibidores de la AChE podrían utilizarse para impedir la degradación de ACh inactivando las colinesterasas.¹⁷⁵

¹⁷² Finder V.H.; Glockshuber R.; *Neurodegener. Dis.* **2007** 4, 13-27.

¹⁷³ Scarpini E. Scheltens P. Feldman H.; *The Lancet Neurology* **2003**, 2, 539-547.

¹⁷⁴ Iraj A.; Khoshneviszadeh M.; Firuzi O.; Khoshneviszadeh M.; Edraki N.; *Bioorg. Chem.* **2020** 97, 103649.

¹⁷⁵ Yiannopoulou K. G.; Papageorgiou S. G.; *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2013** 6, 19-33.

2. La hipótesis amiloide

La hipótesis de la cascada amiloide es actualmente la teoría más aceptada para explicar la fisiopatología y evolución clínica de la EA. El modelo atribuye la patología de la EA a una secuencia de anomalías en el procesamiento de la APP, donde un desequilibrio entre la producción y el aclaramiento de A β desencadena la patología observada en la EA.¹⁷⁶ La β -secretasa y la γ -secretasa, dos complejos enzimáticos unidos a la membrana, participan en el proceso de proteólisis de dos pasos de la producción de APP y A β . La hipótesis mencionada postula que los péptidos A β_{40} y A β_{42} son los elementos críticos en la patogénesis de la EA. Cinco argumentos clave confirman un papel importante de A β en la patogenia de la EA:

- 1) Los depósitos de amiloide preparan una visión patológica temprana de la EA y también las placas neuríticas son componentes clave en el criterio diagnóstico.¹⁷⁴
- 2) En las amiloidosis periféricas (no relacionadas con A β y EA), la causa amiloide conduce al deterioro tisular, lo que indica la patogenicidad del amiloide cerebral. Tres, los oligómeros A β elucidan las propiedades de toxicidad sináptica aguda, por otro lado, las fibrillas A β derivadas de la placa tienen efectos proinflamatorios y cargan la toxicidad neuronal. Cuatro, el factor de riesgo genético más prevalente para la EA, la APOE4, está relacionado con una mayor carga de placa amiloide. Cinco, lo más notable es que todas las mutaciones que causan la EA familiares de inicio temprano elevan la producción de A β_{42} o la correlación de A β_{42} en comparación con la isoforma A β_{40} más baja propensa a la agregación. Todas estas mutaciones amplifican directamente el procesamiento de la APP amiloidogénica.¹⁷⁴

Durante las últimas décadas, se ha explorado un número considerable de terapias, que incluyen anticolinesterasas, antioxidantes, antiinflamatorios, agentes de agregación anti-amiloide, quelatos metálicos y enfoques antiapoptóticos en la búsqueda de estrategias para tratar la EA. Sin embargo, todavía no existen tratamientos efectivos para prevenir o incluso revertir los efectos de la EA.¹⁷⁷ Algunos de los fármacos utilizados inhiben selectivamente la acetilcolinesterasa (AChE), pero los compuestos que también se dirigen a la butirilcolinesterasa (BuChE) pueden proporcionar beneficios adicionales. La BuChE se asocia principalmente con las células gliales y se encuentra en concentraciones mucho más bajas que la AChE en el cerebro sano. Sin embargo, en el transcurso de la EA, la actividad de la AChE disminuye progresivamente, mientras que la actividad de la BuChE

¹⁷⁶ Hardy J.; De Strooper B.; *Brain* **2017** 140, 4, 853-855.

¹⁷⁷ Yan J.; Hu J.; Liu A.; He L.; Li X.; Wei H.; *Bioorg. Med. Chem.* **2017** 25, 2946-2955.

aumenta, y puede actuar como compensador en el mecanismo del metabolismo de la ACh.¹⁷⁸ Las principales opciones terapéuticas actualmente aprobadas por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de la EA son los medicamentos que inhiben las acetilcolinesterasas: donepecilo, rivastigmina, memantina, galantamina y derivados (figura 3.1).¹⁷⁹

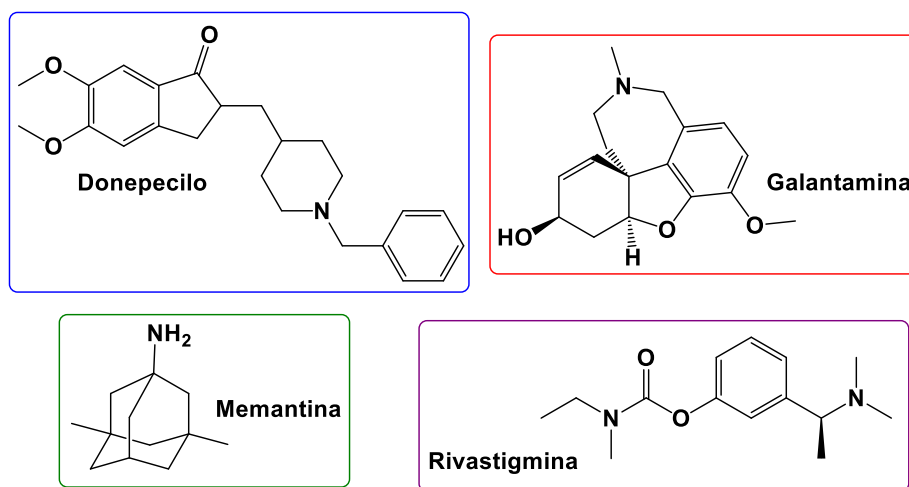


Figura 3.1. Estructuras químicas de los medicamentos aprobados para el tratamiento de EA.

2.1.1 Efectividad del fármaco y sus efectos secundarios en la enfermedad de Alzheimer

A pesar de las diferencias entre sus mecanismos de acción, los efectos clínicos de estos fármacos utilizados para la EA son similares. Generalmente, los inhibidores de la AChE son modestamente efectivos en términos de su capacidad para reducir la tasa de deterioro cognitivo. Por lo general, se prescribe un inhibidor de la AChE durante las etapas iniciales de la enfermedad y se recomienda la memantina cuando el paciente ha progresado a una etapa de EA de moderada a grave, debido a que en su mecanismo, la memantina funciona oponiéndose a los efectos del glutamato, que se cree que inhibe la neurotransmisión por medio de la excitotoxicidad y es un factor en la neurodegeneración. Sin embargo, la terapia combinada que comprende donepecilo y memantina se administra cada vez más desde que se informó el efecto sinérgico entre estos fármacos.¹⁸⁰ Dentro

¹⁷⁸ Rodríguez-Franco M. I.; Fernández-Bachiller M. I.; Pérez C.; Castro A.; Martínez A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2005** 13, 6795-6802.

¹⁷⁹ Sugimoto H.; Yamanishi Y.; Iimura Y.; Kawakami Y.; *Curr. Med. Chem.* **2000** 7, 303-309.

¹⁸⁰ Blaikie L.; Kay G.; Lin P. K. T.; *Med. Chem. Commun.* **2019** 10, 2052.

de los efectos secundarios de estos fármacos tenemos los efectos gastrointestinales adversos como náuseas, vómitos y diarrea, que se describen con frecuencia con el uso de inhibidores de la colinesterasa, que podrían atribuirse al aumento de los niveles de acetilcolina en el sistema nervioso periférico. Se han descrito que la rivastigmina fue responsable de la mayor incidencia de efectos adversos en comparación con otros inhibidores de la colinesterasa, lo que llevó a la introducción de una dosis reducida administrada en forma dérmica con el objetivo de inducir menos efectos secundarios adversos manteniendo una eficacia comparable.²⁵

Hoy en día, los investigadores han cambiado la estrategia para descubrir agentes anti-AD y se está utilizando un enfoque de fármacos multidiana para abordar la patogénesis entrelazada de la enfermedad. El enfoque de los fármacos multidiana, se basa en la observación ventajosa de que un solo fármaco con múltiples acciones puede proporcionar una mejor acción terapéutica en comparación con los fármacos existentes que se dirigen a un único objetivo.¹⁸¹

Un ejemplo es el reportado por Li et al.¹⁸² que sintetizaron una serie de derivados de tacrina conjugados con ácido fenólico y ligustrazina. Este último se eligió en función de su capacidad para proteger las células del estrés oxidativo y la inflamación, mientras que el ácido fenólico se empleó por sus capacidades neuroprotectoras y hepatoprotectoras. Se describió que el tipo de ácido fenólico usado tenía un efecto importante sobre la actividad inhibidora de AChE; por ejemplo, los compuestos con el resto de ácido sinápico tenían mayores potencias que los que contienen ácido cumárico.¹⁸⁰ El compuesto que demostró el mayor potencial como agente neuroprotector se muestra en la figura 3.2. Se describió que el inhibidor de AChE más potente podría prevenir la agregación amiloide *in vitro* con una IC₅₀ de 65,2 nM. Sin embargo, las concentraciones probadas estuvieron dentro del rango de 20 a 100 µM, por lo que se utilizó de nuevo un rango de concentración para determinar la citotoxicidad de los compuestos dentro de las células, que fue considerablemente menor en el rango de 1.25-10 µM.¹⁸⁰

¹⁸¹ Mishra C. B.; Gusain S.; Shalini S.; Kumari S.; Prakash A.; Kumari N.; Yadav A. K.; Kumari J.; Kumar K.; Tiwari M.; *Bioorg. Chem.* **2020** 95,103524.

¹⁸² Li G.; Hong G.; Li X.; Zhang Y.; Xu Z.; Mao L.; Feng X.; Liu T.; *Eur. J. Med. Chem.* **2018** 148, 238-254.

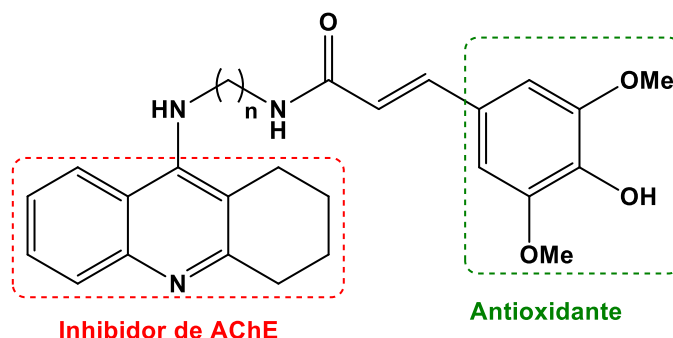


Figura 3.2

2.2 Tacrina

La tacrina (THA, 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina) es el AChEI reversible de acción central que se lanzó al mercado en 1993 como el primer fármaco para aliviar los síntomas de la EA.¹⁸³ La THA es un inhibidor de colinesterasas no selectivo, ya que también inhibe la butirilcolinesterasa (BChE, E.C. 3.1.1.8). Se ha descrito que la THA también modula los receptores muscarínicos y nicotínicos y la vía amiloidogénica.¹⁸⁴ Los beneficios clínicos de la THA se vieron limitados por su escasa biodisponibilidad oral y considerables efectos secundarios definidos probablemente debido a su carácter pro-oxidante.¹⁷⁰ Este hecho provocó la retirada de THA del mercado. Por otro lado, el núcleo de 1,2,3,4-tetrahidroaminocridina sigue estando a la vanguardia de la investigación en el desarrollo de nuevos agentes anti-Alzheimer, debido a su potencia como inhibidor de colinesterasas, y a la facilidad de conjugación con ciertas estructuras para encontrar análogos más potentes y menos tóxicos. De hecho, estos esfuerzos produjeron, por ejemplo, 7-metoxitacrina (7-MEOTA), 6-clorotacrina (6-Cl-THA), o el homodímero bis(7)-tacrina.¹⁷⁰

La tacrina es un potente inhibidor no selectivo tanto de la AChE como de la butirilcolinestasa (BuChE). Si bien esta falta de selectividad y su hepatotoxicidad han reducido su uso terapéutico, la búsqueda de análogos de tacrina sigue siendo de interés en la EA.¹⁸⁵ Gracias a la fácil accesibilidad y al bajo peso molecular, las tacrinas todavía se utilizan ampliamente como fragmentos de partida para el desarrollo de moléculas híbridas con propiedades farmacológicas adicionales más allá de la

¹⁸³ Crismon M.L.; *Ann. Pharmacother.* **1994** 28, 744-751.

¹⁸⁴ Horak M.; Holubova K.; Nepovimova E.; Krusek J.; Kaniakova M.; Korabecny J.; Vyklicky L.; Kuca K.; Stuchlik A.; Ricny J.; Vales K.; Souku O.; *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2017** 75, 54-62.

¹⁸⁵ Rodríguez-Franco M. I.; Fernández-Bachiller M. I.; Pérez C.; Hernández-Ledesma B.; Bartolomé B.; *J. Med. Chem.* **2006** 49, 459-462.

inhibición de ChE. Durante las últimas décadas, moléculas multiana basadas en tacrina ha crecido enormemente.¹⁸⁶

La síntesis de THA se describió por primera vez en 1945. Desde entonces, se han desarrollado varias estrategias sintéticas. La tacrina se puede sintetizar mediante el método de Friedlander, que implica la condensación de antranilonitrilo y ciclohexanona en presencia de un ácido de Lewis, como ZnCl₂, AlCl₃, ácido *p*-toluenosulfónico (*p*-TSA) o BF₃/Et₂O.¹⁸⁷ Sin embargo, debido a las drásticas condiciones de reacción de Friedlander, se ha modificado y mejorado. Por ejemplo, Khalilzadeh y col.¹⁸⁸ describió la síntesis de THA usando catalizador sólido *p*-TSA/gel de sílice bajo irradiación de MW. Hasaninejad col.¹⁸⁹ desarrollaron una estrategia sintética similar, en la que se utilizó PEG-6000 modificado con ácido sulfúrico como un catalizador polimérico eficiente, ecológico, económico y biodegradable. Otro método clásico utilizado para sintetizar THA es mediante la reacción de Hu, en la cual se reflujo ácido antranílico con ciclohexanona y cloruro de fosforilo (POCl₃) y luego el intermedio formado (9-cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina) se trató con hidróxido de amonio concentrado (NH₄OH).¹⁸⁷

Por su gran importancia existen múltiples reportes de este derivado, uno de ellos es el reportado por Zahra Najafi y colaboradores, que diseñaron, sintetizaron y evaluaron una nueva serie de híbridos de tacrina-cumarina conectados por un espaciador de tipo 1,2,3-triazolilo como potentes inhibidores duales de AChE. Entre ellos, el compuesto **8e** fue el derivado anti-AChE más potente (IC₅₀= 27 nM) y el compuesto **8m** mostró la mejor actividad anti-BChE (IC₅₀= 6 nM) mucho más activo que la tacrina y el donepezilo, usados como fármacos de referencia (figura 3.3).¹⁹⁰

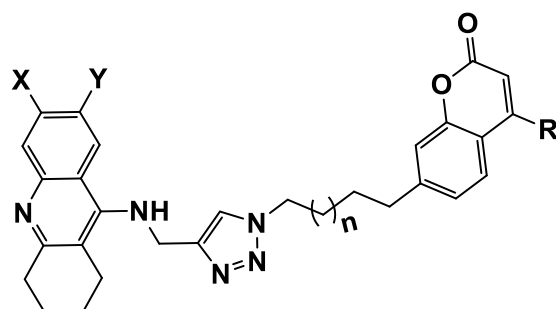
¹⁸⁶ Chalupova K.; Korabecny J.; Bartolini M.; Monti B.; Lamba D.; Caliandro R.; Pesaresi A.; Brazzolotto X.; Gastellier A.-J.; Nachon F.; Pejchal J.; Jarosova M.; Hepnarova V.; Jun D.; Hrabnova M.; Dolezal R.; Karasova J. Z.; Mzik M.; y cols.; *Eur. J. Med. Chem.* **2019** 168, 491-514.

¹⁸⁷ Mesiti F.; Chavarria D.; Gaspar A.; Alcaro S.; Borges F.; *Eur. J. Med. Chem.* **2019** 181, 111572.

¹⁸⁸ Khalilzadeh M.; Hosseini A.; Tajbakhsh M.; *J. Heterocycl. Chem.* **2007** 44, 535-538.

¹⁸⁹ Hasaninejad A.; Zare A.; Shekouhy M.; Ameri-Rad J.; *Green. Chem.* **2011** 13, 958-964.

¹⁹⁰ Najafi Z.; Mahdavi M.; Saeedid M.; Karimpour-Razkenari E.; Edraki N.; Sharifzadeh M.; Khanavi M.; Akbarzadeh T.; *Bioorg. Chem.* **2019** 83, 303-316.



8e: X= Cl, Y= H, R= Me, n=3
8m: X= Y= H, R= H, n= 5

Figura 3.3

Marco Maspero sintetizó un conjunto de nuevos derivados híbridos (**7-C8**, **7-C10**, **7-C12** y **8-C8**, **8-C10**, **8-C12**), en los que una cadena espaciadora de polimetileno de longitud variable conectaba el resto farmacofórico de xanomelina con el de la tacrina. Cuando se evaluaron *in vitro* para determinar su capacidad para inhibir la AChE, los nuevos compuestos mostraron una potencia superior o similar en comparación con la de la tacrina. Descubrieron que el grado de actividad anticolinesterasa se ve afectado tanto por la presencia de un grupo amonio, como por la longitud del espaciador de polimetileno, siendo el derivado **8-C8** el inhibidor más potente del conjunto de compuestos estudiados (figura 3.4).¹⁹¹

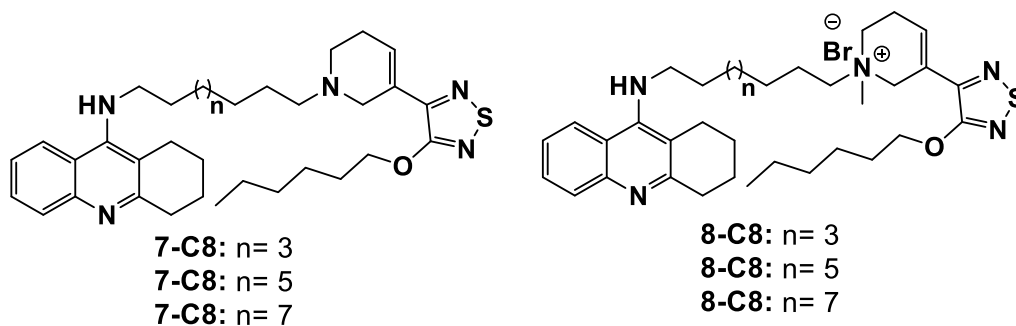


Figura 3.4

¹⁹¹ Maspero M.; Volpato D.; Cirillo D.; Chen N. Y.; Messerer R.; Sotriffer C.; De Amici M.; Holzgrabe U.; Dallanoce C.; *Bioorg. Chem.* **2020** 96, 103633.

2.3 Donepecilo

Donepecilo ha atraído la atención durante casi dos décadas desde su aprobación por la FDA en 1996 bajo la marca comercial Aricept®.¹⁹² En muchos ensayos clínicos con donepecilo, se han demostrado efectos beneficiosos sobre la función cognitiva, actividades de la vida diaria, comportamiento y síntomas neuropsiquiátricos como alucinaciones, distracción, comportamiento motriz aberrante y apatía, en pacientes con un grado de AD de leve a moderado o incluso en etapas avanzadas.¹⁹³ El donepecilo es un inhibidor mixto de las colinesterasas rápidamente reversible, que exhibe una selectividad relativa para la AChE en comparación con la BChE. Se encontró que la proporción IC₅₀ de donepecilo para BChE a AChE de roedores y humanos era 1252:1 y 405:1, respectivamente.¹⁹⁴ Esta selectividad relativa podría ser la razón de la baja incidencia de efectos secundarios colinérgicos periféricos clínicamente relevantes. Con respecto a la AChE, el donepecilo pertenece a una gran familia de AChEI capaces de interactuar simultáneamente con los sitios de unión tanto catalíticos como periféricos (inhibidores duales).¹⁹⁵

Se ha descubierto que el donepecilo atenúa la neurotoxicidad de A β y afecta al procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP). Además, el donepecilo interfiere con el proceso que conduce a la exposición de la región N-terminal de la APP durante la vía amiloidogénica el procesamiento de la APP, al interrumpir el mecanismo en el que se produce la generación de A β seguida de la disfunción colinérgica.¹⁹⁶ El donepecilo también interactúa con los receptores de ACh nicotínicos (nAChR) en la corteza, lo que lleva a una reducción de la excitotoxicidad del glutamato, así como a un aumento de la expresión del receptor de ACh nicotínico y la unión a la nicotina.¹⁹⁷ Además, se ha demostrado que el donepecilo tiene un impacto en la expresión de la isoforma de AChE, promoviendo un aumento en la forma AChE-R (abreviatura de AChE-Read, que se eleva durante el estrés) mientras inhibe la expresión de la forma AChE-S (AChE-Synaptic es una transcripción neuronal importante) y, por lo tanto, proporciona un efecto neuroprotector.¹⁹⁸

¹⁹² Knowles J.; *Core Evid.* **2006** 1, 195-219.

¹⁹³ Lee J.-H.; Jeong S.-K.; Kim B.C.; Park K.W.; Dash A.; *Acta Neurol. Scand.* **2015** 131, 259-267.

¹⁹⁴ Jelic V.; Darreh-Shori T.; *Clin. Med. Insights Ther.* **2010** 2, 771-788.

¹⁹⁵ Korabecny J.; Spilovska K.; Mezeiova E.; Benek O.; Juza R.; Kaping D.; Soukup O.; *Curr. Med. Chem.* **2018** 25, 1-23.

¹⁹⁶ Beach T.G.; Potter P.E.; Kuo Y.M.; Emmerling M.R.; Durham R.A.; Webster S.D.; Walker D.G.; Sue L.I.; Scott S.; Layne K.J.; Roher A.E.; *Neurosci. Lett.* **2000** 283, 9-12.

¹⁹⁷ Kume T.; Sugimoto M.; Takada Y.; Yamaguchi T.; Yonezawa A.; Katsuki H.; Sugimoto H.; Akaike A.; *Eur. J. Pharmacol.* **2005** 527, 77-85.

¹⁹⁸ Nordberg A.; *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, **2006**, 20, S12-18.

Con respecto a su perfil farmacocinético, el donepecilo tiene una conveniente dosis de administración de 5-10 mg una vez al día (23 mg probados experimentalmente) con una vida media de 70 horas. La concentración plasmática de donepecilo alcanza su estado de equilibrio dentro de los tres meses de tratamiento y permanece sin cambios. Se ha comprobado que la concentración de donepecilo en el líquido cefalorraquídeo (LCR) aumenta en un 50% entre los meses 12 y 24 de tratamiento en pacientes con EA.^{199,200}

Por lo que el donepecilo se convirtió en una opción de tratamiento valiosa no solo por su capacidad para aliviar los síntomas que ocurren durante la EA, sino también por su capacidad para reducir la carga de los cuidadores al prolongar la duración del paciente con EA para realizar tareas de autocuidado.^{201,202}

Dado que el donepecilo ha sido considerado el fármaco más eficaz entre los AChEI, se ha realizado un largo trabajo hacia la optimización de sus estrategias sintéticas. Por ejemplo, Mesiti y col.¹⁸⁷ desarrollaron una estrategia sintética eficaz para la síntesis del donepecilo en la que el primer paso incluía una condensación aldólica de 5,6-dimetoxiindanona con piridin-4-carboxaldehído (isonicotinaldehído) para producir 5,6-dimetoxi-2-(piridin-4-ilo)metilenindan-1-ona. Después de la hidrogenación y el ajuste del pH, seguido de la *N*-alquilación con bromuro de bencilo se obtuvo donepecilo con un rendimiento global del 83%.¹⁸⁷

Así como este, existen muchos trabajos abordados para la mejora y diseño de nuevas rutas en la obtención de nuevos derivados de donepecilo como el reportado por Jean-Marie Contreras⁴⁸ y colaboradores, quienes realizaron el diseño, la síntesis y las relaciones estructura-actividad de una serie de análogos de piridazina que actúan como inhibidores de AChE. Entre todos los derivados preparados, encontraron que el derivado de indenopiridazina **4g** era el inhibidor más potente con una IC₅₀ de 10 nM en la AChE, en comparación con el compuesto de partida, esto representa un aumento de 12 veces en la potencia. Además, el derivado **4c** mostró una IC₅₀ de 21 nM, es más

¹⁹⁹ Cummings, J.L.; Geldmacher, D.; Farlow, M.; Sabbagh, M.; Christensen, D.; Betz, P.; *CNS Neurosci. Ther.*, 2013, 19, 294-301.

²⁰⁰ Colovic M. B.; Krstic D. Z.; Lazarevic-Pasti T. D.; Bondzic A. M.; Vasic V. M.; *Curr. Neuropharmacol.* **2013** 11, 315-335.

²⁰¹ Mohs R.C.; Doody R.S.; Morris J.C.; Ieni J.R.; Rogers S.L.; Perdomo C.A.; Pratt R.D.; "312" Study Group.; *Neurology* **2001** 57,481-488.

²⁰² Karasova J. Z.; Sestak V.; Korabecny J.; Mezeiova E.; Palicka V.; Kuca K.; Mzik M.; *J. Chromatogr. B* **2018** 1092, 350-358.

selectiva para la AChE humana que el compuesto de referencia tacrina con valor de 95 nM (figura 3.5).²⁰³

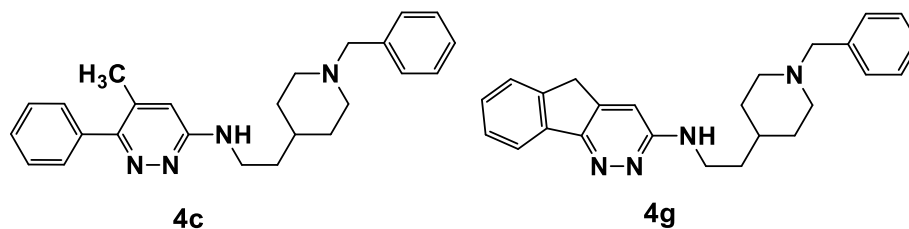


Figura 3.5

El grupo de Gabr²⁰⁴ diseñó, sintetizó y evaluó una nueva serie de análogos de donepezilo estructuralmente rígidos como posibles ligandos multidiaria contra enfermedades neurodegenerativas. Los compuestos investigados **10-13** mostraron actividades inhibitoras frente a AChE y BACE 1 en comparación con donepezilo. El compuesto híbrido **13** (figura 3.6), con un núcleo de 2-aminoquinolina exhibió una potente inhibición de AChE ($IC_{50}=14.7$ nM) y BACE-1 ($IC_{50}=13.1$ nM).²⁰⁴

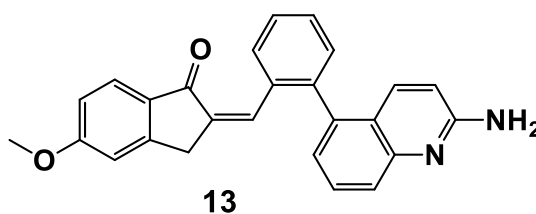


Figura 3.6

²⁰³ Contreras J.-M.; Parrot I.; Sippl W.; Rival Y. M.; Wermuth C. G.; *J. Med. Chem.* **2001** 44, 2707-2718.

²⁰⁴ Gabr M. T.; Abdel-Raziq M. S.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018** 28, 2910-2913.

2.4 Escuaramida

El ácido escuárico (3,4-dihidroxiciclobut-3-en-1,2-diona), sintetizado por primera vez por Cohen y col. en 1959 a través de la hidrólisis de diclorotetrafluorociclobuteno,²⁰⁵ pero fueron West y colaboradores quienes proporcionaron una explicación de la estabilidad y aromaticidad del dicetociclobuteno dianiónico; además, la síntesis de escuaratos de alquilo es la que ha abierto la puerta a la accesibilidad sintética de escuaramidas.²⁰⁶

Las escuaramidas, derivados que resultan de la sustitución de los dos grupos OH del ácido escuárico por dos aminas, son compuestos con dos aceptores de enlaces de hidrógeno carbonilo muy próximos a dos donantes de enlaces de hidrógeno NH; este pequeño el andamio molecular se beneficia de propiedades físicas y químicas únicas que lo hacen extremadamente útil como herramienta en áreas tan diversas como la catálisis, el reconocimiento molecular, la bioconjugación y el autoensamblaje.²⁰⁷ Una de sus propiedades más llamativas surge de la deslocalización de un par solitario de nitrógeno en el sistema de anillo ciclobutenodiona, lo que confiere al anillo de cuatro miembros con carácter aromático (regla de Huckel: $[4n + 2] \pi$ electrones, $n = 0$). Además, la capacidad de las escuaramidas para formar enlaces de hidrógeno fuertes que aumentan simultáneamente el carácter aromático del anillo de cuatro miembros, es muy ventajosa cuando los procesos de autoensamblaje y reconocimiento molecular pueden beneficiarse de una estabilidad termodinámica favorable provocada por la ganancia aromática.²⁰⁷

Dentro de las propiedades físicas que contribuyen a que las escuaramidas son las que mencionan a continuación:

* Conformación

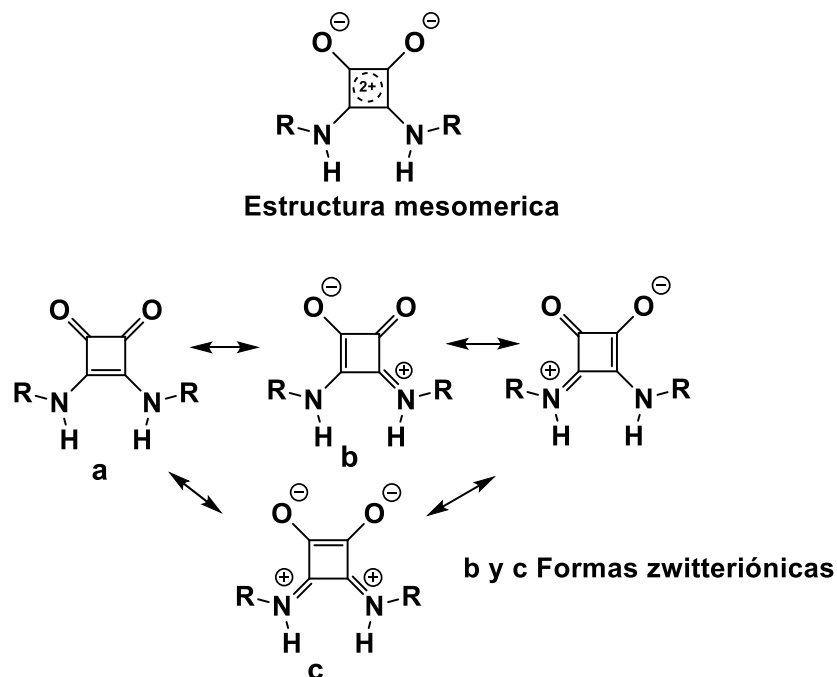
Se observa que las escuaramidas tienen una deslocalización de electrones extensa en todo el marco de ciclobutenodiona. Estructuralmente, la unidad de escuaramida se considera un miembro de la familia de las amidas vinílogas. Al igual que con las amidas normales (y otros derivados, como las ureas), el enlace C-N tiene un carácter de doble enlace parcial debido a la deslocalización de los electrones de pares solitarios de nitrógeno en el orbital π^* del carbonilo. Este carácter, que puede ser racionalizado considerando la estructura mesomérica que resulta de la resonancia entre la estructura parental (a) y las formas bipolares (b y c), esto conduce a la planarización del átomo de

²⁰⁵ Cohen S.; Cohen S. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1966** 88 1533-1536.

²⁰⁶ Ito M.; West R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963** 85, 17, 2580-2584.

²⁰⁷ Marchetti L. A.; Kumawat L. K.; Mao N.; Stephens J. C.; Elmes R. B.P.; *Chem.* **2019** 5, 1398-1485.

nitrógeno y dificulta la rotación alrededor del enlace C-N. (Esquema 3.1).^{208,209} Además, el núcleo de ciclobutenodiona exhibe un grado de aromaticidad, con dos cargas positivas resonando dentro del anillo ($n = 0$ según la regla de Hückel).

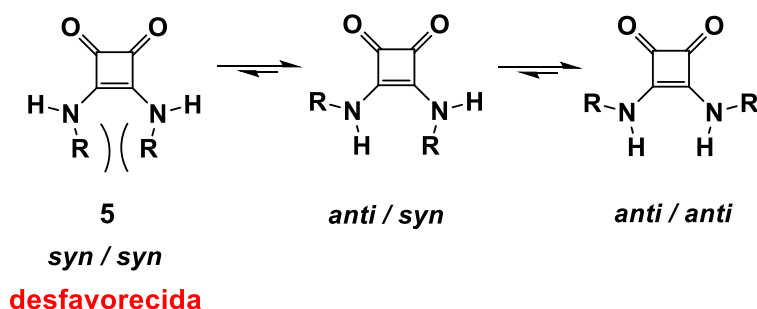


Esquema 3.1

Dado que la rotación alrededor de los enlaces C-N dentro de la estructura de la escuaramida está restringida, las escuaramidas sustituidas adoptan distintas conformaciones *sin* o *anti* en el estado sólido. En estado sólido, se muestra típicamente una fuerte preferencia hacia las conformaciones *antianti* o (menos comúnmente) *antisynd* (esquema 3.2) debido a la minimización de la repulsión estérica entre sustituyentes.²⁰⁸ Estudios previos han demostrado que el control conformacional entre estas dos formas está controlado por enlaces de hidrógeno intermoleculares o intramoleculares.²⁰⁸

²⁰⁸ Rotger M. C.; Piña M. N.; Frontera A.; Martorell G.; Ballester P.; Deya P. M.; Costa A.; *J. Org. Chem.* **2004** 69, 2302-2308.

²⁰⁹ Agnew-Francis Kylie A.; Williams C. M.; *Chem. Rev.* **2020** 120, 20, 11616-11650.



Esquema 3.2

La preferencia hacia la conformación *anti/syn*, es dirigida típicamente por factores de control dentro de la molécula completa, como a través de la presencia de elementos con un elevado impedimento estérico o fuerzas de atracción intramoleculares (como enlaces de hidrógeno). Esto se ilustra en el trabajo realizado por Rotger y col.^{208,210} donde la inclusión de grupos amino o carbonilo distal permitió la formación de puentes de hidrógeno del átomo de oxígeno del carbonilo y el grupo N-H de la escuaramida. Como resultado, los derivados de escuaramida que contienen estas unidades favorecen la conformación *anti/syn* en lugar de la forma *anti/anti* extendida.²⁰⁹

Las escuaramidas sustituidas, en las que al menos uno de los nitrógenos de amida es terciario, tienden a existir como mezclas de las conformaciones *syn/anti* y *anti/anti*, sin preferencia real, en ausencia de enlaces de hidrógeno o elementos estéricamente exigentes hacia una conformación particular.²¹¹ Puede inducirse mediante la incorporación de enlaces de hidrógeno o componentes estéricamente exigentes, por lo tanto es útil para el diseño preciso de sistemas plegables o sensibles a estímulos.^{208,212}

*Acidez

La fuerte naturaleza ácida dual del ácido escuárico, ha sido bien caracterizada en la literatura ($pK_{a1} = 0.58$, $pK_{a2} = 3.48$).⁵¹ Se sabe que los átomos de oxígeno en las escuaramidas exhiben un carácter de base de Lewis, lo que explica su capacidad para actuar como aceptores excepcionales de enlaces de hidrógeno. Sin embargo, actualmente solo hay un número limitado de artículos que cuantifican la acidez de las escuaramidas, lo cual es inesperado en vista de su despliegue

²¹⁰ Martínez L.; Martorell G.; Sampedro A.; Ballester P.; Costa A.; Rotger C.; *Org. Lett.* **2015** 17, 2980-2983.

