



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA  
FACULTAD DE QUÍMICA - UNIVERSIDAD DE SEVILLA

*Desarrollo de sistemas derivados de quitosano para  
su aplicación frente a enfermedades degenerativas*

TESIS DOCTORAL

Memoria para optar al grado de Doctor en Química presentada por

**Antonio Jesús Galera Carrillo**

Sevilla, 2020



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA**  
**FACULTAD DE QUÍMICA - UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

Vº Bº La Directora de la Tesis

Vº Bº El Director de la Tesis

Fdo. Dra. Francisca Cabrera Escribano  
Profesora Titular de Universidad  
Departamento de Química Orgánica  
Universidad de Sevilla

Fdo. Dr. Antonio Franconetti García  
Ikerbasque Post Doctoral Researcher  
Center for Cooperative Research in  
Biosciences, CIC bioGUNE

No soy mucho de escribir estas cosas pero pienso que a veces es de justicia agradecer a alguien cuando es una persona que te aporta tanto en tu camino. Por lo que me gustaría mostrar mi más sinceros agradecimientos a mi directora de tesis, la doctora Francisca Cabrera Escribano, conocida mejor como Francis. Desde el día que llegué por primera vez a Sevilla, sin conocer nada ni a nadie, me recibió con los brazos abiertos y me ofreció su ayuda en todo lo que necesitaba. Pese a que en la carrera nos enseñan numerosos conceptos teóricos, podría decir que la mayoría de nociones en relación a la química orgánica que he aprendido, tanto a nivel teórico como a nivel experimental, me las ha enseñado ella. Además, lo más importante es que no solo me ha adoctrinado en el campo de la química orgánica, sino que también lo ha hecho en el propio razonamiento, mostrándome las herramientas para alcanzar mis objetivos y desenvolverme en un futuro como investigador de forma independiente, cumpliendo el famoso proverbio que dice: “Regala un pescado a un hombre y le darás alimento para un día, enséñale a pescar y lo alimentarás para el resto de su vida”. Por otro lado, en el ámbito personal ha sido inmejorable como directora puesto que nunca ha tenido un mal gesto, ha sido muy flexible, me ha permitido desarrollar mis propias ideas y pese a que hubiese temporadas en las que los resultados no fuesen favorables, nunca se ha rendido y lo ha afrontado con la mejor actitud. Por todo ello y muchísimas cosas que, seguramente me dejo en el tintero, Francis te deseo el mejor posible de los futuros!

Por otro lado, me gustaría también agradecerle toda su ayuda a mi codirector de tesis, el doctor Antonio Franconetti, con el que si bien no he tenido tanto trato por la distancia, ha realizado numerosas aportaciones a esta tesis. Además, lo poco que he podido tratarlo me ha parecido un tipo con un gran coco y una gran capacidad de razonamiento, al que se le nota que le encanta su trabajo, por lo que me hubiera gustado aprender aún más de él.

Por supuesto, esta tesis tampoco hubiera sido posible sin mis maravillosos compañeros TFG y TFM: Rocío, Elizabeth, José Manuel, Belén y Jonathan, los cuáles además de enseñarme un montón y aprender de la mano junto a ellos, me han amenizado muchísimo los momentos del laboratorio con miles de conversaciones, tonterías, risas y cafés. A este mismo respecto, me gustaría también agradecer toda la ayuda que me han aportado otros becarios y doctores del departamento de química orgánica, sobre todo al principio cuando

estaba más verde, a todo el personal de RMN que son encantadores, siempre te reciben entre risas y hacen todo lo que está en su mano para ayudarte y, por último, a los miembros del servicio de espectrometría de masas por toda la ayuda que me han prestado.

Por último, a mi familia, en concreto a mis padres Laureana y Antonio y a mi hermano José, por haberme apoyado en todas mis decisiones sin cuestionarlas, darme todo su respaldo y saber que siempre estarán ahí para todo lo que necesite. Tampoco podría olvidar a mis amig@s: Sandra, Ana, Lucía, Mar, Pablo, Lucía Moreno, Mari Carmen, María del Mar, Jonathan y Dani, cada uno de su padre y de su madre, los que sin entender nada de mi tesis, se han comido toda la chapa que les he soltado.

¡Muchas gracias a todos!

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>RELACIÓN DE COMPUESTOS .....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Estrés oxidativo y enfermedades degenerativas .....</b>	<b>15</b>
1.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	15
1.2. Metabolismo de la oxidación .....	17
1.3. Protección antioxidante celular .....	17
1.4. Estrés oxidativo y enfermedad .....	19
1.5. Terapias y dieta antioxidante.....	21
<b>2. Química de Carbohidratos: Quitina y Quitosano .....</b>	<b>22</b>
2.1. Quitina: estructura y problemática .....	24
2.2. Quitosano: estructura y aplicabilidad .....	27
<b>OBJETIVOS GENERALES .....</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO 1. Desarrollo de sistemas heteroaromáticos polifenólicos fluorescentes monocatiónicos y policatiónicos (derivados de quitosano).....</b>	<b>36</b>
<b>1. Antecedentes .....</b>	<b>37</b>
1.1. Compuestos polifenólicos .....	37
1.2. Sales de pirilio: reactividad, estrategias sintéticas y aplicaciones.....	41
1.3. Sales de flavilio: reactividad, estrategias sintéticas y aplicaciones .....	47
1.3. Sales de piridinio y quinolinio derivadas de quitosano .....	54
<b>2. Objetivos específicos .....</b>	<b>60</b>
<b>3. Resultados y discusión .....</b>	<b>61</b>
3.1. Síntesis de sales de pirilio y sales de flavilio .....	61
3.1.1. Síntesis de sales de pirilio.....	61
3.1.2. Síntesis de sales de flavilio.....	64
3.2. Síntesis de sistemas policatiónicos derivados de quitosano: sales de piridinio y sales de quinolinio .....	68
3.3. Propiedades fotofísicas.....	73
3.4. Actividades biológicas .....	78
3.4.1. Actividad antioxidante (método de DPPH).....	78
3.4.2. Actividad antiproliferativa y de citotoxicidad .....	81
3.4.3. Actividad antibacteriana.....	84
<b>4. Conclusiones .....</b>	<b>90</b>
<b>5. Parte Experimental .....</b>	<b>92</b>

5.1. General methods.....	92
5.1.1. NMR Spectroscopy and determination of Degree of N-Substitution (DS) .....	93
5.1.2. Diffusion experiments: Diffusion filters.....	94
5.1.3. Yield calculation in chitosan derivatives.....	94
5.1.4. Photophysical activity. UV-visible and fluorescence measurements .....	95
5.2. Raw materials.....	95
5.3. Synthesis and characterization of pyrylium salts .....	95
5.5. Synthesis and characterization of quinolinium and pyridinium salts derived of chitosan .....	110
5.6. Biological activity .....	118
5.6.1. Antioxidant activity (DPPH method) .....	118
5.6.2. Antiproliferative activity and cytotoxicity .....	119
5.6.3. Antibacterial activity .....	119
<b>CAPÍTULO 2. Desarrollo de compuestos organoselénicos con aplicación farmacológica potencial.....</b>	<b>121</b>
<b>1. Antecedentes .....</b>	<b>122</b>
1.1. Propiedades y beneficios del selenio.....	122
1.2. Sales de selenopirilio: reactividad, estrategias sintéticas y aplicaciones .....	126
1.3. Función selenourea. Selenoureas derivadas de quitosano.....	135
<b>2. Objetivos específicos .....</b>	<b>141</b>
<b>3. Resultados y discusión .....</b>	<b>142</b>
3.1. Síntesis de sales de selenopirilio .....	142
3.1.1. Vía I: Síntesis de sales de selenopirilio a partir de compuestos 1,5-dicarbonílicos .....	142
3.1.1.1. Síntesis de precursores: pent-2-en-1,5-dionas .....	143
3.1.1.2. Transformación del compuesto 1,5-dicarbonílico en sal de pirilio .....	147
3.1.2. Vía II: Síntesis de sales de selenopirilio directamente a partir de sales de pirilio .....	148
3.1.3. Sal de selenopirilio policatiónica anclada a quitosano .....	156
3.2. Propiedades fotofísicas.....	158
3.3. Estudio de interacciones no covalentes en sales de selenopirilio usando cálculos teóricos .....	160
3.4. Síntesis de selenoureas derivadas de quitosano .....	161
3.5. Actividades biológicas .....	165
3.5.1. Actividad antioxidante (método de DPPH).....	165
3.5.2. Actividad como miméticos de la glutatión peroxidasa.....	166
<b>4. Conclusiones .....</b>	<b>170</b>
<b>5. Parte Experimental .....</b>	<b>171</b>
5.1. General methods.....	171

5.2. Raw materials .....	171
5.2.1. Synthesis of pyrylium salts.....	172
5.2.2. Synthesis of 1,5-dicarbonyl compounds.....	177
5.2.3. Synthesis of formamides .....	183
5.2.4. Synthesis of isoselenocyanates .....	186
5.3. Synthesis and characterization of selenopyrylium salts .....	189
5.4. Computational calculations .....	196
5.5. Synthesis and characterization of chitosan-supported selenoureas .....	196
5.6. Biological activity .....	200
5.6.1. Antioxidant activity (DPPH method) .....	200
5.6.2. GPx mimic activity.....	201
<b>CAPÍTULO 3. Desarrollo de híbridos tacrina-quitosano para su uso frente a la enfermedad de Alzheimer .....</b>	<b>202</b>
<b>1. Antecedentes .....</b>	<b>203</b>
1.1. Enfermedad de Alzheimer.....	203
1.2. Estrategias terapéuticas contra el Alzheimer: derivados de tacrina .....	208
<b>2. Objetivos específicos .....</b>	<b>216</b>
<b>3. Resultados y discusión .....</b>	<b>217</b>
3.1. Síntesis de derivados de tacrina.....	217
3.1.1. Vía I: Síntesis de derivados de tacrina por funcionalización del grupo amino ....	218
3.1.2. Vía II: Síntesis de derivados de tacrina a través de la 9-cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina.....	223
3.2. Síntesis de híbridos tacrina-quitosano.....	228
3.3. Actividades biológicas .....	232
3.3.1. Actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE.....	232
3.3.2. Estudios de hepatotoxicidad .....	234
<b>4. Conclusiones .....</b>	<b>239</b>
<b>5. Parte Experimental .....</b>	<b>240</b>
5.1. General methods.....	240
5.2. Raw materials .....	240
5.3. Synthesis and characterization of tacrine derivatives.....	242
5.4. Biological activity .....	254
5.4.1. Inhibitory activity of the enzymes AChE and BuChE .....	254
5.4.2. Hepatotoxicity assays .....	255



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AOX	Sistemas antioxidantes
br	Ancho
BTC	Triphosgene (bis(trichloromethyl) carbonate (trifogeno)
c	Cuartete
Ch	Calcógenos (Grupo 16)
CI	Ionización química
cm	Centímetros
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CP	<i>Cross Polarization</i>
CS	Quitosano
cuant.	Cuantitativo
d	Doblete
DA	Degree of Acetylation/Grado de Acetilación
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octano
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
DD	Degree of Deacetylation/Grado de Desacetilación
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOSY	<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>
DS	Degree of <i>N</i> -substitution/Grado de <i>N</i> -Sustitución
eq.	Equivalentes
ESI	Ionización por electrospray
ESP	Superficie de potencial electrostático
eV	Electrón-voltio
FT	Transformada de Fourier
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GPX	Glutación Peroxidasa
h	Horas
H	<i>Host</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>

HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HR	<i>High resolution</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
HSQMBC	<i>Heteronuclear Single Quantum Multiple Bond Correlation</i>
Hz	Hertzios
<i>I</i>	Integral
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K	Kelvin
lp	<i>Lone pair</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LUMO	<i>Lowest Occupied Molecular Orbital</i>
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MAS	<i>Magic Angle Spinning</i>
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MHz	Mega Hertzios
min	Minutos
MS	Espectrometría de masas
MTL	<i>Multi Targeted Ligands</i>
$M_w$	Peso molecular
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NLO	Óptica no lineal
nm	Nanometros
NMP	1-metil-2-pirrolidona
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ns	Nanosegundo
°C	Grados Centígrados
OMe	Metoxi
p.f.	Punto de fusión
PFB	Pentafluorobenceno

Ph	Fenilo
PMB	Pentametilbenceno
Pn	Pnicógenos (Grupo 15)
ppm	Partes por millón
Rdto.	Rendimiento
Ref.	Referencia
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
s	Singulete
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SSB	Bandas laterales de rotación
SOD	enzima superóxido dismutasa
SOMO	<i>Singly-Occupied Molecular Orbital</i>
t	Triplete
TFA	Ácido trifluoroacético
TFB	Tetrafluorobenceno
TMB	Tetrametilbenceno
TMC	Trimetilquitosano
TMS	Tetrametilsilano
TrxR	Tiorredoxin reductasa
UV-vis	Ultravioleta-visible

## RESUMEN

Como hipótesis de partida se destaca el hecho de que numerosas enfermedades multifactoriales que afectan de manera creciente a la sociedad, como el cáncer, y ciertas enfermedades neurodegenerativas, a pesar de su compleja e incluso no completamente dilucidada etiología, poseen aspectos farmacológicos comunes, como son el marcado estrés oxidativo en los pacientes.

Se sabe que numerosos compuestos fenólicos ejercen un marcado efecto antiinflamatorio, existiendo una clara correlación entre procesos de inflamación crónica con el desarrollo de cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Por ello, en el *Capítulo I* de la tesis se describe la síntesis de polifenoles heteroaromáticos, en particular, tetrafluoroboratos polihidroxi y/o polimetoxilados fluorescentes derivados del catión pirilio y percloratos de la misma naturaleza derivados del catión flavilio. Estas síntesis se han llevado a cabo mediante una metodología que implica el uso de acetofenonas poli- o monosustituidas con benzaldehídos poli- o monosustituidos en presencia de un ácido de Lewis, que media el proceso de deshidratación y ciclación correspondiente. Concluyéndose, que la única diferencia para obtener selectivamente sales de pirilio o de flavilio es la presencia o no de un grupo hidroxilo en la posición *orto* del benzaldehído de partida. Una vez obtenidos, ambos tipos de sales se han enlazado al quitosano, heteropolímero formado por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina con una amplia gama de aplicaciones en diferentes sectores, para dar lugar a piridinius y quinolinios, respectivamente basados en quitosano.

Adicionalmente, tras la obtención de los nuevos compuestos, se han estudiado las propiedades fotofísicas de toda la gama de compuestos monocatiónicos sintetizados, así como algunas de sus propiedades biológicas como: la capacidad antioxidantes mediante el método de DPPH, la capacidad antiproliferativa frente a la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549 y la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar.

Otra alternativa frente a la lucha contra las enfermedades degenerativas como el cáncer, lo constituye la terapia fotodinámica, que actualmente precisa de compuestos fotosensibilizadores que absorban a una elevada longitud de onda para erradicar de forma selectiva las células tumorales. Por ello, en el *Capítulo II*, siguiendo en la misma línea de

progreso frente a las enfermedades degenerativas, se ha llevado a cabo la síntesis de sales de selenopirilio, puesto que se conoce por diversos estudios bibliográficos que en una misma molécula al descender en la familia de los anfígenos se consigue un aumento de la longitud de onda. Así, dado que las sales de pirilio absorben a altas longitudes de onda de aproximadamente 400-500 nm, se pretende que mediante un cambio del átomo de oxígeno por selenio se logre un incremento significativo de la misma. Se han empleado dos metodologías novedosas y distintas a las reportadas para la obtención de estos compuestos basadas en el empleo del reactivo de Woollins y con la única diferencia que en una se parte de un compuesto 1,5-dicarbonílico y en la otra de la sal de pirilio, evitando así el empleo de compuestos organometálicos. Tras su obtención y caracterización, para corroborar su empleo en terapia fotodinámica se han estudiado sus propiedades fotofísicas.

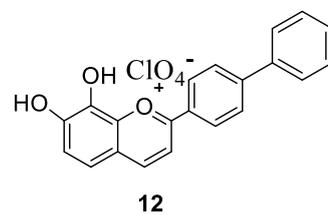
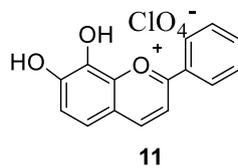
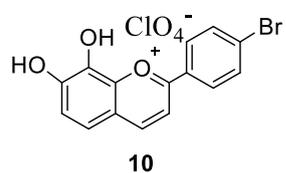
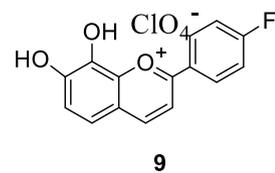
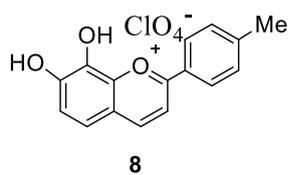
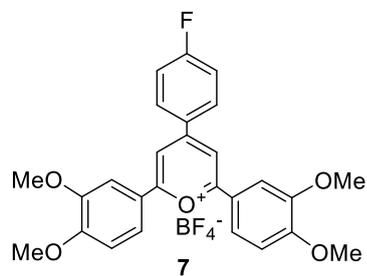
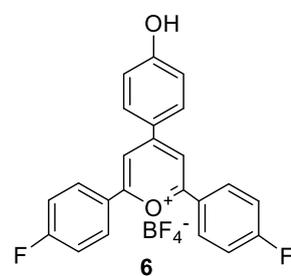
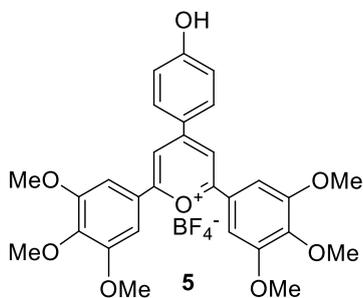
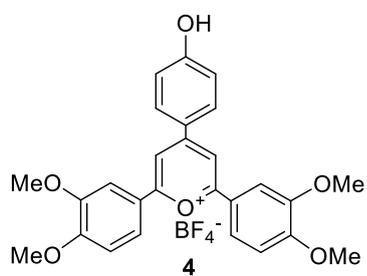
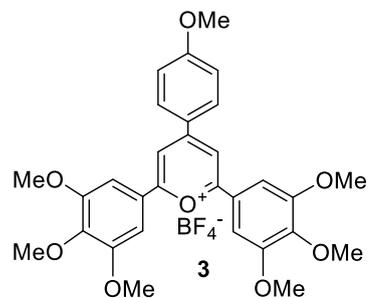
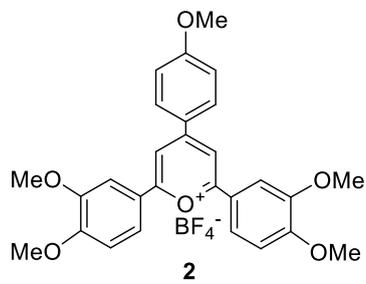
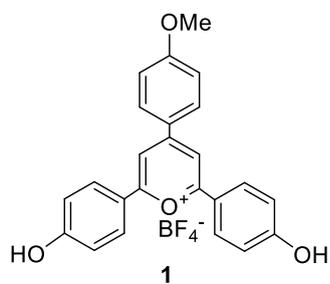
Además, en este mismo capítulo se ha profundizado en compuestos que hagan frente al estrés oxidativo. A este respecto, se han sintetizado las primeras selenoureas derivadas de quitosano debido a los buenos resultados de compuestos organoselénicos como agentes antioxidantes reportados por otros investigadores. Así, una vez obtenidos los compuestos, se han llevado a cabo dos estudios biológicos para comprobar su capacidad de capturar o anular especies reactivas de oxígeno (ROS): la capacidad antioxidante mediante la metodología del DPPH y la actividad como mimético de la enzima Glutatión Peroxidasa (GPx).

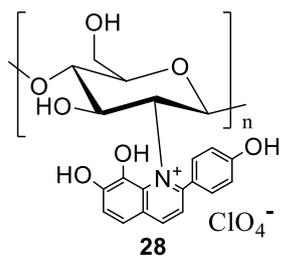
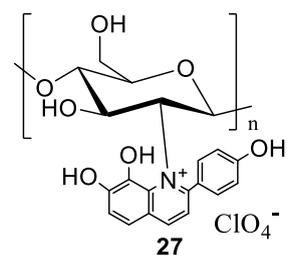
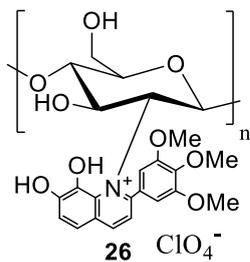
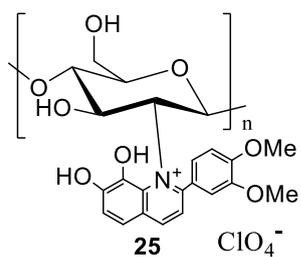
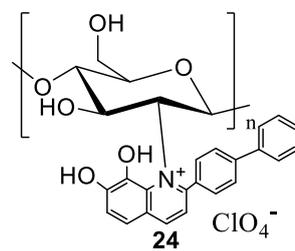
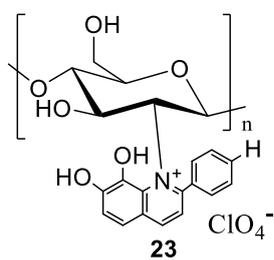
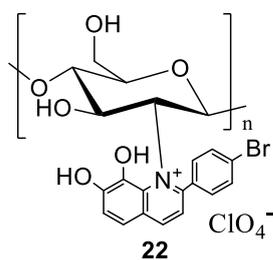
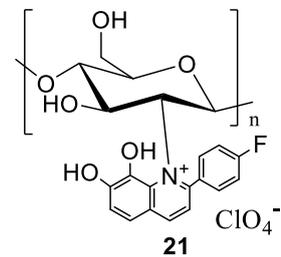
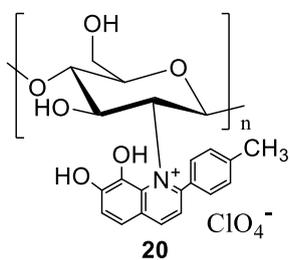
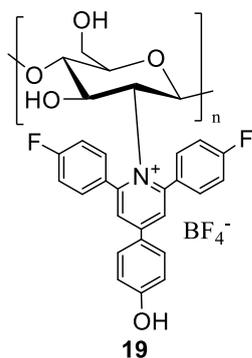
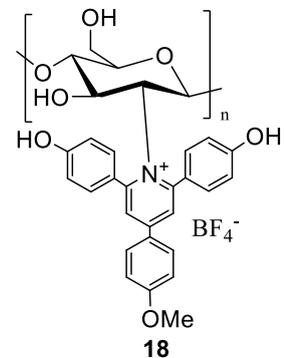
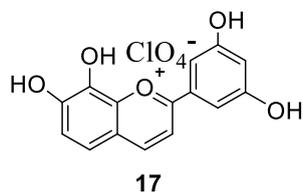
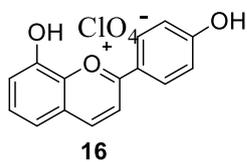
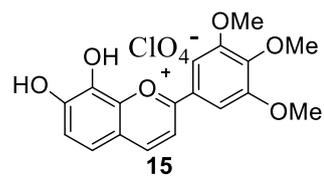
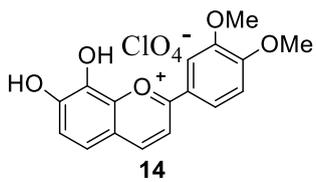
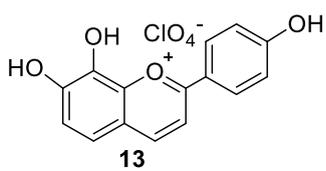
Finalmente, más enfocados a la lucha contra una enfermedad concreta como es la Enfermedad del Alzheimer (EA), en el *Capítulo III*, se ha llevado a cabo la síntesis de derivados de tacrina, el primer fármaco comercializado contra la EA y retirado del mercado posteriormente por su elevada hepatotoxicidad. Además, con el objetivo de reducir la hepatotoxicidad provocada por la tacrina se han preparado híbridos tacrina-quitosano, que además puedan actuar sobre varios receptores simultáneamente, en los llamados fármacos multidiana, una aproximación de última generación en Química Médica.

Tras la obtención y caracterización de los derivados de tacrina, se han evaluado sus propiedades como inhibidores de las enzimas Acetilcolinesterasa y Butilcolinesterasa, así como la hepatotoxicidad de los mismos.

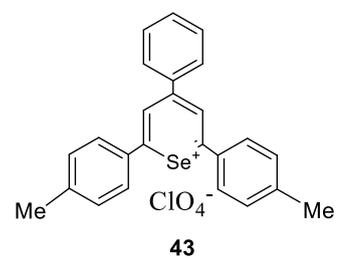
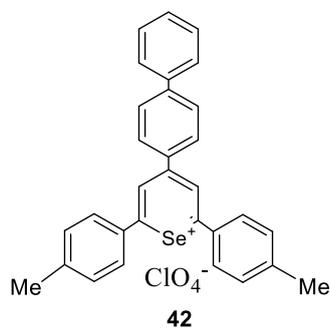
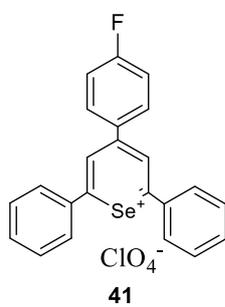
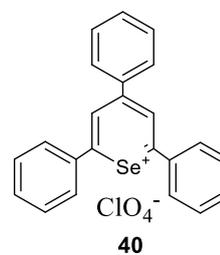
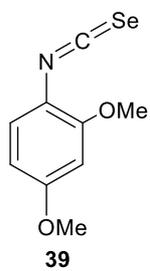
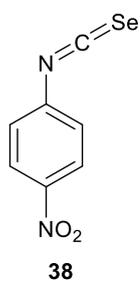
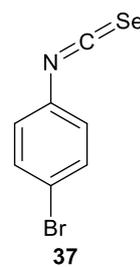
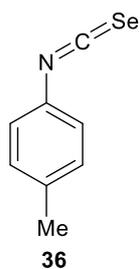
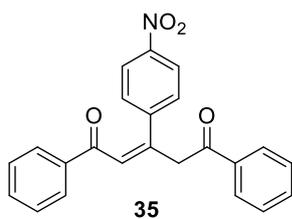
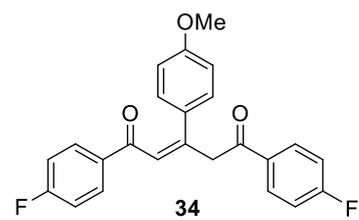
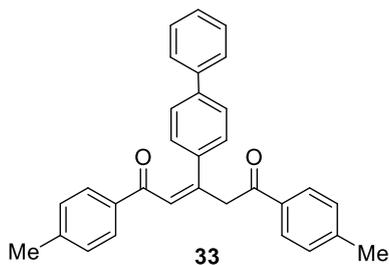
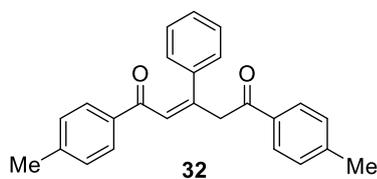
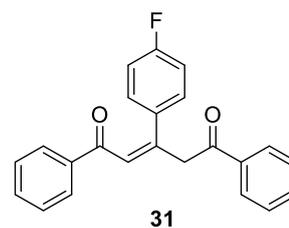
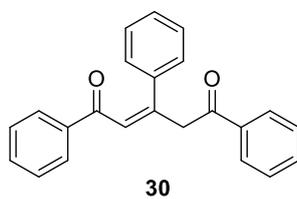
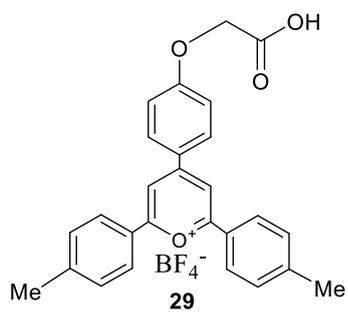
# RELACIÓN DE COMPUESTOS

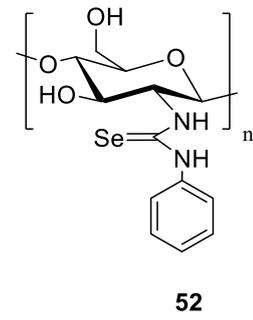
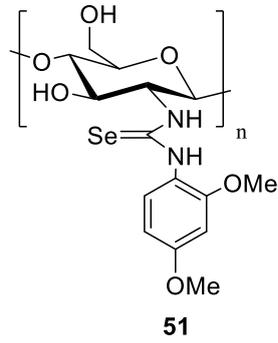
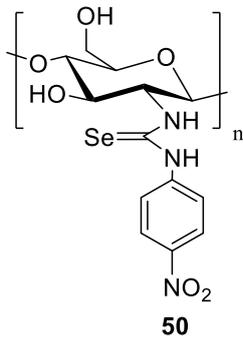
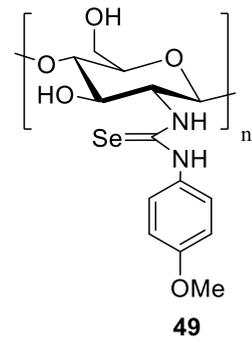
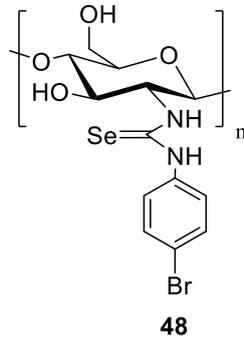
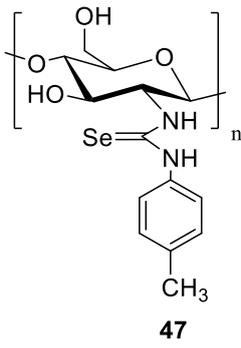
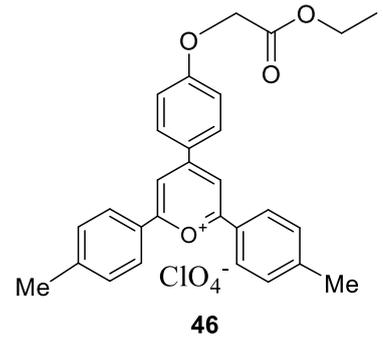
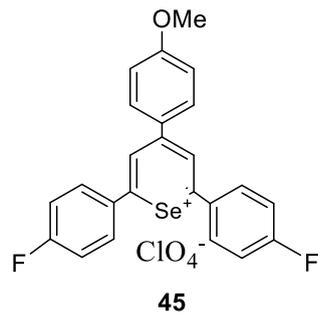
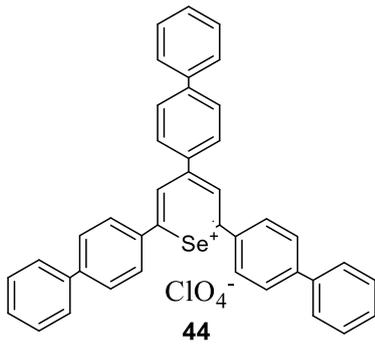
## Compuestos sintetizados en el capítulo 1