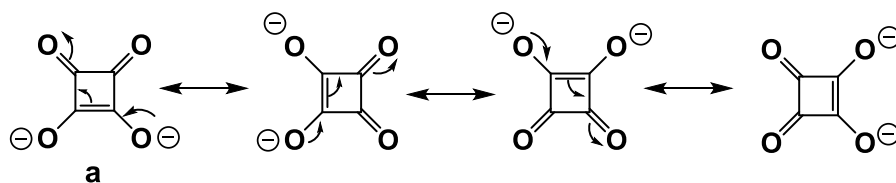
²¹¹ Muthyala R. S.; Subramaniam G.; Todaro L.; *Org. Lett.* **2004** 6, 25, 4663-4665.

²¹² Martínez L.; Sampedro A.; Sanna E.; Costa A.; Rotger C.; *Org. Biomol. Chem.* **2012** 10, 1914-1921.

generalizado en organocatálisis, es decir, donde el ajuste cuidadoso de pK_a es a menudo una consideración crucial en el diseño de catalizadores.^{209,213}

* Aromaticidad y enlace de hidrógeno

La estabilización por resonancia (esquema 3.4) observada en el dianión cuadrático (1), fue presentada por primera vez por Cohen y col.²¹⁴ como una justificación de la acidez dual atípicamente alta observada en el ácido escuárico. Más tarde, West y col.²¹⁵ propusieron que las especies de la forma general $C_nO_n^{2-}$, de las cuales el dianión cuadrático (a) es una de ellas, eran parte de una serie de compuestos aromáticos no descritos anteriormente.²⁰⁹



Esquema 3.3

Utilizando la metodología computacional NICS desarrollada por Schleyer y col.^{216,217} y Quiñonero y col.⁶³ pudieron estimar la aromaticidad de una bis-escuaramida simple (a), la forma O-diprotonada (b), así como en complejo con un catión amonio (c; figura 3.7). Curiosamente, se determinó que la escuaramida O-diprotonada (b) tenía un valor de aromaticidad aproximado similar al del benceno (e), con el complejo de amonio (c) ligeramente por detrás. El aumento aditivo en la aromaticidad mostrada por Quiñonero y col.^{218,219} en los casos de escuaramida protonada o complejada ayuda a racionalizar la poderosa capacidad de enlace de hidrógeno que poseen las escuaramidas porque la aromaticidad adicional obtenida a través del enlace de hidrógeno impartiría mayor estabilidad.²⁰⁹

²¹³ Ni X.; Li X.; Wang Z.; Cheng J.-P.; *Org. Lett.* **2014** 16, 1786-1789.

²¹⁴ Cohen S.; Lacher J. R.; Park J. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1959** 81, 13, 3480.

²¹⁵ West R.; Niu H.-Y.; Powell D. L.; Evans M. V.; *J. Am. Chem. Soc.* **1960** 82, 23, 6204-6205.

²¹⁶ Schleyer P. v. R.; Najafian K.; Kiran B.; Jiao H.; *J. Org. Chem.* **2000** 65, 426-431.

²¹⁷ Schleyer P. v. R.; Maerker C.; Dransfeld A.; Jiao, H.; van Eikema Hommes N. J. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996** 118, 6317-6318.

²¹⁸ Quiñonero D.; Frontera A.; Ballester P.; Deyá P. M.; *Tetrahedron Lett.* **2000** 41, 2001-2005.

²¹⁹ Quiñonero D.; Prohens R.; Garau C.; Frontera A.; Ballester P.; Costa A.; Deyá P. M.; *Chem. Phys. Lett.* **2002** 351, 115-120.

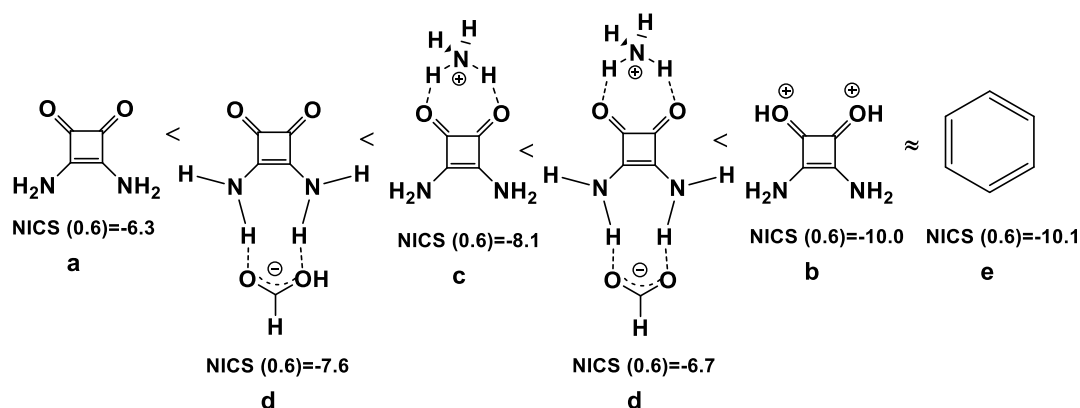


Figura 3.7

*Aplicación a la química medicinal

Hasta hace relativamente poco tiempo, se había mostrado un interés limitado en la incorporación de escuaramidas en programas de química médica de moléculas pequeñas. Esto puede atribuirse a varios factores, incluidos los avances en la síntesis de escuaramida y una mayor disponibilidad comercial de precursores.²²⁰ Otro factor que podría haber desalentado a los químicos medicinales es la falta de familiaridad con las escuaramidas, junto con la preocupación general de que este grupo pueda representar un grupo funcional reactivo, lo que genera preocupaciones sobre el riesgo de toxicidad *in vivo*. Sin embargo, las bis-escuaramidas parecen ser bastante estables al ataque nucleofílico, requiriendo condiciones de forzamiento prolongadas para desplazar los grupos amino, aumentando así la confianza para su aplicación al diseño de fármacos.²²⁰

Aunque hasta la fecha ningún fármaco comercializado contiene escuaramidas, varios candidatos han ingresado a ensayos clínicos en humanos con algunos ejemplos de alto perfil aún progresan activamente. Los compuestos de escuaramida se han investigado para una variedad de dianas terapéuticas, que incluyen quinasas, metaloproteasas, receptores GPCR y canales iónicos para el tratamiento de un amplio espectro de tipos de enfermedades;²²⁰ en consecuencia, estos derivados han surgido como entidades químicas útiles en una serie de aplicaciones, incluida la organocatálisis, química de materiales, biosensores, conectores en bioconjugación, polímeros como sensores de aniones, tintes, y en el desarrollo de nuevos derivados como potenciales fármacos.²⁰⁹

De entre los derivados de escuaramidas con potencial actividad biológica destacan el perzinfotel (figura 3.8), descubierto en 1999 como un antagonista de NMDA (ácido *N*-metil-*D*-aspártico), tenía un perfil preclínico favorable y, por lo tanto, parecía ser una estructura líder adecuada para el

²²⁰ Storer R. I.; Aciro C.; Jones L. H.; *Chem. Soc. Rev.* **2011** 40, 2330-2346.

desarrollo de un fármaco para el tratamiento de trastornos neurológicos como el accidente cerebrovascular y el traumatismo craneal; no obstante, debido a su baja biodisponibilidad, los estudios fueron interrumpidos. Otros intentos de modificar el perzinfotel dieron como resultado el profármaco de perzinfotel que se adsorbió mucho mejor, se transformó enzimáticamente en el compuesto original perzinfotel y esto mejoró significativamente la vida media y la potencia del perzinfotel *in vivo* (administración oral en un modelo de roedor de dolor inflamatorio).²²¹

La navarixina, la escuaramida, la pibutidina y el BMY-25368 (figura 3.7) son otros ejemplos de análogos de escuaramidas que entraron en ensayos clínicos. Navarixin (SCH527123, MK-7123) actúa como un antagonista del receptor de quimiocina de cisteína (receptor de interleucina 8A) y se encuentra en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de tumores sólidos en los EE.UU. e Israel. La navarixina también se ha investigado para el tratamiento del asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la psoriasis. Se pensó que reducía la migración de neutrófilos al pulmón enfermo, lo que debería mejorar los síntomas. Sin embargo, esta suposición no fue probada y esta investigación ha sido descontinuada.²²¹

Se evaluó la seguridad y eficacia de la escuaramida (SQX 770) para el tratamiento del herpes labial en un ensayo clínico que contó con 54 pacientes y se encontró que el compuesto es ligeramente eficaz para reducir el número de brotes de enfermedad por año, pero tuvo efectos adversos no graves en más del 50% de los pacientes tratados (en su mayoría picor, enrojecimiento o hinchazón). La pibutidina mostró un efecto antagonista H₂ y se investigó como agente gastrointestinal para las úlceras por Taisho Pharmaceutical. Sin embargo, en 2000, se suspendió en la Fase I debido a cardiotoxicidad y toxicidad gastrointestinal. BMY 25368, desarrollado por Bristol-Myers Squibb, avanzó hasta los estudios clínicos de fase III para úlceras duodenales y gástricas.²²¹

²²¹ Chasák J.; Šlachťová V.; Urban M.; Brulíková L.; *Eur. J. Med. Chem.* **2020** 112872.

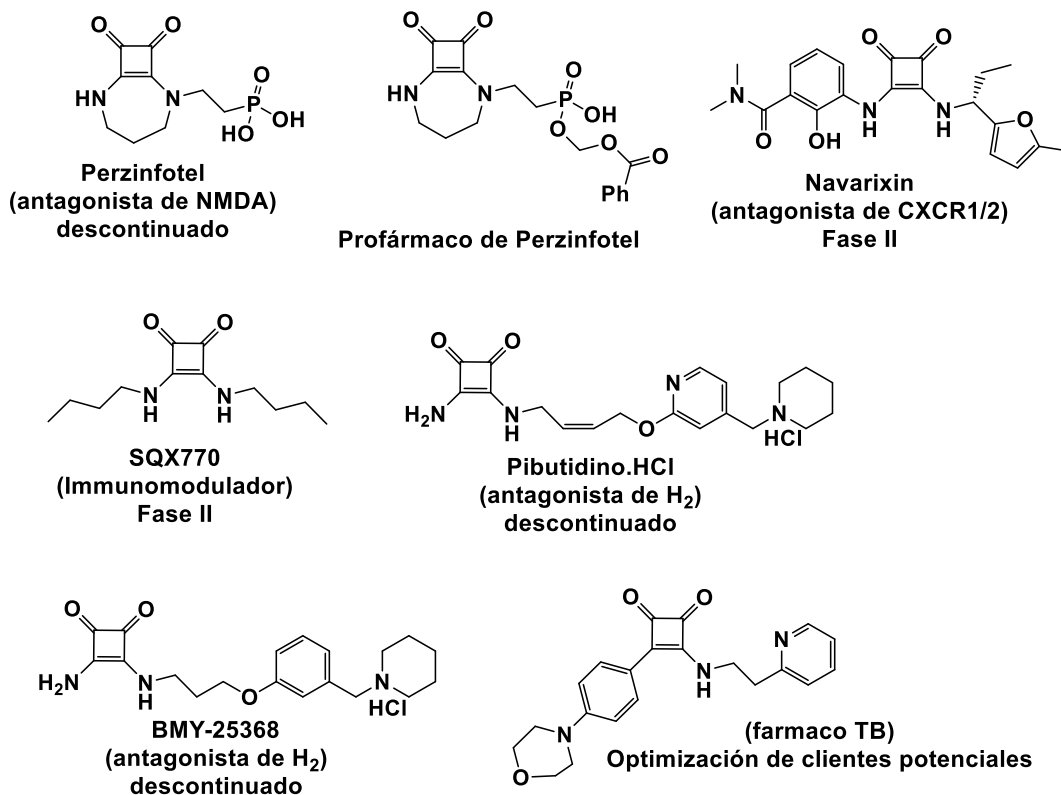


Figura 3.8

Las interesantes propiedades físico-químicas, así como biológicas de los derivados de escuaramidas, nos han animado en este capítulo de la Tesis Doctoral a preparar una serie de heterodímeros de tacrina y donepecilo conectados por un núcleo de escuaramida, como potenciales agentes anti-Alzheimer.

Capítulo 3.3: Objetivos

Objetivo General:

Llevar a cabo la síntesis de nuevos híbridos de escuaramidas de tacrina y de donepecilo como potenciales agentes anti-Alzheimer.

Objetivos Particulares:

- Desarrollar rutas sintéticas para obtener nuevos heterodímeros de escuaramidas provenientes de tacrina, como de donepecilo, mediante la incorporación de diversos sistemas aromáticos que puedan ser de utilidad como moléculas multidiana frente a la enfermedad Alzheimer.
- Modificación estructural (ej. longitud de los espaciadores, sustituyentes sobre los sistemas aromáticos) con objeto de obtener relaciones estructura-actividad.
- Realizar la síntesis de diversos sistemas aromáticos como índoles o cumarinas, adecuadamente funcionalizadas, así como residuos de tipo dimetoxifenilo para su incorporación a los derivados de escuaramidas.
- Caracterizar adecuadamente los productos obtenidos, empleando para ello los diferentes métodos físicos y espectroscópicos comunes en síntesis orgánica.
- Evaluación *in vitro* de las propiedades anti-Alzheimer de los derivados preparados (ej. inhibición de colinesterasas, de MAO, neuroprotección).

Capítulo 3.4: Discusión de Resultados

Tomando en consideración la revisión bibliográfica realizada anteriormente y de conocer la importancia farmacológica que tienen los derivados de escuaramidas que contengan tacrina y un análogo del donepezilo. Se dio a la tarea de sintetizar nuevas estructuras de escuaramidas, a través de híbridos con diferentes derivados como son la melatonina, triptamina, cumarina y 3,4-dimetilfeniletilamina, y el análogo de donepezilo y tacrina (**38a-e** y **60a-e**).

4.1 Estructuras de los derivados de escuaramida obtenidos

A continuación, se presentan los nuevos derivados de híbridos de escuaramidas con tacrina y el análogo de donepezilo (Figura 3.7).

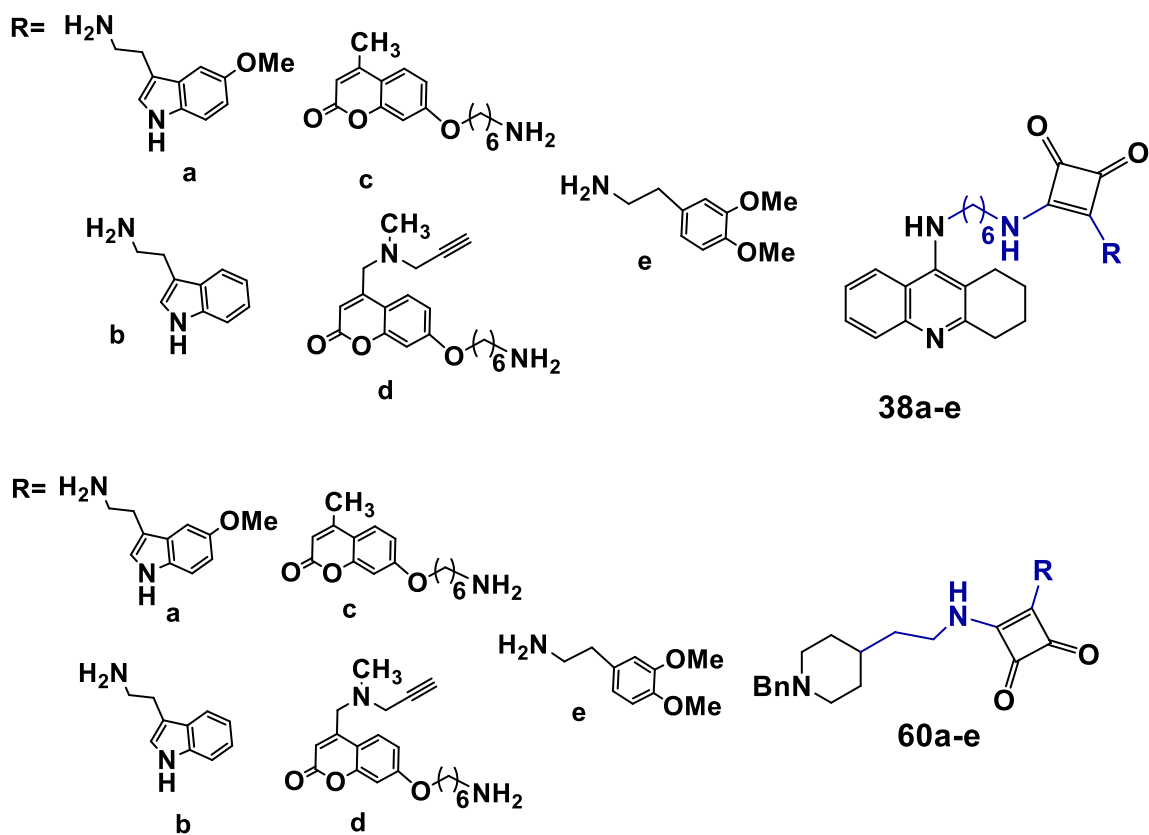
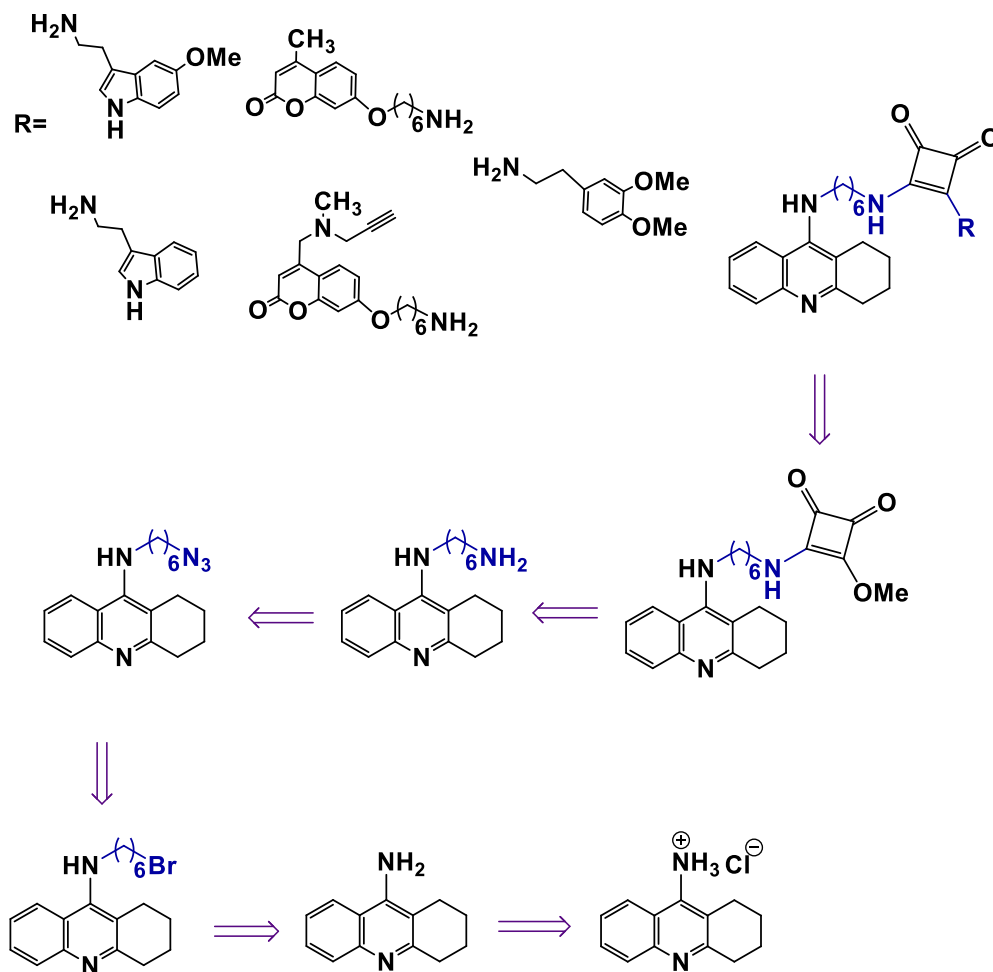


Figura 3.7.

Todos los compuestos sintetizados fueron caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H , ^{13}C y espectrometría de masas.

4.2. Retrosíntesis de derivados de escuaramida

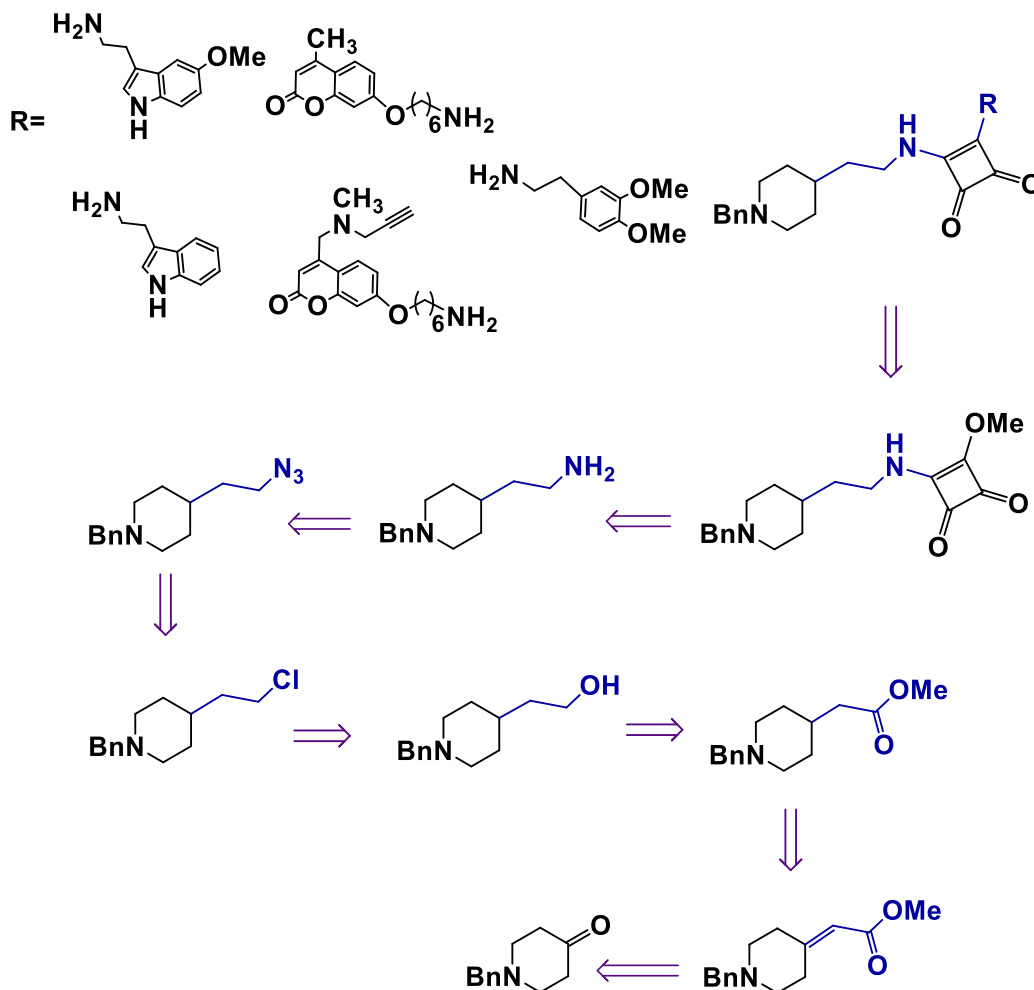
En el esquema 3.4 se muestra la retrosíntesis que se planteó para obtener varios derivados híbridos de tacrina procedentes de diferentes aminas, sintetizando el derivado amina de tacrina en 4 pasos de síntesis, la cual se obtuvo por la incorporación de un espaciador de 6 carbonos en el grupo amino del C-9 de la tacrina para acoplarla al escuarimidato de dimetilo.



Esquema 3.4. Retrosíntesis de los híbridos de tacrina.

Otra retrosíntesis que se planteó es la que se muestra en el esquema 3.5, que son derivados híbridos de un análogo del donepezilo acoplándolo con el escuaramidato de dimetilo y haciéndolo reaccionar con diferentes derivados de aminas, el análogo de amino del donepezilo es procedente

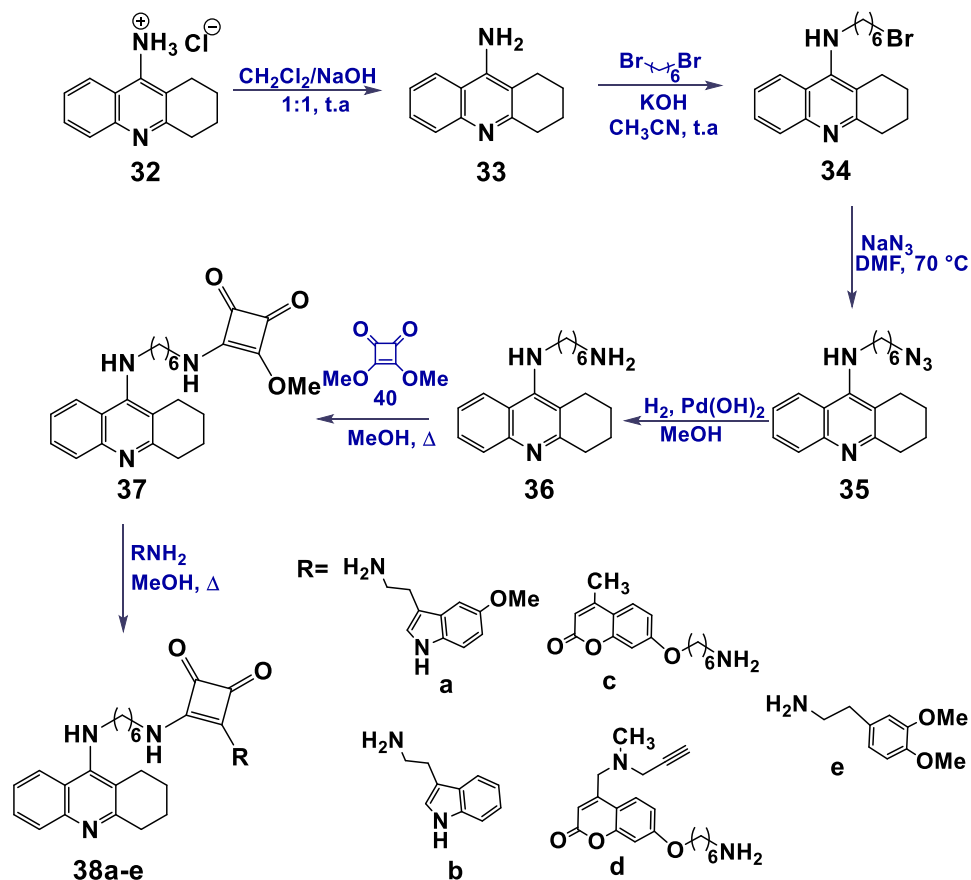
de 6 pasos de síntesis por la incorporación de un espaciador en el grupo carbonilo de la *N*-bencilpiperidin-4-ona.



Esquema 2.5. Retrosíntesis de los derivados híbridos de un análogo de donepezilo.

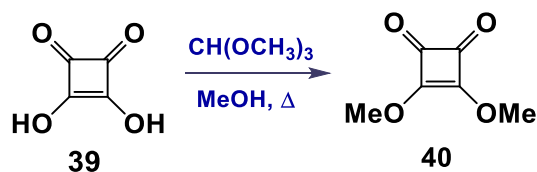
4.2.1. Obtención de los derivados de híbridos de tacrina.

En el esquema 3.6 se muestra la ruta sintética que se llevó a cabo para la obtención de los derivados de tacrina con diferentes derivados de aminas como: melatonina, triptamina, cumarina y 3,4-Dimetoxifenetilamina.



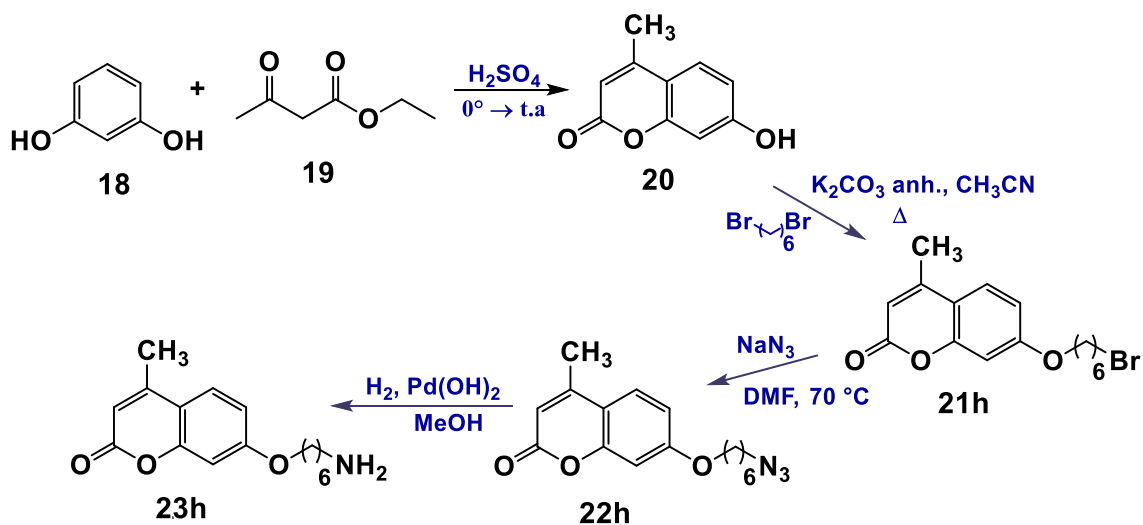
Esquema 3.6. Ruta sintética de los derivados de tacrina.

Para llevar a cabo esta ruta sintética primero se tuvo que realizar la obtención de derivados que no se contaban para la síntesis de las escuaramidas. Por lo que se comenzó con la preparación del escuaramidato de dimetilo como se muestra en el esquema 3.7, en este, el ácido escuarico se coloca a reflujo con ortoformiato de trimetilo en metanol. La reacción duro por 24 h en las cuales, en el comienzo de la reacción el ácido no es soluble en este disolvente pero conforme va avanzando el tiempo de reacción, la mezcla se torne un poco rosa y siendo soluble el escuaramidato. Al purificar el compuesto, la mezcla se evaporo siendo un líquido rosada pero al purificarlo el derivado 40 es un sólido blanco, el cual al estar en ambientes ácidos el compuesto 40 se hidroliza para regresar al ácido escuarico de partida.



Esquema 3.7. Síntesis del derivado escaramdato de dimetilo.

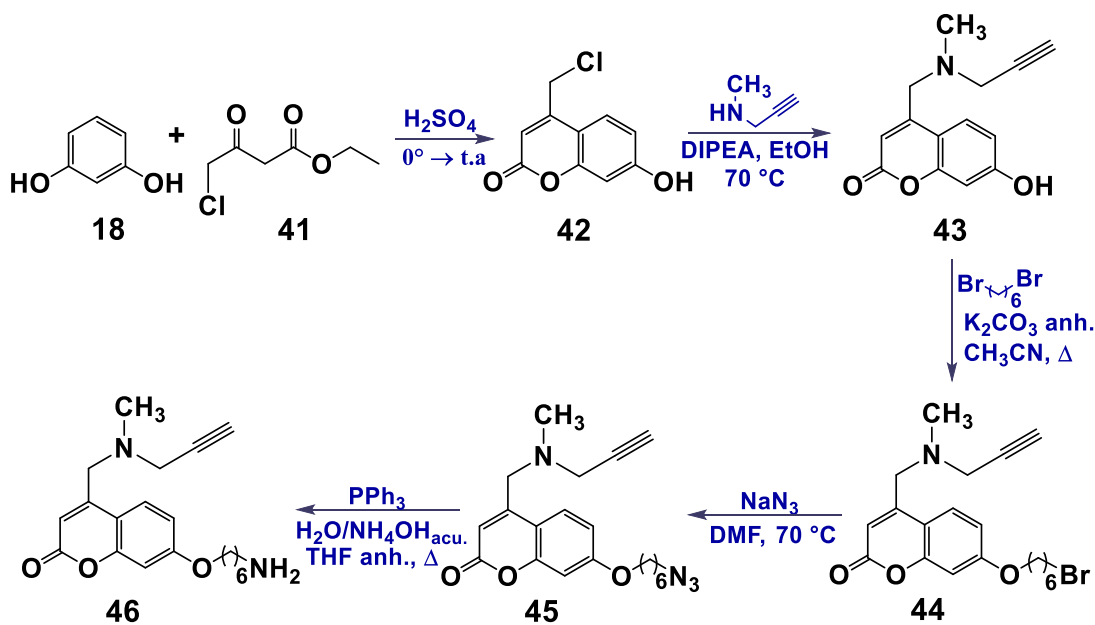
La síntesis del derivado de cumarina **23h** se aisló como se muestra en esquema 3.8, se utilizaron las condiciones descritas anteriormente para la obtención de los derivados de cumarinas. Donde se aísla primero la cumarina **20** que es la materia de partida, posteriormente se somete a una alquilación con un tamaño de cadena hidrocarbonada de 6 carbonos dando en rendimientos cuantitativos (**21h**), seguido de una sustitución nucleófila con NaN_3 para dar el derivado **22h** en rendimientos cuantitativos. Este derivado se somete a una reacción del grupo azido por medio de una hidrogenación catalizada con paladio para dar la amina **23h** sin purificación alguna en rendimientos nuevamente cuantitativos.



Esquema 3.8. Síntesis del derivado **23h**.

Otro derivado de cumarina que se sintetizó fue el derivado **46** como se muestra en el siguiente esquema 3.9. En el cual se utilizaron las mismas condiciones para obtener la cumarina **42** en medio ácido, en este caso ácido sulfúrico en donde la adición de la mezcla de resorcinol **18** y el

β -ceto-éster **41** se hace a cero grados y obteniendo el derivado **42**, se neutralizo y se extrajo con un rendimiento de 50%.

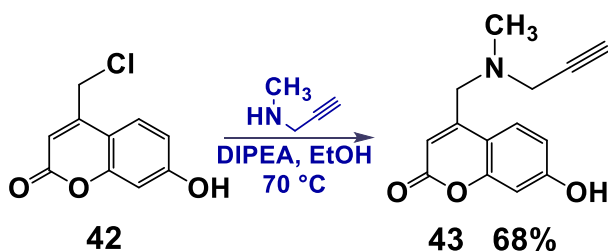


Esquema 3.9. Ruta sintética del derivado **46**.