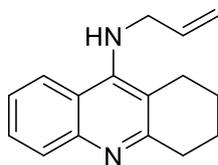


## Compuestos sintetizados en el capítulo 2

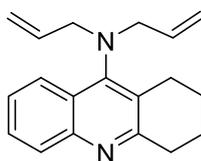




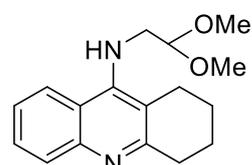
*Compuestos sintetizados en el capítulo 3*



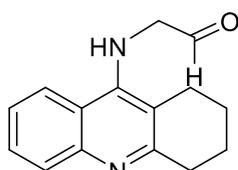
**53**



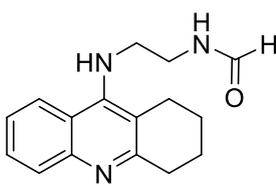
**54**



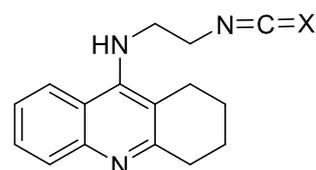
**55**



**58**



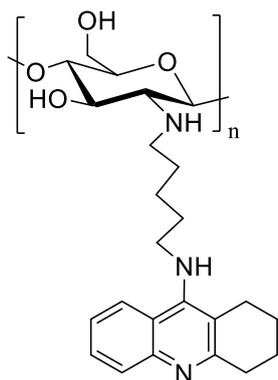
**57**



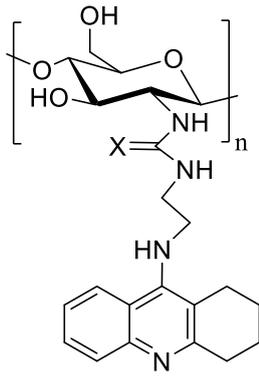
**58, X= O**

**59, X= S**

**60, X= Se**



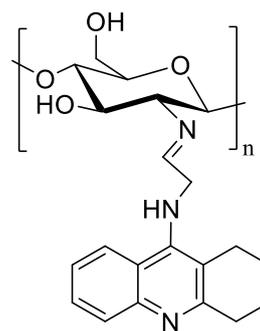
**61**



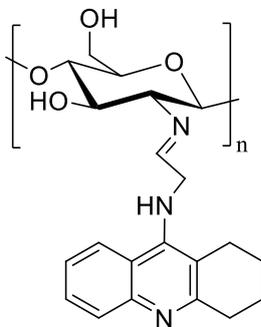
**62, X= O**

**63, X= S**

**64, X= Se**



**65**



**66**

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1. Estrés oxidativo y enfermedades degenerativas

Los seres humanos necesitan de oxígeno (O<sub>2</sub>) para la producción de energía. Sin embargo, la presencia de un exceso de O<sub>2</sub> en las células puede llegar a ser perjudicial para el organismo debido a la posible formación de especies reactivas producidas durante su oxidación. Con el objetivo de contrarrestar el efecto nocivo del O<sub>2</sub> y derivados, la célula cuenta con una serie de mecanismos capaces de eliminar los productos tóxicos del O<sub>2</sub>. Estos mecanismos de defensa son conocidos como sistemas antioxidantes (AOX), encargados de mantener el equilibrio de las reacciones de óxido-reducción y supervivencia celular. En los sistemas antioxidantes se incluyen: enzimas y moléculas secuestrantes de electrones y nutrientes; todos ellos encargados de eliminar y reducir las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula.

En el organismo existe un equilibrio entre las especies reactivas de oxígeno y los sistemas antioxidantes; cuando éste se descompensa a favor de las especies reactivas de oxígeno se dice que la célula sufre estrés oxidativo, considerado éste la causa central de diversas patologías humanas.<sup>1</sup>

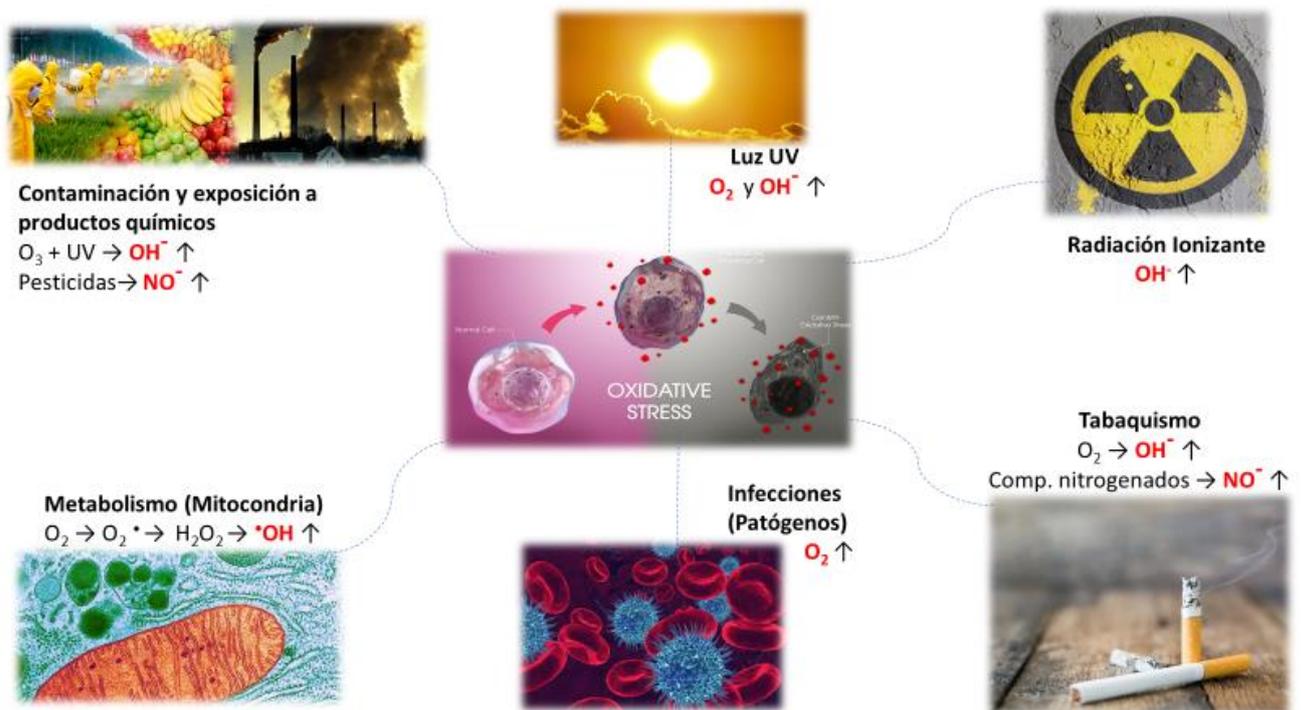
### 1.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Un radical libre es una especie que contiene uno o más electrones no apareados en orbitales del último nivel y que tiene la capacidad de reaccionar con múltiples biomoléculas. Dentro de este concepto general, las formas reducidas del O<sub>2</sub>, se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS); entre ellas se puede incluir radicales libres y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).<sup>2</sup> Las ROS son producto del metabolismo celular y fuentes exógenas (Rayos X, humo de tabaco, contaminación ambiental, mala alimentación, etc.). Además, en función de su concentración, pueden adoptar un papel beneficioso o perjudicial para el organismo de los seres vivos.

---

<sup>1</sup> Poljsak, B. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2011**, 2011, 194586.

<sup>2</sup> Halliwell, B. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, 35, 1147-1150.



**Figura 1.** Algunas fuentes exógenas causantes del estrés oxidativo

Los efectos beneficiosos de las ROS se presentan a bajas concentraciones, participando en diferentes funciones fisiológicas de la célula, entre las que se encuentran la lucha contra agentes infecciosos y los sistemas de señalización celular (mitosis).<sup>3</sup>

Por otra parte, el efecto perjudicial de los radicales libres en los sistemas biológicos es el estrés oxidativo generado por la deficiencia de antioxidantes e incremento de las especies ROS. El estrés oxidativo se da como resultado de reacciones metabólicas que utilizan  $O_2$  y representa una alteración en el equilibrio prooxidante/antioxidante en los sistemas vivos. Este desequilibrio tiene la capacidad de oxidar biomoléculas (lípidos, carbohidratos, proteínas, ADN, etc) e inhibir su estructura y función normal. Por tanto, es importante resaltar que el equilibrio entre las especies ROS y los antioxidantes es un aspecto muy importante para los organismos vivos, el cual se puede lograr a través de mecanismos de “regulación redox” que protegen a los organismos vivos del estrés oxidativo, manteniendo de esta

<sup>3</sup> Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D; Mazur, M., Telser, J.; *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2007**, *39*, 44-84.

forma el control del estado redox a través de los sistemas antioxidantes y atrapadores de radicales libres.<sup>4</sup>

## 1.2. Metabolismo de la oxidación

La producción de energía para los procesos celulares requiere de O<sub>2</sub>, el cual es reducido a agua (H<sub>2</sub>O) tras la aceptación de cuatro electrones por el complejo denominado citocromo-oxidasa de la mitocondria. Normalmente, un 2% del oxígeno es reducido de forma incompleta, al aceptar un menor número de electrones originando una especie reactiva de oxígeno (Figura 1).<sup>2</sup>

La incorporación de un electrón a la molécula de O<sub>2</sub> da lugar a la formación del radical anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el cual presenta un electrón desapareado; éste se forma en cualquier sistema capaz de producir electrones libres y que cuente con la presencia de oxígeno; por otro lado, es producido por macrófagos, leucocitos, neutrófilos fibroblastos y células del endotelio vascular. Se considera un radical menos reactivo, a pesar de ser capaz de oxidar moléculas como el ácido ascórbico.<sup>5</sup>

El radical hidroperóxido (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>), es más proclive a reaccionar con aquellas biomoléculas capaz de iniciar la peroxidación lipídica. Su importancia radica en la formación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), una especie reactiva generada mediante reacción de dismutación catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD).<sup>6</sup> En presencia de metales como hierro, cobalto, cobre y níquel, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se transforma en el radical hidroxilo (<sup>•</sup>OH), una especie mucho más reactiva a través de la reacción de Haber-Weiss (O<sub>2</sub><sup>•-</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → O<sub>2</sub> + <sup>•</sup>OH + OH<sup>-</sup>) o Fenton (Fe<sup>2+</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → Fe<sup>3+</sup> + <sup>•</sup>OH + OH<sup>-</sup>).<sup>7</sup>

Por tanto, el metabolismo aerobio implica la producción de ROS, que son capaces de generar estrés oxidativo, reaccionar con biomoléculas y participar en procesos degenerativos y fisiopatológicos.

## 1.3. Protección antioxidante celular

---

<sup>4</sup> Droge, W. *Physiol. Rev.*, **2002**, 82, 47-95.

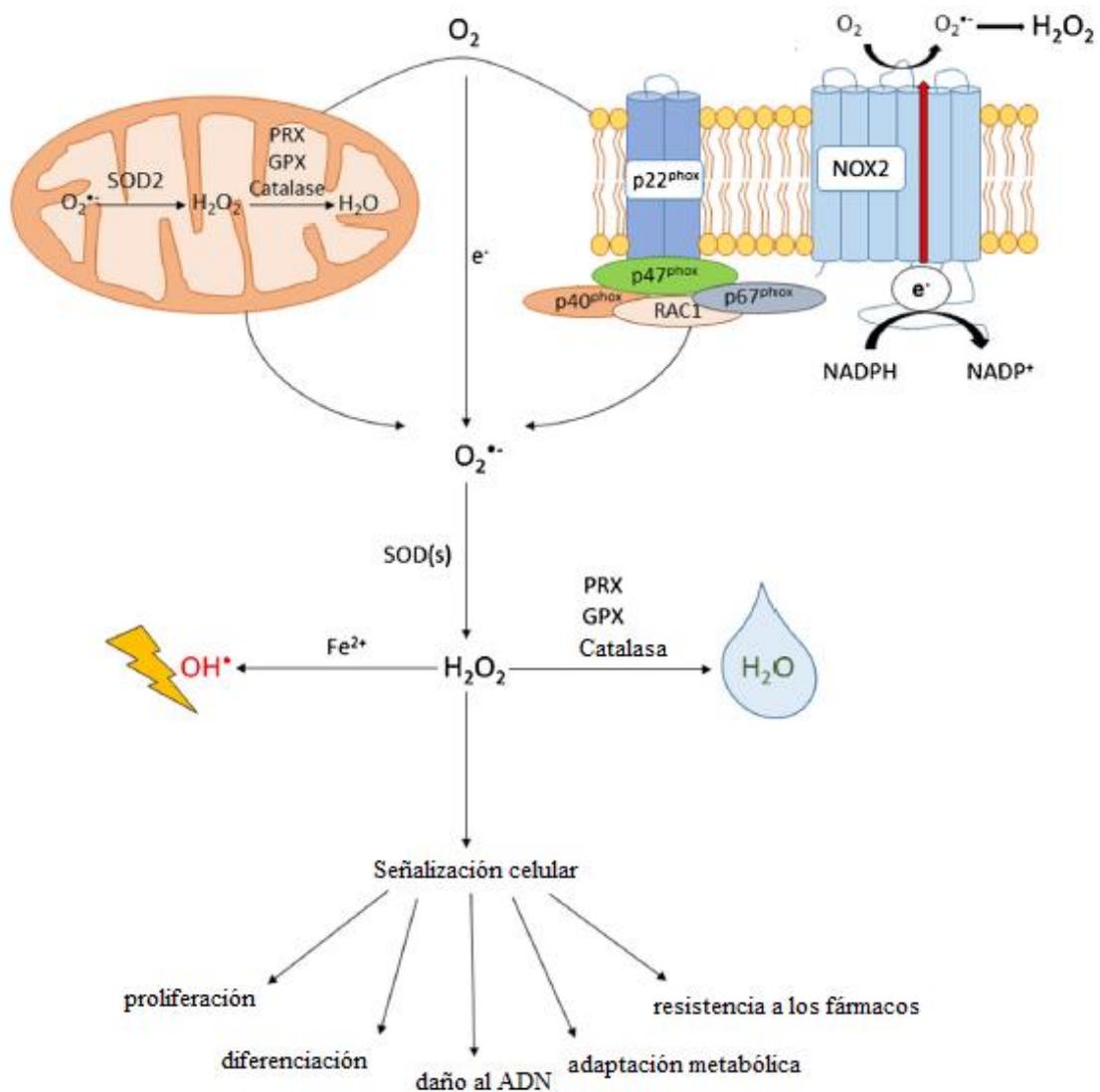
<sup>5</sup> Halliwell, B. *Plant Physiol.*, **2006**, 141, 312-322.

<sup>6</sup> Halliwell, B.; Gutteridge, J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1990**, 280, 1-8.

<sup>7</sup> Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12, 1161-1208.

Con el objetivo de contrarrestar el efecto nocivo que supone la presencia de un exceso de radicales libres, los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa antioxidante, entre los que se incluyen moléculas, enzimas y secuestradores químicos que previenen el daño oxidativo.

La primera línea de defensa celular frente al daño oxidativo está constituida por las enzimas antioxidantes, las cuales eliminan el  $O_2^{\bullet-}$  y el  $H_2O_2$ . Junto a éstas, existe una segunda línea de defensa formada por moléculas no enzimáticas que actúan contra los radicales libres.



**Figura 2.** Producción y regulación de especies reactivas de oxígeno (ROS).<sup>8</sup>

<sup>8</sup> Moloney, J. N.; Cotter, T. G. : *Semin. Cell Dev. Biol.*, **2018**, 80, 50-64.

- Enzimas. Actúan específicamente sobre las ROS, degradándolas a otras moléculas por medio de mecanismos bioquímicos específicos. La mitocondria y las NADPH oxidasas ligadas a la membrana (NOXs) son los dos principales contribuyentes de especies reactivas de oxígeno endógenas. El  $O_2^{\cdot-}$  se forma a partir de  $O_2$  por medio de la aceptación de un electrón a través de la cadena transportadora de electrones (ETC) en la mitocondria o a través de las NOXs. La enzima superóxido dismutasa (SOD) convierte el  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ . Este  $H_2O_2$  puede transformarse por medio de la reacción de Fenton con  $Fe^{2+}$  a la forma de  $OH^{\cdot}$  la cual es extremadamente reactiva pudiendo causar daño al ADN, las proteínas y los lípidos. El  $H_2O_2$  puede ser reducido y convertido a  $H_2O$  a través de las peroxirredoxinas (PRX), Glutación peroxidasas (GPX) y catalasa. La presencia de  $H_2O_2$  es la molécula de señalización más abundante en la presencia de los cánceres y en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Figura 2).
- Antioxidantes preventivos. Se trata de moléculas que tienen la misión de secuestrar a los iniciadores del proceso oxidativo, tales como  $Cu^{2+}$  y  $Fe^{2+}$ , los cuales aceleran la formación de las especies reactivas de oxígeno. Ejemplo de esto son las glicoproteínas que se unen al Fe transportándolo en el torrente sanguíneo por medio de la transferrina y la lactoferrina, para ser almacenado intracelularmente como ferritina.<sup>9</sup>
- Antioxidantes secuestradores de ROS. Tienen la función de inhibir la cadena de reacción y propagación en la formación de radicales libres. Un ejemplo de esto es el ácido úrico que es un producto del metabolismo de las purinas y tiene la capacidad de atrapar radicales peroxilo, alcoxilo, ROS e iones de  $Cu^+$  y  $Fe^+$ .

#### 1.4. Estrés oxidativo y enfermedad

Las especies reactivas de oxígeno y la presencia de estrés oxidativo afectan a una amplia variedad de funciones fisiológicas y participan en el desarrollo de diversas enfermedades humanas de tipo crónico-degenerativas con impacto epidemiológico.<sup>10</sup> A continuación, se explicarán brevemente algunos procesos patológicos con relevancia epidemiológica:

---

<sup>9</sup> Rafiquzzaman, S.M.; Kim, E. Y.; Kim, Y. R.; Nam, T. J.; Kong, I. S. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *62*, 265-272.

<sup>10</sup> Lachance, P. A.; Nakat, Z.; Jeong, W. S.; *Nutrition* **2001**, *17*, 835-838.

-Envejecimiento. Se trata del efecto acumulativo de los cambios bioquímicos y fisiológicos que suceden en un organismo vivo a través del tiempo, como respuesta a la interacción de diversos factores genéticos y ambientales. La teoría de los radicales libres para el envejecimiento propone que este proceso se da como consecuencia de la acumulación de distintas lesiones orgánicas y exposición crónica a radicales libres. Además, se ha identificado una baja actividad antioxidante, inactivación de las enzimas protectoras de los procesos oxidativos, acumulación de proteínas oxidadas e incremento en la tasa de producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$ , en comparación con las células jóvenes.<sup>11, 12</sup>

- Enfermedad de Alzheimer. Se da por la pérdida progresiva de neuronas que se asocia con la agregación de placas de proteína  $\beta$ -amiloide y marañas neurofibrilares de la proteína Tau de unión a microtúbulos. Una de las hipótesis actuales en referencia a la patogénesis de la enfermedad del Alzheimer está relacionada con las mitocondrias y el estrés oxidativo. En un estudio que se realizó en el cerebro y líquido cefalorraquídeo de sujetos con estrés oxidativo, comparando con sujetos de edad avanzada y controles jóvenes, se mostró que tanto el grupo formado por aquellos pacientes que presentaban estrés oxidativo como el grupo de aquellos pacientes de edad avanzada presentaban un aumento en los niveles de ROS y diversos marcadores de oxidación en proteína (como los grupos carbonilo), lípidos (malondialdehído y 4-hidroxinonanal) y ADN (8-hidroxideoxiguanina).<sup>13</sup>

- Carcinogénesis. Se trata de un proceso que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células cancerígenas, entre otros fenómenos que son activados por diversos oncogenes. Diversos estudios experimentales han descrito los posibles mecanismos implicados en la transformación maligna inducida por la presencia de radicales libres, observándose que la carencia de enzimas antioxidantes desencadena alteraciones características de dicha transformación celular.<sup>14</sup>

---

<sup>11</sup> Stadtman, E.R.; Oliver, C. N. *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 2005-2008.

<sup>12</sup> Soong, N. W.; Hinton, D. R.; Cortopassi, G.; Arnheim, N. *Nat. Genet.*, **1992**, 2, 318-323.

<sup>13</sup> Gandhi, S.; Abramov, A. Y.; *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2012**, 2012, 428010.

<sup>14</sup> Sánchez-Valle, V.; Valverde, M.; Carrizales, L.; Mejía, J.; Zepeta, N.; Rojas, E. *Ann. Hepatol.*, **2013**, 12, 315-322.

## 1.5. Terapias y dieta antioxidante

Los avances en el estudio del estrés oxidativo y su participación en el desarrollo de enfermedades, han permitido identificar sus mecanismos de acción, así como el de aquellas moléculas con capacidad de inhibir o modular sus efectos en la célula. Por ello, se ha propuesto que una dieta rica en antioxidantes puede prevenir o disminuir el deterioro celular y funcional ocasionado en el organismo por el exceso de radicales libres. Es preciso indicar que se han realizado diversos estudios en los que se han empleado diferentes terapias antioxidantes con resultados positivos; aunque, también se han observado resultados negativos con el uso de dichos antioxidantes.

Estos resultados no concluyentes o contradictorios pueden achacarse a diversas causas, como el inicio precoz o por el contrario tardío de la intervención, dosis insuficientes, etc. En base a estos, autores coinciden en la idea de la necesidad que hay de realizar grandes estudios con el objetivo de aclarar el papel de los antioxidantes en la salud humana.<sup>1</sup>

De hecho, la eficacia de estas terapias dependerá de definir qué enfermedades, circunstancia y/o condiciones son propicias para que resulten exitosos estos tratamientos. A continuación, se describen algunos elementos y compuestos empleados en las terapias antioxidantes con resultados positivos.<sup>15,16</sup>

-Selenio. Se trata de un micronutriente esencial localizado en alimentos como lentejas, cereales y productos lácteos. Este elemento es necesario para la función activa de enzimas tales como AOX, como la GPX y tiorredoxin reductasa (TrxR). Se ha estudiado una correlación existente entre la carencia de selenio y el desarrollo de ciertos tipos de cáncer (colon, recto, próstata, mama, leucocitos, piel e hígado). Por tanto, el suplemento de selenio se recomienda en aquellos individuos con un alto riesgo de desarrollar alguno de estos tipos de cáncer. Además, el selenio funciona como un cofactor capaz de regular la expresión de selenoproteínas que tienen la función de reducir el estrés oxidativo.<sup>17</sup>

-Polifenoles. Se trata de moléculas polihidroxiladas presentes en alimentos como el aceite de oliva, frutas y verduras. Entre ellos se pueden destacar el hidroxitirosol,

---

<sup>15</sup> Halliwell, B. *Nutr. Rev.*, **2012**, *70*, 257-265.

<sup>16</sup> Willcox, J. K.; Ash, S.L.; Catignani, G. L. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.*, **2004**, *44*, 275-295.

<sup>17</sup> Guo, F.; Monsefi, N.; Moritz, A.; Beiras-Fernandez, A. *Curr. Drug Saf.*, **2012**, *7*, 321-327.

tirosol, oleuropeína, flavonoides, etc. Su consumo está relacionado con una alta reducción de diversos tipos de cánceres.<sup>18</sup>

-Vitamina C. Es una molécula polifenólica hidrosoluble que puede eliminar radicales libres y permite regenerar la capacidad de enzimas antioxidantes. En algunos estudios se le ha atribuido un efecto anticancerígeno con capacidad quimioprotectora.<sup>19</sup>

-β-caroteno. Es un carotenoide precursor de la vitamina A, el cual puede transformarse en dos moléculas de vitamina A en el intestino, metabolizándose a retinoides. Se ha estudiado que una dieta rica en este nutriente presente en vegetales, como zanahoria, calabaza, tomates o espárragos, puede reducir el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón.<sup>20, 21</sup>

-Vitamina E. Se trata de una vitamina liposoluble que tiene la capacidad de inhibir la oxidación de las LDL. Diversos estudios han demostrado que la ingestión de vitamina E disminuye el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, sugiriendo la incorporación de esta vitamina en la dieta o a través de suplementos. Además, se ha demostrado que el daño hepático inducido por la ingesta de alcohol y su progresión pueden ser modulados por la vitamina E a través de la disminución del estrés oxidativo, ya que previene la oxidación de lípidos.<sup>22</sup>

## 2. Química de Carbohidratos: Quitina y Quitosano

Los carbohidratos, son la principal fuente de energía para la mayoría de las células, como es el caso del almidón en plantas y el glucógeno en los animales. Poseen también, funciones estructurales, siendo los constituyentes principales de las paredes celulares de los vegetales o del exoesqueleto de muchos artrópodos.<sup>23</sup> Además, está descrito que los carbohidratos pueden ser moduladores del nivel de glucosa e insulina

---

<sup>18</sup> Sajadimajd, S.; Roodabeh, B.; Iranpanah, A.; Kumar, J. *Pharmacological Research*, **2020**, *151*, 104584.

<sup>19</sup> Nagao, N.; Nakayama, T.; Etoh, T.; Saiki, I.; Miwa, N. *Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2000**, *126*, 511-518.

<sup>20</sup> Michaud, D. S.; Feskanich, D.; Rimm, E. B.; Colditz, G. A.; Speizer, F. E.; Willett, W. C.; Giovannucci, E. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2000**, *72*, 990-997.

<sup>21</sup> Shete, V.; Quadro, L. *Nutrients*, **2013**, *5*, 4849-4868.

<sup>22</sup> Ha, H. L.; Shin, H. J.; Feitelson, M. A.; Yu, D. Y. *World J. Gastroenterol.*, **2010**, *16*, 6035-6043.

<sup>23</sup> Zhao X.; Zhang, J.; Zhu, K. Y. Chito-Protein Matrices in Arthropod Exoeskeletons and Peritrophic Matrices. *Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices* **2019**, *7*, 3-56.

en sangre, participar en la disminución del colesterol en sangre, favorecer la absorción del calcio y otros minerales, etc.<sup>24, 25</sup>

Dentro de la Química Orgánica y de la Bioquímica uno de los campos que ha experimentado un rápido crecimiento en los últimos años es la Química de los Carbohidratos, pues el conocimiento de su estructura y funciones es de gran importancia en el desarrollo de nuevos fármacos específicos para el tratamiento de múltiples enfermedades. Dentro del campo de la Química de Carbohidratos las posibilidades son infinitas.

Hoy en día, está claro que una de las principales funciones de los carbohidratos es la de ser puntos específicos de reconocimiento celular. En muchos casos los carbohidratos contienen la información estructural adecuada para dar lugar a procesos de reconocimiento con una gran selectividad, en los que involucran a células, agentes patógenos, orgánulos subcelulares y membranas por mediación de toxinas, proteínas reguladoras, enzimas, anticuerpos y principalmente, de proteínas que reconocen carbohidratos, denominadas lectinas (Figura 3).<sup>26, 27, 28</sup>

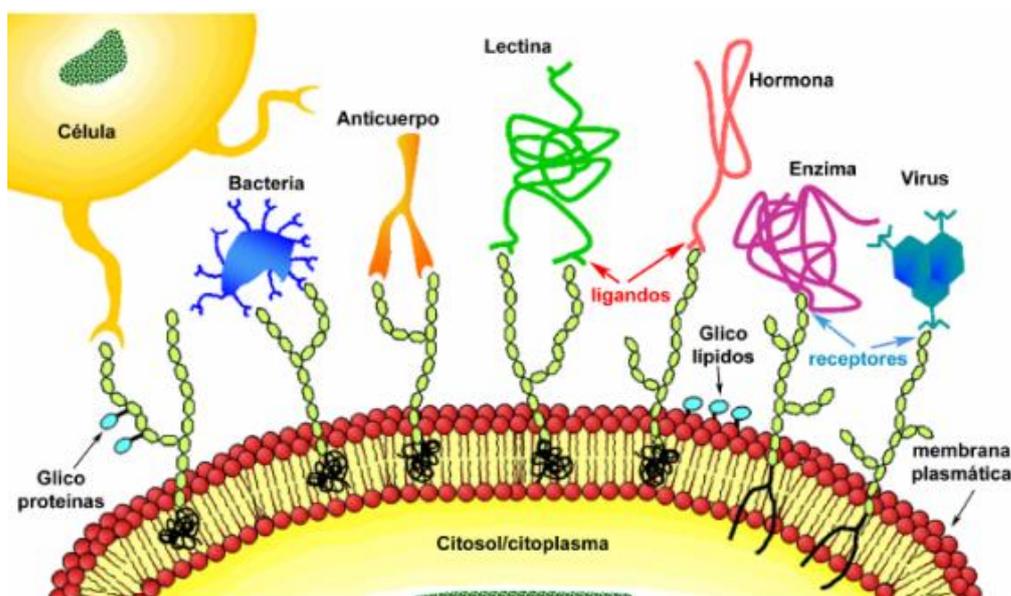


Figura 3. Procesos de reconocimiento mediante interacciones proteína-carbohidrato<sup>29</sup>

<sup>24</sup> Lee, H. A.; An, H. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 913.

<sup>25</sup> Lian, B. R.; Wood, R. J.; Rosenberg, I. H. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1986**, *44*, 244–247.

<sup>26</sup> Gimeno, A.; Valverde, P.; Ardá, A.; Jiménez-Barbero, J. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **2020**, *62*, 22-30

<sup>27</sup> Valverde, P.; Quintana, J. I.; Santos, J. I.; Ardá, A.; Jiménez-Barbero, J. *ACS Omega*, **2019**, *4*, 13618-13630

<sup>28</sup> Ardá, A.; Jiménez-Barbero, J.; *Chem. Comm.*, **2018**, *54*, 4761-4769.

<sup>29</sup> Hernández, J. J. La conformación de glicomiméticos en su estado libre en disolución y asociados a sus receptores. Una visión 3D utilizando RMN., Universidad Autónoma de Madrid, 2008.

En este sentido, el avance en el conocimiento de la relación estructura-actividad se está produciendo mediante el uso de no solamente productos naturales, sino también análogos químicos.<sup>30</sup> En este contexto podemos destacar el papel de los glicomiméticos,<sup>31</sup> que son aquellos análogos de carbohidratos en los que se ha sustituido alguno de los átomos de la molécula del azúcar natural por otros átomos o grupos funcionales, con objeto de inhibir la actividad de ciertas biomoléculas o entidades biológicas mediante bloqueo de los procesos de reconocimiento de carbohidratos en los que estén involucradas, inducir un proceso biológico, favoreciendo un proceso (favorable) de reconocimiento celular; o dirigir terapias a través de ligandos de naturaleza glicídica.<sup>32</sup> Un ejemplo de esto son los iminoazúcares.<sup>33,34</sup> Además, los estudios con glicomiméticos pueden facilitar el desarrollo de fármacos derivados de los carbohidratos (o análogos), así se pueden citar, los antigripales Relenza o Tamiflu, o las heparinas modificadas.

Los derivados de carbohidratos han supuesto además un excelente excipiente en referencia a la liberación de fármacos controlada debido a su baja toxicidad, estabilidad y biodegradabilidad.<sup>35</sup>

## 2.1. Quitina: estructura y problemática

En la naturaleza se encuentran multitud de polisacáridos naturales con funciones ampliamente conocidas entre los que destacan el almidón, clásicamente conocido por su función de almacenamiento energético, la celulosa y la quitina, ambas con una marcada función estructural en plantas y exoesqueletos, respectivamente.