Una vez aislado el derivado **42**, se planteó dos tipos de rutas sintéticas para la obtención del derivado **44**; la primera consiste en la sustitución del cloro de la cumarina y después alquilar, la segunda fue alquilar primero y después sustituir; pero dentro de este planteamiento se analizó que la misma cumarina una vez convertido el fenol de esta en el ion fenoxido, podría atacar a la posición donde está el cloro por lo que no se podría obtener una mezcla de compuestos. Decidiendo optar por el primer planteamiento tal como se muestra en el esquema 3.10, en donde se utilizaron las condiciones reportadas por Rama Krishna Boddu²²² en donde se lleva a cabo una sustitución nucleofílica del átomo de cloro por la de *N*-Metilpropargilamina dando **43**, en estas condiciones solo se variaron los equivalentes de 1.3 a 2 eq. de la *N*-Metilpropargilamina y de 1.6 a 3 eq. de la DIPEA para tratar de consumir la cumarina de partida con un tiempo de reacción de 7 h. La disolución se comienza a tornar amarilla cuando se adiciona la mezcla de la DIPEA y la de *N*-Metilpropargilamina, al evaporar el disolvente queda un líquido amarillo, que al purificarlo queda como una espuma color crema; en la purificación del compuesto se tuvo que variar la polaridad, debido a que los R_f de la

²²² Boddu K. R.; Thummuri D.; Naidu V.G.M.; Sistla R.; Uppuluri M. V.; *Bioorg. Chem.* **2018** 78, 94–102.

materia y el derivado **43** son muy cercanos que prácticamente iguales, en un sistema ciclohexano/AcOEt dando el compuesto **43** en un rendimiento de 68%.



Esquema 3.10. Obtención del derivado **43**.

Este compuesto no se encuentra reportado en la literatura por lo que se caracterizó por RMN. En el espectro de RMN de ^1H de la figura 3.8 se observan las señales del CH del triple enlace 2.30 ppm, a otra señal de unos de los CH_2 que está unido a ese triple enlace en 3.35 ppm y la otra aparece en 3.64 ppm como una señal doble, y por último el CH_3 que está unido al átomo de nitrógeno aparece en 2.34 ppm confirmando que sea sustituido el átomo de cloro dando en derivado **43**. El resto de señales pertenecen a la cumarina que no han sufrido cambio significativo.

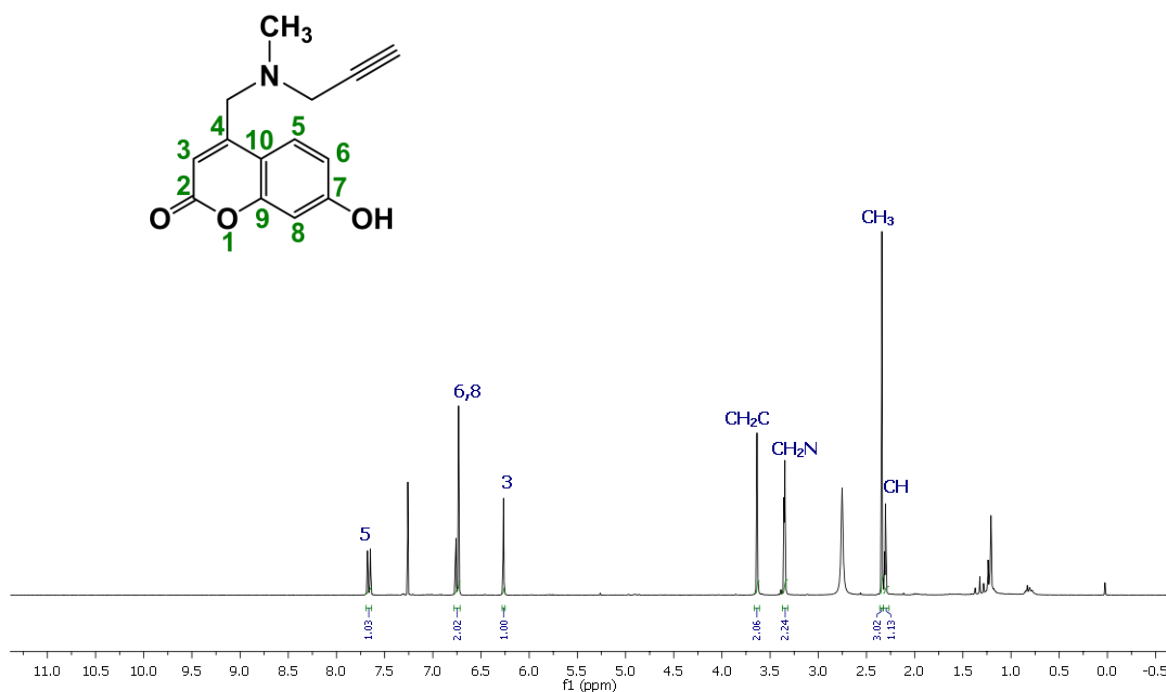


Figura 3.8. Espectro de RMN de ^1H del derivado **43**.

En la figura 3.9 se muestra el espectro de RMN de ^{13}C en donde las señales del CH perteneciente al triple enlace se muestra en 74.1 ppm, la otra señal del carbono cuaternario de ese triple enlace está en 77.6 ppm. Además de estas señales están las de 56.3 ppm que pertenecen a un CH_2 unido al carbono 4 de la cumarina, el otro CH_2 en 41.9 ppm que es el que esta enlazado el triple enlace y por último en 45.5 ppm pertenece al CH_3 que está unido al átomo de nitrógeno confirmando que sea llevado acabo la reacción de sustitución nucleófila de átomo de cloro, el resto de señales son del esqueleto de la cumarina que nos sufren cambio significativo.

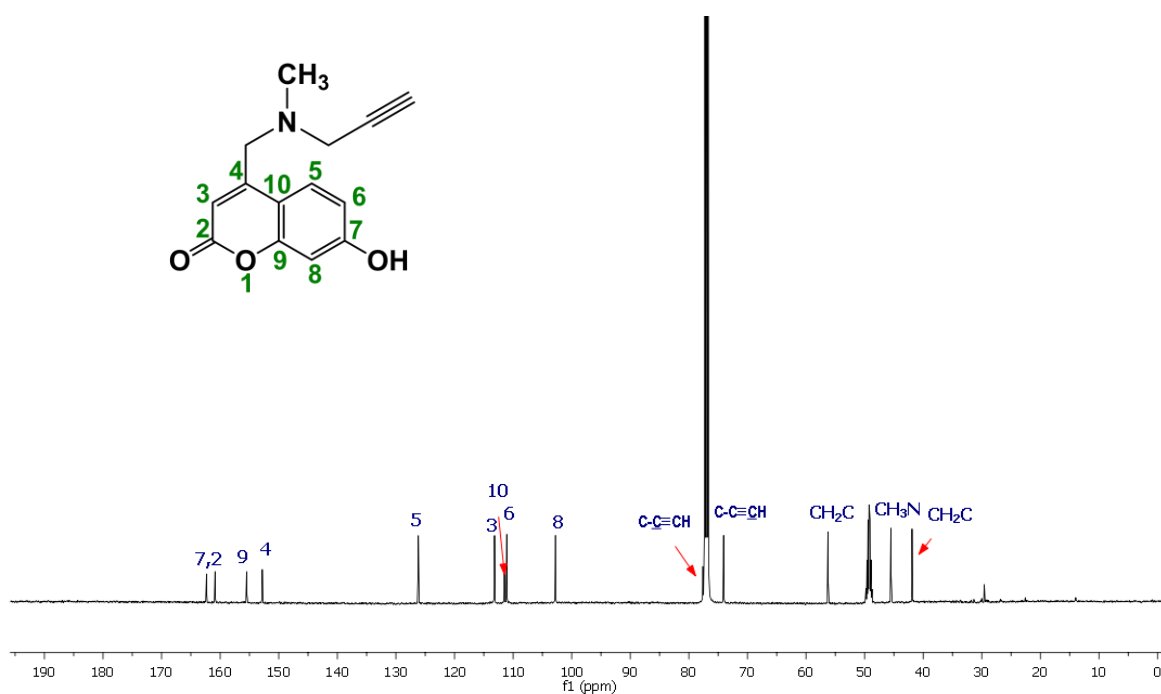
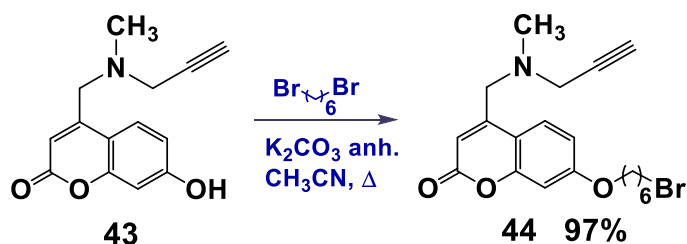


Figura 3.9. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **43**.

El derivado **43** se sometió a una reacción de alquilación con el 1,6-dibromohexano en condiciones ya utilizadas para este tipo de alquilación tal como se platea en el esquema 3.11, en donde la reacción procedió como se esperaba, dando el compuesto **44** con un aspecto aceitoso de color amarillo y un rendimiento de 97% con un tiempo de reacción de 3 h.



Esquema 3.11. Obtención del derivado **44**.

Este compuesto también se caracterizó por no estar descrito, en la figura 3.10 se muestra el espectro de RMN de ^1H donde se puede observar las señales pertenecientes a la *N*-Metilpropargilamina en 2.32 ppm para la señal hidrogeno del CH del triple enlace, en 3.67 ppm y 3.39 ppm para los protones de los CH_2 : uno enlazado al carbono de la posición 4 de la cumarina y el otro unido al triple enlace, además de la señal de los hidrógenos del CH_3 en 2.39 ppm que nos confirma que se ha mantenido el fragmento de la *N*-Metilpropargilamina. Las señales en 4.02 ppm y 3.43 ppm de los protones de los CH_2 unidos uno al átomo de oxígeno del grupo fenol de la cumarina y el otro al átomo de bromo, confirmando que se adiciono el espaciador a la cumarina **43**, el resto de señales pertenecen a las hidrógenos del esqueleto de la cumarina que no sufrieron cambios significativos.

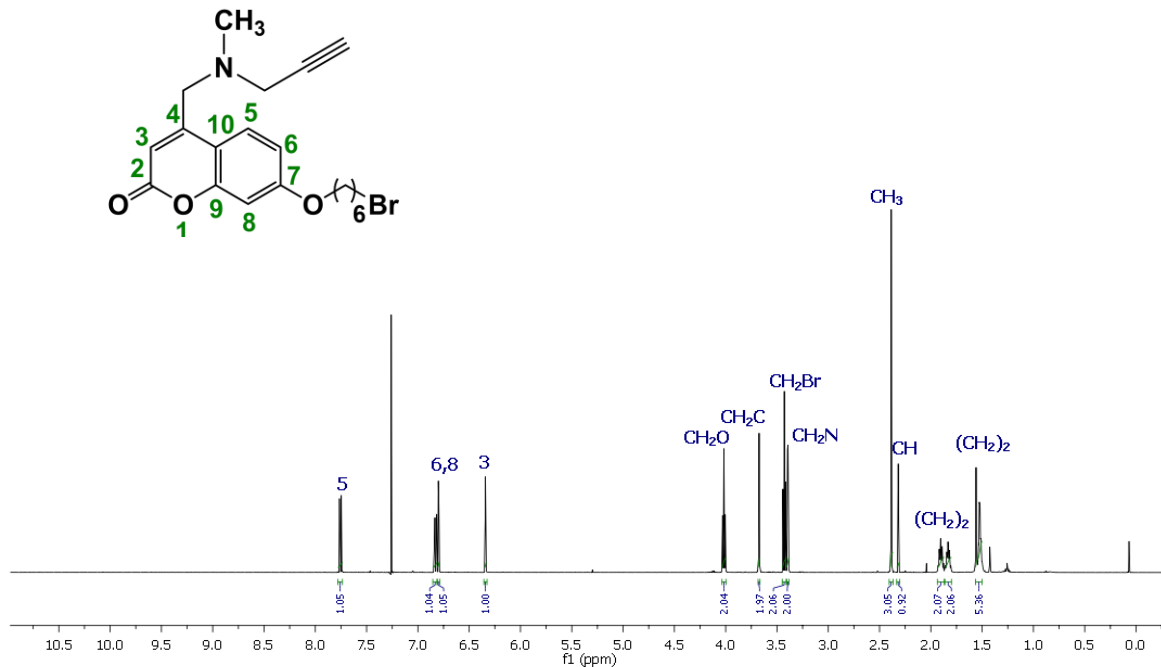


Figura 3.10. Espectro de RMN de ^1H del derivado **44**.

En la figura 3.11 se muestra el espectro de RMN de ^{13}C del derivado **44**, en el cual se observan las señales principalmente de la cadena hidrocarbonada de 68.3 ppm que es de una señal de CH_2 unido al átomo de oxígeno que es la que se desplaza a frecuencias altas, otra señal de CH_2 que se ve afectada es la que está unida al átomo de bromo en 33.7 ppm y el resto de la cadena se encuentra en 32.6 ppm a 25.2 ppm terminando de confirmar que se llevó a cabo la reacción de alquilación del grupo fenol de la cumarina. Las señales de la *N*-Metilpropargilamina principalmente la del triple enlace está en 77.7 ppm del carbono cuaternario de este, seguido de a señal del carbono del CH en 74.1 ppm, la señal de los dos carbonos de los CH_2 en 42.0 ppm y en 56.5 ppm pertenecientes a la cumarina, por último la señal del carbono del CH_3 en 45.6 ppm verificando que estas condiciones no afectaron en nada a este fragmento y el resto de señales pertenecen a la cumarina que no sufren cambio alguno.

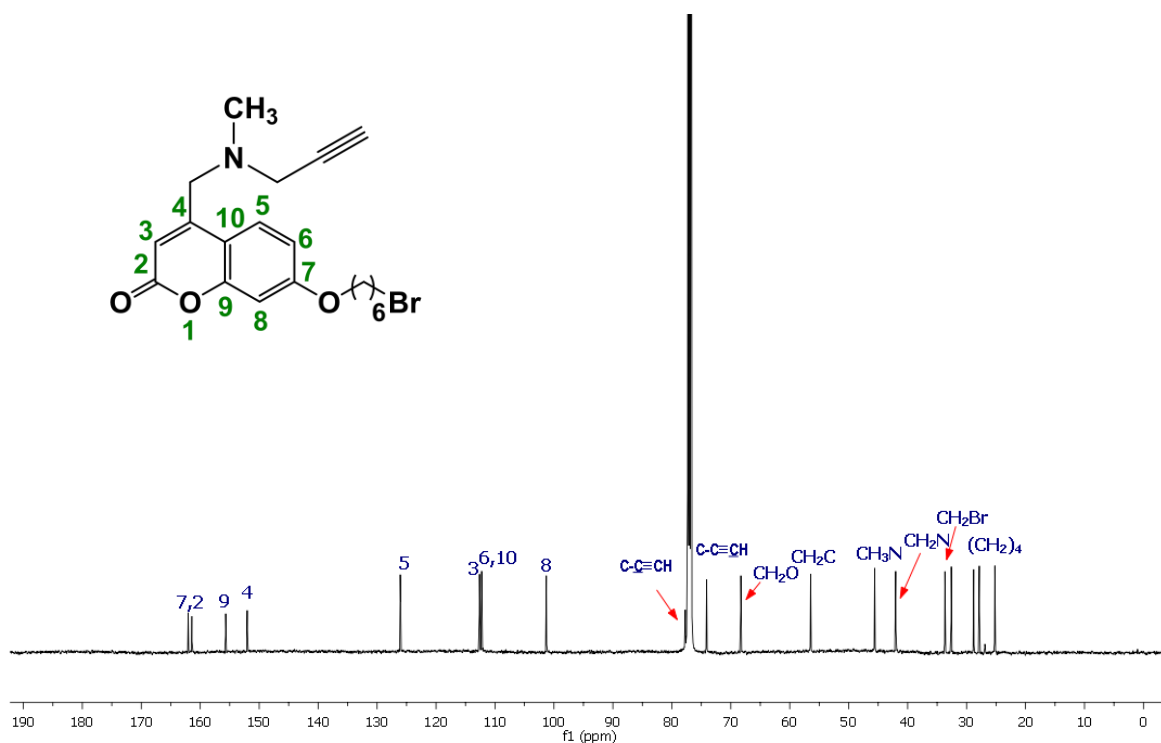
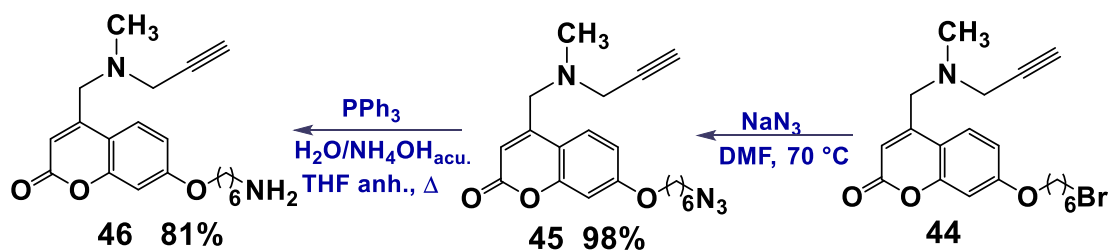


Figura 3.11. Espectro de RMN de ¹³C del derivado 44.

Para la obtención del derivado **45** nuevamente se utilizaron las condiciones descritas en el capítulo anterior, con NaN₃ a una temperatura de 70 °C por un tiempo de reacción de 4 h para dar un compuesto de apariencia aceitosa y de color amarillo-naranja con un rendimiento de 98%. Una vez obtenido este compuesto se levo acabo una reducción del grupo azido para dar la amina **46**, en la cual se utilizaron las condiciones reportadas por Pablo Rios²²³ para realizar la reacción de Staudiger para evitar que el triple enlace se redujera también. Por tanto primero el derivado **45** se colocó con la PPh₃ para formar el iminofosforano para después adicionar H₂O y NH₄OH y llevar acabo la hidrolisis de ese intermediario. La formación de ese intermediario se llevó en 4 h de reacción, mientras que la hidrolisis se mantuvo en un tiempo de 7 h debido a que el intermediario y la amina tiene el mismo R_f en diferentes sistemas de disolventes, por lo que se decidió dejarlo reaccionar más tiempo. Este derivado **46** se obtiene como un aceite color marrón en un 81% tal como se muestra en el esquema 3.12.

²²³ Rios P.; Carter T. S.; Mooibroek T. J.; Crump M. P.; Lisbjerg M.; Pittelkow M.; Supekar N. T.; Boons G.-J.; Davis A. P.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016** 55, 3387-3392.



Esquema 3.12. Obtención del derivado **46**.

En la siguiente figura 3.12 se muestra el espectro de RMN de ^1H del derivado **46**, en el cual se muestra que se sigue manteniendo la *N*-Metilpropargilamina en 2.32 ppm del CH del triple enlace, otra señal es la del CH_3 en 2.39 ppm además del CH_2 en 3.39 ppm que está unido al triple enlace y otro CH_2 en 3.38 ppm unido al carbono de la posición 4 de a cumarina. Las señales de la cadena hidrocarbonada que se afectan son las del CH_2 que está unido al átomo de oxígeno en 4.02 ppm y la del CH_2 unido al grupo azido en 3.39 ppm como señales pertenecientes a un triplete, el resto de señales son del esqueleto de la cumarina que no sufren un cambio significativo.

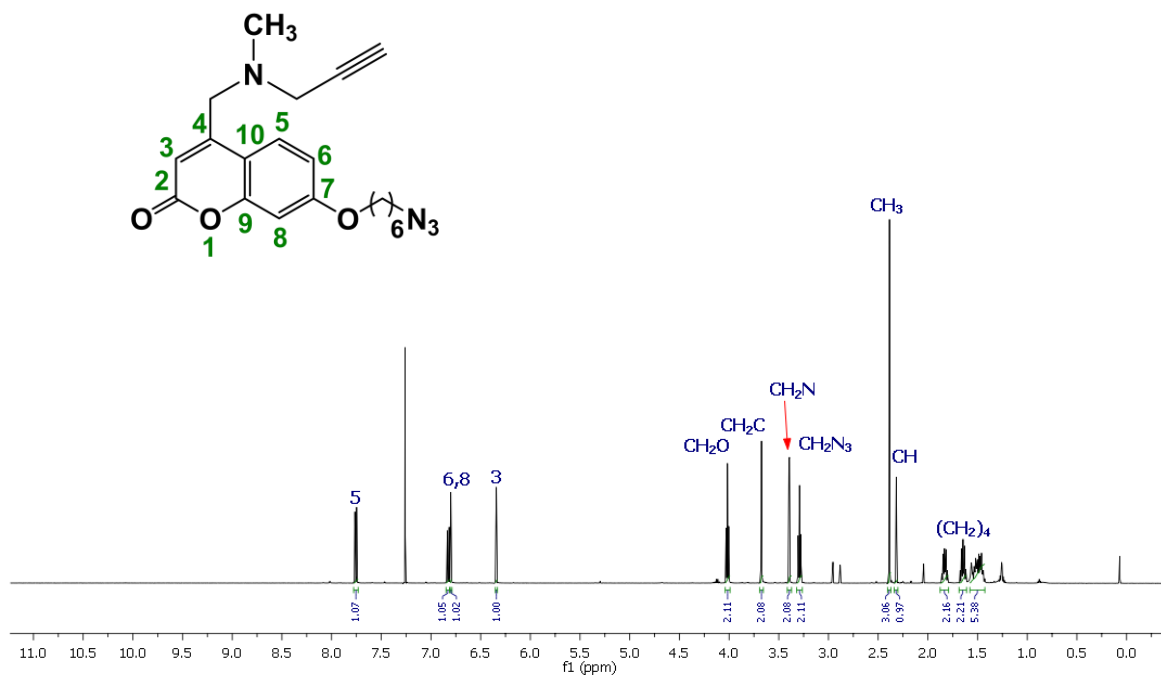


Figura 3.12. Espectro de RMN de ^1H del derivado **46**.

En el espectro de RMN de ^{13}C en la figura 3.13 se muestra las señales de la cadena hidrocarbonada de los CH_2 que se ven afectados a frecuencias altas un en 68.3 ppm para el que está unido al átomo de oxígeno y el otro se mueve a 45.6 ppm cuando está unido con el grupo azido cuando antes aparecía en 33.7 ppm. Otras señales que permanecen y no se ve afectadas por las condiciones utilizadas son las de la *N*-Metilpropargilamina en 74.1 ppm para el carbono del CH, el carbono que pertenece al CH_3 en 51.3 ppm, el carbono del triple enlace aparece en 77.7 ppm, mientras que el carbono del CH_2 que está unido a ese triple enlace en 42.0 ppm y otro CH_2 que se muestra en 56.5 ppm es el carbono que está unido al carbono de la posición 4 de la cumarina y el resto de señales pertenecen al esqueleto de la cumarina

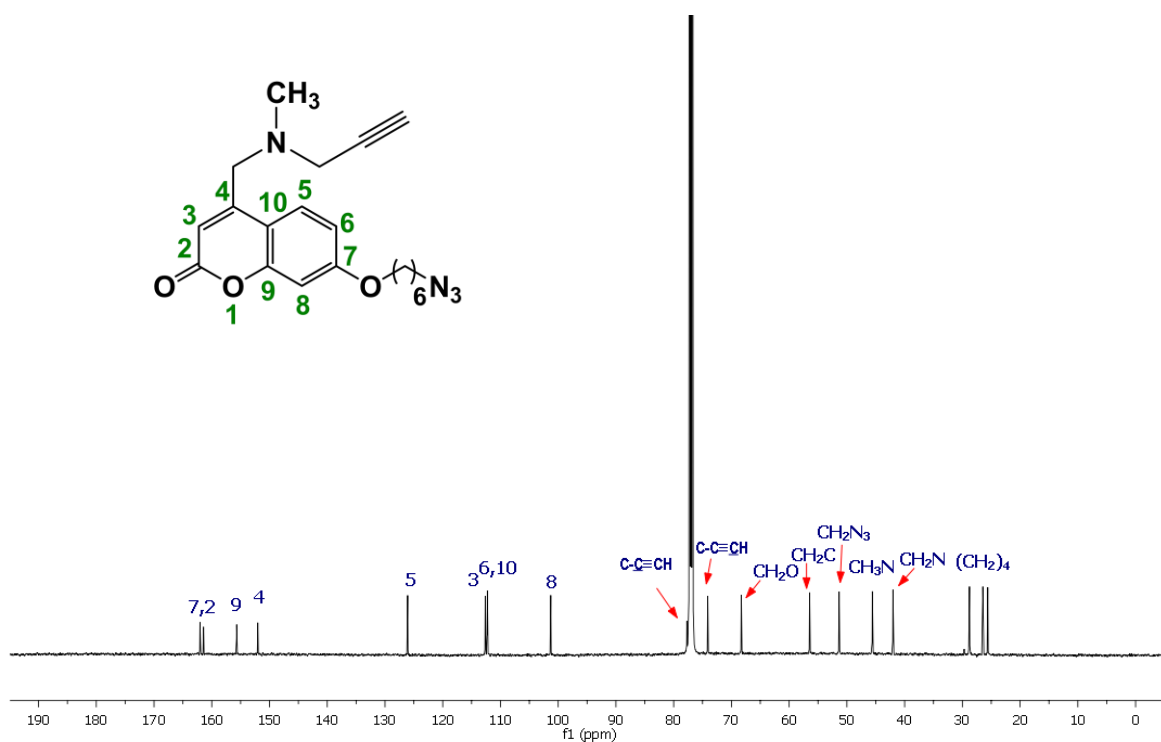
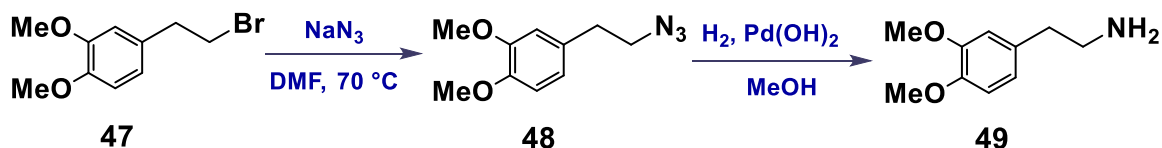


Figura 3.13. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado 46.

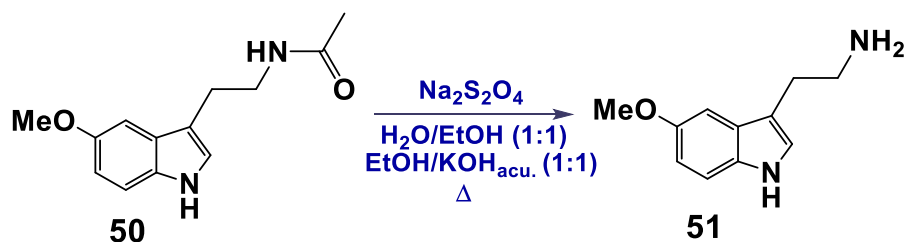
El 3,4-Dimetoxifenetilamina se sintetizo a partir de 3,4-Dimetoxifenetilbromo que es el compuesto con el que se contaba. El compuesto **47** se hizo reaccionar con las condiciones ya utilizadas anteriormente con NaN_3 a 70 °C, en la cual la mezcla al calentar se puso color azul y después de 30 min la mezcla se pone incolora color crema, y la reacción dura 1 h y 30 min con rendimientos cuantitativos. Después se somete a una reducción de hidrogenación catalizada con

paladio en MeOH, en donde reacciono durante una noche dando un rendimiento cuantitativo sin ninguna purificación se utilizó (esquema 12).



Esquema 3.12. Obtención del derivado 49.

También se llevó la hidrólisis de la melatonina para dar 2-(5-Metoxi-1*H*-indol-3-il)etanamina como se muestra en el esquema 3.13, se utilizaron las condiciones reportadas por Nithiananda Chatterje²²⁴ en la cual se utilizan mezclas de sistemas de H₂O, EtOH y KOH con Na₂S₂O₄ catalíticamente. Esta reacción duró 16 h y se obtuvo el producto 51 con un rendimiento de 99% con una apariencia de espuma de color café claro que no necesitó purificación adicional.



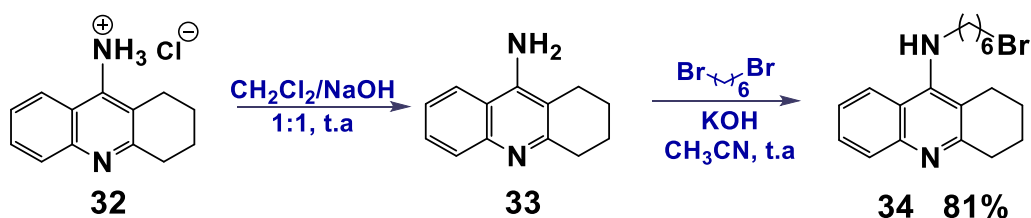
Esquema 3.13. Obtención del derivado 51.

En los derivados en los cuales se tenía que adicionar un espaciador para la obtención de las aminas, se decidió ocupar uno de un tamaño de 6 carbonos para poder hacer el análisis de estructura-actividad con un tamaño de cadena que no fuera muy corto ni muy largo, así determinar el compuesto cabeza de serie y poder hacer variaciones posteriores en otro trabajo.

Una vez obtenido las aminas se dio a la tarea de sintetizar la amina derivada de la tacrina 36 para acoplarlo al escaramidato de dimetilo 40. La preparación de este compuesto comienza con la desprotonación del hidrocloreto de tacrina para dar la tacrina libre 33, en donde la tacrina 32 se

²²⁴ Chatterje N.; Alexander G.; Wang H.; *Neurochem. Res.* **2001** 26, 10, 1171–1176.

coloca en una reacción bifásica, en la cual se va disolviendo poco a poco conforme se va desprotonando durando alrededor de 7 h a temperatura ambiente. El derivado **33** se colocó a reaccionar en condiciones ya reportadas por el grupo de investigación²²⁵ como se muestra en el esquema 3.14, la cual consiste en adicionar una basa más fuerte a la que se ocupado en otras alquilaciones anteriormente, con otro disolvente como acetonitrilo y a temperatura ambiente. La reacción es dejada en agitación por 24 h en la metodología reportada obteniendo un rendimiento de alrededor de 28%, este rendimiento bajo se debe a la amina de la tacrina es poco nucleofílica por lo que le cuesta reaccionar con el 1,6-dibromohexano. Este rendimiento fue incrementado a un 81% con solo darle más tiempo de reacción de hasta 5 días mejorándolo notablemente, este mejoró debido a que al ser menos nucleofílica la amina **33** como se mencionó anteriormente, al dejar más tiempo en reacción se ve favorecido hacia los productos.

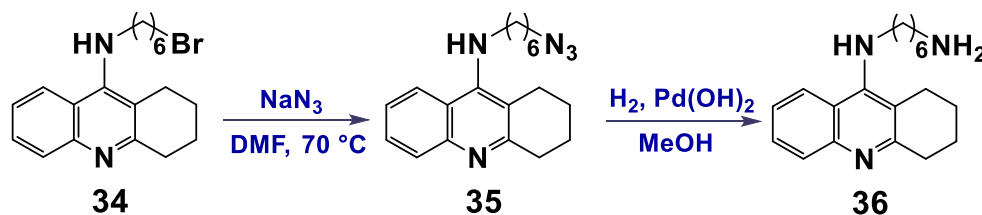


Esquema 3.14. Obtención del derivado alquilado **34**.

El derivado **34** nuevamente fue sometido a condiciones ya utilizadas en otros intermediarios, con azida de sodio calentada a 70 °C dejándola reaccionar durante toda la noche debido a que el derivado **34** y el derivado **35** tiene el mismo R_f en diferentes sistemas que se utilizaron en cromatografía de capa fina, para asegurarse de que reaccionara todo se dejó un largo tiempo de reacción, ya que en esas condiciones es estable el compuesto y no se degrada dando el compuesto **35** en rendimientos cuantitativos con una apariencia aceitosa de color marrón. Este compuesto se pasó a la siguiente reacción sin una purificación adicional, se sometió a una reducción por hidrogenación catalítica con paladio; en la cual nuevamente se dejó reaccionar durante de toda una noche para asegurarse que se redujera toda la azida derivado a que estos dos derivados tiene R_f

²²⁵ Roldán-Peña J. M.; Romero-Real V.; Hicke J.; Maya I.; Franconetti A.; Lagunes I.; Padrón J. M.; Petralla S.; Poeta E.; Naldi M.; Bartolini M.; Monti B.; Bolognesi M L.; López Ó.; Fernández-Bolaños J. G.; *Eur. J. Med. Chem.* **2019** 181, 111550.

iguales, obteniendo el derivado **36** con rendimientos cuantitativos y de un aspecto aceitoso de color café (esquema 3.15).

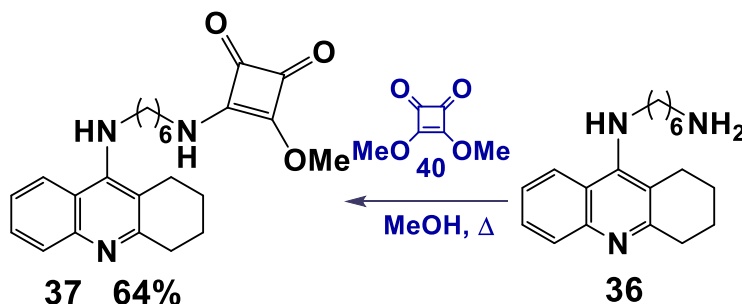


Esquema 3.15. Obtención del derivado alquilado **36**.

Una vez obtenido la amina de la tacrina **36** se acoplo al escuaramidato de dimetilo **40**, primero se hizo reaccionar colocando la mezcla de estos dos derivados en MeOH a reflujo durante un tiempo de reacción de 24 h al ver que aún había compuesto se pasó al tubo Schlenk calentando a 100 °C por otras 24 h, en las cuales aparentemente no quedaba materia prima por lo que se pasó a la siguiente reacción y con la primera amina que se probó fue con el 3,4-Dimetoxifenetilamina. En esta segunda reacción, se dejó a reflujo durante 42 h en el mismo disolvente en la cual se mostraba la formación de un nuevo producto pero al mismo tiempo se observaban impurezas adicionales, porque lo que su purificación se complicaba al bajar las impurezas junto con el compuesto a pesar de que se varió la polaridad del eluyente. Posteriormente se decidió mantener las condiciones de calentar la mezcla de reacción en el tubo Schlenk a 100 °C la cual se dejó por un tiempo de 41 h pero no se consumió la tacrina **36**, se mantuvo la formación de un producto menos polar que al principio, se pensó que era el escuaramidato de dimetilo **40** pero al purificar esta reacción en realidad se formó el homodímero de tacrina-escuaramidato. De este derivado existen ya reportes en la literatura de homodímeros de tacrina-escuaramidato, ejemplos de ellos son los reportados por Barbora Svobodova¹⁵ y otro por Marco A. Ceschi²²⁶ por lo que no se caracterizó además de que el rendimiento es de 9%. Al observar anteriormente que meter la mezcla de la obtención de **37** a la siguiente reacción de sustitución sin previa purificación, daba impurezas muy cercanas al compuesto y se volviera complicado purificarlo se decidió purificar este compuesto para evitar eso, dando **37** con un rendimiento de 61% en esta primera prueba y el homodímero mencionado anteriormente.

²²⁶ Ceschi M. A.; Pilotti R. M.; Lopes J. P. B.; Dapont H.; da Rocha J. B. T.; Afolabi B. A.; Guedes I. A.; Dardenne L. E.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2020** 00, 00, 1-10.

Tomando en cuenta estas dos pruebas para la obtención de **37**, se colocó el escuaramidato **40** y la tacrina **36** a reflujo en MeOH durando 50 h y dando al producto **37** ahora con rendimiento de 64%, apareciendo los mismos productos mostrados desde la primera prueba. Tomando en cuenta estos ensayos se decidió mantener las condiciones de reflujo en metanol y purificar en esta primera etapa para después adicionar las diferentes aminas y así evitar que se complique más la purificación del producto final (esquema 3.16).



Esquema 3.16. Obtención del derivado **37**.

Este compuesto se llevó a RMN de ^1H para comprobar que se obtuvo el compuesto deseado (no se caracterizó en su totalidad con las demás técnicas espectroscópicas porque este intermediario no era de nuestro interés ya que existen algunos reportes con derivados de tacrina), en este espectro nos arrojó que para los compuestos monosustituídos como el derivado **37** con cadena lateral flexible se observan dos conjuntos de señales en resonancia para el grupo metoxi. Los cambios químicos de los protones se observan en 4.33 ppm y 4.27 ppm son establecidos por la existencia de conformeros de esta estructura, Carlos J.A. Ribeiro²²⁷ reporta que para compuestos monosustituídos sintetizados con cadenas laterales flexibles, se observan dos señales para los grupos NH, NCH_2 y metoxi o butoxi, en donde sus resultados revelan la presencia de una mezcla de isómeros. El estable de la estereoquímica del isómero principal se basó en que debido a la influencia paramagnética del grupo carbonilo de la escuaramida, los *N*-sustituyentes en una conformación *syn* están desprotegidos en relación con su contraparte *anti* y la mejor disposición de puentes de H intermoleculares parece favorecer esta conformación *syn*.^{53,228} Esto se ve reflejado en la figura 3.14

²²⁷ Ribeiro C. J.A.; Kumar S. P.; Gut J.; Gonçalves L. M.; Rosenthal P. J.; Moreira R.; Santos M. M.M.; *Eur. J. Med. Chem.* **2013** 69, 365-372.

²²⁸ Tomas S.; Prohens R.; Vega M.; Rotger M. C.; Deya P. M.; Ballester P.; Costa A.; *J. Org. Chem.* **1996** 61, 9394-9401.

en donde se muestra las dos señales del grupo metoxi como se mencionó anteriormente en 4.33 ppm y en 4.27 ppm, con lo que se puede pensar que al tener una cadena flexible con grupos aceptores de hidrogeno al final de la cadena, los estudios dicen aquellos que pueda tener un grupo aceptor de hidrógenos pueden formar puentes de hidrogeno intramoleculares con el NH que está unido al ciclobutenediona o los carbonilos de este ciclo y favorecer así la conformación *anti*. Pero eso surge porque la cadena es pelicularmente pequeña que favorece la formación de ciclos estables, pero en el compuesto **37** es una cadena larga y no contiene grupos aceptores que no favorecía posibles puentes de hidrogeno intermoleculares del NH de la tacrina, si no que sería más favorecido estos puentes con el carbonilo de otra molécula favoreciendo la conformación *syn* como se ve en la figura 3.15 o que el NH de la tacrina forme puentes de hidrogeno con los carbonilos del ciclo al ser más larga esta cadena y tener mucha flexibilidad.

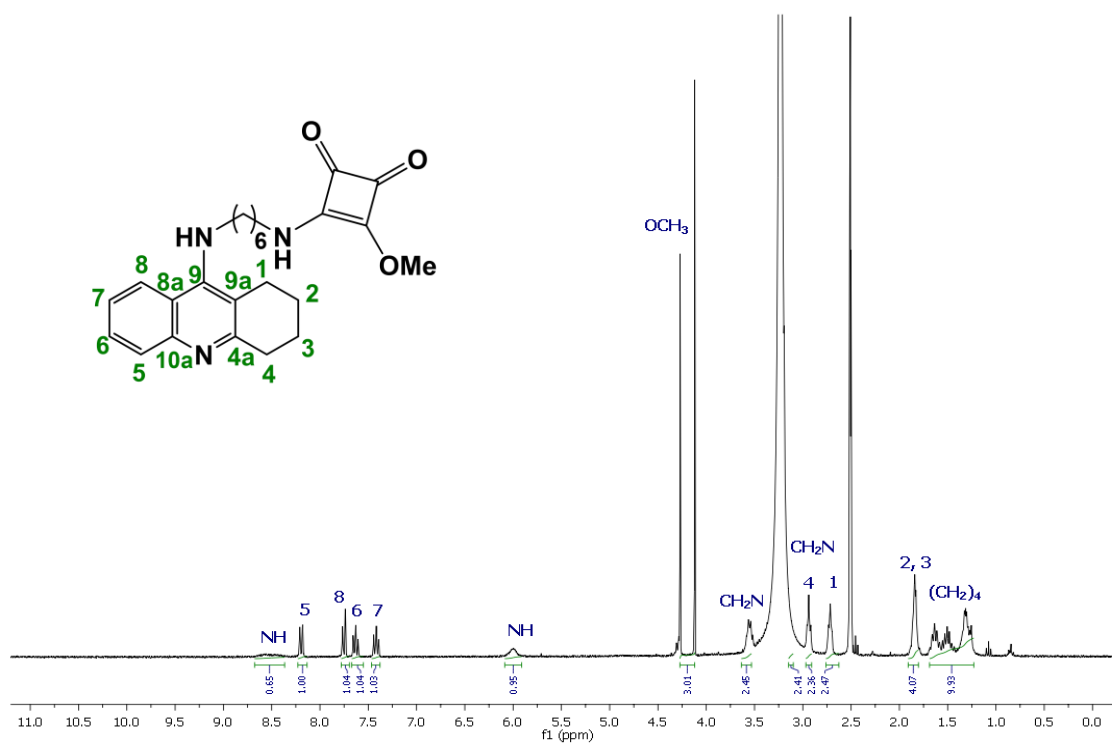


Figura 3.14. Espectro de RMN de ^1H del derivado **37**.

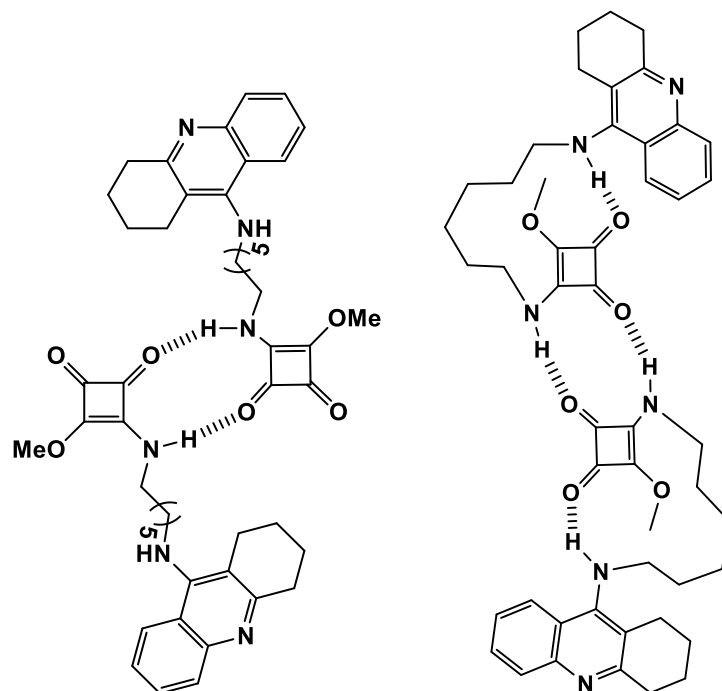
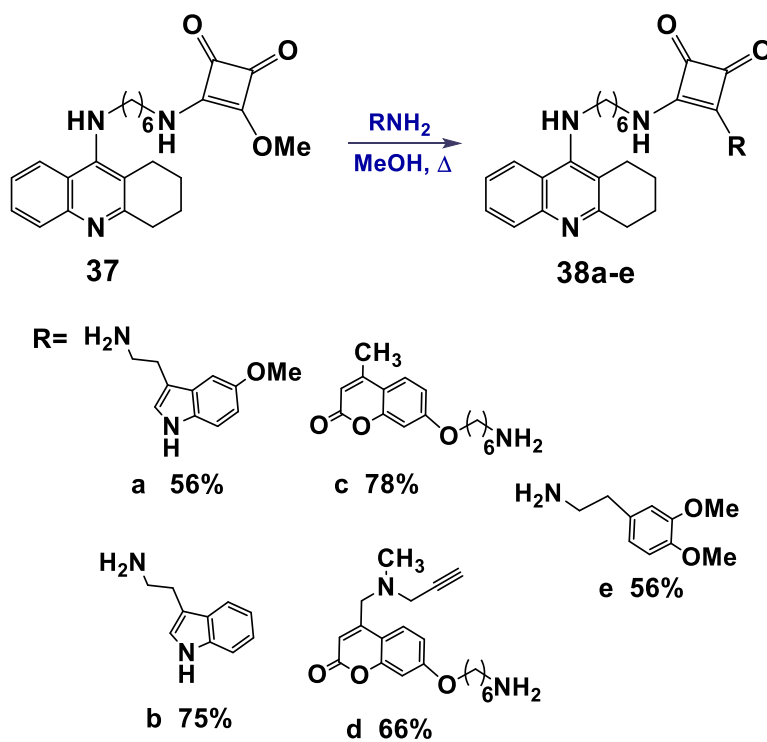


Figura 3.15. Representación del derivado **37** estabilizado por enlace de hidrógeno.

Logrando aislar el compuesto **37** se realizó una escala más grande para poder dividir ese compuesto entre las aminas que se utilizaron. Se volvieron a probar las condiciones que se realizaron con 3,4-Dimetoxifenetilamina pero ahora con la melatonina hidrolizada **51**, colocándola con el derivado **37** previamente purificado en metanol a reflujo durante un tiempo de 39 h. Pero ahora con un exceso de la amina **51**, comenzando de un equivalente hasta llegar a 2 equivalentes, en la cual no hubo complicación alguna de obtener el derivado **38a** con un rendimiento de 56% con un aspecto de espuma color marrón. Estas mismas condiciones se probaron con las demás aminas, tal como se muestra en el esquema 3.17 que fueron reproducibles, con tiempo de reacción largos de 30-53h con rendimientos de 56-78%.



Esquema 3.17. Obtención de híbridos de escuaramidatos de tacrina **38a-e**.

En la figura 3.16 se muestra el espectro de RMN de ^1H del derivado **38a**, el resto de espectros de los demás derivados se muestran en el anexo. En este podemos ver nuevas señales de protones aromáticos en 7.20 ppm, 7.04 ppm en esta señal también cae la señal del protón del CH del ciclo de la melatonina y 6.71 ppm en otro aromático de este compuesto. Otras señales que se observan son las de los hidrógenos del CH_3 del grupo metoxi en 3.80 ppm, en 3.33 ppm se encuentran los protones del CH_2 unido al grupo amino además de que en esa señal se empalma la otra señal del CH_2 unido del NH de la cadena hidrocarbonada de la estructura de a tacrina y en 3.01 ppm esta los protones del CH_2 que está unido al ciclo de la melatonina, esto nos confirma que se ha llevado la reacción de sustitución del grupo metoxi. Las demás señales pertenecen al esqueleto de la tacrina y a la cadena hidrocarbonada que se adiciono a ella, las cuales no sufren cambio significativo.

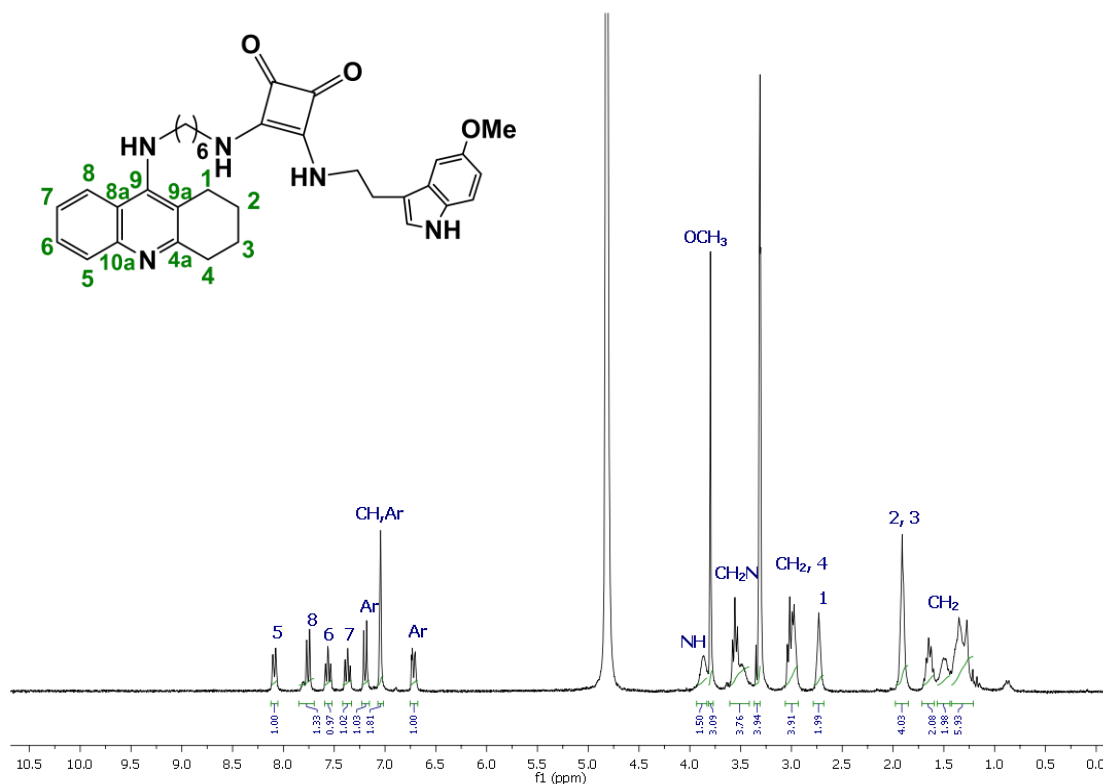


Figura 3.16. Espectro de RMN de ^1H del derivado **38a**.

En el espectro de RMN de ^{13}C como se ve en la figura 3.17 se ve que se ha sustituido el grupo metoxi por la molécula de derivado de melatonina con las señales de los carbonos aromáticos entre 153.2 ppm a 101.0 ppm, otras señales son las del doble enlace del anillo de la melatonina que para el carbono cuaternario está en 112.6 ppm y para el carbono del CH en 124.3 ppm. A frecuencias más bajas encontramos las señales de 25.8 ppm que pertenece al carbono CH_2 que está unido al carbono cuaternario del ciclo de la melatonina y en 44.9 ppm el otro carbono de CH_2 unido al átomo de nitrógeno, además de la señal del carbono del CH_3 del grupo metoxi en 56.3 ppm. El resto de señales corresponden al esqueleto de la tacrina y a la cadena hidrocarbonada que no sufren cambios significativos.

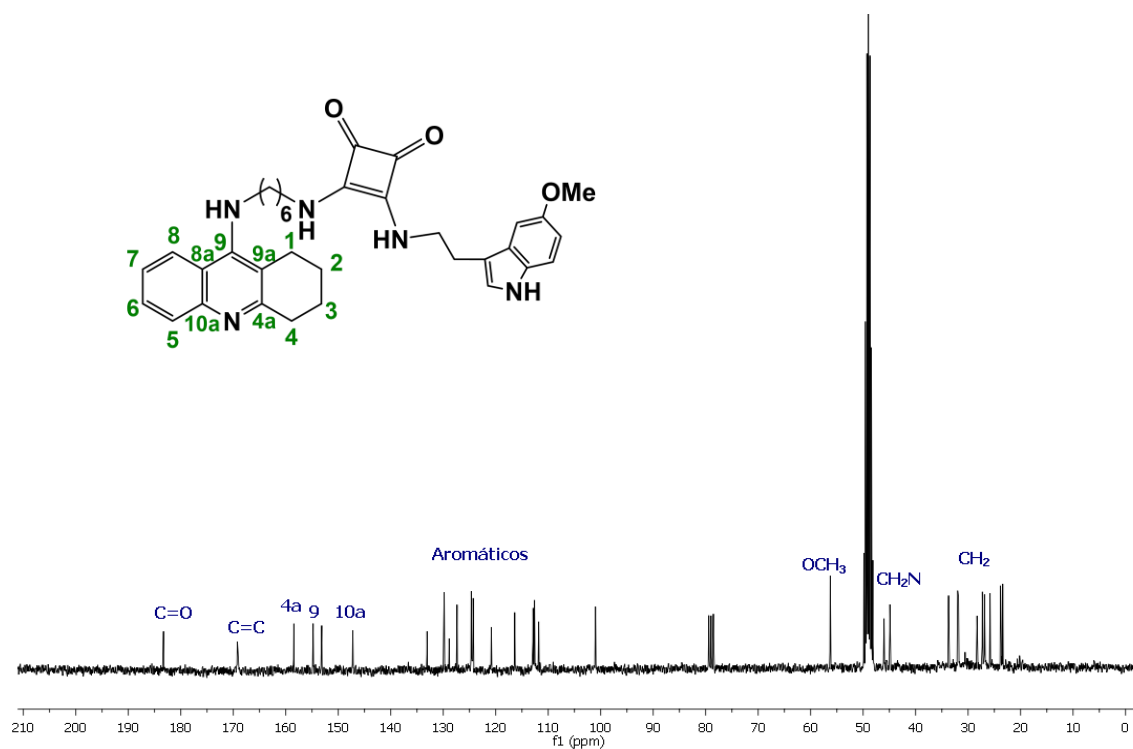
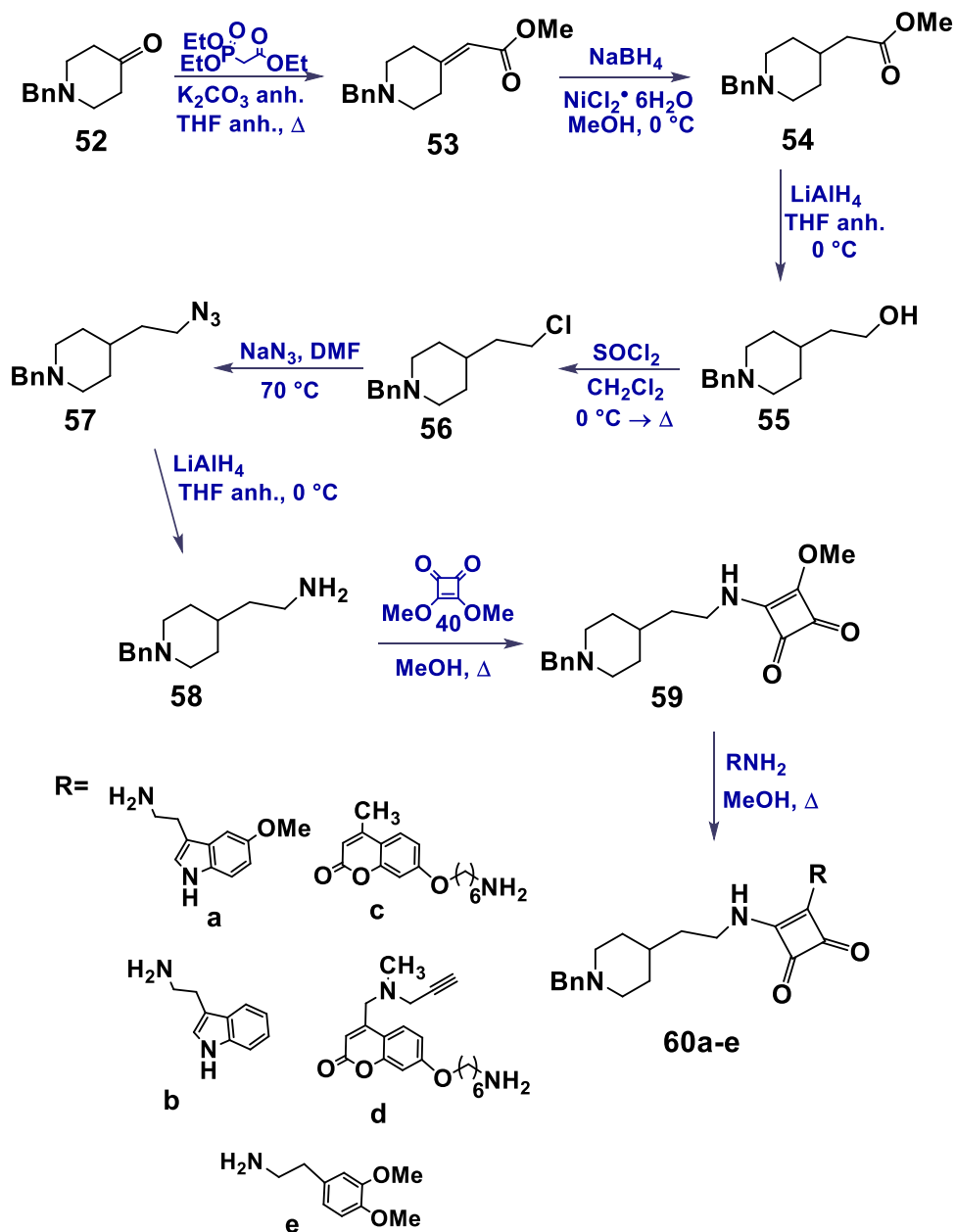


Figura 3.17. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **38a**.

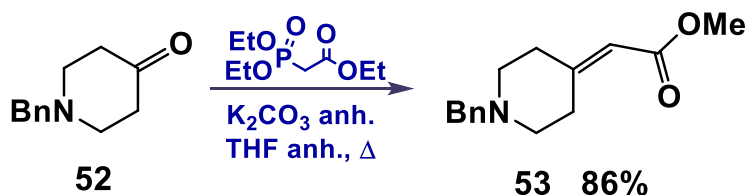
Por otro lado se realizó la síntesis de nuevos híbridos de escuaramidatos de un derivado de donepecilo tal como se muestra en el siguiente esquema 3.18, en este se muestra la ruta que se siguió para la obtención de los derivados **60a-e**.



Esquema 3.18. Obtención de híbridos de escaramidatos de derivados de donepecilo **60a-e**.

Esta ruta comienza con la *N*-benzylpiperidin-4-ona **52**, que fue sometida a una reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) dando el derivado **53** tal como se muestra en el esquema 3.19, dentro de esta reacción es importante que no exista trazas de agua en el medio si no el rendimiento de esta reacción se ve afectado debido a la estabilidad del intermediario que es sensible. Debido a esto los disolventes deben ser secos y aun así no se termina de consumir toda la materia, la

metodología que se utilizó es la reportada por Jean-Marie Contreras²²⁹ y colaboradores, ellos reportan la obtención del derivado **53** con un rendimiento de 84% mientras que nosotros variaba conforme se cuidaban las condiciones de reacción desde un rendimiento desde 50% hasta 86%.

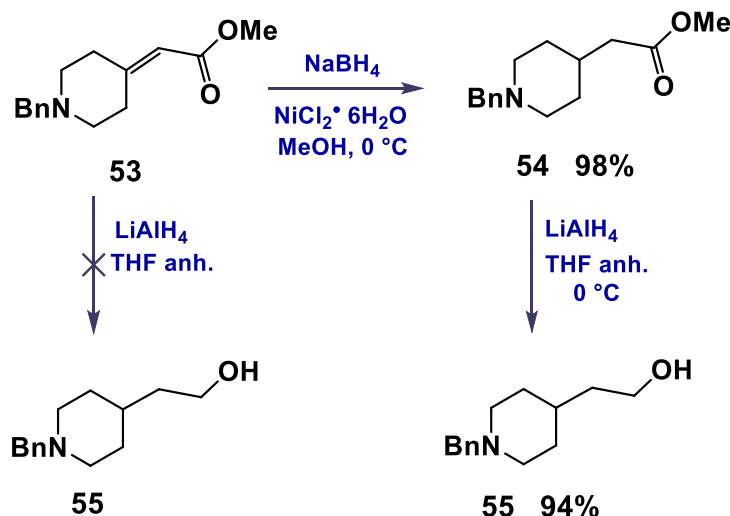


Esquema 3.19. Obtención del derivado de donepecilo **53**.

Jean-Marie Contreras⁷⁴ y colaboradores también reportan la síntesis de la reducción del ester α,β -insaturado al alcohol **55** como se muestra en el esquema 3.20, en donde el derivado se sometió a condiciones de reducción con LiAlH_4 en condiciones anhidras disuelto en THF. En estas condiciones se probaron tres veces en las cuales dio el resultado de una mezcla de productos: el primero era la deducción del doble enlace permaneciendo el ester, el segundo era la reducción del ester y permaneciendo el doble enlace y el último producto que era el más polar era la reducción del ester junto con el doble enlace que era el producto de interés **55** con tiempos de reacción de 26 horas y en las cuales aun así no se consumió todo el derivado **53**. Al observar que ocurría esto se decidió realizar un último intento de probar estas condiciones, en donde lo que se modificó solo fue secar más el disolvente que se estaba ocupando que en este caso era THF, ya que lo que afecta en la reacción es la humedad; lo que ocurrió esta vez fue que el derivado que se aisló fue la reducción del ester permaneciendo el doble enlace consumiéndose toda a materia prima y obtenido lo como único producto en un tiempo de 24 h. Se realizó una búsqueda bibliográfica de obtención de este derivado ya que se encuera reportado y se encontró que se podía llegar a **55** reduciendo el doble enlace y después el ester con dos reducciones, pero las metodologías que se encontraron era reduciendo primero con una hidrogenación catalítica con paladio soportado en carbono o con oxido de platino variando la presión; anteriormente se intentó hidrogenar ese doble enlace con las condiciones ya probadas en los demás compuestos y lo que se logró obtener fue la desbencialación del producto. Por lo que se probaron condiciones de reducción quimioselectivas, utilizando

²²⁹ Contreras J.-M.; Parrot I.; Sippl W.; Rival Y. M.; Wermuth C. G.; *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2707-2718.

$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ catalíticamente con NaBH_4 , dando una reducción quimioselectiva para el doble enlace sobre el ester obteniendo el derivado **54** en rendimientos de 98% con un tiempo de reacción de 20 min. y aislándolo como único producto. Después este derivado **54** se volvió a reducir con LiAlH_4 durante un tiempo de 20 min. con rendimientos de 94%, en donde se obtuvo el derivado **55** como único producto; en estas dos etapas se comprobaron la obtención de los derivados por RMN comparando los datos con los ya reportados.^{230,231,232,233}



Esquema 3.20. Obtención del alcohol del derivado de donepecilo **55**.

Una vez aislado el derivado **55**, se probaron las condiciones reportadas por Lalthazuala Rokhum²³⁴ para la obtención de la azida **57**; que implican una reacción de *one-pot* involucrando la reacción de Appel para transformar el alcohol **55** a un derivado halogenado, que posteriormente es sustituido por azida tal como se muestra en el esquema 3.21. Este compuesto se purificó y se logró aislar en un rendimiento de 23%, a pesar de que en cromatografía en capa fina se veía que se consumió toda la materia y se varió los tiempos de reacción de 3-6 h; no se logró incrementar ese rendimiento. Antes de optar por la cloración del alcohol **55** como ya se encuentra reportado, se

²³⁰ Sakaki J.; Kishida M.; Matsuura N.; Umemura I.; Kawahara E.; Yamada K.; Konishi K.; Iwaki Y.; Imase H.; Miyake T.; Pyridinyl amine derivatives as inhibitors of cholesteryl ester transfer protein (CETP); WO 2007/073934 A1.

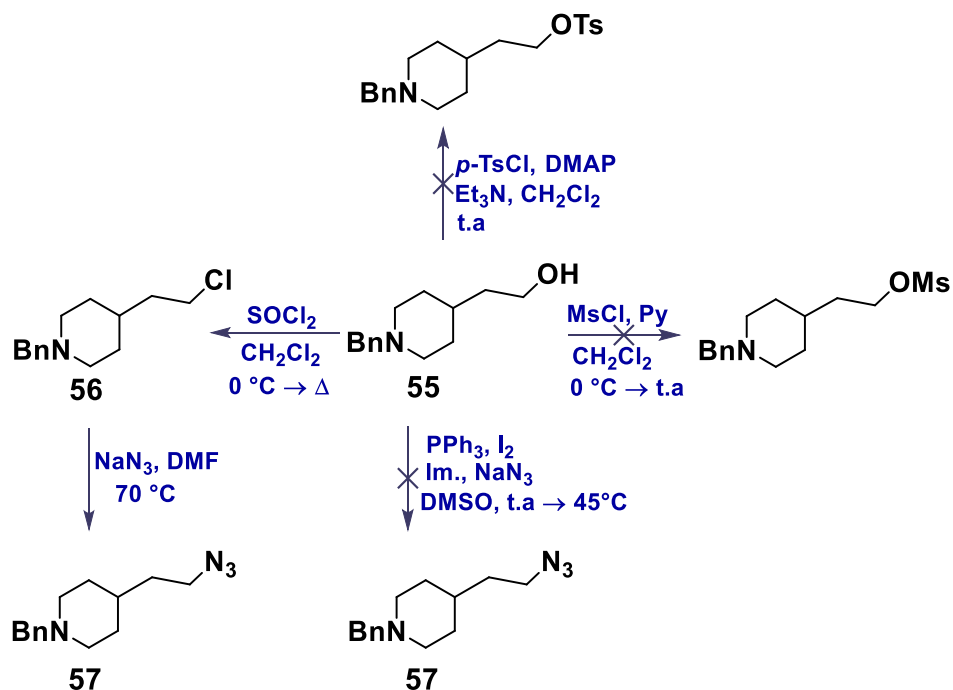
²³¹ Rodríguez-Franco M. I.; Fernández-Bachiller M. I.; Pérez C.; Castro A.; Martínez A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 6795–6802.

²³² Yan J.; Hu J.; Liu A.; He L.; Li X.; Wei H.; *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, 25, 2946–2955.

²³³ Zhou Y.; Sun W.; Peng J.; Yan H.; Zhang L.; Liu X.; Zuo Z.; *Bioorg. Chem.* **2019**, 93, 103322.

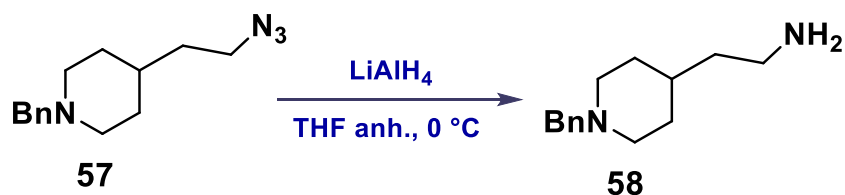
²³⁴ Rokhum L.; Bez G.; *J. Chem. Sci.* **2012**, 124, 3, 687-691.

decidió probar dos condiciones diferentes para la sustitución con azida: la primera son las condiciones de tosilación del alcohol, en las cuales comenzaba a ver reacción en un trascurso de 4 h pero aún no se consumía por completo la materia prima, con lo que se adicionó más equivalentes de *p*-TsCl y Et₃N dejándola reaccionar más tiempo; lo que mostro la cromatografía en capa fina fue que lo que ya se había formado al parecer había regresado al alcohol sin a ver reacción alguna y RMN lo confirmo que no se había llevado acabo la tosilación del alcohol **55**. La segunda reacción que se probaron fue mesilar ese alcohol, en donde la reacción duro 1 h y se mostraba un solo producto, por lo que se dio a la tarea de purificarlo; este nuevo compuesto se realizó RMN para confirmar que se llevó acabo la mesilación, la cual mostro que si se había mesilado el alcohol pero al mismo tiempo había sustituido el grupo bencilo y mesilado el átomo de nitrógeno. Al ver estos resultados y para incrementar el rendimiento de la obtención de la azida, se decidió seguir lo reportado Jean-Marie Contreras²²⁹ que realiza la cloración del alcohol **55**, esta reacción se llevó sin ningún inconveniente en un tiempo de 2 h de reacción con un rendimiento de 91% incrementando un poco el rendimiento reportado de un 81% para el derivado **56**.



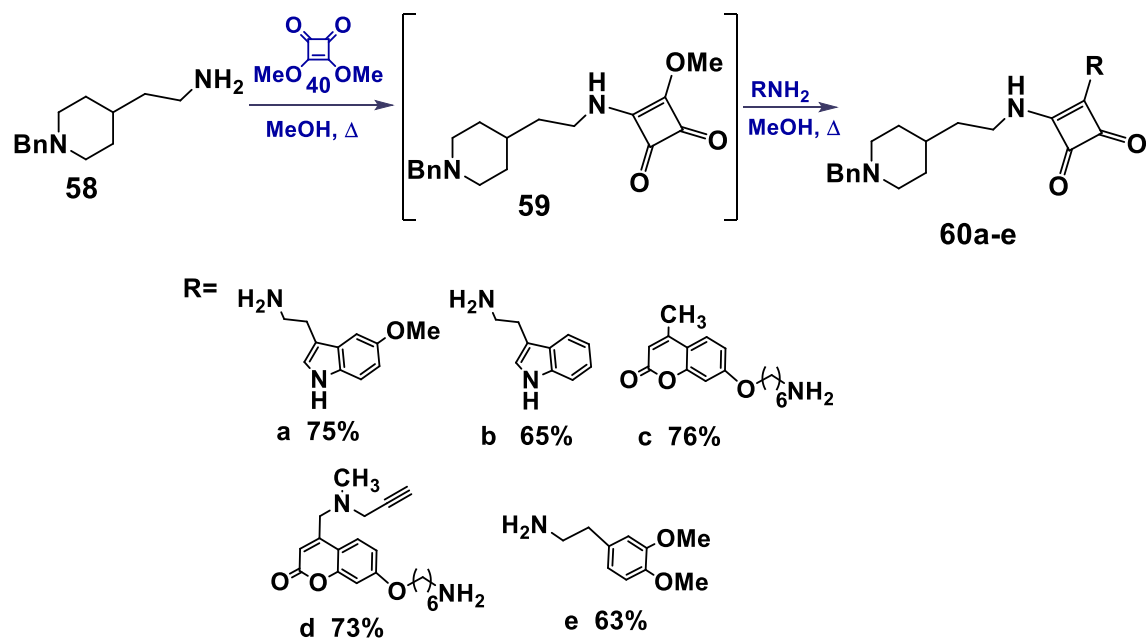
Esquema 3.21. Obtención de la azida del derivado de donepecilo **57**.