La quitina es un copolímero compuesto por unidades de *N*-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina enlazadas mediante enlaces glicosídicos  $\beta(1\rightarrow4)$ , donde predominan de forma mayoritaria las unidades de *N*-acetil-D-glucosamina (Figura 4).

---

<sup>30</sup> Franconetti, A.; López, O.; Fernández-Bolaños, J. G. *Curr. Med. Chem.*, **2020**, *27*, 1206-1242.

<sup>31</sup> Valverde, P.; Ardá, A.; Reichard, N. C.; Jiménez-Barbero, J.; Gimeno, A. *Med. Chem. Commun.*, **2019**, *10*, 1678-1691.

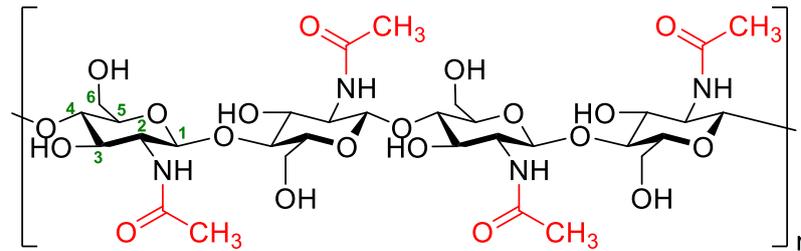
<sup>32</sup> Bennet, C. S.; Galan, M. C. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 7931-7985.

<sup>33</sup> Sánchez-Fernández, E. M.; Rísquez-Cuadro, R.; Chasseraud, M.; Ahidouch, A.; Ortiz, C.; Ouadid-Ahidouch, H.; García-Fernández, J. M. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5328-5330.

<sup>34</sup> Schaeffer, E.; Sánchez-Fernández, E. M.; Gonçalves-Pereira, R.; Flacher, V.; Lamon, D.; Duval, M.; Fauny, J. D.; García, J. M.; Mueller, C. G.; Ortiz, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *169*, 111-120.

<sup>35</sup> Ranjbari, J.; Mokhtarzadeh, A.; Alibakhshi, A.; Tabarzad, M.; Hejazi, M.; Ramezani, M. *Curr. Pharm. Des.* **2018**, *23*, 6019-6032.

Curiosamente, este polímero fue el primer polisacárido identificado por el hombre casi 30 años antes que la celulosa, de la que se diferencia estructuralmente por el grupo acetamido en la posición C-2. La producción mundial de quitina se ha estimado en torno a  $10^{11}$  toneladas por año, lo que la hace uno de los compuestos naturales más abundantes de la tierra.<sup>36</sup>



**Figura 4.** Estructura química de la quitina

Una fuente natural de quitina, y por tanto de sus derivados desacetilados, es los exoesqueletos de crustáceos, como cangrejos y gambas. Estas especies, ampliamente aceptadas y distribuidas para el consumo humano generan un volumen importante de residuos, aproximadamente un 25 % del total de producción. El problema de estos residuos se debe a la presencia de una elevada persistencia en el medio ambiente debido su baja biodegradabilidad. Por ejemplo, una consecuencia de estos residuos en el mar es una eutrofización del medio (elevada concentración de nutrientes) y un aumento de la DBO, mientras que en la superficie terrestre estos residuos pueden ser rápidamente colonizados por patógenos causando problemas en la salud y medioambientales.<sup>37</sup>

<sup>36</sup> Kurita, K. *Mar. Biotechnol.* **2006**, 8, 203-226.

<sup>37</sup> Brück, W. M.; Slater, J. W.; Carney, B. F. Chitin and Chitosan from Marine Organisms. En *Chitin, Chitosan and their derivatives*; Kim, S. -W., Ed.; CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, **2011**; pg. 11-23.



**Figura 5.** *Procambarus clarkii*

A pesar de que hoy en día el mundo se encuentre cada vez más globalizado y la sociedad tenga una mayor conciencia, en general, sobre la problemática medioambiental, es necesario destacar que la problemática de los residuos quitinosos está presente en nuestro entorno más próximo. Así, en la zona de las Marismas del Guadalquivir, numerosas empresas se dedican a la pesca y comercialización de la carne del cangrejo de río americano *Procambarus clarkii* y su inevitable producción de residuos.<sup>38</sup> Esta especie de cangrejo, fue introducido con fines comerciales en 1974 debido a la sobreexplotación del cangrejo autóctono y está considerado como una especie exótica invasora.<sup>39</sup> De hecho, en la actualidad ha colonizado toda la península ibérica y ha derivado en una práctica desaparición del cangrejo autóctono debido a factores como una mayor resistencia a temperaturas, bajos niveles de oxígeno y grado de contaminación de las aguas, además de ser un vector de la afanomicosis, enfermedad infecciosa letal para el cangrejo autóctono induciendo impactos y amenazas sobre el hábitat.<sup>40</sup> Sin embargo, la visión de la realidad no se puede restringir al marco medioambiental sino que tiene una repercusión económica positiva sobre las regiones donde se explota comercialmente.<sup>41</sup> En el contexto medioambiental, una de las medidas propuestas para mitigar la proliferación de este cangrejo consiste en un incremento de la actividad de pesca, objetivo que de cumplirse repercutiría en un aumento de residuos quitinosos. Por tanto, el desarrollo de mecanismos que

---

<sup>38</sup> La pesca y comercialización de este invertebrado está aprobada por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ver: BOE 224 del 19 de Marzo de 1989, pg. 29453-29454.

<sup>39</sup> Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras.

<sup>40</sup> Para una descripción detalla. Ver: Catálogo español de especies exóticas invasoras: *Procambarus clarkii*. PROCLA/EEI/CR005.

<sup>41</sup> Cano-Sánchez, E.; Jiménez-Pino, A.; Ocete-Rubio, E. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol.* **2003**, *98*, 85-89.

favorezcan la transformación *in situ* de residuos de exoesqueletos en biomateriales no contaminantes es un desafío por conseguir a nivel nacional.<sup>42</sup>

## 2.2. Quitosano: estructura y aplicabilidad

El principal derivado desacetilado de la quitina es el quitosano. Se trata de un polisacárido que por sus características: es biodegradable, biocompatible, fisiológicamente inerte y una mayor solubilidad en agua, emerge como una vía para paliar los inconvenientes generados por los residuos de quitina así como proporcionar a esta estructura polimérica aplicabilidad tanto en el campo químico, biológico y en ciencia de materiales totalmente inaccesibles para el biopolímero de partida, quitina.

El quitosano es un heteropolímero lineal que está constituido por una distribución aleatoria de unidades de D-glucosamina y de N-acetil-D-glucosamina unidas mediante enlaces glicosídicos  $\beta(1\rightarrow4)$  (Figura 6). Hay descritos diversos métodos de obtención de quitosanos, bien químicamente, mediante desacetilación de la quitina en medio básico, o enzimáticamente mediante el uso de unas quitindesacetilasas.<sup>43</sup> Contrariamente a la quitina, en el quitosano las unidades de N-acetil-D-glucosamina se encuentran en una menor proporción. Una medida cuantitativa de la proporción de grupos aminos libres frente a los grupos acetilos es el grado de desacetilación (DD). De hecho, la frontera entre estos polisacáridos la marca el grado de desacetilación, aceptándose como quitosano polímeros con DD > 60 %, correspondiendo el valor de 100 % al polímero completamente desacetilado.<sup>44</sup>

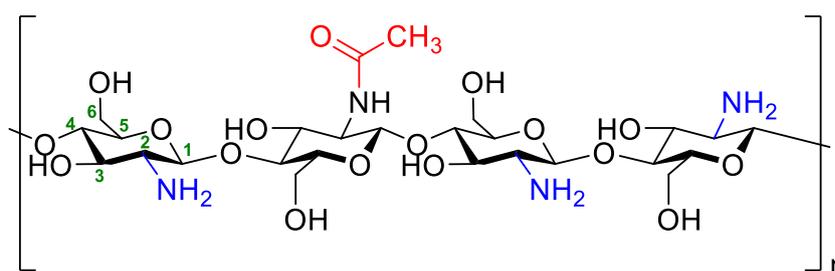


Figura 6. Estructura química del quitosano

<sup>42</sup> Franconetti, A. Sistemas heteroaromáticos de tipo pirilio: Evaluación de la interacción anión- $\pi$ . Tesis doctoral, Universidad de Sevilla, 2016.

y aplicación al desarrollo de materiales multifuncionales basados en quitosano,

<sup>43</sup> Jo, G.-H.; Park, R.-D.; Jung, W.-J. Enzymatic Production of Chitin from Crustacean Shell Waste. En *Chitin, Chitosan and their derivatives*; Kim, S. -W., Ed.; CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2011; pg. 37-45.

<sup>44</sup> Sorlier, P.; Denuzière, A.; Viton, C.; Domard, A. *Biomolecules*, **2001**, 2, 765-772.

La calidad y propiedades del quitosano depende de la fuente de quitina de la que haya sido obtenido, el grado de desacetilación y la separación entre las unidades acetiladas y desacetiladas.<sup>45</sup>

El quitosano presenta una amplia gama de propiedades biológicas, entre las que se encuentran:

- No tóxico. Es una de sus principales características, ello hace que no induzca una inflamación en el organismo ni provoque la respuesta del sistema inmunitario.<sup>46,47</sup>

- Agente antimicrobiano. Se ha descrito que ciertas disoluciones de quitosano presentan propiedades bactericidas. Esto es debido a que la carga positiva de la cadena polimérica se adhiere a las paredes bacterianas, induciendo cambios en la permeabilidad de la membrana celular y derivando en una prevención del crecimiento microbiano. Además, se ha comprobado que existe cierta correlación entre el bajo grado de acetilación del quitosano y el bajo pH del medio en el que se encuentre el mismo con un incremento de la actividad antibacteriana.<sup>48,49</sup>

- Mucoadhesivo. La habilidad del quitosano para adherirse a las superficies es una de sus más importantes características. Esta propiedad no sólo permite generar nuevas estrategias para la liberación de moléculas beneficiosas a través de las mucosas, sino que además ayuda a adsorber moléculas que no presentan afinidad por la mucosidad.<sup>50</sup>

- Hemocompatibilidad. El quitosano ha sido empleado en diversos estudios relacionados con la coagulación de la sangre. De hecho, se ha descrito que el quitosano puede acelerar la rapidez con la que se curan las heridas por medio de las interacciones que ocurren entre las plaquetas y los grupos amino del quitosano.<sup>51</sup>

- Actividad antitumoral. Se ha demostrado que el quitosano y sus derivados podrían tener cierta actividad antitumoral usando modelos *in vitro* e *in vivo*. El efecto

---

<sup>45</sup> Galed, G.; Miralles, B.; Inés Paños, I.; Santiago, A.; Heras, A. *Carbohydr. Polym.*, **2005**, *62*, 316–320.

<sup>46</sup> Huang, M.; Khor, E.; Lim, L.Y. *Pharm. Res.*, **2004**, *21*, 344–353.

<sup>47</sup> Chien, R.; Yen, M.; Mau, J. *Carbohydr. Polym.*, **2016**, *138*, 259–264.

<sup>48</sup> Younes, I.; Sellimi, S.; Rinaudo, M.; Jellouli, K.; Nasri, M. *Int. J. Food Microbiol.*, **2014**, *185*, 57–63.

<sup>49</sup> Kong, M.; Chen, X.G.; Xing, K.; Park, H. J. *Int. J. Food Microbiol.*, **2010**, *144*, 51–63.

<sup>50</sup> Loic, B.; Catherine, L. *Prog. Polym. Sci.*, **2016**, *60*, 1–17.

<sup>51</sup> Okamoto, Y.; Yano, R.; Miyatake, K.; Tomohiro, I.; Shigemasa, Y.; Minami, S. *Carbohydr. Polym.*, **2003**, *53*, 337–342.

antitumoral de los derivados de quitosano es consecuencia de un incremento en la secreción de interleucina 1 y 2, lo que deriva en la maduración y posterior generación de linfocitos T.<sup>52</sup>

- Actividad antioxidante. Diversos estudios han mostrado que el quitosano y sus derivados tienen la habilidad de capturar especies ROS in vitro. Además, parece ser que los quitosanos de bajo peso molecular tienen mayores ventajas a este respecto que aquellos con un peso molecular superior en la eliminación de radicales libres. Un estudio sugiere que el mecanismo de la actividad antioxidante del quitosano podría estar relacionado con la estabilización de los radicales libres por medio de los grupos amino del quitosano.<sup>53</sup>

- Biodegradabilidad. El quitosano puede ser degradado en organismos biológicos a través de bioenzimas que despolimerizan la molécula. Los productos de degradación son unidades de *N*-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, las cuales no tienen ninguna toxicidad en el cuerpo humano.

La amplia gama de propiedades beneficiosas del quitosano ha hecho que la síntesis de derivados del mismo despierte un gran interés ya que es posible modificar e incluso mejorar las propiedades nativas del biopolímero mediante la introducción de sustituyentes de distinta naturaleza sobre el esqueleto polimérico.

La química de derivados del quitosano se basa en las propiedades nucleófilas que presentan los grupos amino e hidroxilos, tanto primario (C-6) como secundario (C-3). Así, se ha descrito en bibliografía la síntesis de diversos derivados de quitosano con distintas propiedades mediante reacciones de alquilación, acilación, condensación y transformación en otros grupos funcionales.

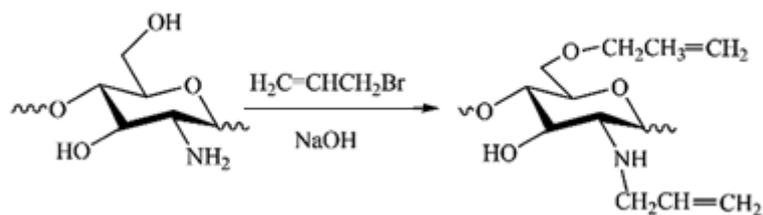
#### a) *Derivados de quitosano mediante reacción de alquilación*

Es bien conocido en Química Orgánica que la nucleofilia de los grupos amino es superior a la de los grupos hidroxilo, lo que supone que la obtención de derivados vía sustitución nucleófila S<sub>N</sub>2 o adición nucleófila involucrando un grupo hidroxilo sin previa reacción de los grupos amino es prácticamente inviable.

---

<sup>52</sup> Tokoro, A.; Tatewaki, N.; Suzuki, K.; Mikami, T.; Suzuki, S.; Suzuki, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 784–790.

<sup>53</sup> Younes, I.; Rinaudo, M. *Mar. Drugs*, **2015**, *13*, 1133–1174.



**Esquema 1.** Ejemplo de obtención de derivados de quitosano mediante reacción de N-alkilación empleando bromuro de alilo y NaOH.<sup>54</sup>

Además, se han descrito en bibliografía diversos derivados de quitosano con el grupo amino cuaternizado obtenidos por reacción con yoduro de metilo. Otros derivados de este tipo también se han preparado mediante otras metodologías sintéticas que consisten en hacer reaccionar el quitosano con epóxidos cuaternarios.<sup>55</sup> Los derivados cuaternizados de quitosano han mostrado diferentes aplicaciones en la preparación de materiales anticoagulantes, materiales proteicos funcionalizados y polímeros funcionalizados debido a su alta solubilidad y seguridad.<sup>56</sup>

*b) Derivados de quitosano mediante reacción de acilación*

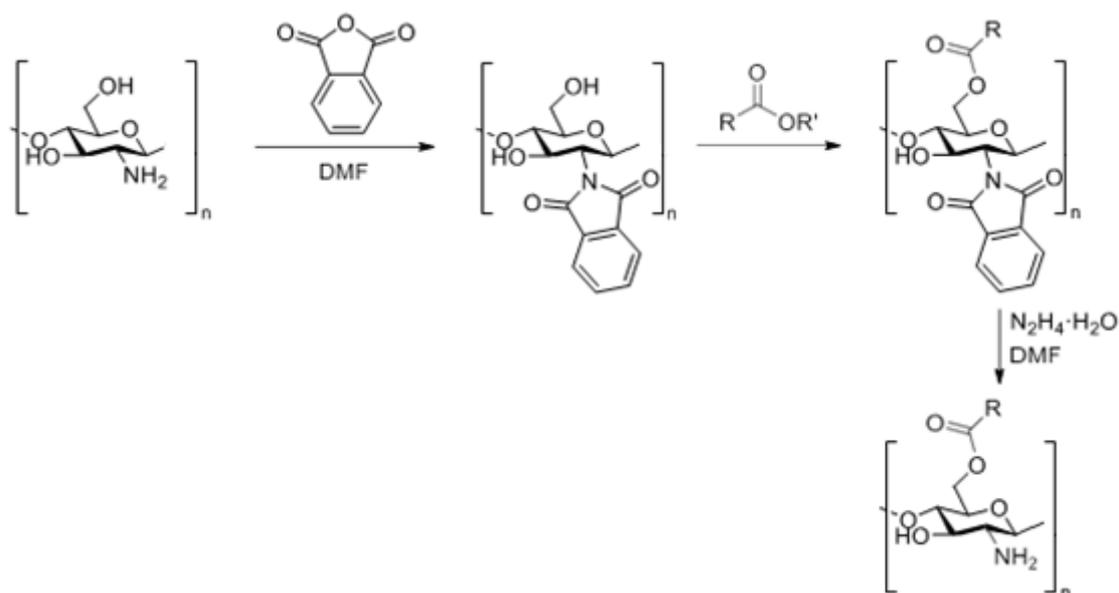
Los grupos amino e hidroxilo del quitosano pueden participar en una reacción de acilación dando lugar a amidas o ésteres, respectivamente. En este contexto, una de las reacciones más importantes consiste en la formación de amidas mediante reacción del grupo amino en el C-2 con un derivado de ácido carboxílico. Sin embargo, las metodologías en las que se emplean haluros de acilo conducen inevitablemente a mezclas que se dan por acilación en el grupo amino y en el grupo hidroxilo. Aunque el proceso que se da principalmente es la N-sustitución debido a la mayor nucleofilia del grupo amino, se puede abordar la O-sustitución quimiosselectivamente. Es posible conseguir la protección selectiva de los grupos amino mediante reacción de ftaloilación y posterior desprotección tras reacción del grupo hidroxilo primario

<sup>54</sup> Akopova, T. A, Demina, T. S, Cherkaev, G. V, Khavpachev, M. A, Bardakova, K. N, Grachev, A. V, Vladimirov, L. V, Zelenetskii, A. N, Timashev, P. S. *RSC advances*, **2019**, 9, 20968-20975.

<sup>55</sup> Senra, T.D.A.; Khoukh, A.; Desbrières, J. *Carbohydr. Polym*, **2017**, 156, 182–192.

<sup>56</sup> Wang, Q.; Zhang, J.; Mu, B.; Fan, L.; Wang, A. *Carbohydr. Polym*, **2014**, 102, 877–883.

(Esquema 2).<sup>57</sup> Además, es posible modular la reactividad del grupo amino a través del pH, ya que las propiedades nucleófilas del mismo disminuyen al protonarse.



**Esquema 2.** Estrategia sintética para hacer reaccionar únicamente grupo hidroxilo primario del quitosano.

Otro ejemplo de esta ruta sintética lo encontramos en la preparación de derivados de quitosano mediante protección previa de los grupos hidroxilo de la posición 6 con aplicabilidad en la liberación controlada de fármacos a nivel pulmonar.<sup>58</sup>

### c) Derivados de quitosano mediante reacción de condensación

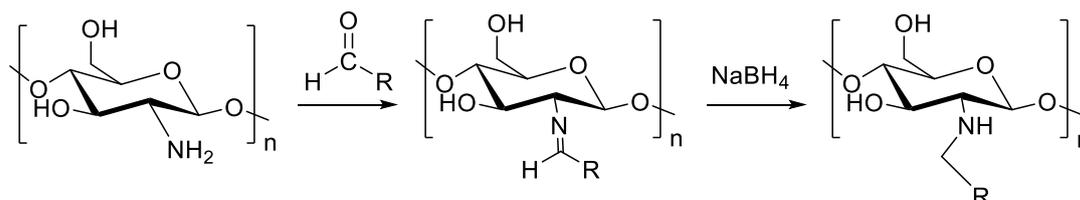
La reacción de formación de iminas o *bases de Schiff* supone otra de las reacciones clásicas aplicadas sobre el quitosano. Esta consiste en la condensación entre el grupo amino del quitosano y un aldehído o cetona. Una vez obtenida la imina, es posible obtener el *N*-alquil derivado correspondiente por reacción mediante un reductor adecuado como  $\text{NaBH}_4$  (Esquema 3). Así, en nuestro grupo de investigación se ha descrito una gama de iminas fluorescentes derivadas de este polímero, que pueden ser

<sup>57</sup> Liu, L.; Wang, Y.; Shen, X.; Fang, Y. *Biopolymers*, **2005**, *78*, 163–170.

<sup>58</sup> Muhsin, M. D. A.; George, G.; Beagley, K.; Ferro, V.; Armitage, C.; Islam, N. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 3596-3607.

empleadas como sensores de polaridad, entre los que podría destacarse la detección de disolventes por cambios en la emisión de fluorescencia.<sup>59, 60</sup>

En referencia a este apartado, se han sintetizado diferentes derivados de quitosano *N*-alquilados los cuales han presentado resultados positivos en el campo de la contención de los procesos hemorrágicos.<sup>61</sup>



**Esquema 3.** Estrategia sintética para la obtención de derivados de quitosano *N*-alquilados.<sup>54</sup>

#### d) Derivados de quitosano mediante transformación en otros grupos funcionales

Además de las reacciones clásicas, otro tipo de transformaciones menos estudiadas se han ensayado con los grupos amino del quitosano, como es por ejemplo la obtención de ureas derivadas del biopolímero, la síntesis sales de piridinio cuaternizadas derivadas de quitosano o la preparación de hidroxialquil quitosanos (Esquema 4).

La obtención de ureas derivadas de quitosano también ha sido estudiada por nuestro grupo de investigación y consiste en la reacción del grupo amino del biopolímero con un isocianato. Así, se han descrito ureas derivadas de quitosano mediante esta metodología y también de ureas entrecruzadas por reacción del quitosano y diisocianatos, generando a su vez geles de estos compuestos con diferente aplicabilidad.<sup>62</sup>

Al igual que ocurría con las iminas y las ureas derivadas de quitosano, nuestro grupo de investigación ha sido pionero en el desarrollo de piridinius derivados de

<sup>59</sup> Jatunov, S.; Franconetti, A.; Prado-Gotor, R.; Heras, A.; Mengíbar, M.; Cabrera-Escribano, F. *Carbohydr. Polym.*, **2015**, *123*, 288-296.

<sup>60</sup> Warayuth, S.; Uracha, R.R.; Pattarapond, G.; Choochart, W. *Carbohydr. Polym.*, **2010**, *4*, 1143-1152.

<sup>61</sup> Chen, Z.; Yao, X.; Liu, L.; Guan, J.; Li, Z.; Yang, J.; Huang, S.; Wu, J.; Tian, F.; Jing, M. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *173*, 259-268.

<sup>62</sup> S. Jatunov Santamaría, *Nuevos derivados de Quitosano funcionalizados en el grupo amino, de alto valor añadido*, Tesis Doctoral dirigida por F. Cabrera Escribano, US, **2015**

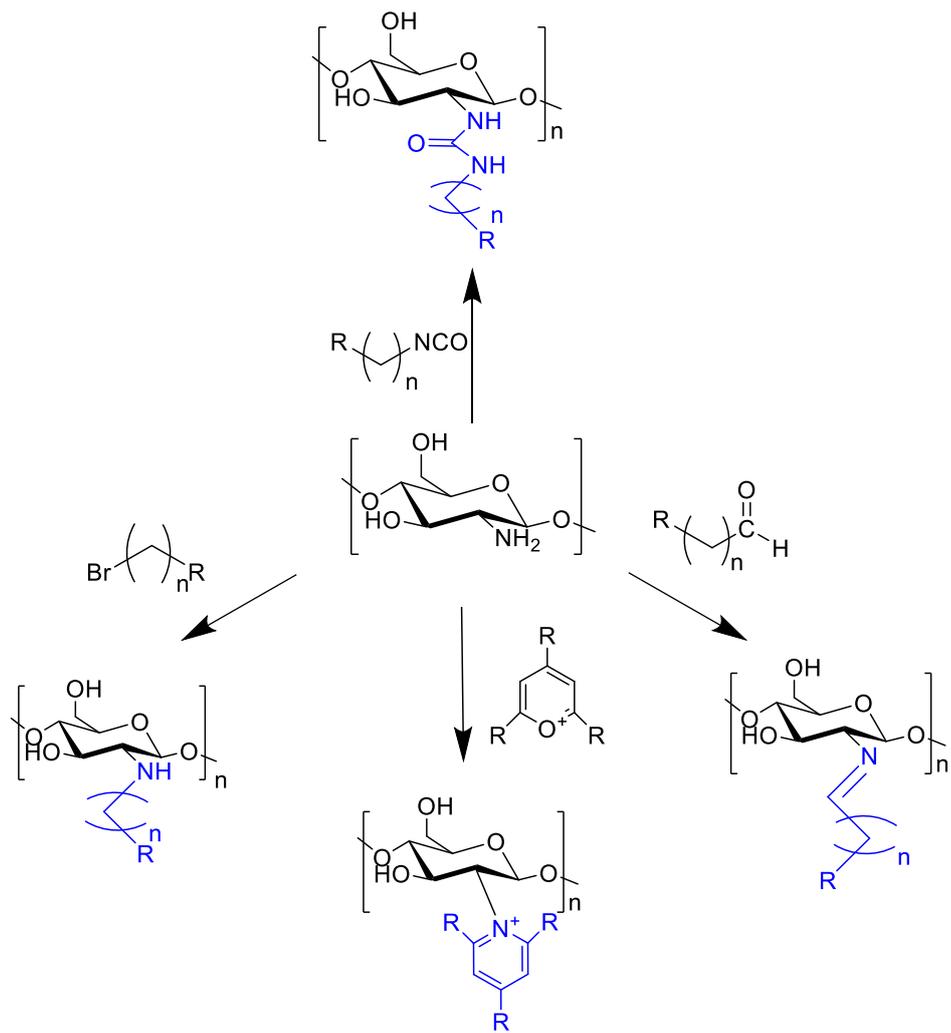
quitosano fluorescentes, con una metodología que implicaba el ataque del grupo amino del quitosano a las posiciones 2 ó 6 de la sal de pirilio correspondiente.<sup>63</sup>

Desde un punto de vista químico, una de las reacciones con mayor dificultad y menos estudiada del biopolímero es la obtención de hidroxialquil quitosanos mediante apertura de anillos oxirano. Estos oxiranos, también denominados epóxidos son éteres cíclicos de tres miembros y se consideran intermedios versátiles en síntesis orgánica. La dificultad de esta reacción radica en que la apertura del epóxido puede producirse por dos caminos diferentes debido a la naturaleza electrofílica de ambos carbonos unidos al átomo de oxígeno, obteniéndose en ambos casos 1,2-hidroxiamino quitosanos. Uno de los factores más importantes que gobierna la regioselectividad en este tipo de reacción es el pH del medio de reacción. Sin embargo, no hay apenas estudios al respecto de este tipo de reacción por lo que no se puede considerar un factor concluyente. En este contexto, se han diseñado resinas tipo epoxi derivadas de quitosano para su empleo en plataformas petrolíferas como sustancia acidificante.<sup>64</sup>

---

<sup>63</sup> Franconetti, A.; Contreras-Bernal, L.; Prado-Gotor, R.; Cabrera-Escribano, F. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 74274-74283

<sup>64</sup> Cestari, A. R.; Vieira, E. F. S.; Alves, F. J.; Silva, E. C. S.; Andrade Jr, M. A. S. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *213-214*, 109-166.



**Esquema 4.** Síntesis de diferentes derivados de quitosano llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación.

## **OBJETIVOS GENERALES**

En base a las consideraciones anteriores, se plantean los dos siguientes objetivos generales:

1. Desarrollo de sistemas monomoleculares antioxidantes y/o con actividad potencial frente a cáncer y enfermedades degenerativas.

2. Anclaje de estos sistemas en el esqueleto biopolimérico del Quitosano como estrategia para la presentación multivalente de los mismos y para el aprovechamiento y valorización de residuos agroindustriales.

# CAPÍTULO 1

*Desarrollo de sistemas heteroaromáticos  
polifenólicos fluorescentes monocatiónicos  
y policatiónicos (derivados de quitosano)*

# 1. Antecedentes

## 1.1. Compuestos polifenólicos

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y son los metabolitos secundarios más abundantes de la naturaleza. Se han identificado más de 8000 y, aunque no se consideran alimentos esenciales para los seres humanos, su ingesta a través de fuentes naturales como la fruta, la verdura, el vino, el té, el cacao o el aceite de oliva, tiene un impacto positivo la salud.

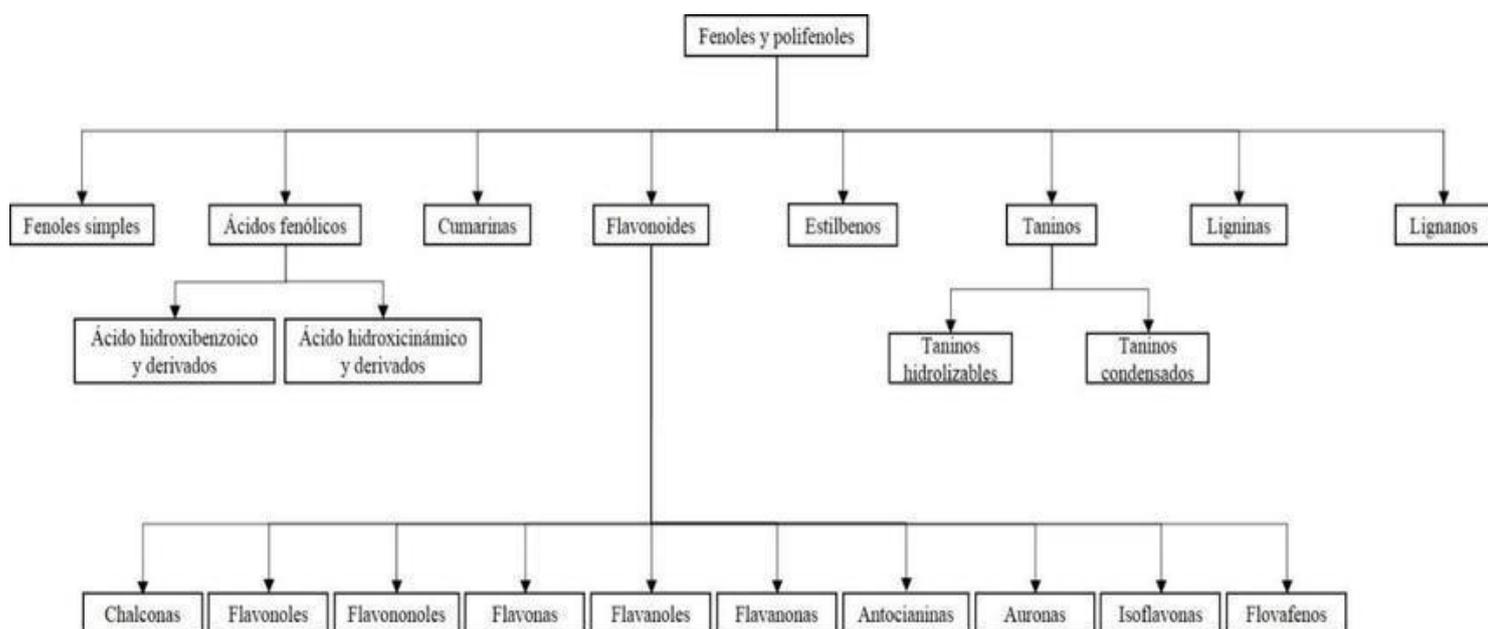


Figura 7. Clasificación de los fenoles y polifenoles.