Aislado el derivado **56** se procedió a realizar la reacción de sustitución con azida de sodio en las condiciones ya utilizadas en otros derivados y para asegurarse que se llevara a cabo la reacción se dejó reaccionar por un tiempo de 21 h debido a que por la técnica de cromatografía de capa fina no se notaba ningún cambio por que la materia prima y el compuesto mostraban los mismos R_f en diferentes sistemas que se utilizaron, este derivado **57** se aisló con un rendimiento de 73% con un aspecto aceitoso color marrón. Posteriormente como se muestra en el esquema 3.22 se procedió a obtener la amina **58**, en donde se redujo con LiAlH_4 durando esta reacción una hora, realizándose sin ningún problema y dando como único producto **58** con un rendimiento de 87%, inicialmente se pretendía reducir con una reacción de Staudiger pero se optó por condiciones más amigables.



Esquema 3.22. Obtención de la amina del derivado de donepecilo **58**.

Tal como se muestra en el esquema 3.23 la amina **58** se acoplo al escuaramidado de dimetilo **40** sustituyendo un solo grupo metoxi para después sustituir el segundo grupo metoxi por las diferentes aminas que se utilizaron para la obtención de derivaos de tacrina. Se utilizaron las condiciones usadas para los derivados anteriores de escuaramidas, solo que en esta ocasión se realizó el acoplamiento de las aminas sin pararnos en la purificación el derivado **59**. Por tanto la primera etapa se adicionó la amina **58** con el escuaramidato de dimetilo **40** durando esta reacción por 3 h, posteriormente, una vez que en cromatografía en capa fina se observó el consumo de estas dos materias de adicionó la correspondiente amina para sustituir el segundo grupo metoxi, en donde los tiempos de reacción variaron desde 2-12 h dando los productos **60a-e** con rendimientos de 63-76%.



Esquema 3.23. Obtención de los híbridos de escuaramidas de derivados de donepecilo **60a-e**.

En la figura 3.18 se muestra espectro de RMN de ^1H del derivado **60a**, el resto de espectro de los derivados **60b-e** se encuentran en el anexo. En ese se muestra las señales de la melatonina en 6.70 ppm para uno de hidrógenos aromáticos, el otro hidrogeno aromático aparece en 7.11 ppm junto con hidrogeno del CH del doble enlace del heterociclo de la melatonina y entre 7.57-7.17 ppm aparecen los protones aromáticos del anillo del grupo bencilo junto con un protón aromático del anillo aromático de la melatonina además de dos hidrógenos de los NH. Otras señales pertenecientes a la molécula de melatonina son las de los hidrógenos de los CH_2 , una en 3.76 ppm para los hidrógenos del CH_2 unido al átomo de nitrógeno que en esa misma señal se encuentra los protones de CH_3 del grupo metoxi y entre 3.55-3.45 ppm esta la señal de los hidrógenos del CH_2 unido al carbono cuaternario del heterociclo de la melatonina además de que ahí mismo se encuentra los hidrógenos del CH_2 que pertenece al grupo bencilo confirmando que se ha llevado acabo la reacción, el resto de señales pertenece al esqueleto del donepecilo que no sufren cambio significativo.

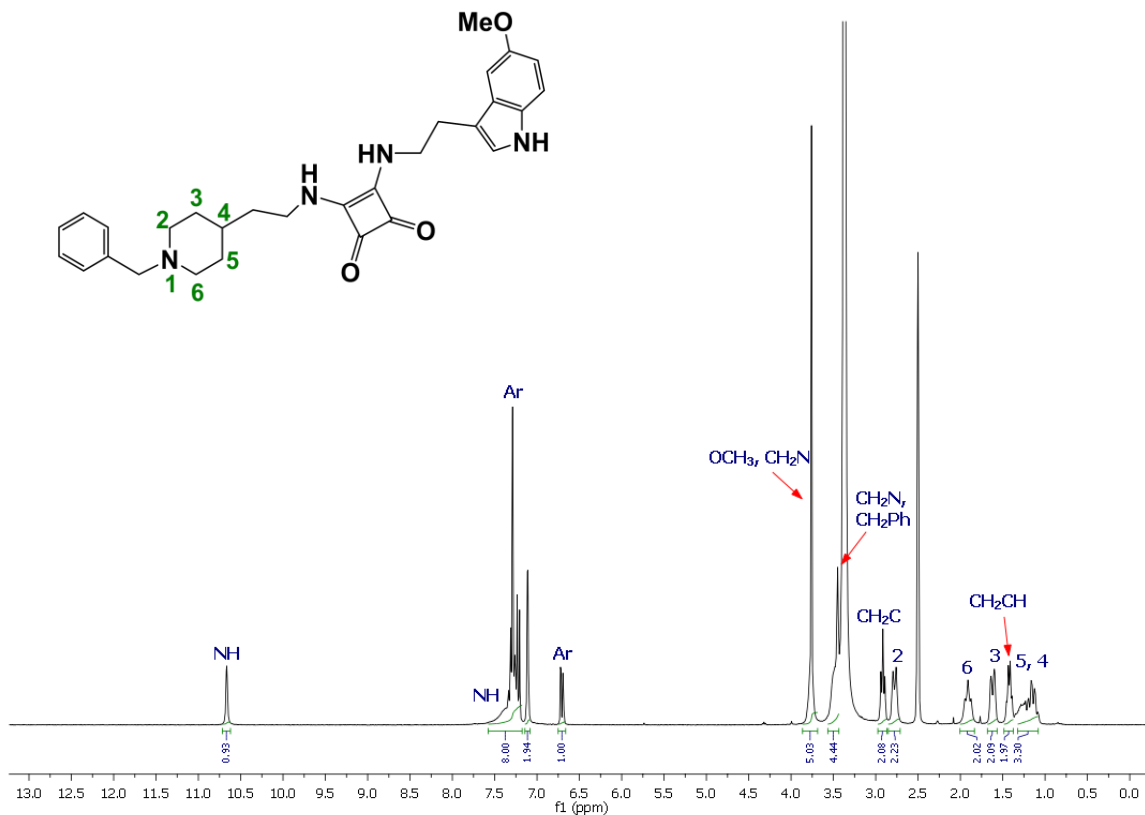


Figura 3.18. Espectro de RMN de ^1H del derivado **60a**.

En el espectro de RMN de ^{13}C de la figura 3.19 se observan las señales de los carbonos aromáticos tanto del anillo de la melatonina como el anillo del grupo bencilo encontrándose entre 153.1-100.2 ppm, entre esa escala también están las señales de los carbonos pertenecientes al doble enlace del heterociclo de la melatonina en 123.7 ppm para el carbono del CH y para el carbono cuaternario en 112.1 ppm. También están las señales de los carbonos de los carbonilos del ciclobutadieno en 182.4 ppm y los carbonos del doble enlace de ese ciclo en 167.8 ppm, otras señales son los carbonos de los CH_2 pertenecientes de a la melatonina; uno en 44.1 ppm es el carbono que está unido al átomo de nitrógeno y el otro en 27.4 ppm que es el carbono que está unido al carbono cuaternario del heterociclo de la melatonina y además del carbono del CH_3 de grupo metoxi en 55.3 ppm, las demás señales pertenecen al esqueleto del donepecilo que no sufrieron un cambio significativo.

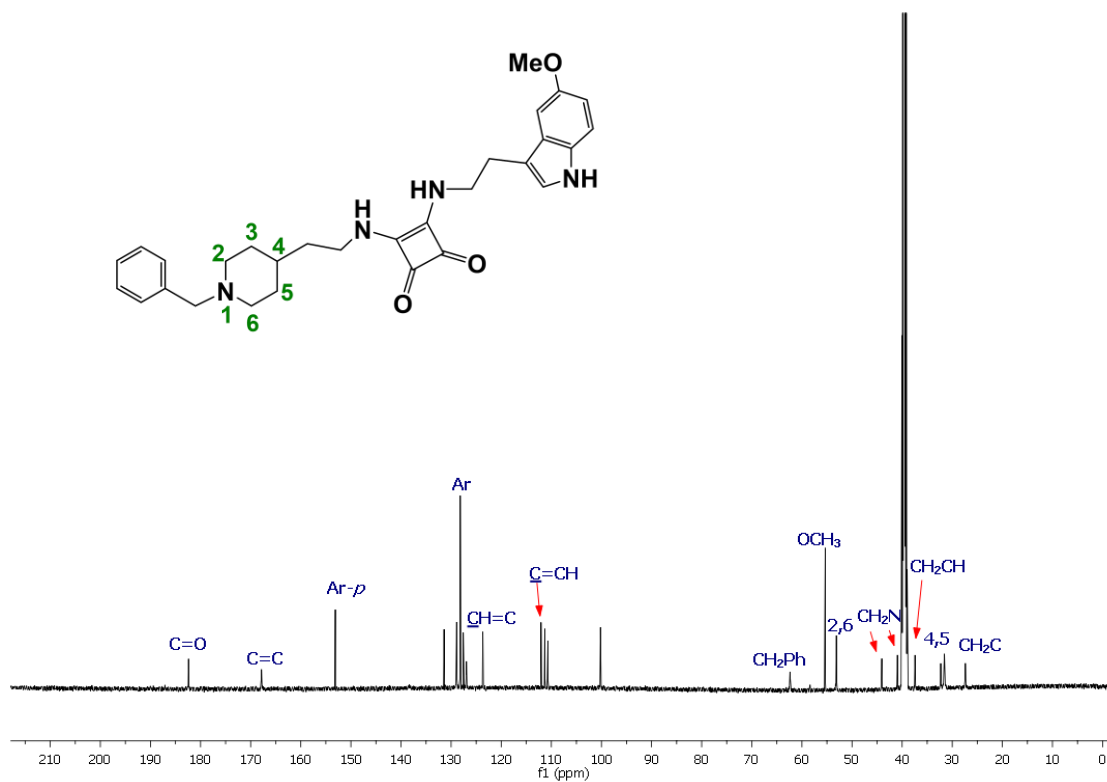


Figura 3.19. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado 60a.

Capítulo 3.5: Desarrollo Experimental

5.1 Equipos y técnicas utilizadas

Puntos de fusión

Los puntos de fusión fueron determinados por la técnica de capilar abierto en un aparato electrotérmico modelo Electrothermal, utilizando la escala de grados Celsius y no fueron corregidos.

Cromatografía

Para la cromatografía analítica en capa fina (c.c.f.) se utilizaron placas comerciales de gel de sílice ALUGRAM[®] SIL G/UV254 y como fase móvil sistemas de elución acetato de etilo-ciclohexano, cloruro de metileno-metanol o cloruro de metileno-hexano. Como revelador se utilizó indicador de fluorescencia, una lámpara de luz ultravioleta de onda corta (254 nm, lámpara UV-G-54) y el revelado por calcinación de las placas con vainillina (0.6 g de vainillina en 100 ml EtOH con 2 ml de H₂SO₄), ácido fosfomolibdico (1 g en 100 ml de EtOH), ninhidrina (0.6g en 200 ml EtOH) o ácido sulfúrico (5 ml de H₂SO₄ en 95 ml de EtOH).

Para la cromatografía en columna, se empleó gel de sílice Davisil[™] grado 633 (malla 200–425) de acuerdo a la técnica de cromatografía tipo flash utilizando sistemas de eluyentes de acetato de etilo-ciclohexano o diclometano-metanol en diversas proporciones.

Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética fueron obtenidos con un equipo de Bruker UltraShield 300 MHz para espectros de ¹H y 75 MHz para los espectros de ¹³C, también fueron obtenidos Bruker Ascend 500 MHz para espectros de ¹H y 125 MHz donde el equipo tenía instalado una criosonda para los espectros de ¹³C; se utilizó cloroformo deuterado (CDCl₃) o metanol deuterado (MeOD) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento se expresan en hertzios (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; “t” para una señal triple; “dd” para una señal doble de doble; “ddd” para una señal doble de doble de doble; “dc” para una señal doble de cuartetos, “a” para una señal ancha y “m” para una señal múltiple.

Masas

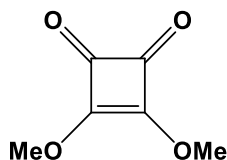
Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrómetro QExactive mass Spectromer, por electrospray y las fragmentaciones están referidas como m/z .

Disolventes y materias primas

Las materias primas comerciales se emplearon sin purificación previa. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y no requirieron purificación. Los disolventes utilizados fueron grado analítico y no requirieron purificación.

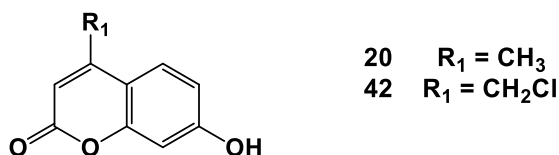
5.2 Síntesis de los derivados de escuaramidas.

5.2.1. 3,4-dimetoxiciclobut-3-eno-1,2-diona (**40**).



El compuesto **40** se sintetizó usando el procedimiento descrito por Lu y colaboradores.³¹⁴ El ácido escuárico (2.06 g, 18 mmol, 1.0 eq.) se disolvió en MeOH anh. (20 ml) y a esta solución se le adiciono ortoformiato de trimetilo (4ml, 36 mmol, 2 eq.) y se reflujo durante 24 h. Terminada la reacción, se evapora el disolvente y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (2:1 Ciclohex/AcOEt) obteniéndose **40** como un sólido blanco. Rendimiento: 1.76 g, 69%; R_f 0.48 (Ciclohexano/AcOEt 1:1). Los datos espectroscópicos fueron comparados con los reportados en la bibliografía.^{315,316}

5.2.2. Procedimiento general para la preparación de las cumarinas (**20** y **42**).



Se utilizó las metodologías ya reportadas en la literatura, con pequeñas modificaciones. Sobre H_2SO_4 (12 ml) enfriado a 10°C se adicionó gota a gota una disolución del resorcinol (500 mg, 4.54 mmol, 1 eq.) y diferentes β -ceto-ésteres (1 eq.). Una vez terminada la adición se dejó agitar a temperatura ambiente durante 4 h; posteriormente se vertió sobre hielo y se neutralizó con Na_2CO_3 . A continuación se extrajo con AcOEt (3x30 ml), y la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H_2O (3x20 ml); se secó con Na_2SO_4 , se filtró y el filtrado se concentró a sequedad; dando lugar a los

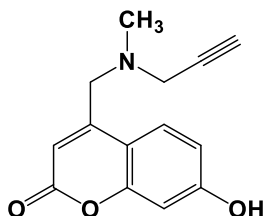
³¹⁴ Lu M.; Lu Q.-B.; Honek J. F.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 282–287.

³¹⁵ Liu H.; Tomooka C. S.; Moore H. W.; *Synth. Commun.* **1997** 27, 12, 2177-2180.

³¹⁶ Cohen S.; Cohen S. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1966** 88, 7, 1533-1536.

derivados **20** y **42** con rendimientos del 50 a 56%, sin ninguna purificación adicional. Los datos espectroscópicos de **20** y **42** fueron comparados con los reportados en la bibliografía.³¹⁷⁻³²²

5.2.3. 7-Hidroxi-4-(N-metil-N-propargilamino)metil-2H-cromen-2-ona (**43**).



A una disolución agitada de la cumarina **42** (200 mg, 0.95 mmol, 1 eq.) en EtOH (10 ml), se adiciono una mezcla de *N*-metilpropargilamina (0.2 ml, 1.89 mmol, 2 eq.) y *N*-etilidiisopropilamina (DIPEA) (0.4 ml, 2.85 mmol, 3 eq.) gota a gota.⁶⁷ Terminada la adición, la mezcla se calentó a 70 °C durante 7 h, después se dejó enfriar y se evaporó el disolvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna (9:1 CH₂Cl₂/CicloHex → 8:2 CicloHex/AcOEt) obteniéndose **43** como una espuma color crema. Rendimiento: 157.5 mg, 68%; *R_f* 0.16 (Ciclohex/AcOEt 7:3). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.66 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.8 Hz, H-5), 6.75 (m, 2H, H-6, H-8), 6.27 (t, 1H, *J*_{3,H} = 0.9 Hz, H-3), 3.64 (d, 2H, *J*_{H,3} = 0.9 Hz, CH₂-C4), 3.35 (d, 2H, *J*_{H,H} = 2.4 Hz, CH₂-≡-H), 2.34 (s, 3H, CH₃), 2.30 (t, 1H, *J*_{H,H} = 2.4 Hz, C≡CH) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 162.3 (C-7), 161.9 (C-2), 155.5 (C-9), 152.8 (C-4), 126.2 (C-5), 113.2 (C-3), 111.5 (C-10), 111.1 (C-6), 102.8 (C-8), 77.6 (C≡CH), 74.1 (C≡CH), 56.3 (CH₂-C4), 45.5 (CH₃), 41.9 (CH₂-≡-H) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₁₄H₁₄O₃N ([M+H]⁺): 244.0968, observado: 244.0966.

³¹⁷ Chauhan N. B.; Patel N. B.; Mistry B. M.; *J. Chem. Pharm. Res.* **2017** 9, 7, 171-178.

³¹⁸ Najjar R.; Bigdeli E.; *Eur. Polym. J.* **2018** 104, 136-146.

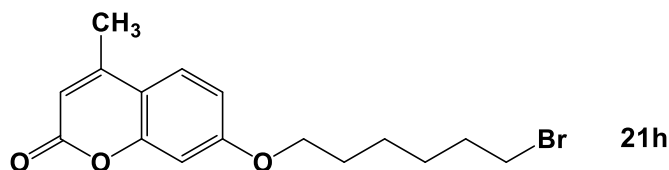
³¹⁹ Kathuria A.; Gupta A.; Priya N.; Singh P.; Raj H. G.; Prasad A. K.; Parmar V. S.; Sharma S. K.; *Bioorg. Med. Chem.* **2009** 17, 1550-1556.

³²⁰ Chauhan N. B.; Patel N. B.; Mistry B. M.; *IJPSR* **2018** 9,6, 2595-2603.

³²¹ El-Haggar R.; Al-Wabli R. I.; *Molecules* **2015** 20, 5374- 5391.

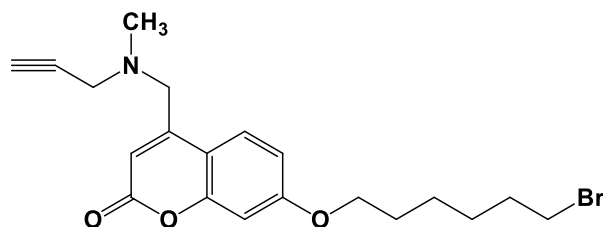
³²² Harada K.; Kubo H.; Tomigahara Y.; Nishioka K.; Takahashi J.; Momose M.; Inoue S.; Kojima A.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010** 20, 272-275.

5.2.4. Procedimiento general para la preparación de los derivados **21h** y **44**.



Una solución de la cumarina **20** o **43** (1eq.) en CH₃CN (5 ml) se adicionó K₂CO₃ anh. (4 eq.) y el correspondiente 1,6-dibromohexano (10 eq.), esta solución se colocó a reflujo durante 3-4 h. La solución se dejó enfriar y se extrajo con AcOEt (3x30 ml), la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H₂O (3x20 ml); se secó con Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (Ciclohexano→8:2 Ciclohex/AcOEt) teniendo rendimientos cuantitativos para el derivado **21h**. Los datos espectroscópicos fueron comparados con los reportados en la bibliografía para el derivado **21h**.^{323,324}

5.2.4.1 7-[(6-Bromohexil)oxi]-4-[[metil(prop-2-in-1-il)amino]metil]-2H-cromen-2-ona (**44**).



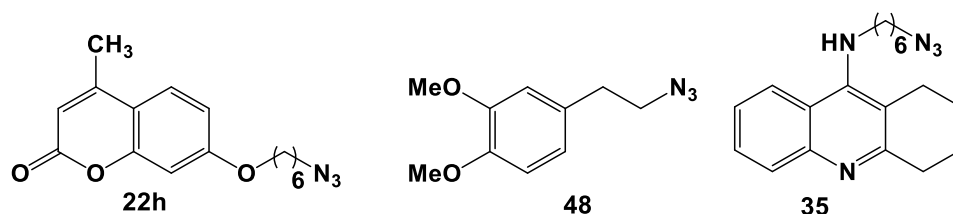
Se adicionó **43** (129.2 mg, 0.53 mmol, 1 eq.), K₂CO₃ anh. (293.61 mg, 2.12 mmol, 4 eq.) y 1,6-dibromohexano (0.8 ml, 5.31 mmol, 10 eq.) obteniéndose **44** como un aceite color amarillo. Rendimiento: 188.4 mg, 97%; *R_f* 0.44 (Ciclohexano/AcOEt 7:3). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.78 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.8 Hz, H-5), 6.83 (dd, 1H, *J*_{6,5} = 8.8 Hz, *J*_{6,8} = 2.5 Hz, H-6), 6.80 (d, 1H, *J*_{8,6} = 2.5 Hz, H-8), 6.34 (t, 1H, *J*_{3,H} = 0.9 Hz, H-3), 4.02 (t, 2H, *J*_{H,H} = 6.4 Hz, CH₂O), 3.67 (d, 2H, *J*_{H,3} = 0.9 Hz, CH₂C-4), 3.43 (t, 2H, *J*_{H,H} = 6.8 Hz, CH₂Br), 3.39 (d, 2H, *J*_{H,H} = 2.4 Hz, CH₂N), 2.39 (s, 3H, CH₃N), 2.32 (t, 1H, *J*_{H,H} = 2.4 Hz, C≡CH), 1.90 (m, 2H, CH₂), 1.83 (m, 2H, CH₂), 1.57 – 1.50 (m, 4H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 162.0 (C-7), 161.4 (C-2), 155.7 (C-9), 152.0 (C-4), 126.1 (C-5), 112.6 (C-

³²³ Jiang N.; Huang Q.; Liu J.; Liang N.; Li Q.; Li Q.; Xie S.-S.; *Eur. J. Med. Chem.* **2018** 146, 287-298.

³²⁴ Xie S.-S.; Wang X.-B.; Li J.-Y.; Yang L.; Kong L.-Y.; *Eur. J. Med. Chem.* **2013** 64, 540-553.

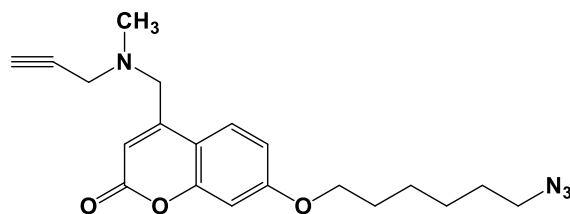
3), 112.3 (C-10, C-6), 101.3 (C-8), 77.7 (C≡CH), 74.1 (C≡CH), 68.3 (CH₂O), 56.5 (CH₂C-4), 45.6 (CH₃N), 42.0 (CH₂N), 33.7 (CH₂Br), 32.6 (CH₂), 28.8 (CH₂), 27.8 (CH₂), 25.2 (CH₂) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₀H₂₅BrO₃N ([M+H]⁺): 406.1012, observado: 406.1012.

5.2.5. Procedimiento general para la preparación de las azidas (22h, 35, 45 y 48).



Una solución ya sea de **21h**, **34**, **44** o **47** en DMF (5 ml) se adicionó NaN₃ (3 eq.), esta mezcla se calentó a 70 °C durante 3-4 h para los derivados **22h**, **45** y **48**, mientras que para el derivado **35** se calentó toda la noche. Terminada la reacción se dejó enfriar y se extrajo con AcOEt (3x30 ml), la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H₂O (3x0 ml); se secó con N₂SO₄, se filtró y el filtrado fue concentrado a sequedad para dar **22h**, **35**, **45** o **48** sin ninguna purificación adicional. Los datos espectroscópicos de los derivados fueron comparados con los reportados en la bibliografía.^{325,326}

5.2.5.1 7-[(6-Azidohexil)oxi]-4-[[metil(prop-2-in-1-il)amino]metil]-2H-cromen-2-ona (45).



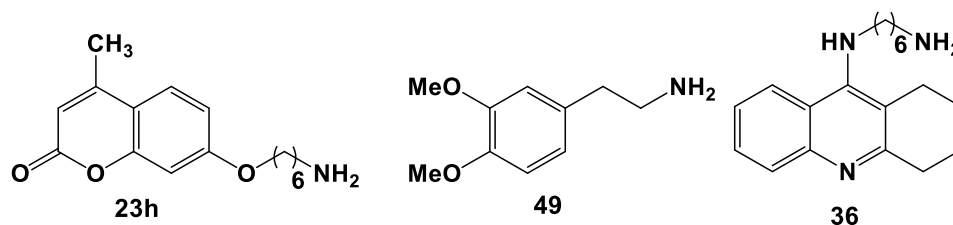
Se adicionó **44** (168.8 mg, 0.42 mmol, 1 eq.) y NaN₃ (81.02 mg, 1.25 mmol, 3 eq.) obteniéndose **45** como un aceite color amarillo-naranja. Rendimiento: 150.5 mg, 98%; *R_f* 0.39 (Ciclohexano/AcOEt 7:3). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.76 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.8 Hz, H-5), 6.83 (dd, 1H, *J*_{6,5} = 8.8 Hz, *J*_{6,8} = 2.5 Hz, H-6), 6.80 (d, 1H, *J*_{8,6} = 2.5 Hz, H-8), 6.34 (t, 1H, *J*_{3,H} = 0.9 Hz, H-3), 4.02 (t, 2H, *J*_{H,H} = 6.4

³²⁵ Najafi Z.; Mahdavi M.; Saeedi M.; Karimpour-Razkenari E.; Edraki N.; Sharifzadeh M.; Khanavi M.; Akbarzadeh T.; *Bioorg. Chem.* **2019** 83, 303-316.

³²⁶ Roldán-Peña J. M.; Alejandro-Ramos D.; López Ó.; Maya I.; Lagunes I.; Padrón J. M.; Peña-Altamira L.; E.; Bartolini M.; Monti B.; Bolognesi M L.; Fernández-Bolaños J. G.; *Eur. J. Med. Chem.* **2017** 138, 761-773.

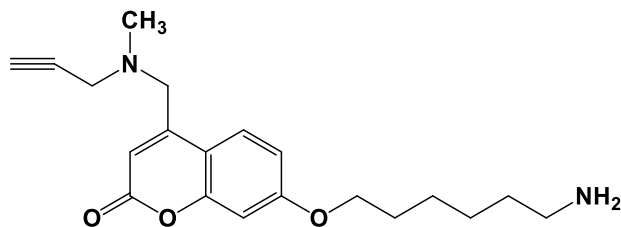
Hz, CH₂O), 3.68 (d, 2H, $J_{H,3} = 0.9$ Hz, CH₂C-4), 3.39 (d, 2H, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, CH₂N), 3.29 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.9$ Hz, CH₂N₃), 2.39 (s, 3H, CH₃N), 2.32 (t, 1H, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, C≡CH), 1.83 (m, 2H, CH₂), 1.65 (m, 2H, CH₂), 1.57–1.44 (m, 4H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 162.0 (C-7), 161.4 (C-2), 155.7 (C-9), 152.0 (C-4), 126.1 (C-5), 112.6 (C-3), 112.3 (C-10, C-6), 101.3 (C-8), 77.7 (C≡CH), 74.1 (C≡CH), 68.3 (CH₂O), 56.5 (CH₂C-4), 51.3 (CH₂N₃), 45.6 (CH₃N), 42.0 (CH₂N), 28.8 (CH₂), 28.7 (CH₂), 26.5 (CH₂), 25.6 (CH₂) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₀H₂₅O₃N₄ ([M+H]⁺): 369.1921, observado: 369.1919.

5.2.6. Procedimiento general para la preparación de las aminas (23h, 49 y 36).



Una solución ya sea de **22h**, **35** o **48** en MeOH (5 ml) se añadió Pd(OH)₂/C (10-20 mg). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de hidrógeno durante 4 h para los derivados **23h** y **49**, mientras que para el derivado **36** se dejó durante toda la noche. Se elimina el catalizador por filtración sobre Celite® y el filtrado fue concentrado a sequedad para dar **23h**, **36** o **49**, sin ninguna purificación adicional.

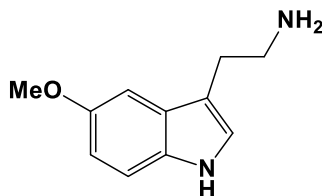
5.2.7. 7-[(6-Aminohexil)oxi]-4-[[metil(prop-2-in-1-il)amino]metil]-2H-cromen-2-ona (46).



El compuesto **46** se sintetizó usando una modificación del procedimiento informado por Rios y col.⁶⁸ Una solución de **45** (150.5 mg, 0.44 mmol, 1 eq.) en THF anh. (10 ml) se añadió PPh₃ (230.5 mg, 0.88 mmol, 2 eq.), la mezcla se coloca a reflujo durante 4 h. Transcurrido dicho tiempo, se adiciono

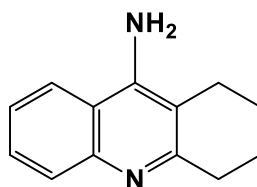
H₂O (7 ml) y NH₄OH al 28% (1 ml); se dejó por 7 h más a reflujo, después se enfrió y se evaporó el disolvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna (5:1 CH₂Cl₂/MeOH → 5:1:1 CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N) obteniéndose **46** como un aceite color marrón. Rendimiento: 121.3 mg, 81%; *R*_f 0.14 (Ciclohex/AcOEt 5:1).

5.2.8. Procedimiento de la hidrolisis de melatonina (**51**).



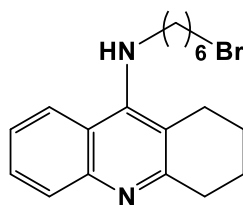
Utilizando la metodología de Chatterjee y col.⁶⁹ La melatonina **50** (600 mg, 2.58 mmol, 1 eq.) se disolvió en un sistema 1:1 de H₂O/EtOH (18 ml) se adicionó Na₂S₂O₄ (89.95 mg, 0.52 mmol, 0.2 eq.) y un sistema 1:1 de KOH_{acu.}/EtOH (18 ml), esta mezcla se colocó a reflujo durante 16 h bajo una atmósfera de Ar. Terminada la reacción se dejó enfriar y se extrajo con AcOEt (3x30 ml), la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H₂O (3x0 ml); se secó con N₂SO₄, se filtró y el filtrado fue concentrado a sequedad para dar **51** sin ninguna purificación adicional. Los datos espectroscópicos del derivado **51** fueron comparados con el reportado en la bibliografía.³²⁷

5.2.9. 1,2,3,4-Tetrahydroacridin-9-amina **33**.

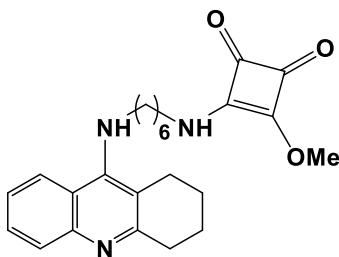


El clorhidrato de tacrina **32** se disolvió en un sistema 1:1 (CH₂Cl₂/NaOH al 1M), esta mezcla se colocó en agitación vigorosa a t.a durante 2 h. Terminada la reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (3x30 ml), la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H₂O (3x0 ml); se secó con N₂SO₄, se filtró y el filtrado fue concentrado a sequedad para dar **33** sin ninguna purificación adicional.

³²⁷ Venkatachalam S. R.; Salaskar A.; Chattopadhyay A.; Barik A.; Mishra B.; Gangabhairathi R.; Priyadarsini K. I.; *Bioorg. Med. Chem.* **2006** 14, 6414–6419.

5.2.10. N-(6-Bromohexil)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (**34**).

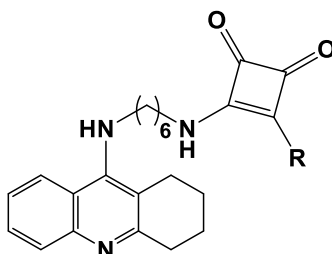
Una solución de **33** (854.6 mg, 4.31 mmol, 1 eq.) en CH₃CN se adicionó KOH (2.38 g, 17.24 mmol 4 eq.) y 1, 6-dibromohexano (2.7 ml, 17.24 mmol, 4 eq.), esta mezcla se agito bajo atmosfera de Ar a t. a durante 5 días. Transcurrido ese tiempo, se extrajo con AcOEt (3x30 ml) y la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H₂O (3x20 ml); se secó con Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (Ciclohexano→2:1 Ciclohex/AcOEt→4:6:1 Ciclohex/AcOEt/Et₃N) obteniéndose **34** como un aceite color marrón. Rendimiento: 1.26 g, 81%; R_f 0.71 (Ciclohex/AcOEt/Et₃N 4:6:1).⁷⁰

5.2.11. 3-Metoxi-4-[[6-((1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-il)amino)hexil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (**37**).

Una solución de **36** (401.8 mg, 1.35 mmol, 1 eq.) en MeOH (20 ml), se adicionó el escuaramidato de dimetilo **40** (191.9 mg, 1.35 mmol, 1 eq.). Después esta mezcla se colocó a reflujo por 50 h, terminada la reacción se enfrió y se evaporó el disolvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna (2:7:3 CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH → 2:7:3:1 CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH/Et₃N) obteniéndose **37** como un aceite color marrón. Rendimiento: 354.6 mg, 64%; R_f 0.34 (AcOEt/MeOH 1:1). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ: 8.52 (s, 1H, NH), 8.19 (m, 1H, H-5), 7.75 (m, 1H, H-8), 7.63 (m, 1H, H-6),

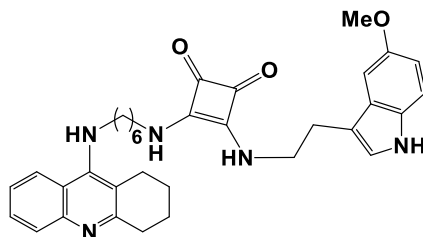
7.42 (m, 1H, H-7), 6.00 (s, 1H, NH), 4.28-4.12 (s, 3H, CH₃O), 3.54 (m, 2H, CH₂N), 3.11 (m, 2H, CH₂N), 2.93 (m, 2H, H-4), 2.72 (m, 2H, H-1), 1.84 (m, 4H, H-2, H-3), 1.67 – 1.27 (m, 8H, CH₂).

5.2.12. Procedimiento general para la preparación de las escuaramidas con tacrina (38a-e).



Una solución de **37** (1 eq.) en MeOH (10 ml), se adicionó las correspondientes aminas **23h**, **triptamina**, **46**, **49** o **51** (2 eq.). Después esta mezcla se colocó a reflujo por 31-53 h, terminada la reacción se enfrió y se evaporó el disolvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna (3:7:2 CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH).