Existen numerosos estudios que asocian la ingesta de polifenoles a una mejora de la función cardiovascular, disminuyendo en un 46% el riesgo de padecer estos trastornos.<sup>65</sup> Otros investigadores han publicado que una dieta rica en compuestos fenólicos está asociada a un mejor funcionamiento del tejido endotelial y a la inhibición de la agregación plaquetaria con la consiguiente disminución de problemas coronarios serios.<sup>66</sup> Además, la mayoría de los polifenoles tienen propiedades antiinflamatorias,<sup>67</sup> existiendo a su vez una clara correlación entre inflamación crónica y el desarrollo de ciertos tumores.<sup>68</sup> Adicionalmente, estudios epidemiológicos señalan

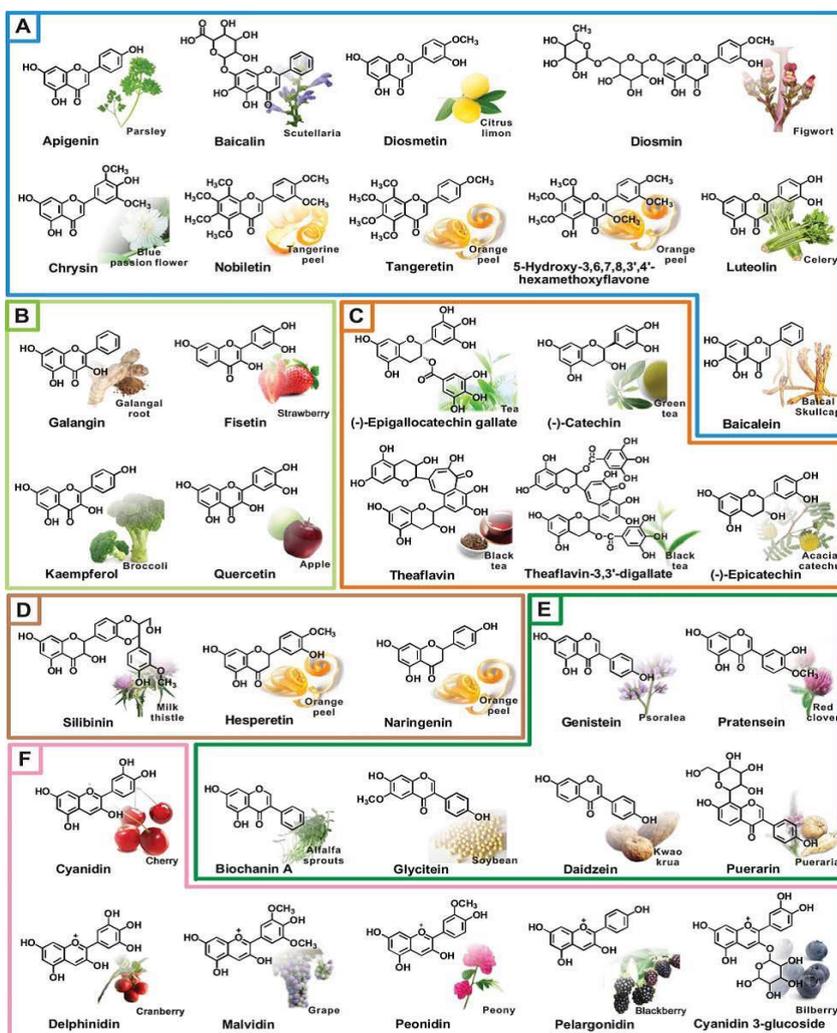
<sup>65</sup> Tresserra-Rimbau, A; Rimm, EB; Medina-Remón, A; Martínez-González, MA; de la Torre, R; Corella, D; Salas-Salvadó, J; Gómez-Gracia, E; Lapetra, J; Arós, F; Fiol, M; Ros, E; Serra-Majem, L; Pintó, X; Saez, GT; Basora, J; Sorlí, JV; Martínez, JA; Vinyoles, E; Ruiz-Gutiérrez, V; Estruch, R; Lamuela-Raventós, RM. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2014**, *24*, 639–647.

<sup>66</sup> Vita, JA. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 292S–297S.

<sup>67</sup> Derek, A.M.; Bradley, W.B. *Food Funct.* **2015**, *6*, 1773–1786.

<sup>68</sup> Edna, Z.; Kodappully, S.; Muthu, K.; Frank, A.; Gautam, S. *Biochemical Journal*, **2015**; *468*, 1–15.

que el tratamiento con antiinflamatorios posee un efecto beneficioso sobre la enfermedad de Alzheimer.<sup>69</sup> También su ingesta prolongada está relacionada con un menor riesgo de padecimiento de enfermedades crónicas como la diabetes tipo II,<sup>70</sup> enfermedades neurodegenerativas como el cáncer, y otros síntomas propios de la tercera edad.



**Figura 8.** Representación de algunos polifenoles y sus fuentes alimentarias.<sup>71</sup>

Desde antaño la actividad biológica de estos compuestos ha estado íntimamente relacionada con su capacidad antioxidante, la cual está estrechamente ligada a la estructura de la molécula, siendo los principales factores que influyen en la misma: el número de grupos hidroxilos fenólicos y el número de fragmentos catecol.<sup>72</sup> Así, se

<sup>69</sup> Miguel-Alvarez, M.; Santos-Lozano, A.; Sanchis-Gomar, F.; Fiuza-Luces, C.; Pareja-Galeano, H.; Garatachea, N.; Lucia, A. *Drugs Aging*, **2015**, *32*, 139-147.

<sup>70</sup> Xiao, JB; Hogger P. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 23-38.

<sup>71</sup> Min-Hsiung, Pan.; Ching-Shu, L.; Chi-Tang, H. *Food Funct.* **2010**, *1*, 15-31.

<sup>72</sup> Fraga, CG; Galleano, M; Verstraeten, SV; Oteiza, PI. *Mol. Aspects Med.* **2010**, *31*, 435-445.

ha demostrado que existe una perfecta correlación entre el estrés oxidativo y las enfermedades anteriormente comentadas por lo que parece lógico pensar que sus efectos beneficiosos no sólo se encuentran asociados a mecanismos específicos de interacción con diversas enzimas o factores de transcripción, sino además a otros factores más inespecíficos como la simple destrucción de radicales libres que funcionan como agentes oxidantes en los organismos.

En este contexto, diversos estudios han puesto de manifiesto que los polifenoles totales presentes en el aceite de oliva virgen extra (AOV) están directamente relacionados con la estabilidad oxidativa del mismo, tanto en recipientes abiertos a baja temperatura<sup>73,74</sup> como a altas temperaturas, (100-120°C) mediante el empleo de los métodos de oxígeno activo (AOM), entre los que destaca el método Rancima,<sup>75,76</sup> jugando un papel muy importante en la conservación de las características de calidad del aceite. Posteriormente este hecho ha sido corroborado al encontrarse una correlación aceptable con la estabilidad Rancimat a 100° C, corregida con un factor que tiene en cuenta la susceptibilidad oxidativa de la matriz según su composición en ácidos grasos.<sup>77</sup> Sin embargo, como se ha visto anteriormente, la fracción fenólica es muy compleja y sus componentes mayoritarios tienen estructuras químicas diferentes, aunque la mayor parte de ellos contiene la unidad de hidroxitirosol o tirosol en sus moléculas.

El mecanismo propuesto para la explicación de estos resultados podría ser el siguiente: el fenol transfiere un átomo de hidrógeno al radical peroxilo (Esquema 5a). El radical fenoxilo o fenóxido formado a partir del antioxidante puede reaccionar con un segundo radical peroxilo mediante una asociación radical-radical, para dar un peróxido, la peroxidienona (Esquema 5b). Los radicales fenoxilos son estables por resonancia, y relativamente poco reactivos frente a los ácidos grasos y el oxígeno, y por lo tanto no son capaces de iniciar o propagar reacciones de oxidación (Esquema 5c). Sin embargo, la formación de peroxidienona puede limitar la eficacia de un

---

<sup>73</sup> Gutfinger, T. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1981**, 58, 966-968.

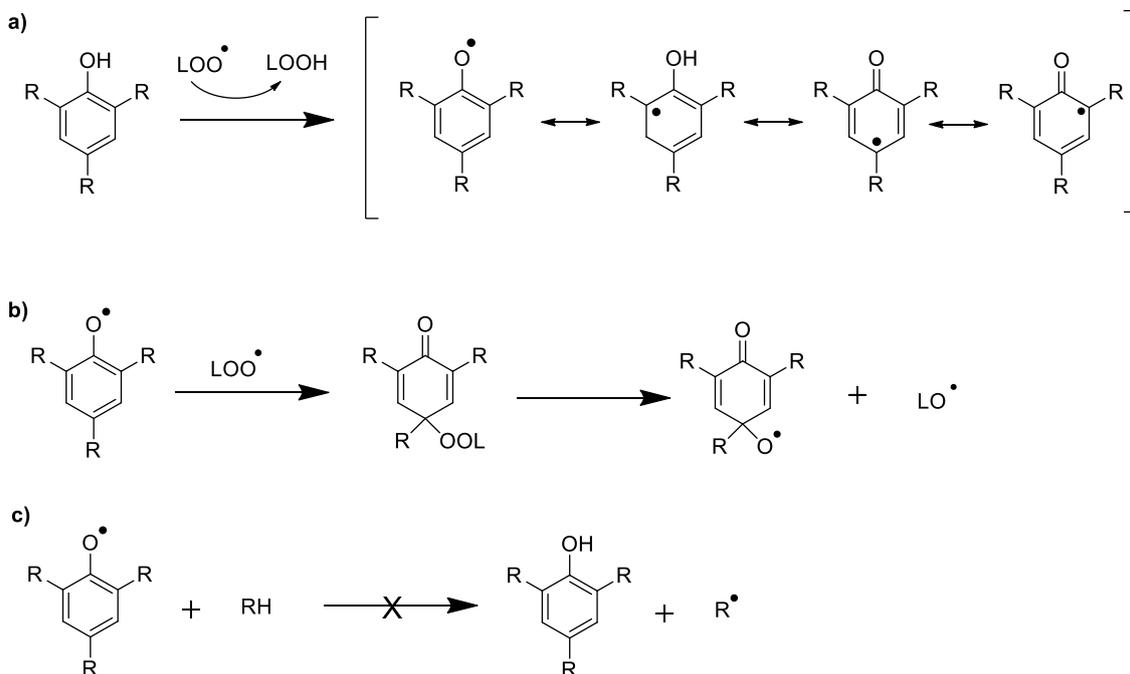
<sup>74</sup> Tsimidou, M.; Papadopoulos, G.; Boskou, D. *Food Chem.*, **1992**, 44, 53-60.

<sup>75</sup> Vázquez, A.; Janer, C.; Janer, M.L. *Grasas y Aceites*, **1975**, 26, 14-18.

<sup>76</sup> Gutiérrez, R.; Janer, C.; Janer, M.L.; Gutiérrez, F. *Grasas y Aceites*, **1977**, 28, 101-106.

<sup>77</sup> Cert, A.; Alba, J.; León-Camacho, M.; Moreda, W.; Pérez-Camino, M.C. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 3930-3934.

antioxidante a temperatura elevada y en presencia de luz UV, ya que en estas condiciones se generan nuevos radicales libres (Esquema 5b).



Esquema 5. Propuesta mecánica para la oxidación de fenoles<sup>71</sup>

La eficacia de los antioxidantes fenólicos depende de la estabilización por resonancia del radical fenoxilo. Esta viene condicionada por los sustituyentes del anillo aromático y por el tamaño de los mismos.<sup>78</sup> Los grupos donadores de electrones reducen la energía del estado de transición en la formación del radical fenoxilo. Los sustituyentes voluminosos crean impedimento estérico y proporcionan una mayor estabilidad al radical fenoxilo. Sin embargo, el impedimento estérico también hace que el antioxidante sea menos accesible para el radical peroxilo.

Estudios realizados sobre flavonoides corroboran que la actividad antioxidante es mucho mayor para compuestos con varios sustituyentes hidroxilo, y en particular para las moléculas que tienen un grupo *o*-difenol.<sup>79,80</sup>

<sup>78</sup> Scott, G. "Atmospheric oxidation and antioxidants". Ed Elsevier, London and New York, **1965**.

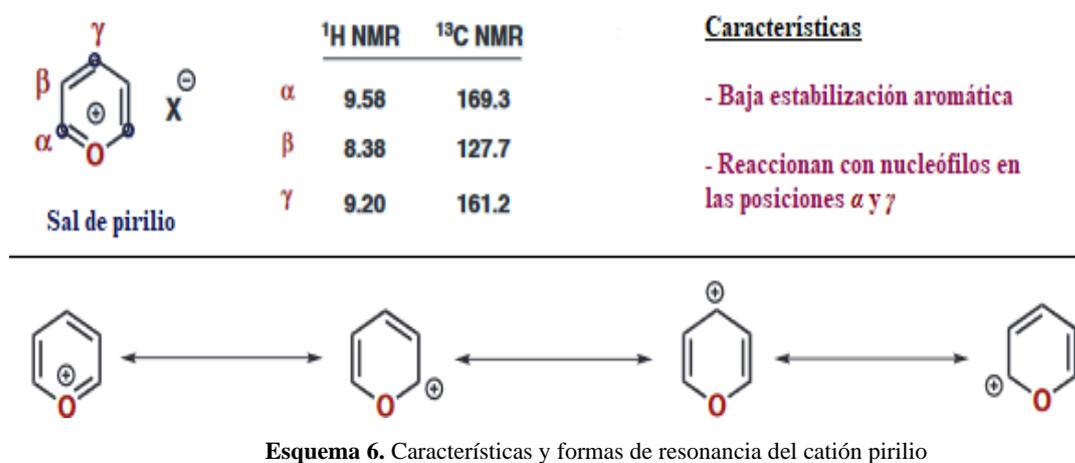
<sup>79</sup> Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. *Free Radic. Biol. Med.*, **1996**, 20, 933-956.

<sup>80</sup> Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. *Free Radical Biology and Medicine*, **1997**, 22, 749-760.

## 1.2. Sales de pirilio: reactividad, estrategias sintéticas y aplicaciones

El estudio de las sales de pirilio se remonta a más de 120 años. En 1896, von Kostanecki y Rossbach aislaron una sal fluorescente fuertemente verde de una mezcla de acetofenona y ácido sulfúrico.<sup>81</sup> En una hazaña tremenda de dilucidación de la estructura, Dilthey identificó la sal 20 años más tarde como tetrafluoroborato de 2,4,6-trifenilpirilio.<sup>82</sup>

Las sales de pirilio son compuestos aromáticos de seis miembros con un oxígeno cargado positivamente y un contraión bien definido (Esquema 6). Aunque el catión pirilio consiste en la simple sustitución de un enlace C-H en el benceno por un átomo de oxígeno, el anillo de pirilio tiene un grado de aromaticidad más baja que el benceno.<sup>83</sup> Como puede observarse una perturbación en el anillo aromático tiene un importante efecto en su estructura electrónica: por ejemplo, un pirilio sustituido es altamente electrófilo y los enlaces C-O están extremadamente polarizados.