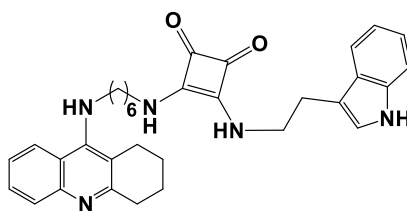
5.2.12.1 3-{{[2'-(5''-Metoxi-1''H-indol-3''-il)etil]amino}-4-{{[6''-((1'',2'',3'',4''-tetrahydroacridin-9''-il)amino)hexil]amino}ciclobut-3-eno-1,2-diona (38a).



Se adicionó **37** (50 mg, 0.12 mmol, 1 eq.) y derivado **51** (34.99 mg, 0.18 mmol, 2 eq.) obteniéndose **38a** como una espuma color marrón. Rendimiento: 39.1 mg, 56%; *R_f* 0.18 (AcOEt/MeOH 1:1). ¹H-RMN (300 MHz, MeOD/CDCl₃, 0.5:0.1) δ: 8.09 (d, 1H, *J*_{5'',6''} = 8.5 Hz, H-5''), 7.76 (d, 1H, *J*_{8'',7''} = 8.4 Hz, H-8''), 7.56 (t, 1H, *J*_{6'',5''} = *J*_{6'',7''} = 7.6 Hz, H-6''), 7.37 (t, 1H, *J*_{7'',6''} = *J*_{7'',8''} = 7.5 Hz, H-7''), 7.20 (d, 1H, *J*_{H,H} = 8.8 Hz, Ar-H), 7.04 (m, 2H, CH=C, Ar-H), 6.71 (dd, 1H, *J*_{H,H} = 4 Hz, *J*_{H,H} = 3.5 Hz, Ar-H), 3.86 (s, 2H, NH), 3.80 (s, 3H, CH₃O), 3.56 (t, 2H, *J*_{H,H} = 7.3 Hz, CH₂N), 3.47 (s, 2H, NH), 3.33 (m, 4H, CH₂N), 3.01 (m, 4H, H-4'', CH₂C), 2.73 (m, 2H, H-1''), 1.91 (m, 4H, H-2'', H-3''), 1.64 (m, 2H, CH₂), 1.50 (m, 2H, CH₂), 1.42-1.21 (m, 4H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, MeOD/CDCl₃, 0.5:0.1) δ: 183.3

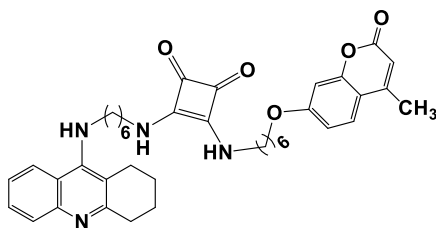
(C=O), 169.2 (C=C), 169.1 (C=C), 158.5 (C-4a''), 154.8 (C-9''), 153.2 (Ar-*p*), 147.2 (C-10a''), 133.1 (Ar-*ipso*), 129.8 (C-5''), 128.9 (C-6''), 127.4 (Ar-*o*), 124.7 (C-7''), 124.5 (C-8''), 124.3 (CH=C), 120.8 (C-8a''), 116.4 (C-9a''), 112.9 (Ar-*o*), 112.6 (C=CH), 111.8 (Ar-*m*), 101.0 (Ar-*m*), 56.3 (CH₃O), 46.0 (CH₂N), 44.9 (CH₂N), 33.7 (CH₂N), 32.0 (C-1''), 31.8 (CH₂), 28.3 (CH₂), 27.3 (C-4''), 26.9 (CH₂, CH₂), 25.8 (CH₂-C), 23.8 (C-3''), 23.4 (C-2'') ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₃₄H₄₀O₃N₅ ([M+H]⁺): 566.3126, observado: 566.3121.

5.2.12.2 **3-{{2'-(1''H-indol-3''-il)etil}amino}-4-{{6'-((1'',2'',3'',4''-tetrahydroacridin-9''-il)amino)hexil}amino}ciclobut-3-eno-1,2-diona (38b).**



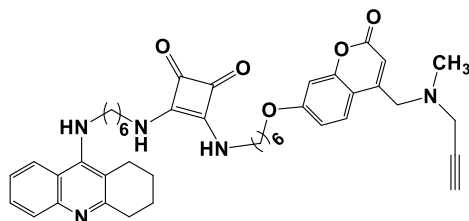
Se adicionó **37** (100.4 mg, 0.25 mmol, 1 eq.) y **triptamina** (78.92 mg, 0.49 mmol, 2 eq.) obteniéndose **38b** como una espuma color marrón. Rendimiento: 99.6 mg, 75%; *R_f* 0.24 (AcOEt/MeOH 1:1). ¹H-RMN (300 MHz, MeOD/CDCl₃, 0.4:0.2) δ: 7.90 (d, 1H, *J*_{5'',6''} = 8.2 Hz, H-5''), 7.70 (d, 1H, *J*_{8'',7''} = 8.0 Hz, H-8''), 7.46 (m, 1H, H-6'', H-7''), 7.24 (m, 2H, H-CH=C, Ar-H), 6.97 (m, 4H, Ar-H, NH), 3.78 (m, 3H, CH₂N, NH), 3.41 (m, 4H, CH₂N), 2.93 (t, 1H, *J*_{H,H} = 6.8 Hz, CH₂C), 2.87 (m, 4H, H-4''), 2.54 (m, 2H, H-1''), 1.77 (m, 4H, H-2'', H-3''), 1.57-1.33 (m, 4H, CH₂), 1.33-1.14 (m, 4H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, MeOD/CDCl₃, 0.4:0.2) δ: 182.0 (C=O), 182.0 (C=O), 167.8 (C=C), 167.6 (C=C), 156.3 (C-4a''), 151.9 (C-9''), 144.9 (Ar-*p*), 136.2 (C-10a''), 129.1 (Ar-*ipso*), 126.9 (C-5''), 125.5 (C-6''), 123.7 (Ar-*o*), 123.1 (C-7''), 122.5 (C-8''), 121.2 (CH=C), 118.8 (C-8a''), 118.6 (C-9a''), 117.9 (Ar-*o*), 114.5 (C=CH), 111.1 (Ar-*m*), 110.8 (Ar-*m*), 44.5 (CH₂N), 43.7 (CH₂N), 31.9 (CH₂N), 30.9 (C-1''), 30.5 (CH₂), 29.3 (CH₂), 26.8 (C-4''), 26.0 (CH₂), 25.6 (CH₂), 24.2 (CH₂-C), 22.3 (C-3''), 21.9 (C-2'') ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₃₃H₃₈O₂N₅ ([M+H]⁺): 536.3020, observado: 536.3009.

5.2.12.3 3-[[6'-((4''-metil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi)hexil]amino]-4-[[6'-((1'',2'',3'',4''-tetrahidroacridin-9''-il)amino)hexil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (**38c**).



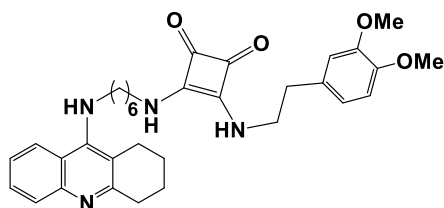
Se adicionó **37** (98.49 mg, 0.24 mmol, 1 eq.) y derivado **23h** (132.2 mg, 0.48 mmol, 2 eq.) obteniéndose **38c** como una espuma color marrón. Rendimiento: 123.2 mg, 78%; R_f 0.16 (AcOEt/MeOH 1:1). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.97 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8.7$ Hz, H-5''), 7.82 (d, 1H, $J_{8'',7''} = 8.3$ Hz, H-8''), 7.75 (m, 1H, NH), 7.53 (t, 1H, $J_{6'',5''} = J_{6'',7''} = 7.1$ Hz, H-6''), 7.43 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8.9$ Hz, H-5''), 7.33 (t, 1H, $J_{7'',6''} = J_{7'',8''} = 6.5$ Hz, H-7''), 7.17 (m, 1H, NH), 6.78 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8.9$ Hz, $J_{6'',8''} = 2.4$ Hz, H-6''), 6.69 (d, 1H, $J_{8'',6''} = 2.4$ Hz, H-8''), 6.07 (q, 1H, $J_{3'',H} = 1.1$ Hz, H-3''), 4.60 (s, 1H, NH), 3.93 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.4$ Hz, CH_2O), 3.67 (m, 2H, CH_2N), 3.55 (m, 4H, CH_2N), 3.00 (m, 2H, H-4''), 2.66 (m, 2H, H-1''), 2.35 (d, 1H, $J_{H,3''} = 1.0$ Hz, CH_3), 1.88 (m, 4H, H-2'', H-3''), 1.80-1.26 (m, 16H, CH_2) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 182.3 (C=O), 182.2 (C=O), 168.0 (C=C), 167.9 (C=C), 161.9 (C-7''), 161.3 (C-2''), 156.9 (C-4a''), 154.9 (C-9''), 152.8 (C-4''), 151.6 (C-9''), 145.7 (C-10a''), 128.9 (C-5''), 126.7 (C-6''), 125.5 (C-5''), 123.7 (C-7''), 123.2 (C-8''), 119.3 (C-8a''), 114.8 (C-9a''), 113.2 (C-6''), 112.3 (C-3''), 111.4 (C-10''), 101.1 (C-8''), 68.2 (CH_2O), 48.9 (CH_2N), 44.3 (CH_2N), 44.1 (CH_2N), 32.8 (C-1''), 31.2 (CH_2), 30.9 (CH_2), 30.8 (CH_2), 28.7 (CH_2), 26.2 (C-4''), 26.0 (CH_2), 25.9 (CH_2), 25.5 (CH_2), 24.5 (CH_2), 22.7 (C-3''), 22.3 (C-2''), 18.5 (CH_3) ppm. HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{O}_5\text{N}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 651.3541, observado: 651.3528.

5.2.12.4 **3-[[6'-((4''-((metil(prop-2'''-in-1'''-il)amino)metil)-2''-oxo-2'H-cromen-7''-il)oxi)hexil]amino]-4-[[6'-((1'',2'',3'',4''-tetrahidroacridin-9''-il)amino)hexil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (38d).**



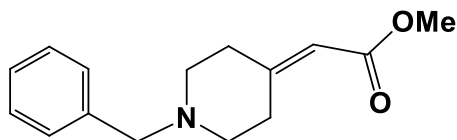
Se adicionó **37** (52.3 mg, 0.13 mmol, 1 eq.) y derivado **46** (65.92 mg, 0.19 mmol, 2 eq.) obteniéndose **38d** como una espuma color marrón. Rendimiento: 60.9 mg, 66%; R_f 0.89 (AcOEt/MeOH 1:1). ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- D_6) δ : 8.19 (m, 1H, $J_{5'',6''} = 8.5$ Hz, H-5), 7.80 (d, 1H, $J_{8'',7''} = 8.5$ Hz, H-8'), 7.73 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8.3$ Hz, H-5'), 7.62 (t, 1H, $J_{6'',5''} = J_{6'',7''} = 7.5$ Hz, H-6''), 7.56 (s, 1H, NH), 7.41 (t, 1H, $J_{7'',6''} = J_{7'',8''} = 7.5$ Hz, H-7), 6.93 (d, 1H, $J_{8'',6''} = 2.2$ Hz, H-8), 6.91 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8.4$ Hz, $J_{6'',8''} = 2.2$ Hz, H-6), 6.22 (t, 1H, $J_{3'',\text{H}} = 0.9$ Hz, H-3''), 4.10 (m, 2H, CH_2N), 4.04 (t, $J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 2H, CH_2O), 3.65 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.55 (m, 4H, CH_2N), 3.29 (m, 2H, CH_2N), 3.23 (t, $J_{\text{H,H}} = 2.3$ Hz, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.90 (m, 2H, H-4''), 2.66 (m, 2H, H-1''), 2.26 (s, 1H, CH_3), 1.80 (m, 4H, H-2'', H-3''), 1.71 (m, 2H, CH_2) 1.60 (m, 2H, CH_2) 1.55-1.22 (m, 12H, CH_2) ppm; ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- D_6) δ : 190.4 (C=O), 190.4 (C=C), 182.3 (C-4a''), 167.9 (C-9''), 167.8 (C-10a''), 161.7 (C-7''), 160.4 (C-2''), 155.2 (C-9''), 152.6 (C-4''), 129.7 (C-5''), 129.6 (C-6''), 126.9 (C-5''), 123.9 (C-7''), 123.8 (C-8''), 118.6 (C-8a''), 114.2 (C-9a''), 112.4 (C-6''), 111.9 (C-3''), 111.5 (C-10''), 101.1 (C-8''), 78.7 (C \equiv CH), 76.6 (C \equiv CH), 68.2 (CH_2O), 57.9 ($\text{CH}_2\text{C-4''}$), 55.9 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 47.7 (CH_2N), 45.1 (CH_2N), 43.2 (CH_2N), 43.1 (CH_2), 41.4 (CH_3N), 31.2 (C-1''), 30.7 (CH_2), 30.3 (CH_2), 28.4 (CH_2), 25.9 (CH_2), 25.6 (C-4''), 25.5 (CH_2), 25.1 (CH_2), 24.7 (CH_2), 22.3 (C-3''), 21.7 (C-2''), ppm. HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{43}\text{H}_{52}\text{O}_5\text{N}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 718.3963, observado: 718.3955.

5.2.12.5 **3-[(3'',4''-dimetoxifenetil)amino]-4-[[6''-(1'',2'',3'',4''-tetrahidroacridin-9''-il)amino]hexil]amino}ciclobut-3-eno-1,2-diona (38e).**



Se adicionó **37** (90 mg, 0.22 mmol, 1 eq.) y derivado **49** (60.02 mg, 0.33 mmol, 1.5 eq.) obteniéndose **38e** como una espuma color marrón. Rendimiento: 68.4 mg, 56%; R_f 0.39 (AcOEt/MeOH 1:1). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, MeOD/ CDCl_3 , 0.5:0.1) δ : 8.14 (m, 1H, $J_{5'',6''} = 8.7$ Hz, H-5''), 7.75 (d, 1H, $J_{8'',7''} = 7.7$ Hz, H-8''), 7.60 (t, 1H, $J_{6'',5''} = J_{6'',7''} = 7.6$ Hz, H-6''), 7.40 (t, 1H, $J_{7'',6''} = J_{7'',8''} = 7.5$ Hz, H-7), 6.81 (m, 2H, Ar-H), 6.73 (dd, 1H, $J_{\text{H,H}} = 8.1$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, Ar-H), 3.84-3.76 (m, 5H, CH_2N , CH_3O), 3.75 (s, 3H, CH_3O), 3.60 (m, 2H, CH_2N), 3.52 (m, 2H, CH_2N), 2.96 (m, 4H, H-4''), 2.83 (t, $J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH_2C), 2.72 (m, 2H, H-1''), 1.90 (m, 4H, H-2'', H-3''), 1.67 (m, 2H, CH_2), 1.54 (m, 2H, CH_2), 1.43-1.32 (m, 4H, CH_2) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, MeOD/ CDCl_3 , 0.5:0.1) δ : 181.7 (C=O), 181.6 (C=O), 167.5 (C=C), 167.4 (C=C), 155.7 (C-4a''), 152.4 (C-9''), 148.6 (Ar-*p*), 147.5 (C-10a''), 144.3 (Ar-*ipso*), 130.5 (C-5''), 128.8 (C-6''), 124.4 (C-7''), 123.2 (Ar-*o*), 123.0 (C-8''), 120.6 (C-8a''), 118.6 (C-9a''), 114.1 (Ar-*o*), 112.1 (Ar-*m*), 111.3 (Ar-*m*), 54.7 (OCH_3), 54.5 (OCH_3), 44.7 (CH_2N), 43.1 (CH_2N), 36.2 (CH_2N), 31.3 (C-1''), 30.2 (CH_2), 30.1 (CH_2), 25.5 (C-4''), 25.1 (2 CH_2), 24.0 ($\text{CH}_2\text{-C}$), 22.0 (C-3''), 21.4 (C-2'') ppm. HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{O}_4\text{N}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 557.3122, observado: 557.3122.

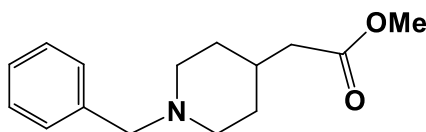
5.2.13. 2-(1-Bencilpiperidin-4-iliden)acetato de metilo (53).



El compuesto **53** se sintetizó usando el procedimiento repostado Contreras y col.⁷⁴ Una mezcla de K_2CO_3 (1.68 g, 12.14 mmol, 1.5 eq.) y fosonoacetato de trietilo (1.5 ml, 12.14 mmol, 1.5 eq.) en THF anh. (20 ml) se agito a t.a durante 15 min y después se colocó a reflujo por 20 min. Esta mezcla se enfrió y se añadió la *N*-bencilpiperidin-4-ona, posteriormente se colocó a reflujo durante 72 h. La

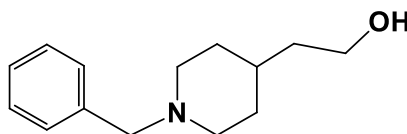
solución una vez fría, se adiciono una solución de K_2CO_3 al 10% (10 ml) y la mezcla se extrajo con AcOEt (3x30 ml), la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H_2O (3x20 ml); se secó con Na_2SO_4 , se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (2:1 Ciclohex/AcOEt) obteniéndose **53** como un aceite incoloro. Rendimiento: 1.81 mg, 86%; R_f 0.76 (Ciclohex/AcOEt 1:1).

5.2.14. 2-(1-Bencilpiperidin-4-il)acetato de metilo (**54**).



El compuesto **54** se sintetizó usando el procedimiento repostado Sakaki y col.⁷⁵ El compuesto **53** (200 mg, 0.77 mmol, 1 eq.) y $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (18.33 mg, 0.08 mmol, 0.1 eq.) en MeOH (5 ml), se colocó a 0 °C y se adiciono poco a poco $NaBH_4$ (204.2 mg, 5.40 mmol, 7 eq.). Terminada la adición, la solución se agito durante 20 min; después se evaporo el disolvente y se redisolvió en AcOEt (5 ml) y H_2O (10 ml). Se extrajo con AcOEt (3x30 ml) y la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H_2O (3x20 ml); se secó con Na_2SO_4 , se filtró, el filtrado se concentró a sequedad y se utilizo sin ninguna purificación adicional obteniéndose **54** como un color crema. Rendimiento: 197.9 mg, 98%; R_f 0.34 (Ciclohex/AcOEt 1:1).

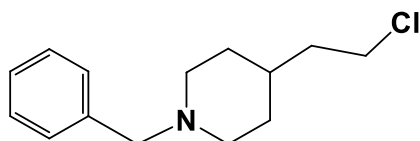
5.2.15. 2-(1-Bencilpiperidin-4-il)etan-1-ol (**55**).



El compuesto **54** (183.6 mg, 0.70 mmol, 1 eq.) se disolvió en THF anh. (5 ml), se colocó a 0 °C y se adiciono poco a poco $LiAlH_4$ (26.65 mg, 0.70 mmol, 1 eq.). La solución se agito durante 20 min, terminada la reacción se adiciono una solución de NaOH al 10% (10 ml) y se filtran las sales en celita. El filtrado se extrajo con AcOEt (3x30 ml) y la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H_2O (3x20 ml); se secó con Na_2SO_4 , se filtró, el filtrado se concentró a sequedad y se utilizo sin ninguna purificación adicional obteniéndose **55** como un aceite incoloro. Rendimiento 145 mg, 94%;

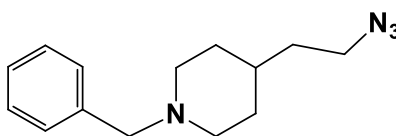
R_f 0.19 (Ciclohex/AcOEt 3:7). Los datos espectroscópicos de **55** fueron comparados con los reportados en la bibliografía.^{77,78}

5.2.16. 1-Bencil-4-(2-cloroetil)piperidina (**56**).



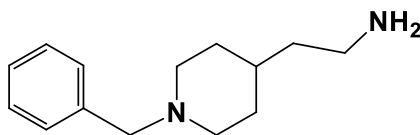
El compuesto **56** se sintetizó usando el procedimiento repostado Contreras y col.⁷⁴ Una solución de **55** (2.59 g, 11.82 mmol, 1 eq.) en CH_2Cl_2 (20 ml) se coloca a 0 °C y se adicionó SOCl_2 (1.7 ml, 23.63 mmol, 2 eq.) gota a gota. Después terminada la adición, esta mezcla se colocó a reflujo durante 2 h; se evaporó el disolvente y se redisuelve con AcOEt (10 ml). Se le adicionó una solución de K_2CO_3 al 10% y se extrajo con AcOEt (3x30 ml), la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H_2O (3x20 ml); se secó con Na_2SO_4 , se filtró, el filtrado se concentró a sequedad y se utilizó sin ninguna purificación adicional obteniéndose **56** como un aceite color marrón. Rendimiento: 2.58 g, 91%; R_f 0.51 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1).

5.2.17. 4-(2-Azidoetil)-1-bencilpiperidina (**57**).



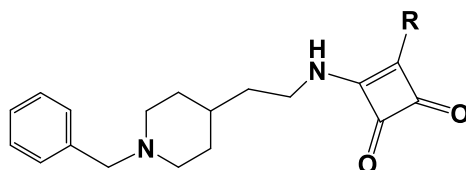
Una solución de **56** (2.55 g, 10.72 mmol, 1 eq.) en DMF (5 ml) se adicionó NaN_3 (2.10 g, 32.15 mmol, 3 eq.) y esta mezcla se calentó a 70 °C durante 21 h. Terminada la reacción se dejó enfriar y se extrajo con AcOEt (3x30 ml), la fase orgánica se lavó con salmuera (3x20 ml), H_2O (3x0 ml); se secó con Na_2SO_4 , se filtró y el filtrado fue concentrado a sequedad para dar **57** sin ninguna purificación adicional como un aceite color marrón. Rendimiento: 1.91 g, 73%; R_f 0.38 (Ciclohex/AcOEt 8:2).

5.2.18. 2-(1-Bencilpiperidin-4-il)etan-1-amina (58).



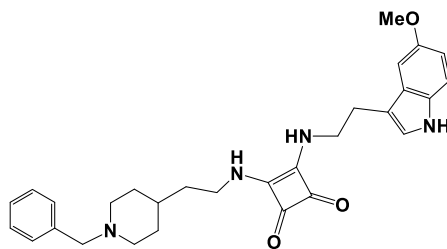
El compuesto **57** (282 mg, 1.15 mmol, 1 eq.) se disolvió en THF anh. (5 ml), se colocó a 0 °C y se adiciono LiAlH₄ (175.19 mg, 4.62 mmol, 4 eq.) poco a poco. La solución se agito durante 20 min a 0 °C y después se colocó por 1 h a t.a, terminada la reacción se adiciono una solución de NaOH al 10% (10 ml) y se filtraron las sales sobre Celite®; se extrajo con AcOEt (3x30 ml), se lavó con salmuera (3x20 ml), H₂O (3x20 ml); se secó con Na₂SO₄, se filtró, el filtrado se concentró a sequedad y se utilizo sin ninguna purificación adicional. Rendimiento 218.8 mg, 87%; *R_f* = 0.20 (20:1 CH₂Cl₂/MeOH). Aceite color amarillo.

5.2.19. Procedimiento general para la preparación de las escuaramidas con un derivado de donepezilo (60a-e).



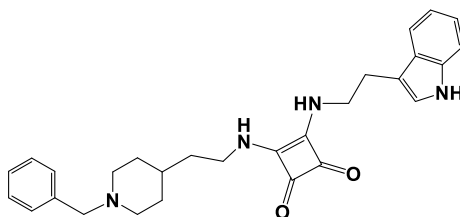
Una solución de **58** (1 eq.) en MeOH (10 ml), se adicionó el escuaramidato **40** (1 eq.) y esta mezcla se colocó a reflujo por 3 h, terminada la reacción se adicionó las correspondientes aminas **23h**, **triptamina**, **46**, **49** o **51**. Después la mezcla se dejó a reflujo por 2-12 h, terminada la reacción se enfrió y se evaporó el disolvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna 20:1 CH₂Cl₂/MeOH → 15:1 CH₂Cl₂/MeOH → 10:1 CH₂Cl₂/MeOH.

5.2.19.1 **3-[[2'-(5''-metoxi-1''H-indol-3''-il)etil]amino]-4-[[2'-(1''-bencilpiperidin-4''-il)etil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (60a).**



Se adicionó **58** (58.6 mg, 0.27 mmol, 1 eq.), escuaramidato **40** (38.14 mg, 0.27 mmol, 1 eq.) y la amina **51** (76.56 mg, 0.40 mmol, 1.5 eq.) obteniéndose **60a** como una espuma color crema. Rendimiento: 97.4 mg, 75%; R_f 0.38 (AcOEt/MeOH 2:1). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- D_6) δ : 10.66 (s, 1H, NH), 7.57-7.17 (m, 8H, Ph-H, NH, Ar-H), 7.11 (m, 2H, CH=C, Ar-H), 6.70 (dd, 1H, $J_{\text{H,H}} = 8.7$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 2.3$ Hz, Ar-H), 3.76 (m, 5H, OCH₃, CH₂N), 3.55-3.45 (m, 4H, CH₂N, CH₂Ph), 2.92 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, CH₂C=CH), 2.78 (m, 2H, H-2''), 1.93 (m, 2H, H-6''), 1.62 (m, 2H, H-3''), 1.42 (m, 2H, CH₂CH), 1.32-1.08 (m, 3H, H-5'', H-4'') ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, DMSO- D_6) δ : 182.4 (C=O), 167.8 (C=C), 153.1 (Ar-*p*), 131.4 (Ar-*ipso*), 128.9 (Ph-*m*), 128.2 (Ph-*o*, Ph-*ipso*), 127.6 (Ar-*o*), 126.9 (Ph-*p*), 123.7 (CH=C), 112.1 (C=CH), 111.3 (Ar-*o*), 110.7 (Ar-*m*), 100.2 (Ar-*m*), 62.4 (CH₂Ph), 55.3 (OCH₃), 53.1 (C-2'', C-6''), 44.1 (CH₂N), 40.9 (CH₂N), 37.4 (CH₂CH), 32.3 (C-4''), 31.6 (C-3, C-5''), 27.4 (CH₂-C=CH) ppm. HRESI-MS m/z calc. para C₂₉H₃₅O₃N₄ ([M+H]⁺): 487.2704, observado: 487.2697.

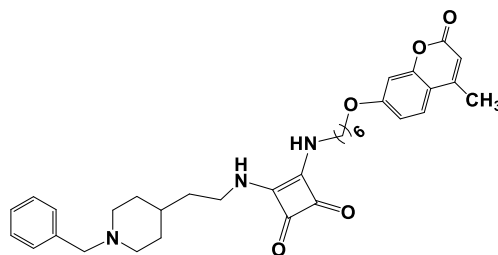
5.2.19.2 **3-[[2'-(1''H-indol-3''-il)etil]amino]-4-[[2'-(1''-bencilpiperidin-4''-il)etil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (60b).**



Se adicionó **58** (60.8 mg, 0.28 mmol, 1 eq.), escuaramidato **40** (39.57 mg, 0.28 mmol, 1 eq.) y la triptamina (66.92 mg, 0.42 mmol, 1.5 eq.) obteniéndose **60b** como una espuma color amarillo. Rendimiento: 82.6 mg, 65%; R_f 0.31 (AcOEt/MeOH 2:1). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- D_6) δ : 10.84 (s, 1H, NH), 7.58 (m, 1H, Ar-*p*), 7.51-7.19 (m, 8H, Ph-H, NH, Ar-*m*), 7.16 (m, 1H, CH=C), 7.06 (t, 1H,

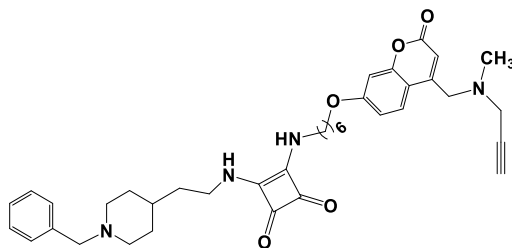
$J_{H,H} = J_{H,H} = 7.5$ Hz, Ar-H), 6.97 (t, 1H, $J_{H,H} = J_{H,H} = 7.5$ Hz, Ar-H), 3.79 (m, 2H, CH₂N), 3.54-3.46 (m, 4H, CH₂N, CH₂Ph), 2.95 (t, 2H, $J_{H,H} = J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH₂C=CH), 2.78 (m, 2H, H-2''), 1.93 (m, 2H, H-6''), 1.62 (m, 2H, H-3''), 1.42 (m, 2H, CH₂CH), 1.32-1.08 (m, 3H, H-5'', H-4'') ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-D₆) δ: 182.4 (C=O), 167.8 (C=C), 136.3 (Ar-*ipso*), 128.9 (Ph-*m*), 128.2 (Ph-*o*, Ph-*ipso*), 127.2 (Ar-*o*), 127.0 (Ph-*p*), 123.1 (CH=C), 121.1 (Ar-*p*), 118.4 (C=CH), 118.4 (Ar-*o*), 111.4 (Ar-*m*), 110.9 (Ar-*m*), 62.3 (CH₂Ph), 53.1 (C-2'', C-6''), 44.0 (CH₂N), 40.9 (CH₂N), 37.4 (CH₂CH), 32.3 (C-4''), 31.6 (C-3'', C-5''), 27.2 (CH₂-C=CH) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₈H₃₃O₂N₄ ([M+H]⁺): 457.2598, observado: 457.2590.

5.2.19.3 3-{{6'-((4''-metil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi)hexil}amino}-4-{{2'-(1''-bencilpiperidin-4''-il)etil}amino}ciclobut-3-eno-1,2-diona (60c).



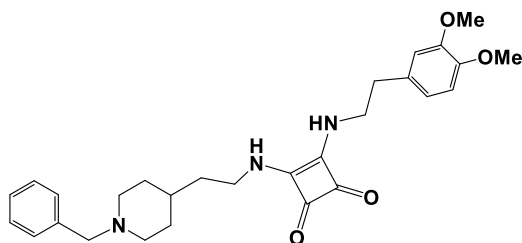
Se adicionó **58** (65 mg, 0.30 mmol, 1 eq.), escuaramidato **40** (42.30 mg, 0.30 mmol, 1 eq.) y la amina **23h** (163.98 mg, 0.60 mmol, 2 eq.) obteniéndose **60c** como una espuma color crema. Rendimiento: 128.7 mg, 76%; *R_f* 0.30 (AcOEt/MeOH 2:1). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.70 (s, 2H, NH), 7.37 (d, $J_{5'',6''} = 8.8$ Hz, 1H, H-5''), 7.26-7.12 (m, 5H, Ph-H), 6.73 (dd, $J_{6'',5''} = 8.8$ Hz, $J_{6'',8''} = 2.4$ Hz, 1H, H-6''), 6.63 (d, $J_{8'',6''} = 2.4$ Hz, 1H, H-8''), 6.01 (q, $J_{3'',H} = 1.1$ Hz, 1H, H-3''), 3.87 (t, 2H, $J_{H,H} = J_{H,H} = 6.4$ Hz, CH₂O), 3.64-3.55 (m, 4H, CH₂N), 3.41 (s, 2H, CH₂Ph), 2.80 (m, 2H, H-2''), 2.29 (d, $J_{H,3''} = 1.1$ Hz, 1H, CH₃), 1.89 (m, 2H, H-6''), 1.70 (m, 2H, H-3''), 1.64-1.57 (m, 4H, CH₂), 1.49 (m, 2H, CH₂CH), 1.42-1.16 (m, 7H, H-5'', H-4'', CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ: 182.1 (C=O), 168.0 (C=C), 167.8 (C=C), 162.4 (C-7''), 161.4 (C-2''), 155.1 (C-9''), 152.9 (C-4''), 129.2 (Ph-*m*), 128.2 (Ph-*o*, Ph-*ipso*), 127.2 (Ph-*p*), 125.6 (C-5''), 113.4 (C-10''), 112.6 (C-6''), 111.7 (C-3''), 101.3 (C-8''), 68.4 (CH₂O), 63.2 (CH₂Ph), 53.6 (C-2'', C-6''), 44.5 (CH₂N), 42.3 (CH₂N), 37.7 (CH₂CH), 32.8 (C-4''), 31.8 (C-3'', C-5''), 31.0 (CH₂), 28.9 (CH₂), 26.2 (CH₂), 25.7 (CH₂), 18.7 (C-CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₃₄H₄₂O₅N₃ ([M+H]⁺): 572.3119, observado: 572.3109.

5.2.19.4 3-[[6'-((4''-(etnil(metil)amino)metil)-2''-oxo-2'H-cromen-7''-il)oxi)hexil]amino]-4-[[2'-(1''-bencilpiperidin-4''-il)etil]amino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (60d).



Se adicionó **58** (40.9 mg, 0.19 mmol, 1 eq.), escuaramidato **40** (26.6 mg, 0.19 mmol, 1 eq.) y la amina **46** (128.23 mg, 0.37 mmol, 2 eq.) obteniéndose **60d** como una espuma color crema. Rendimiento: 87.7 mg, 73%; R_f 0.33 (AcOEt/MeOH 2:1). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.66 (d, $J_{5,6} = 8.9$ Hz, 3H, H-5''), 7.27-7.11 (m, 5H, Ph-H), 6.72 (dd, $J_{6'',5''} = 8.9$ Hz, $J_{6'',8''} = 2.4$ Hz, 1H, H-6''), 6.66 (d, $J_{8'',6''} = 2.4$ Hz, 1H, H-8''), 6.24 (m, 1H, H-3''), 3.88 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, CH_2O), 3.66-3.54 (m, 6H, CH_2N , $\text{CH}_2\text{C-4''}$), 3.44 (s, 2H, CH_2Ph), 3.30 (d, $J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.82 (m, 2H, H-2''), 2.30 (s, 1H, CH_3), 2.25 (t, $J_{\text{H,H}} = J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1H, $\text{CH}\equiv\text{C}$), 1.92 (m, 2H, H-6''), 1.70 (m, 2H, H-3''), 1.62 (m, 4H, CH_2), 1.51 (m, 2H, CH_2CH), 1.45-1.11 (m, 7H, H-5'', H-4'', CH_2) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 182.2 (C=O), 182.1 (C=O), 168.1 (C=C), 167.8 (C=C), 162.0 (C-7''), 161.5 (C-2''), 155.6 (C-9''), 152.4 (C-4''), 129.3 (Ph-*m*), 128.3 (Ph-*o*, Ph-*ipso*), 127.3 (Ph-*p*), 126.1 (C-5''), 112.6 (C-6''), 112.2 (C-10''), 112.0 (C-3''), 101.2 (C-8''), 77.7 (C \equiv CH), 74.2 (C \equiv CH), 68.3 (CH_2O), 63.2 (CH_2Ph), 56.4 ($\text{CH}_2\text{C-4''}$), 53.5 (C-2'', C-6''), 45.6 (CH_3N), 44.6 (CH_2N), 42.2 (CH_2N), 42.0 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 37.6 (CH_2CH), 32.7 (C-4''), 31.8 (C-3'', C-5''), 31.0 (CH_2), 28.9 (CH_2), 26.2 (CH_2), 25.7 (CH_2) ppm. HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{O}_5\text{N}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 639.3541, observado: 639.3531.

5.2.19.5 3-[(3'',4''-dimetoxifenetil)amino]-4-[2'-(1''-bencilpiperidin-4''-il)etil]amino}ciclobut-3-eno-1,2-diona (60e).



Se adicionó **58** (51.3 mg, 0.23 mmol, 1 eq.), escuaramidato **40** (33.39 mg, 0.23 mmol, 1 eq.) y la amina **49** (85.14 mg, 0.47 mmol, 2 eq.) obteniéndose **60e** como una espuma color crema. Rendimiento: 70.6 mg, 63%; R_f 0.22 (AcOEt/MeOH 2:1). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, MeOD) δ : 7.73 (s, 1H, NH), 7.36-7.24 (m, 5H, Ph-H), 6.84 (m, 2H, Ar-H), 6.76 (dd, 1H, $J_{\text{H,H}} = 8.1$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 2.0$ Hz, Ar-H), 4.41 (s, 1H, NH), 3.83 (m, 5H, OCH₃, CH₂N), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.62 (m, 4H, CH₂N, CH₂Ph), 2.95 (m, 2H, H-2''), 2.86 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, CH₂C), 2.12 (m, 2H, H-6''), 1.74 (m, 2H, H-3''), 1.53 (m, 2H, CH₂CH), 1.43-1.26 (m, 3H, H-5'', H-4'') ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, DMSO-D₆) δ : 182.4 (C=O), 182.3 (C=O), 167.8 (C=C), 167.7 (C=C), 148.7 (Ar-*p*), 147.4 (Ar-*m*), 131.0 (Ar-*ipso*), 129.1(Ph-*m*), 128.2 (Ph-*o*, Ph-*ipso*), 127.1 (Ph-*p*), 120.8 (Ar-*o*), 112.7 (Ar-*o*), 112.0 (Ar-*m*), 62.3 (CH₂Ph), 55.6 (OCH₃), 55.4 (OCH₃), 53.0 (C-2'', C-6''), 44.7 (CH₂N), 40.9 (CH₂N), 37.4 (CH₂CH), 36.5 (CH₂C), 32.2 (C-4''), 31.4 (C-3'', C-5'') ppm. HRESI-MS m/z calc. para C₂₈H₃₆O₄N₃ ([M+H]⁺): 478.2700, observado: 478.2694.

Capítulo 3.6: Conclusiones

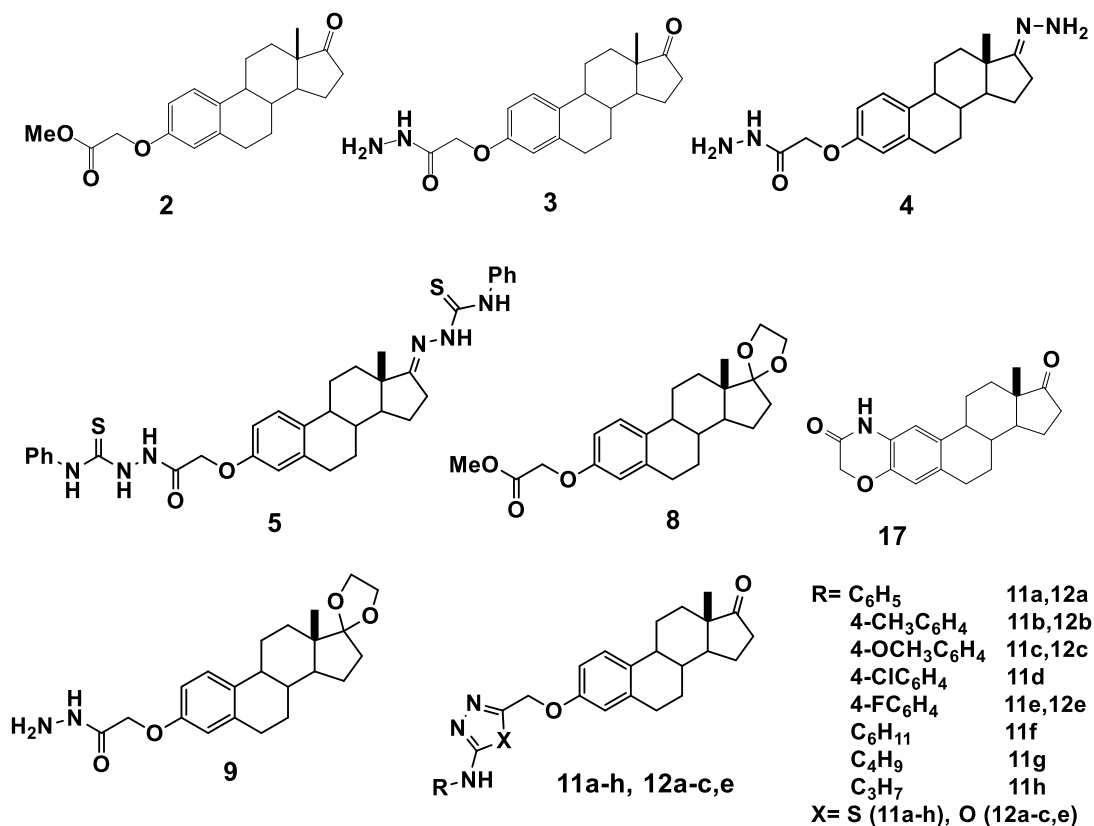
- ❖ Se ha demostrado la versatilidad del núcleo de escuaramida para la preparación de derivados con potencial actividad anti-Alzheimer.
- ❖ Se logró la obtención de una nueva familia de heterodímeros de tacrina conectados por una unidad de escuaramida, dando 5 derivados (**34a-e**) con rendimientos de 56% a 78%.
- ❖ Se prepararon los derivados **56a-e** con rendimientos de 63% a 76%, análogos del donepezilo con una unidad de escuaramida.
- ❖ Se mejoró el rendimiento de la alquilación del derivado **30** de la tacrina de un 81% en comparación del reportado en la literatura de 28% mediante el incremento de los tiempos de reacción.
- ❖ La obtención del alcohol **51**, intermedio clave para generar la unidad de *N*-bencilpiperidina en los análogos de donepezilo se llevó a cabo mediante dos reducciones consecutivas: reducción quimioselectiva del doble enlace del correspondiente éster α,β -insaturado con NaBH_4 y NiCl_2 como catalizador, seguido de reducción del éster con LiAlH_4 .
- ❖ Se logró la obtención de las diferentes aminas que se utilizaron para la formación de las escuaramidas a partir de diferentes precursores
- ❖ La caracterización de cada compuesto se llevó a cabo debidamente utilizando técnicas espectroscópicas como RMN de ^1H , ^{13}C (DEPT, HSQC, HMBC) y espectrometría de masas.

Unidad 4: Resultados Biológicos

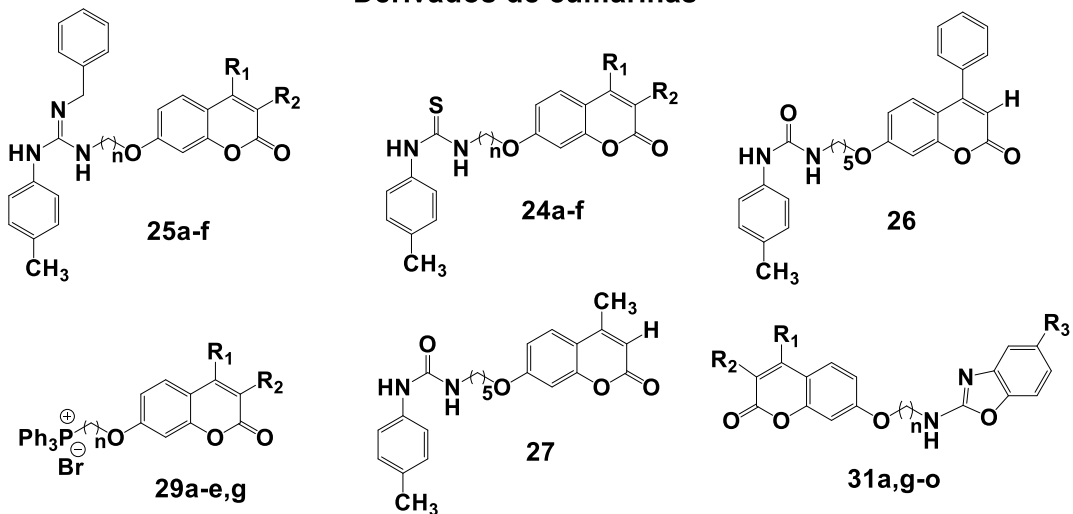
4.1. Ensayos de pruebas biológica.

En colaboración con algunos grupos de investigación, se realizaron diferentes ensayos de actividad biológica de las familias que se obtuvieron anteriormente, como los derivados de esteroides (**2-17**) que se les realizaron solamente ensayos de actividad antiproliferativa. A los derivados de guanidina (**25a-f**), las sales de fosfonio (**29a-e,g**) y los bicíclo de benzoxazoles (**31a,g-o**), además de las tioureas intermediarias (**24a-f**) y las dos ureas que se lograron aislar (**26** y **27**); se le realizaron ensayos de actividad antiproliferativa y ensayo de la capacidad inhibitoria de anhidrasa carbónica (CA), para los derivados de bicíclo de benzoxazoles (**31a,g-o**) se les realizaron ensayos de inhibición de las colinesterasas. Los derivados de escuaramidas (**38a-e** y **60a-e**) se les realizaron ensayos de actividad antiproliferativa y ensayos de inhibición de las colinesterasas como se muestra a continuación, pero algunos de estos derivados se siguen estudiando a profundidad en otros tipos de ensayos que no se muestran en esta tesis, debido a que están en proceso. En la figura 4.1 se muestran las estructuras de estos derivados.

Derivados de esteroides



Derivados de cumarinas



Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	n
a	CH ₃	H	H	5
b	CH ₃	CH ₃	-	5
c	CH ₃	Cl	-	5
d	Ph	H	-	5
e	CH ₃	H	-	12
f	CH ₃	H	-	2
g	CH ₃	H	H	3
h	CH ₃	H	H	6
i	CH ₃	CH ₃	H	6
j	CH ₃	Cl	H	6
k	Ph	H	H	6
l	CH ₃	H	Br	5
m	CH ₃	H	CH ₃	5
n	CH ₃	H	Ph	5
o	CH ₃	H	SO ₂ NH ₂	5

Derivados de escuaramidas

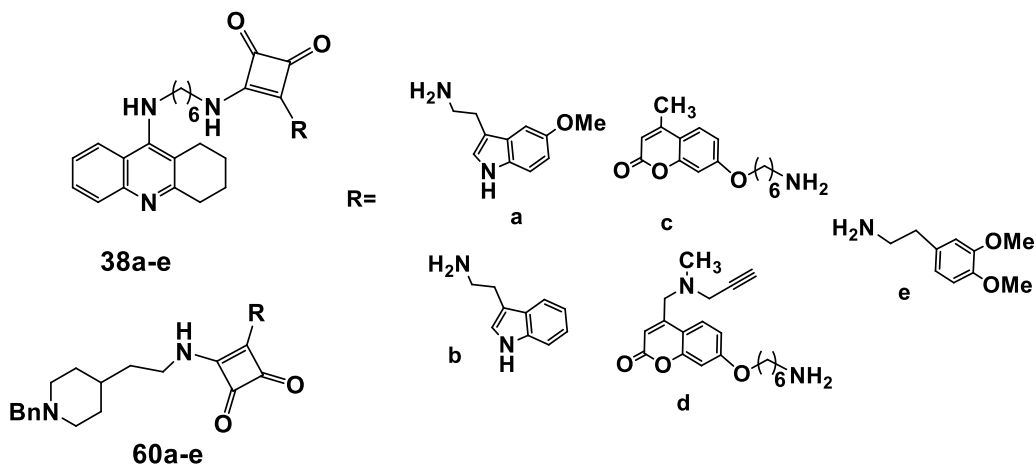


Figura 4.1. Estructuras de los compuestos estudiados.

4.2 Ensayos de actividad antiproliferativa.

Las pruebas de actividad antiproliferativa *in vitro* fueron realizadas en el grupo del Dr. José M. Padrón, del Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González (Universidad de la Laguna, Tenerife).

4.2.1. Metodología

La actividad antiproliferativa *in vitro* se evaluó utilizando modificaciones menores²⁴⁹ del protocolo del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos²⁵⁰ contra las seis líneas de células tumorales sólidas humanas y la única no tumoral (BJ-hTert , fibroblastos humanos).

4.2.2. Discusión de los resultados del ensayo de actividad antiproliferativa.

Este ensayo se realizó para los derivados de esteroides (**2-17**), guanidina (**25a-f**), las sales de fosfonio (**29a-e,g**) además de las tioureas intermediarias (**24a-f**) y las dos ureas que se lograron aislar (**26** y **27**), los bicíclicos de benzoxazoles (**31a,g-o**) así como de las escuaramidas (**38a-e** y **60a-e**) como ya se había mencionado anteriormente. Es decir este ensayo se dividió en tres familias: derivados de esteroides, derivados de cumarinas y derivados de escuaramida como se muestra a continuación, para realizar una discusión de estructura-actividad respecto a los resultados obtenidos.

4.2.2.1 Derivados de Esteroides.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para los derivados **2-17**, los valores se expresan como GI₅₀ definido como la concentración del compuesto necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular, el cual debe ser menor a 10 µM. Menores valores de GI₅₀ implican una mayor capacidad antiproliferativa del compuesto estudiado.²⁵¹ Los fármacos antitumorales Abiraterona y Galeterona se utilizaron como referencia para conocer la potencia de nuestros compuestos.

²⁴⁹ Miranda P. O.; Padrón J. M.; Padrón J. I.; Villar J.; Martín V. S.; *ChemMedChem* **2006** 1, 323-329.

²⁵⁰ Skehan P.; Storeng R.; Scudiero D.; Monks A.; McMahon J.; Vistica D.; Warren J. T.; Bokesch H.; Kenney S.; Boyd M. R.; *J. Natl. Cancer Inst.* **1990** 82, 13, 1107-1112.

²⁵¹ Calcaterra V.; López Ó.; Fernández-Bolaños J. G.; Plata G. B.; Padrón J. M.; *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 94, 63-72.

Tabla 1. Resultados de las pruebas antiproliferativas (GI_{50} en μM) de los derivados 2-17.

Compuestos	Línea celular (Valores de GI_{50} expresados en μM)					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
2	48 ± 4.1	98 ± 2.9	44 ± 7.6	68 ± 6.5	>100	>100
3	>100	>100	>100	>100	>100	>100
4	46 ± 14	>100	34 ± 0.82	>100	71 ± 9.6	46 ± 12
5	87 ± 20	>100	>100	>100	>100	>100
8	54 ± 8.1	>100	51 ± 8.3	>100	96 ± 7.6	62 ± 5.5
9	33 ± 7.3	17 ± 0.45	18 ± 2.2	20 ± 1.7	31 ± 1.4	30 ± 5.6
11a	22 ± 4.0	30 ± 7.6	24 ± 9.0	54 ± 13	29 ± 13	20 ± 3.9
11b	21 ± 1.3	26 ± 1.0	21 ± 4.6	44 ± 5.5	43 ± 3.7	25 ± 4.3
11c	9.4 ± 0.2	35 ± 4.8	22 ± 1.5	23 ± 5.4	20 ± 4.2	19 ± 1.9
11d	9.8 ± 0.2	30 ± 6.9	14 ± 3.6	18 ± 5.8	16 ± 2.4	16 ± 3.7
11e	7.6 ± 1.2	29 ± 3.0	18 ± 4.4	19 ± 4.5	26 ± 4.2	29 ± 7.2
11f	5.1 ± 0.8	13 ± 3.5	5.5 ± 0.9	5.5 ± 1.0	3.9 ± 1.1	5.1 ± 1.4
11g	1.7 ± 1.2	10 ± 2.2	13 ± 3.3	2.9 ± 0.5	2.2 ± 0.1	4.7 ± 0.8
11h	11 ± 3.2	24 ± 5.3	14 ± 0.7	17 ± 1.0	5.2 ± 2.1	7.3 ± 0.5
12a	1.3 ± 0.5	4.8 ± 0.8	2.5 ± 0.3	3.6 ± 0.6	2.7 ± 1.1	4.6 ± 1.2
12b	4.6 ± 0.3	>100	33 ± 9.4	37 ± 5.6	7.7 ± 2.4	61 ± 21
12c	5.2 ± 0.4	>100	21 ± 2.4	>100	5.3 ± 0.7	7.5 ± 2.4
12e	1.9 ± 0.6	76 ± 23	11 ± 2.0	2.6 ± 0.1	3.3 ± 0.4	7.8 ± 1.1
17	18 ± 0.8	12 ± 0.2	9.2 ± 1.8	16 ± 0.76	18 ± 1.3	24 ± 6.1
Abiraterona	95 ± 8.0	>100	7.9 ± 0.5	85 ± 8.9	24 ± 4.5	42 ± 7.7
Galeterona	3.9 ± 1.3	10 ± 0.1	5.3 ± 0.4	3.9 ± 0.5	2.1 ± 0.1	2.7 ± 0.2

A549: cáncer de pulmón, HBL-100: cáncer de mama, HeLa: cáncer cérvico-uterino, SW1573: cáncer de pulmón, T-47D: cáncer de mama, WiDr: cáncer de colon.

En la figura 4.2 se muestra una comparación de la actividad antiproliferativa de los compuestos en las diferentes líneas celulares de tumores sólidos humanos ensayadas. La comparación de resultados permite realizar un análisis de relación estructura-actividad llegando a algunas conclusiones.

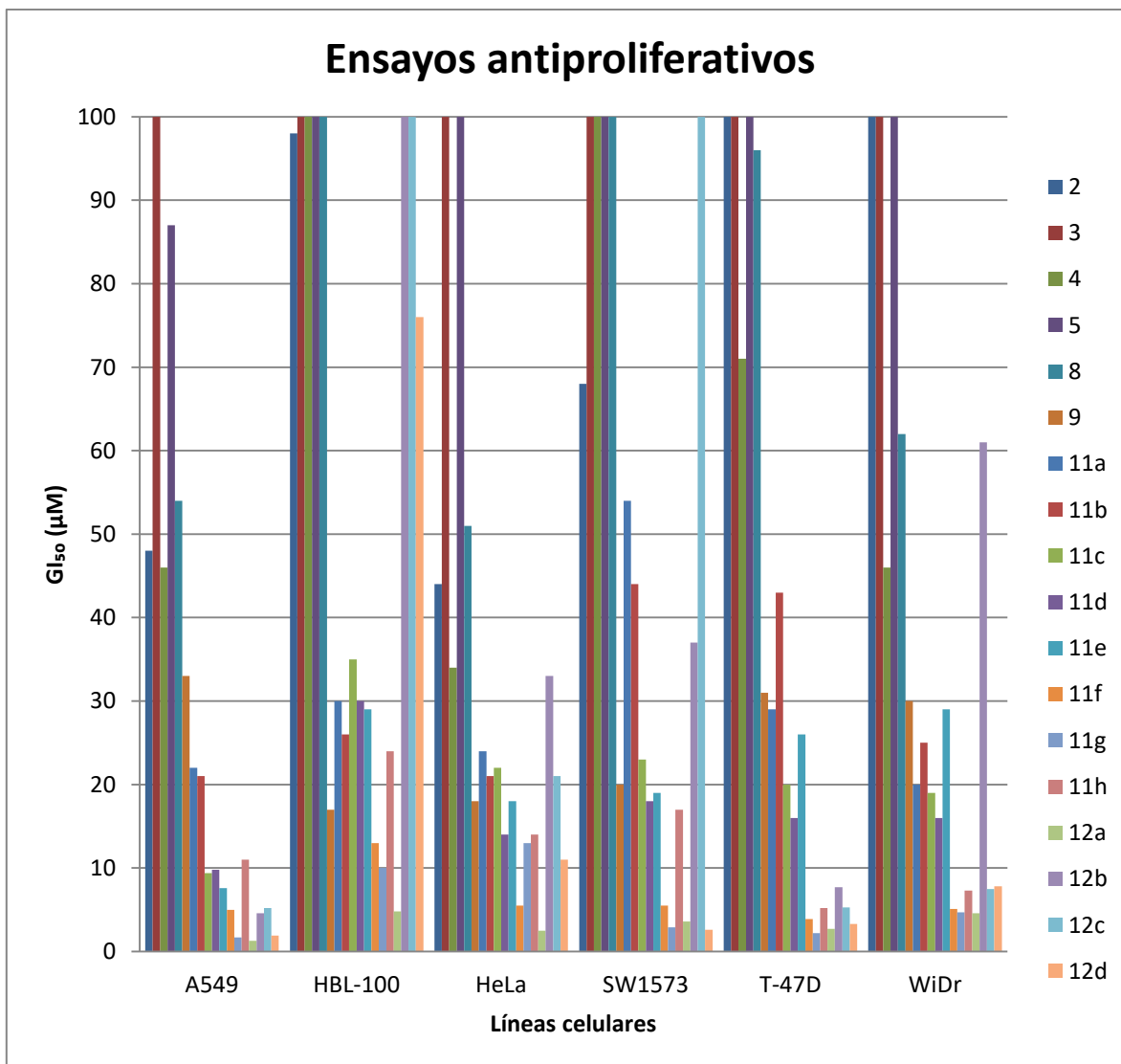


Figura 4.2. Resultados del ensayo de actividad antiproliferativa.

La comparación de estos resultados permite observar que los derivados **2-9** no fueron muy prometedores teniendo valores por arriba de los 10 μM e incluso ser inactivos a 100 μM , pero en algunas líneas celulares como A549, HBL-100 o SW1573 el derivado 9 tiene mejores valores en comparación al fármaco de referencia abiraterona. Dentro de las dos familias que se realizaron de 1,3,4-tiadiazoles y 1,3,4-oxadiazoles en forma general los derivados que contienen el átomo de oxígeno en el heterociclo de diazolina, presentan mejores valores en comparación a los derivados que contienen el átomo de azufre.

Dentro de los derivados **11a-h** los derivados que tienen en el heterociclo un sustituyente alifáticos (**11e-h**) se observa que tienen mejores resultados de aquellos que tienen como sustituyentes aromáticos (**11a-e**), pero en general dentro de esta familia (**11a-h**) tienen resultados mejores que el fármaco e referencia abiraterona utilizando actualmente para el cáncer; el derivado **11g** presenta mejores valores no solo para el fármaco abiraterona sino también para el fármaco galeteron en la mayoría de las líneas celulares. Por lo que para los derivados **11f-h** que son alifáticos se puede observar que tienen mejores valores con sustituyentes de cadena lineal (**11g,h**) que el que tiene el ciclo **11f**, pero no tan cortas como la de tres carbonos con valores 5.2-14 μM que disminuye su efectividad comparado ante los dos fármacos y solo presenta mejores valores que la abiraterona; se podría pensar que con una cadena más larga podría mejorar los valores de actividad antiproliferativa. Con respecto a los derivados 11a-e que tienen sustituyentes aromáticos, la mayoría tienen mejores valores que el fármaco de referencia abiraterona en casi todas las líneas celulares, pero no tan buenos para mejorar los del galeterona; solo en la línea celular de A549 los derivados **11c-e** muestran valores por debajo de los 10 μM en un rango de 7.6-9.4 μM , en las demás líneas son superiores a eso valores, se puede concluir que en esa línea los derivados que tienen anillos aromáticos y se en la posición *para* de este tiene sustituyentes más electronegativos que el H o C, por lo que el derivado **11e** tiene un valor más bajo que los otros derivados con 7.6 μM .

Dentro de los derivados **12a-c,e** que tienen como sustituyentes aromáticos en el heterociclo de diazoles, se observa que no sigue el mismo patrón que los derivado con átomo de azufre, ya que el derivado **12a** muestra valores mejores que los derivados 12b,c,e en todos las líneas celulares mejores que los dos fármacos utilizados como referencia, al no tener ningún sustituyente en el anillo aromático en la posición *para*, al introducir en esa posición un sustituyente disminuyo un poco en algunas líneas celulares pero se ve que se favorece teniendo un átomo de electronegativo como en el derivado **12e**, por que al tener un CH_3 o OMe en alguna líneas celulares mostraron valores por arriba de 10 μM e incluso ser inactivos en las líneas celulares. Cambiando de heterociclos ahora al formar una oxazina como el derivado **17**, donde está funcionando al anillo A del esqueleto de la estrona se observa que los valores no mejoran pero son buenos en comparación la referencia de abiraterona, que se podría pensar que bloqueando algunas de las posiciones en el anillo A de la estrona desfavorece la actividad antiproliferativa a que solo este sustituido o unido por un linker a un heterociclo a la estrona.

4.2.2.2 Derivados de Cumarina.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para los derivados de cumarinas **20a-d**, tioureas **24a-f**, ganidina **25a-f**, ureas **26** y **27**, sales de fosfonio **29a-e,g** y biciclo de benzoxazoles **31a,g-o**, del estudio de la capacidad antiproliferativa de esos derivados frente a 6 líneas tumorales diferentes, obteniéndose los siguientes resultados expresados en GI_{50} en unidades μM . Los fármacos antitumorales 5-Fluorouracilo y Cisplatino se utilizaron como referencia para conocer la potencia de nuestros compuestos.

Tabla 2. Resultados de las pruebas antiproliferativas (GI_{50} en μM) de los derivados **20a- 31o**.

Compuestos	Línea celular (Valores de GI_{50} expresados en μM)						
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr	Bj-hTERT
20a	>100	>100	9.2 ± 0.69	>100	>100	>100	NP
20b	68 ± 0.42	>100	>100	>100	>100	>100	NP
20c	47 ± 2	100	51 ± 5.4	88 ± 17	>100	>100	NP
20d	22 ± 9	39 ± 12	19 ± 7	22 ± 3	86 ± 20	35 ± 12	NP
24a	23 ± 7	69 ± 4	30 ± 2	39 ± 3.2	78 ± 6.1	62 ± 8.1	NP
24b	1.9 ± 0.2	3.5 ± 0.9	2.8 ± 0.33	2.7 ± 0.45	3.1 ± 0.15	3.2 ± 0.64	NP
24c	2.2 ± 0.9	4.2 ± 0.6	3.1 ± 0.77	3.1 ± 0.90	3.5 ± 0.57	3.3 ± 0.64	NP
24d	>100	>100	>100	>100	>100	>100	NP
24e	11 ± 11	38 ± 47	16 ± 16	16 ± 18	41 ± 48	30 ± 34	NP
24f	3.8 ± 0.10	22 ± 9.3	17 ± 0.36	8.6 ± 4.1	12 ± 3.9	9.7 ± 2.4	NP
25a	6.4 ± 3.1	9.0 ± 2.3	3.8 ± 1.3	6.1 ± 2.0	3.4 ± 0.3	2.8 ± 0.4	NP
25b	2.0 ± 0.27	2.0 ± 0.08	2.0 ± 0.30	1.9 ± 0.44	1.9 ± 0.34	1.3 ± 0.10	>100
25c	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.9 ± 0.3	>100
25d	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.13	1.7 ± 0.08	1.4 ± 0.06	1.1 ± 0.06	0.46 ± 0.03	>100
25e	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.85 ± 0.21	0.81 ± 0.09	0.87 ± 0.22	0.41 ± 0.06	>100
25f	13 ± 2.8	15 ± 1.2	13 ± 1.2	8.8 ± 1.60	5.2 ± 0.61	4.5 ± 0.13	NP
26	2.3 ± 0.60	7.7 ± 2.7	3.6 ± 0.82	4.8 ± 1.90	36 ± 2.4	33 ± 14	NP
27	>100	>100	>100	>100	>100	>100	NP
29a	2.1 ± 0.89	3.9 ± 0.29	3.8 ± 1.1	2.7 ± 0.56	3.6 ± 0.44	3.4 ± 0.39	NP
29b	2.8 ± 0.77	3 ± 1	2.1 ± 0.13	2.2 ± 0.68	2.4 ± 0.05	2.6 ± 0.73	NP
29c	2.5 ± 0.47	1.5 ± 0.44	1.6 ± 0.50	1.5 ± 0.41	2.5 ± 1.1	2.6 ± 0.73	NP
29d	1.6 ± 0.38	1.1 ± 0.26	0.6 ± 0.14	0.95 ± 0.14	0.72 ± 0.32	0.58 ± 0.19	>100

29e	0.36 ± 0.08	0.44 ± 0.09	0.32 ± 0.10	0.28 ± 0.06	0.29 ± 0.06	0.32 ± 0.05	>100
29g	5.5 ± 4.7	20 ± 2.7	11 ± 1.2	16 ± 0.68	24 ± 0.68	25 ± 2.5	NP
31a	15 ± 6.4	49 ± 5.5	39 ± 1.1	33 ± 3.8	38 ± 10	33 ± 0.29	NP
31g	32 ± 0.44	41 ± 4.7	30 ± 1.5	29 ± 3.8	33 ± 2.7	37 ± 3.7	NP
31h	8.3 ± 1.6	>100	96 ± 6.9	>100	>100	>100	NP
31i	15 ± 3	53 ± 14	29 ± 8.3	20 ± 2.7	>100	>100	NP
31j	2.6 ± 0.5	5.1 ± 1.4	3.9 ± 0.7	3.1 ± 0.5	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.5	NP
31k	>100	>100	>100	>100	>100	>100	NP
31l	6.5 ± 3.1	23 ± 4.8	16 ± 0.10	14 ± 1.1	32 ± 6.9	29 ± 0.69	NP
31m	>100	>100	>100	>100	>100	>100	NP
31n	41±20	30±9.3	28±13	60±4.4	>100	78±38	NP
31o	13±3	27±7.5	21±7	29±8	34±7.6	29±9	NP
5-Fluorouracilo	----	5.5 ± 2.3	15 ± 4.7	4.3 ± 1.6	47 ± 18	49 ± 6.7	5.5 ± 0.5
Cisplatino	----	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.3	3.4 ± 0.7	15 ± 2.3	26 ± 5.6	14 ± 2.4

*NP: No probado

A549: cáncer de pulmón, HBL-100: cáncer de mama, HeLa: cáncer cérvico-uterino, SW1573: cáncer de pulmón, T-47D: cáncer de mama, WiDr: cáncer de colon, BJ-hTert: fibroblasto humano (célula sana) inmortalizado

En la figura 4.3 se muestra una comparación de la actividad antiproliferativa de los compuestos en las diferentes líneas celulares de tumores sólidos humanos ensayadas. La comparación de estos resultados permite sacar algunas conclusiones de estructura-actividad: los compuestos que contienen carga como los derivados de guanidina o sales de fosfonio tienen mejor actividad inhibitoria para las 6 líneas celulares de aquellos que no tienen carga. El tamaño de la cadena también influye, donde es preferentemente un tamaño más grande a una cadena pequeña que no tiene buena actividad solo en algunas líneas celulares específicas, por lo que mejora la actividad teniendo una cadena más larga. Entre los compuestos que poseen carga (**25a-f** y **29a-e,g**), tienen mejor valor de actividad inhibitoria aquellos que en la posición del C-4 de la cumarina poseen un grupo diferente a un CH₃.

Entre tioureas (**24a-f**) y ureas (**26** y **27**) se puede concluir que derivados que en la posición del C-4 de la cumarina sea diferente a CH₃ como **24c** y **26** tiene actividad inhibitoria en todas las líneas celulares o en algunas, además de que también el derivado **24b** que tienen un CH₃ en la posición da mejor inhibición que el que no tiene como **23** que presenta valores por arriba de 10 µM e

incluso inactivos en estas líneas celulares sin modificar a cadena. En la misma familia de tiureas **24a-f** los derivados que tienen un tamaño de cadena de 5 carbonos que es ni muy grande ni muy pequeño se ven favorecidos al presentar mejor actividad antiproliferativa en comparación del derivado **24e** que es muy larga la cadena y de **24f** que solo presenta actividad en ciertas líneas celulares como A549, SW1573 y WiDr que son valores cercanos a 10 μM . Para los compuestos de guanidina **25a-d** que permanece con el mismo tamaño de cadena, en donde se modifica la posición del C-4 y C-3 de la cumarina presentan mejores valores de inhibición en comparación al derivado **24a** que solo tiene un H; al modificar la cadena y sin modificar esas posiciones (C-4 y C-3) de la cumarina, se ve favorecido tamaños de cadena más grande que los de intermedia y mejor que el que posee un tamaño más pequeño presentando mejor valores de inhibición del crecimiento celular. Para los derivados de sales de fosfonio se observan el mismo comportamiento que los derivados de guanidiana. Dentro de los bicíclicos de benzoxazoles el derivado que destaca es el **31j** presentando valores de un rango de 2.6-5.1 μM mejorando en algunas líneas celulares los valores presentados por los fármacos de referencia, además los derivados **31h** y **31i** presentan una actividad cercana a 10 μM , los de más derivados son mayores o nulos por lo que se puede pensar que en la estructura de la cumarina no favorece tener este tipo de bicíclicos o tomando en cuenta que el derivado **31j** sería el compuesto cabeza de serie, se puede analizar que manteniendo el mismo esqueleto de la cumarina y mismo heterociclo que esa único por el linker se podría modificar el tamaño de cadena a uno más largo e incluso más corto; aunque los derivados con cadena corta no tuvieron una buena actividad, manejando ese análisis podría mejorar esos resultados. Los derivados de sales de guanidinas **25a-e** y sales de fosfonio **29a-e** presentan mejor valores de inhibición para las 6 líneas celulares en comparación con los derivados de cisplatino y 5-fluorouracilo. Además, estos derivados (**25b-e** y **29d** o **29e**) no producen inhibición del crecimiento celular de células humanas sanas (BJ-hTert) apreciable a una concentración de 100 μM , es decir, si son inactivos en las células sanas hay más selectividad hacia las células tumorales. Por lo tanto en conclusión la actividad antiproliferativa se puede ver que varía en el sentido de Guanidinas>Sales de fosfonio>Tiureas>Ureas>Bicíclicos de benzoxazoles.

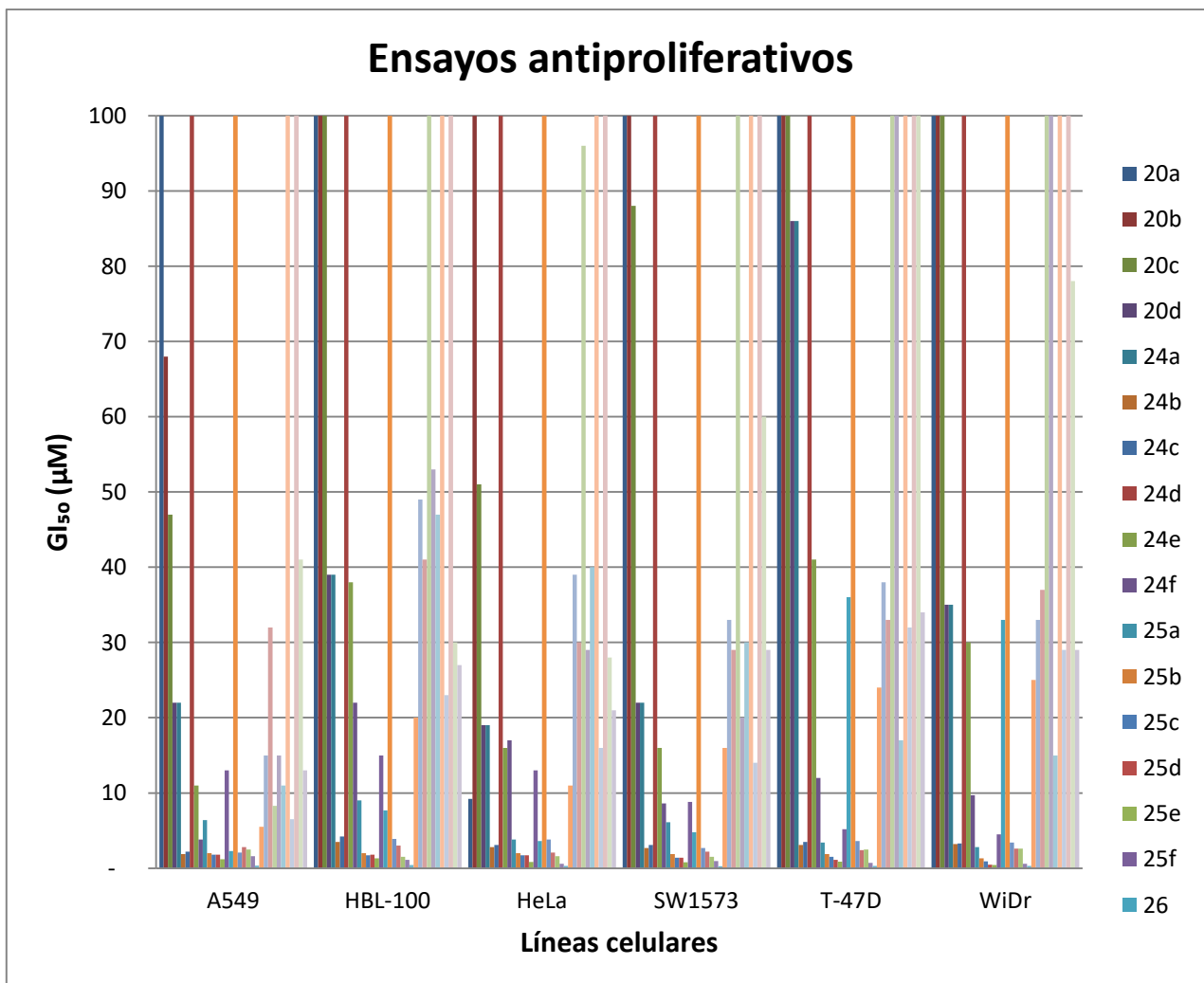


Figura 4.3. Resultados del ensayo de actividad antiproliferativa.

4.2.2.2 Derivados de Escuaramidas.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para los derivados **38a-e** y **60a-e**, los valores se expresan como GI_{50} definido como la concentración del compuesto necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular, el cual se expresa en unidades μM .

Tabla 3. Resultados de las pruebas antiproliferativas (GI_{50} en μM) de los derivados **38a-60e**.

Compuestos	Línea celular (Valores de GI_{50} expresados en μM)					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
38a	>100	39 ± 3.1	25 ± 4.5	48 ± 3.2	60 ± 11	60 ± 3.8
38b	>100	32 ± 4.8	26 ± 6.1	57 ± 5	96 ± 7.7	89 ± 13
38c	>100	90 ± 13	29 ± 6.7	>100	80 ± 22	86 ± 18
38d	93±11	18±6.1	12±4.4	48±17	23±2.7	21±10
38e	28±4.6	32±11	25±1.9	50±30	35±11	34±13
60a	22±6.2	26±2.1	28±0.17	25±2.9	30±0.008	34±5.6
60b	18±9.4	22±9.7	16±0.15	22±0.54	28±1.2	14±3.2
60c	>100	83±0	>100	>100	>100	>100
60d	84±28	64±31	78±34	80±35	5.5±0.97	3.9±0.1
60e	92±13	81±33	>100	>100	>100	>100
5-Fluorouracilo	----	5.5 ± 2.3	15 ± 4.7	4.3 ± 1.6	47 ± 18	49 ± 6.7
Cisplatino	----	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.3	3.4 ± 0.7	15 ± 2.3	26 ± 5.6

A549: cáncer de pulmón, HBL-100: cáncer de mama, HeLa: cáncer cérvico-uterino, SW1573: cáncer de pulmón, T-47D: cáncer de mama, WiDr: cáncer de colon.

En la figura 4.4 se muestra una comparación de la actividad antiproliferativa de los compuestos en las diferentes líneas celulares de tumores sólidos humanos ensayadas. La comparación de estos resultados permite observar que los derivados de escuaramidas no muestran inhibición en el crecimiento celular en estas 6 líneas presentando valores mayores a 10 μM y superiores al de los fármacos de referencia, excepto el compuesto **60d** en las líneas T-47D con un valor de 5.5±0.97 y en WiDr con un valor de 3.9± 0.1. Lo cual es bueno porque estos derivados fueron diseñados para la inhibición de las colinesterasas que tienen que ver con la enfermedad de Alzheimer.

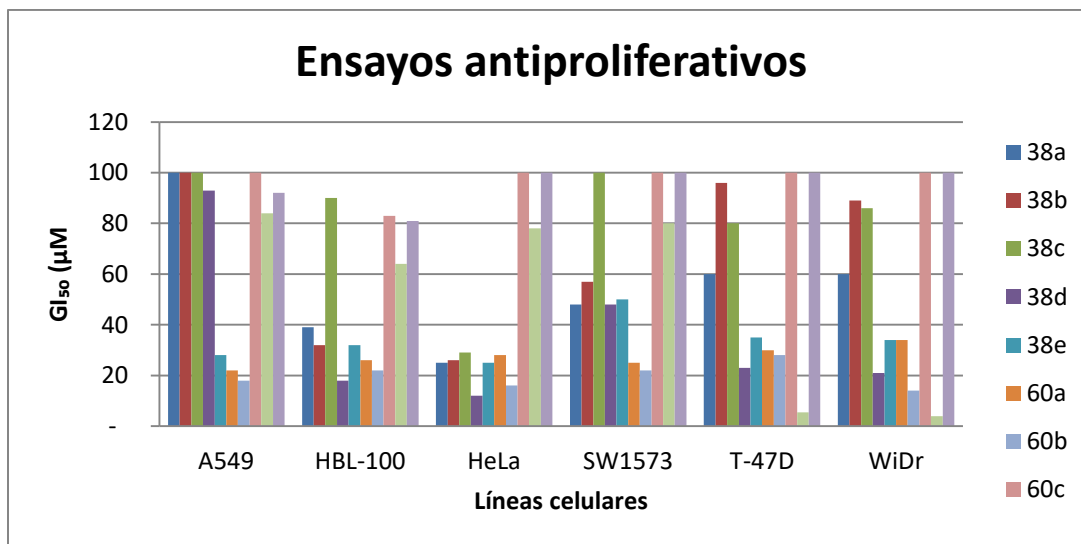


Figura 4.4. Resultados del ensayo de actividad antiproliferativa.

4.3 Ensayos de capacidad inhibitoria de la anhidrasa carbónica (CA).

Para inhibidores de anhidrasa carbónica los estudios se realizaron con el Dr. Claudiu T. Supurán en la Universidad de Florencia, Italia. Para las isoformas de la CA I, II, IV, VII, XI y XII y obtenido la K_i de estas isoformas.

4.3.1. Metodología

Los ensayos de inhibición de CA se realizaron con los protocolos ya reportados por el grupo de investigación de Dr. Claudiu T. Supurán,^{252,253,254,255} al mismo tiempo para el cálculo de los valores de K_i que se muestran a continuación; utilizaron tres concentraciones diferentes, dibujaron las curvas Lineweaver-Burk y realizaron los cálculos según los métodos ya portados.^{256,257,258}

²⁵² Gul H. I.; Yamali C.; Bulbuler M.; Kirmizibayrak B. P.; Gul M.; Angeli A.; Bua S.; Supuran C. T.; *Bioorg. Chem.* **2018** 78, 290-297.

²⁵³ Gul H. I.; Yamali C.; Yesilyurt F.; Sakagami H.; Kucukoglu K.; Gulcin II.; Gul M.; Supuran C. T.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017** 32, 1, 369-374.

²⁵⁴ Bilginer S.; Gonder B.; Gul H. I.; Kaya R.; Gulcin I.; Anil B.; Supuran C. T.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020** 35, 1, 325-329.

²⁵⁵ Aspatwar A.; Parvathaneni N. K.; Barker H.; Anduran E.; Supuran C. T.; Dubois L.; Lambin P.; Parkkila S.; Winum J.-Y.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020** 35, 1, 109-117.

²⁵⁶ Verpoorte J. A.; Mehta S.; Edsall J. T.; *J. Biol. Chem.* **1967** 242, 18, 25, 4221-4229.

²⁵⁷ Bradford M.M.; *Anal. Biochem.* **1976** 72, 248-254.

²⁵⁸ Lineweaver H.; Burk D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1934** 56, 658-66.

4.3.2. Discusión de los resultados del ensayo de capacidad inhibitoria de la anhidrasa carbónica (CA).

Los ensayos de inhibición de CA, se realizó para los derivados de guanidina (**21a-f**), las sales de fosfonio (**25a-e,g**) además de las tioureas intermediarias (**20a-f**) y las dos ureas que se lograron aislar (**22** y **23**), y los bicíclicos de benzoxazoles (**27a,g-o**). En donde solo se compararon todos los derivados de cumarina, debido a que este andamio de cumarina se identificó un nuevo inhibidor de la anhidrasa carbónica (CA, EC 4.2.1.1) en donde bloquea la entrada del sitio activo de la enzima de CA y así realizar una discusión de estructura-actividad de estos derivados.

4.2.2.1 Derivados de Cumarinas.

Los resultados de los ensayos para la inhibición de anhidrasa carbónica que se muestran en la tabla 4, la cual muestra la K_i que es la constante de inhibición expresada en nM. Esta constante no es más que la constante de disociación del inhibidor y de la enzima, cuanto menor sea el valor de K_i será mayor la afinidad de este inhibidor por la enzima, es decir será mejor inhibidor el compuesto estudiado. La mayoría de los compuestos descritos aquí se ensayaron como inhibidores de seis isoformas de CA fisiológicamente relevantes, la hCA I, II y VII que son citosólico y la hCA IV, IX y XII asociado a tumores transmembranales utilizando el ensayo de hidrasa de CO_2 .²⁵⁹ La sulfonamida clínicamente empleada, acetazolamida (AAZ, 5-acetamido-1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida), se ha utilizado como estándar en estas mediciones.

Tabla 4. Resultados capacidad inhibitoria de anhidrasa carbónica.

Compuestos	K_i (nM) ^{a,b}					
	CA I	CA II	CA IV	CA VII	CA IX	CA XII
24a	>100 μM	>100 μM	NP	NP	6.7	9.8
24b	>100 μM	>100 μM	NP	NP	6.0	49.9
24c	>100 μM	>100 μM	NP	NP	6.7	20.2
24d	>10 μM	>10 μM	733	>10 μM	751	291
24e	>10 μM	>10 μM	904	>10 μM	78.7	89.5
24f	>10 μM	>10 μM	901	>10 μM	87.6	80.6
25a	>100 μM	>100 μM	NP	NP	8.1	619.1

²⁵⁹ Rami M.; Dubois L.; Parvathaneni N.-K.; Alterio V.; van Kuijk S. J. A.; Monti M.; Lambin P.; De Simone G.; Supuran C. T.; Winum J.-Y.; *J. Med. Chem.* **2013** 56, 8512–8520.

25b	>10 μ M	>10 μ M	958	>10 μ M	685	54.5
25c	>10 μ M	>10 μ M	792	>10 μ M	313	74.4
25d	>10 μ M	>10 μ M	834	>10 μ M	57.8	319
25e	>10 μ M	>10 μ M	852	>10 μ M	415	95.5
25f	>10 μ M	>10 μ M	891	>10 μ M	143	93.6
26	>100 μ M	>100 μ M	NP	NP	14.1	671.8
27	>100 μ M	>100 μ M	NP	NP	6.6	44.2
29a	>100 μ M	>100 μ M	NP	NP	54.1	9.2
29b	>100 μ M	>100 μ M	NP	NP	7.8	8.1
29c	>100 μ M	>100 μ M	NP	NP	7.9	58.2
29d	>10 μ M	>10 μ M	796	>10 μ M	408	89.3
29e	>10 μ M	>10 μ M	689	>10 μ M	460	88.3
29g	>10 μ M	>10 μ M	794	>10 μ M	82.5	80.6
31a	>10 μ M	>10 μ M	950	>10 μ M	70.7	84.5
31g	>10 μ M	>10 μ M	839	>10 μ M	74.2	84.4
31h	>10 μ M	>10 μ M	984	>10 μ M	82.3	65.1
31i	>10 μ M	>10 μ M	802	>10 μ M	64.5	69.8
31j	>10 μ M	>10 μ M	820	>10 μ M	74.3	75.7
31k	>10 μ M	>10 μ M	808	>10 μ M	271	316
31l	>10 μ M	>10 μ M	792	>10 μ M	757	80.7
31m	>10 μ M	>10 μ M	762	>10 μ M	417	67.3
31n						
31o						
AAZ*	250.0	12.0	74.0	2.5	25.0	5.7

*AAZ: acetazolamida (5-acetamido-1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida)

NP: No probado

a. Media de 3 ensayos diferentes, mediante una técnica de flujo detenido (los errores estaban en el rango de \pm 5-10% de los valores reportados); b. tiempo de incubación 6h.

De estos resultados podemos llegar a algunas conclusiones de estructura-actividad, de las más importantes es que la mayoría de los compuestos son selectivos a no inhibir las enzimas CA I y II en un rango de en 15 mil veces contra las CA I y II respecto a los derivados más activos en las CA IX y XII. Todos los derivados son selectivos a no inhibir las isoformas CA I, II y VII que son citosólicos, las cuales involucran otros procesos en la célula por lo que es bueno que no las inhiban. Recordemos que a valores más bajos mejor actividad de inhibición; dentro de las isoformas asociado a tumores transmembranales que son las CA IV, IX y XII y que tienen que ver con células cancerosas en donde se sobreexpresión estas isoformas, tenemos que en la isoforma CA IV los

derivados que se probaron en esta no mostraron inhibirla si no mostraron tener valores mayores en comparación que el compuesto estándar. Pero se puede observar que derivados que contiene cadenas hidrocarbonadas de 5 carbonos como **24d** o **29g** presentan mejores valores que derivados con cadenas hidrocarbonadas largas como **24e** o muy cortas como **24f**. Los compuestos que están cargados como las sales de fosfonio (**29d** o **29g**) o guanidinas (**25c**) presentan valores de 700 nM mejores de aquellos que no están cargados como las tioureas (**24e** o **24f**) o derivados de benzoxazoles (**31a** o **31h**) de valores de 900 nM.

En la isoforma CA IX los derivados que mostraron eficazmente inhibición para esta isoforma asociada a tumores son **24a-c**, **25a**, **26**, **27** y **29b-c**, en los que se puede ver que la inhibición de esta isoforma tienen mejor resultados los derivados que no están cargados como las tioureas (**24a-c**) o ureas (**27**) con valores de K_i de 6.0-6.6 nM de los derivados que están cargados como las guanidinas (**25a**) o sales de fosfonio (**29b-c**) con valores de 7.8-8.1 nM. Derivados que contienen una cadena hidrocarbonada de 5 carbonos suelen inhibir mejor esta isoforma de aquellos que contiene una cadena más larga (12 carbonos) o mucho más corta (2 carbonos). Entre los derivados de tiourea y ureas, los que presenta un CH_3 en la posición C-4 de la cumarina presentan mejor inhibición con valores de 6.0-6.6 nM a los que contienen el grupo Ph en la misma posición, como la urea **26** con un valor de K_i de 14.1 nM. Pero presenta mejor inhibición la urea **26** que la tiourea **24d** con un valor de 751 nM, en donde estructuralmente solo cambia el átomo de oxígeno por el de azufre; mostrando que solo el cambio de átomo es suficiente para mejorar la inhibición.

Para isoforma CA XII los derivados que presentaron inhibición fueron **24a**, **29a** y **29b** con valores de K_i de 8.1-9.8 nM, en donde las sales de fosfonio que son compuestos cargados presentan mejores valores de inhibición de los derivados no cargados como del derivado **24a**.

En conclusión general, es que la actividad inhibitoria varía en el sentido: tioureas>ureas>sales de fosfonios>guanidinas>benzoxazoles en las isoformas CA IX y XII.

4.4 Ensayos de inhibición de las colinesterasas (AChE y BuChE).

Dentro de los ensayos de la inhibición de las colinesterasas que en este caso se realizaron para la AChE (acetilcolinesterasa) y BuChE (butirilcolinesterasa), los ensayos se efectuaron por el Dr. Óscar López López que se encuentra dentro del grupo de investigación del Dr. José María Fernández-Bolaños de la Universidad de Sevilla, Sevilla.

4.4.1. Metodología

El método utilizado para la medida de la inhibición de la AChE y BuChE para los derivados de escuaraminda y de benzaxazoles fue el desarrollado por Ellman y col. (1961).²⁶⁰ Se empleó para ello un espectrofotómetro de doble haz Hitachi U-2900 conectado a un termóstato (T = 25 °C). Las disoluciones de los compuestos testados (10 mM) se prepararon y diluyeron en DMSO.

4.4.1. Discusión de los resultados del ensayo de inhibición de las colinesterasas (AChE y BuChE).

Dentro de los ensayos de las colinesterasas se realizó para los derivados de benzoxazoles (**27a,g-o**) y para los derivados de escuaramidas; en los que se encuentran los derivados con tacrina (**27a,g-o**) y donepecilo (**27a,g-o**). Estos se dividieron en dos familias (derivados de cumarinas y derivados de escuaramidas) para la discusión de estructura-actividad que se ha realizado en cada uno de los estudios anteriores.

Las dos familias de escuaramidas y benzaxazoles derivados de cumarinas fueron evaluados como inhibidores de la AChE de los tejidos de aves y mamíferos, se presenta en varias formas moleculares, de una manera similar a las formas enzimáticas de los órganos eléctricos *Electrophorus* (*Electrophorus electricus*) y *Torpedo* (de la familia *Torpedinidae*).²⁶¹ Que muestra gran similitud estructural con la enzima humana y BuChE o pseudocolinesterasa se encuentra en el sistema nervioso de los mamíferos tanto en las células nerviosas y en la neuroglia.²⁶² Para evaluar la actividad de la enzima se emplea el método de Ellman,²⁶⁰ basado en una espectrofotometría indirecta. Así, utilizando como sustrato un mimético de la ACh la acetilcolina y de la BuCh la butirilticolina, se lleva a cabo la hidrólisis catalizada por la enzima en un medio básico (tampón fosfato pH = 8), liberando la tiocolina. Este compuesto reacciona con el ácido 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzónico (DTNB), obteniéndose un compuesto de color amarillo, el 5-Tio-2-nitrobenzoato (TNB), que presenta un máximo de absorbancia entre 405-412 nm y se puede medirse espectrofotométricamente, esta reacción se representa en la figura 4.5.²⁶⁰

²⁶⁰ Ellman G.L.; Courtney D. K.; Andres V.; Featherstone R. M.; *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88-95.

²⁶¹ Bon S.; Vigny M.; Massoulie J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1979** 76, 6, 2546-2550.

²⁶² Kutty K. M.; *Clin. Biochem.* **1980** 13, 6, 239-243.

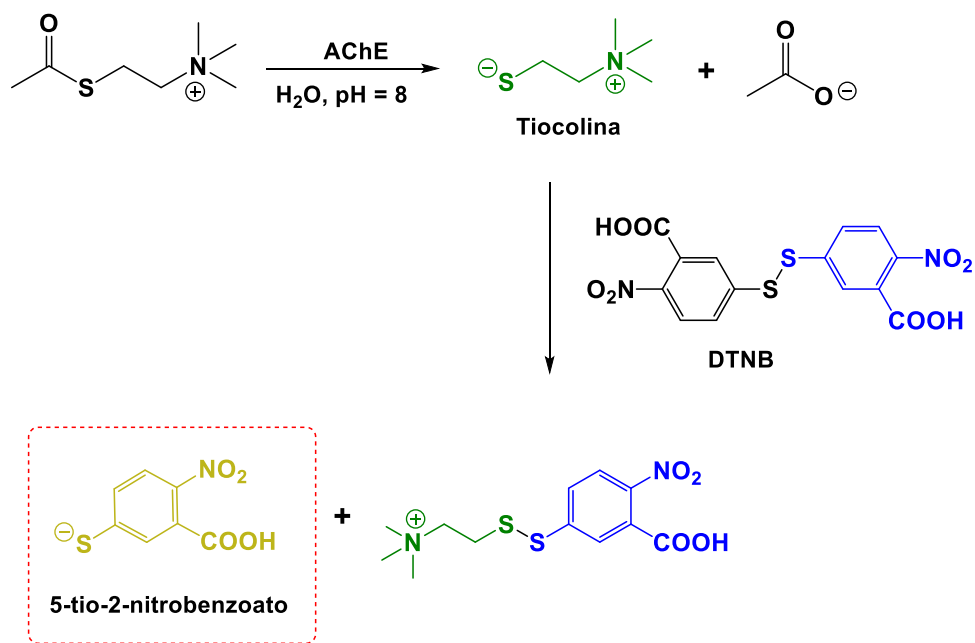


Figura 4.5. Reacción colorimétrica del método de Ellman.

Se calcularon las constantes (K_i) y el modo de inhibición de estas dos familias como se muestra continuación. Este ensayo involucra realizar la manipulación necesaria para detectar el producto o el sustrato remanente dentro de la mezcla de ensayo de modo que el cambio pueda monitorearse continuamente, por lo que, la constante de inhibición se ve menos influenciada por las condiciones experimentales, es decir, ese ensayo tiene la ventaja de no ser susceptible a errores durante la manipulación posterior de la muestra y que además permiten obtener la curva progreso de la reacción. El modo de inhibición puede arrojar alguna información acerca de la interacción con la enzima, por ejemplo, si sólo interacciona con el centro activo de la misma o adicionalmente con alguna otra región.

La representación de Lineweaver-Burk (o dobles recíprocos, $1/V$ vs. $1/[S]$), es el método más frecuente para determinar el tipo de inhibición, el cual es realizado para varias concentraciones del inhibidor, así como la constante de Michaelis-Menten (K_M) y velocidad máxima (V_{max}), que a su vez se emplean para el cálculo de las constantes de inhibición; además de dicho método, se ha incluido también la representación de Cornish-Bowden,²⁶³ que implica una doble representación ($1/V$ vs. $[I]$ y $[S]/V$ vs. $[I]$), y por consiguiente, reduce la incertidumbre en la determinación del modo de acción, que no resulta totalmente claro con la representación de Lineweaver-Burk.

²⁶³ Cornish-Bowden A.; *Biochem. J.* **1974** 137,143-144.

Aunque la representación de Lineweaver-Burk se ha utilizado muy frecuentemente para determinar los parámetros cinéticos (K_M y V_{max}), necesarios para el cálculo de las constantes de inhibición, al ser una representación con dobles inversos como se mencionó anteriormente, presenta mayor grado de incertidumbre. Para evitar esta incertidumbre e inconveniente, los parámetros cinéticos han sido calculados mediante una regresión no lineal (método de los mínimos cuadrados), como a continuación se muestra.

4.4.3.2 Derivados de Escuaramidas.

En la tabla 5 se muestra los resultados de las K_i obtenidas para las AChE y la BuChE mostrando la K_{ia} donde la inhibición implica que el inhibidor se une a la enzima libre y la K_{ib} donde la inhibición implica que el inhibidor se une al complejo enzima-sustrato. Utilizando como estándar en estas mediciones a la tacrina y galantamina uno de los cuatro fármacos empleados en la actualidad frente al Alzheimer. En la cual se muestra las constantes de inhibición (K_{ia} y K_{ib}) y el modo de inhibición de los compuestos con la enzima.

Tabla 5. Resultados de las constantes de inhibición (K_i 's, nM) frente a AChE y BuChE y modo de inhibición.

Compuestos	AChE (K_i , nM)			BuChE (K_i , nM)		
	K_{ia}	K_{ib}	Modo de inhibición	K_{ia}	K_{ib}	Modo de inhibición
38a	10.4 ± 3.3	20.4 ± 3.2	Inhibidor mixto	13.5 ± 2.8	13.5 ± 2.8	No competitivo
38b	6.9 ± 1.2	12.3 ± 1.0	Inhibidor mixto	14.9 ± 0.9	14.9 ± 0.9	No competitivo
38c	37.6 ± 4.4	---	Competitivo	3.2 ± 1.7	5.4 ± 1.9	Inhibidor mixto
38d	20.0 ± 5.8	34.3 ± 10.3	Inhibidor mixto	3.2 ± 1.1	8.4 ± 2.9	Inhibidor mixto
38e	4.2 ± 0.4	11.0 ± 0.1	Inhibidor mixto	4.7 ± 0.9	13.4 ± 3.5	Inhibidor mixto
60a	844.9 ± 88.6	725.4 ± 144.1	Inhibidor mixto	4315.6 ± 432.7	7127.5 ± 2727.3	Inhibidor mixto
60b	336.5 ± 63.0	399.7 ± 66.1	Inhibidor mixto	1511 ± 229.9	7175.1 ± 40.2	Inhibidor mixto
60c	455.6 ± 4.5	251.0 ± 23.0	Inhibidor mixto	5845.3 ± 1735.0	11394.1 ± 4075.0	Inhibidor mixto
60d	272.5 ± 48.1	371.8 ± 84.3	Inhibidor mixto	1741.1 ± 731.2	5821.7 ± 1341.6	Inhibidor mixto
60e	1091.6 ± 89.7	1501.7 ± 383.2	Inhibidor mixto	1347.7 ± 501.5	4638.0 ± 1794.0	Inhibidor mixto

Tacrina	54.8 ± 3.9	54.8 ± 3.9	No competitivo	4.8 ± 0.5	4.8 ± 0.5	No competitivo
Galantamina	2995.2 ± 866.0	---	Competitiva	4483.8 ± 896.4	---	Competitiva

Con los resultados obtenidos en esta tabla, se observa que la mayoría de los compuestos analizados frente a la AChE y BuChE tienen un modo de inhibición mixta, lo cual implica que el inhibidor es capaz de unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato y que el inhibidor puede interaccionar con la enzima a través de dos regiones, la región catalítica (Kia) debido a la especial estructura de los compuestos preparados y probablemente la región aniónica periférica (Kib) tal vez a la presencia de fragmentos de tacrina y donepecilo. Dentro de la literatura muchos investigadores defienden que es clave en el Alzheimer inhibir la AChE debido a que es responsable del cese de la transmisión de impulsos por hidrólisis rápida de ACh en casi todas las vías colinérgicas del sistema nervioso. Por tanto, es una diana terapéutica para mejorar la calidad de vida de los pacientes con EA,²⁶⁴ mientras que otros reportan la importancia de inhibir la BuChE ya que la actividad y el nivel de expresión aumentan significativamente en estados más avanzados de la EA o en las últimas etapas de esa, por lo que desempeña solo un papel de apoyo en la neurotransmisión colinérgica, pero se ha considerado como un objetivo farmacológico prometedor debido a su acción enzimática.²⁶⁵

En la discusión de la estructura-actividad de estos compuestos se puede observar que los derivados que contienen tacrina presentaron mejores valores de K_i que la tacrina y mucho mejores que la galantamina; derivados de donepecilo mostraron tener resultados de K_i 's mejores que la galantamina pero peores que la tacrina que son los compuestos que se utilizaron como referencia en este estudio. Todos los compuestos **38a-e** mostraron ser más selectivos para inhibir la AChE y pocos de ellos como **38c-e** inhibieron a BuChE en comparación con la referencia de tacrina.

Los compuestos **38c-e** tienen un doble efecto de acción al inhibir la AChE y BuChE, los derivados como **38a-b** al tener una cadena hidrocarbonada corta de dos carbonos son más selectivos a inhibir a AChE con valores de $K_{ia} = 10.4 \pm 3.3$ y 6.9 ± 1.2 nM, y $K_{ib} = 20.4 \pm 3.2$ y 12.3 ± 1.0 nM pero no a la BuChE, además el derivado **38e** tiene el mismo tamaño de cadena que estos dos derivados y realiza una doble acción al inhibir las dos enzimas (AChE y BuChE), esto se debe

²⁶⁴ Bar A F. M.; Elimam D. M.; Mira A. S.; El-Senduny F. F.; Badria F. A.; *Nat. Prod. Res.* **2018** 16, 1-9.

²⁶⁵ Tu Y.; Wu C.; Kang Y.; Li Q.; Zhu C.; Li Y.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019** 29, 1194-1198.

probablemente a la presencia de un segundo grupo OMe en el anillo aromático y a la ausencia del heterociclo que poseen estos derivados (**38a-b**).

Los derivados **38c-e** muestran valores de K_i en BuChE mejores al unirse a la enzima libre que al unirse al complejo enzima-sustrato, **38a-b** presentan dos tipos de modo de inhibición; donde para la AChE tienden a ser inhibidores mixtos y en la BuChE a ser no competitivos (unirse solo al complejo E-S). Todas estas conclusiones se hacen con respecto a la referencia de tacrina. El compuesto **38c** muestra un modo de inhibición competitivo en la AChE, es decir solo se une a la enzima libre y esto se ve reflejado en las K_i de BuChE donde se observa que tiene un valor $K_{ia} = 3.2 \pm 1.7$ nM mejor que su $K_{ib} = 5.4 \pm 1.9$ nM, mostrando que se une mejor a la enzima libre; en comparación con su análogo el derivado **38d**, se podría esperar que presentara efectos similares pero se observa que al añadir el fragmento de *N*-metilpropargilamina cambia el modo de inhibición al ser ahora un inhibidor mixto, mejorando un poco el valor de $K_{ia} = 20.0 \pm 5.8$ para AChE.

Con respecto a los derivados de donepecilo (**60a-e**) se observa que tienen doble efecto de acción al inhibición a la AChE y BuChE mejor que la galatamina, el cual solo se une a la enzima y estos derivados muestran unirse al complejo E-S como a la enzima libre. El compuesto **60c** presenta mejores valores que la galantamina para inhibir a AChE y no para la BuChE. Todos los derivados estudiados podrían ser prometedores para inhibir las colinesterasas al tener un doble efecto de acción, pudiendo ser una nueva estrategia terapéutica eficaz al lograr inhibir las dos enzimas (AChE y BuChE) presentando mejores valores en rango nanomolar en comparación con los dos compuestos de referencia.

4.5. Conclusiones de los ensayos de pruebas biológica.

A continuación se muestran las conclusiones generales de la discusión de los resultados de los ensayos realizados de todas las familias que se sintetizaron. Llegando a diferentes conclusiones de la comparativa de cada una de las familias, es decir que se concluye por separado cada una de las familias obtenidas y se compara los derivados obtenidos en cada una de ellas.

4.5.1. Ensayos de actividad antiproliferativa.

- ❖ La actividad de los derivados sintetizados como agentes antiproliferativos frente a 6 líneas celulares se evaluaron midiendo los valores de GI_{50} , de los cuales, los derivados **12a-c,e** resultaron ser mejores inhibidores que los derivados **11a-h** con solo cambiar el heteroátomo del heterociclo de diazolininas.
- ❖ Los intermediarios muestran valores por arriba de 10 μ M e incluso inactivos en algunas líneas celulares, pero presentan el derivado **9** mejores valores aun por arriba de ese rango mejores que el fármaco de referencia abiraterona.
- ❖ Dentro los derivados **11a-h**, prestan mejores valores los derivados **11f-h** que tienen sustituyentes alifáticos a los derivados **11a-e** que contienen sustituyentes aromáticos.
- ❖ La actividad de los derivados sintetizados como agentes antiproliferativos frente a 6 líneas celulares se evaluaron midiendo los valores de GI_{50} , dentro de estos derivados la actividad antiproliferativa se puede ver que varía en el sentido de Guanidinas=Sales de fosfonio>Tioureas>Ureas>Biciclos de benzoxazoles, realizando diferentes modificaciones como el tamaño de cadena o modificando la cumarina en las posiciones del C-4 o C-3 de este esqueleto.
- ❖ Se encontró el compuesto cabeza de serie **31j** de los derivados de benzaoxazoles con valores de inhibición en un rango de 2.6-5.1 μ M, el que da pauta para modificar la estructura de ese derivado como en el tamaño de cadena para mejorar esa actividad.
- ❖ Los derivados con carga como Guanidinas o Sales de fosfonio presentan mejores resultados de inhibición de aquellos que no lo están como Tioureas o Ureas.
- ❖ La actividad de los derivados de escuaramidas como agentes antiproliferativos frente a 6 líneas celulares se evaluaron midiendo los valores de GI_{50} , mostrando no inhibir el crecimiento celular presentando valores mayores a 10 μ M, excepto el derivado **60d** en las líneas T-47D con un valor de 5.5 ± 0.97 y en WiDr con un valor de 3.9 ± 0.1 .

4.5.2 Ensayos de la capacidad inhibitoria de la anhidrasa carbónica (CA).

- ❖ La actividad inhibitoria de la anhidrasa carbónica se midieron frente a las isoformas o isoenzimas CA I, II, IV, VII, IX y XII, en donde todos los compuestos son selectivos a no inhibir las enzimas CA I, II y VII. Pero si inhiben las enzimas CA IX y XII, donde las tioureas>ureas>sales de fosfonios>guanidinas>benzoxazoles en estas isoformas.
- ❖ Derivados que se encuentren formando sales o incluso que tengan un heterociclo en la posición C-3 de la cumarina inhibirán menos de aquellos que no lo son.
- ❖ Derivados que tenga una cadena hidrocarbonada de 5 serán mejores inhibidores de aquellos que tienen una cadena hidrocarbonada larga como de 12 o muy corta como de 2.

4.5.3. Ensayos de inhibición de las colinesterasas (AChE y BuChE).

- ❖ Derivados de tetrina presentan mejor actividad inhibitoria para las colinesterasas que los compuestos de referencia (tacrina y galantamina) y los derivados de donepecilo son mejores que la galantamina pero peores que la tacrina.
- ❖ La mayoría de los derivados muestran un modo de inhibición mixto, exacto el derivado **38c** que muestra un modo inhibición competitivo para a inhibición de AChE y los derivados **38a-b** un modo de inhibición no competitivo para BuChE.