Como resultado de dicha perturbación electrónica, el anillo de pirilio tiene una reactividad distinta a la del benceno o la piridina. Las sales de pirilio básicamente no participan en la sustitución aromática electrófila (S<sub>E</sub>Ar); sin embargo, son capaces de

<sup>81</sup> Von Kostanecki, S.; Rossbach, G. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1896**, *29*, 1488-.

<sup>82</sup> Dilthey, W. *J. Prakt. Chem.* **1916**, *94*, 53-76.

<sup>83</sup> (a) Bird, C. W. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 89-92. (b) Omelchenko, I. V.; Shishkin, O. V.; Gorb, L.; Leszczynski, J.; Fias, S.; Bultinck, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 20536-20548.

reaccionar fácilmente con nucleófilos. Las estructuras de resonancia representadas en el Esquema 6 indican que la carga positiva normalmente asignada al átomo de oxígeno está deslocalizada sobre las posiciones  $\alpha$  (posiciones 2 y 6) y  $\gamma$  (posición 4). La alta deficiencia de electrones característica de las posiciones  $\alpha$  puede traducirse en términos de reactividad originando que, en general, los ataques nucleofílicos se producen en las posiciones  $\alpha$ . Además, debido a la baja aromaticidad, se produce la apertura fácil de una sal de pirilio al ser atacada por un nucleófilo. En este contexto, emergen las 1,5-dionas que, a su vez en ciertas circunstancias, pueden ciclar para producir una nueva estructura carbocíclica o heterocíclica, que tiene una mayor energía de estabilización aromática. Por ejemplo, en el caso de una amina, el producto final es una sal de piridinio, en la que la carga positiva reside en el nitrógeno, proporcionando así una estabilización aromática mucho mayor. El mecanismo por el cual los nucleófilos atacan y abren una sal de pirilio se ha estudiado y sucede a través de un proceso conocido como ANRORC (adición de un nucleófilo, apertura de anillo, cierre de anillo).<sup>84</sup> De hecho, este tipo de reacción se puede aplicar a una gran variedad de nucleófilos tal y como está descrito en la bibliografía: aminas, sulfuros o fosfinas, que generalmente conducen a bencenos sustituidos,<sup>85</sup> piridina o piridinos,<sup>73</sup> tiopirilio<sup>86</sup> o las fosfininas, que han sido menos estudiadas.<sup>87</sup>

La síntesis de las sales de pirilio se ve favorecida por tratarse de la formación de un anillo aromático de seis miembros y presenta simplicidad operativa y diversidad sintética. El hecho de que las sales de pirilio sean sales orgánicas, las hace bastante insolubles en disolventes como el éter dietílico, lo que permite una separación sencilla y fácil de los compuestos deseados. Los sustituyentes en las posiciones *orto* y *para* en un anillo de pirilio los hacen relativamente resistentes al ataque de nucleofilo y a la dimerización de radicales. Sin embargo, si una o ambas de las posiciones en *orto* no están sustituidas, la sal de pirilio se vuelve sensible a la humedad y su preparación generalmente se torna problemática.

---

<sup>84</sup> Van der Plas, H. C. *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 462-468.

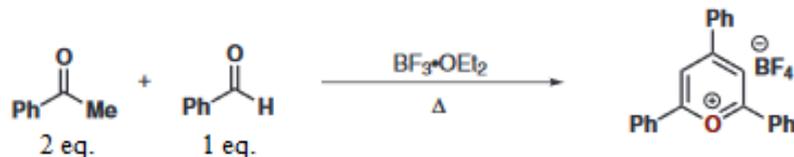
<sup>85</sup> Dimroth, K.; Berndt, A.; Reichardt, C. *Org. Synth., Coll. Vol. 5*; John Wiley & Sons: London, **1973**, 1128.

<sup>86</sup> (a) Wizinger, R.; Ulrich, P. *Helv. Chim. Acta* **1956**, *39*, 207-216. (b) Reynolds, G. A. *Synthesis* **1975**, 638-643.

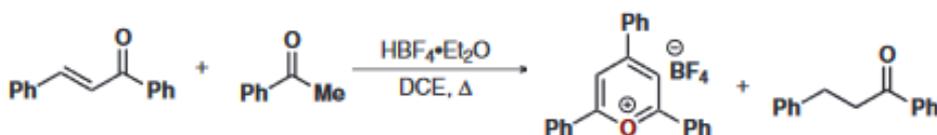
<sup>87</sup> (a) Märkl, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1966**, *5*, 846-847. (b) Breit, B. *Chem. Commun.* **1996**, 2071-2072. (c) Müller, C.; Vogt, D. *Dalton Trans.* **2007**, 5505-5523.

Existen numerosos métodos disponibles para la síntesis de sales de pirilio, por lo que se resaltarán aquellos métodos representativos y más utilizados para su síntesis.

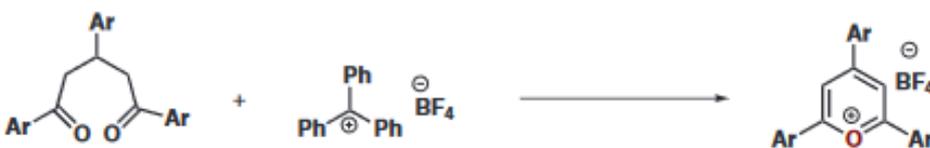
**Estrategia (a), empleada por nuestro grupo de investigación**



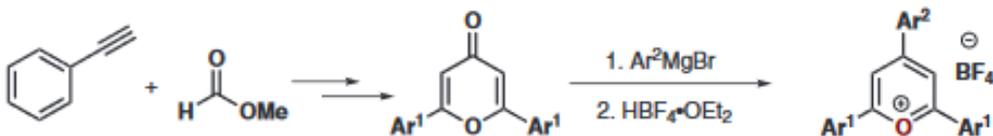
**Estrategia (b)**



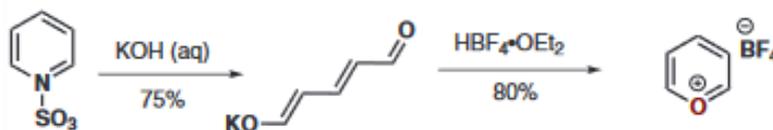
**Estrategia (c)**



**Estrategia (d)**



**Estrategia (e)**



**Esquema 7.** Algunas de las estrategias sintéticas más representativas para la obtención de sales de pirilio

Una de las estrategias más comúnmente utilizadas consiste en hacer reaccionar una chalcona y una acetofenona en presencia de  $\text{HBF}_4$ , formándose la 1,5-diona que posteriormente ciclará a la sal de pirilio correspondiente (estrategia b, Esquema 7).<sup>88</sup>

<sup>88</sup> Bos, H. J. T.; Arens, J. F. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1963**, 82, 845-858.

Otra estrategia posible para la preparación de estos compuestos consiste en utilizar una 1,5-dicetona. En este caso, la presencia de un ácido de Lewis permite captar un protón de la 1,5-dicetona provocando de esta forma la ciclación a la sal de pirilio (estrategia c, Esquema 7).<sup>89</sup>

Otro enfoque distinto consiste en la adición de reactivos nucleófilos a una pirarona, previamente preparada a partir de arilacetileno y formiato de etilo. La adición de un contenido un reactivo de Grignard y el tratamiento posterior con un ácido de Lewis conduce a la deshidratación y formación de la sal de pirilio deseada (estrategia d, Esquema 7).<sup>90</sup>

Recientemente, el grupo de Cornella y colaboradores han desarrollado una estrategia sintética para preparar tetrafluoroboratos de pirilio de manera económica y a gran escala. Esta metodología consiste en utilizar en un primer paso un complejo de pirdina-SO<sub>3</sub>, cuyo precio es muy asequible, con una disolución acuosa de KOH dando lugar a una apertura del anillo y formando una sal denominada glutalconaldehído de potasio. Este intermedio reacciona con HBF<sub>4</sub>·OEt<sub>2</sub> a baja temperatura para dar la sal de pirilio con un buen rendimiento (estrategia e, esquema 7).<sup>91</sup>

Por último, en nuestro grupo de investigación se decidió trabajar con una modificación de una metodología ya desarrollada por Lombard y colaboradores<sup>92</sup>, que consistía en la condensación de dos moléculas de acetofenona con benzaldehído en presencia de BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>.<sup>93</sup> La decisión de emplear esta metodología implementada es que, sin necesidad de la preparación previa de la chalcona o de la 1,5-dicetona, se puede llegar con rendimientos buenos-moderados a la obtención sales de pirilio simétricas en una reacción *one pot*, lo que conlleva un ahorro significativo de tiempo y dinero (estrategia a, Esquema 7).

---

<sup>89</sup> VanAllan, J. A.; Reynolds, G. A. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 1102-1106.

<sup>90</sup> Alfonzo, E.; Alfonso, F. S.; Beeler, A. B. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 2989-2992.

<sup>91</sup> (a) Becher, J. *Org. Synth.* **1979**, *59*, 79-80. (b) Moser, D.; Duan, Y.; Wang, F.; Ma, Y.; O'Neill, M. J.; Cornella, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 11035-11039.

<sup>92</sup> (a) Lombard, R.; Stephan, J. P. *Bull. Soc. Chem. Fr.* **1957**, 1369-1375. (b) Lombard, R.; Stephan, J. P. *Bull. Soc. Chem. Fr.* **1958**, 1458-1462.

<sup>93</sup> Franconetti, A.; Contreras-Bernal, L.; Jatunov, S.; Gómez-Guillén, M.; Angulo, M.; Prado-Gotor, R.; Cabrera-Escribano, F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 18442-18453.

Aunque las sales de pirilio se han utilizado como agentes anticorrosivos<sup>94</sup> o como iniciadores de polimerización catiónica,<sup>95</sup> la aplicación predominante siempre se ha asociado con sus propiedades ópticas. De hecho, las sales de pirilio están presentes en un gran número de patentes por su éxito como fotosensibilizadores en las industrias fotográficas y reprográficas. Además, las sales de pirilio también podrían utilizarse en láseres<sup>96</sup> y como luminóforos incorporados en plásticos y pinturas luminiscentes.<sup>97</sup>

Debido a sus notables propiedades fotofísicas, los derivados de pirilio también se han empleado como fotocatalizadores orgánicos. Dentro de la diversidad estructural de las sales de pirilio, los reactivos de 2,4,6-triarilpirilio han sido reconocidos como fotocatalizadores muy eficientes en síntesis orgánica.<sup>98</sup> Por ejemplo, el 2,4,6-trifenilpirilio (TPP) se encuentra entre los fotocatalizadores más oxidantes en estado fotoexcitado ( $E^*_{\text{reducción}} (^3\text{TPP}^{+*} / \text{TPP}^{\bullet}) = \text{ca. } +2.45 \text{ V}$ ), un potencial muy superior a los fotocatalizadores basados en Ru e Ir.<sup>99</sup> Estas propiedades únicas permiten que los 2,4,6-triarilpirilios catalicen una gran variedad de reacciones, entre las que se encuentran: cicloadiciones,<sup>100</sup> reordenamientos,<sup>101</sup> oxigenaciones,<sup>102</sup> y fragmentaciones.<sup>103</sup>

En este mismo contexto, se han llevado a cabo diversos estudios estructurales y cristalográficos de estas sales, que resaltan su rápida absorción, su elevada fluorescencia y su excelente comportamiento como aceptores de electrones.<sup>104</sup> El anillo de pirilio posee carácter electrofílico, haciendo que este tipo de compuestos sean cromóforos ideales para la identificación de aniones. Una estrategia para mejorar la detección “*in situ*” de aniones consiste en la incorporación de estas sales de pirilio en un esqueleto polimérico.

---

<sup>94</sup> Grigor'ev, V. P.; Ekilik, V. V. *Zh. Prikl. Khim.* **1969**, 41-45.

<sup>95</sup> Bawn, C. E. H.; Carruthers, R.; Ledwith, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1965**, 522-523.

<sup>96</sup> Rulliere, C.; Declémy, A.; Balaban, A. T. *Can. J. Phys.* **1985**, 63, 191-194.

<sup>97</sup> Hartmann, H.; Förster, D. *J. Prakt. Chem.* **1971**, 313-314.

<sup>98</sup> Miranda, M. A.; Garcia, H. *Chem. Rev.* **1994**, 94, 1063-1089.

<sup>99</sup> Romero, N. A.; Nicewicz, D. A. *Chem. Rev.* **2016**, 116, 10075-10166.

<sup>100</sup> (a) Farid, S.; Shealer, S. E. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 677-678. (b) Martiny, M.; Steckhan, E.; Esch, T. *Chem. Ber.* **1993**, 126, 1671-1682. (c) Riener, M.; Nicewicz, D. A. *Chem. Sci.* **2013**, 4, 2625-2629.

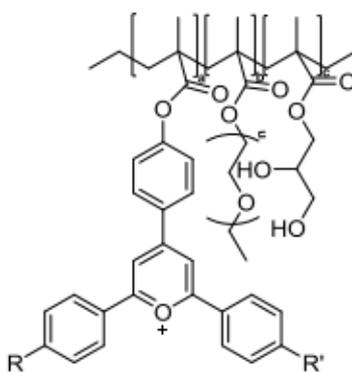
<sup>101</sup> (a) Wiest, O.; Steckhan, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, 32, 901-903. (b) Perkowski, A. J.; Cruz, C. L.; Nicewicz, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 15684-15687.

<sup>102</sup> Akaba, R.; Sakuragi, H.; Tokumaru, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1991**, 291-297.

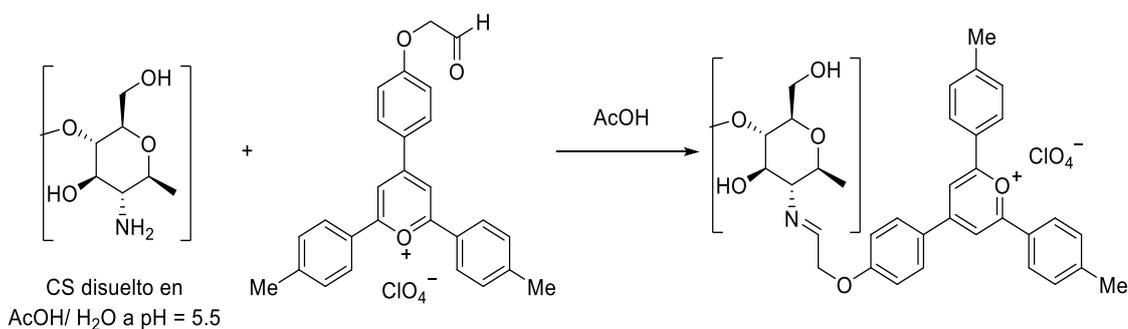
<sup>103</sup> Akaba, R.; Niimura, Y.; Fukushima, T.; Kawai, Y.; Tajima, T.; Kuragami, T.; Negishi, A.; Kamata, M.; Sakuragi, H.; Tokumaru, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4460-4464.

<sup>104</sup> Omelchenko, I. V.; Shishkin, O. V.; Gorb, L.; Leszczynski, J.; Fias, S.; Bultinck, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 20536-20548.

Un ejemplo representativo es la producción de un film polimérico, compuesto de monómeros de metacrilatos de diferente naturaleza unidos a pirilios (Figura 9)<sup>105</sup>, capaces de detectar aniones en medio acuoso, tales como  $F^-$ ,  $PO_4^{2-}$  o  $HCO_3^-$ . Además, este tipo de compuestos se han utilizado como “camaleones” fluorescentes con el fin de detectar y cuantificar proteínas como la seroalbúmina humana.<sup>106</sup> Nuestro grupo ha investigado la síntesis de sistemas policatiónicos derivados de quitosano-triarilpirilio fluorescentes y demostrado la capacidad de los mismos para la detección de aniones ( $OH^-$  y  $HCO_3^-$ ) (Esquema 8).<sup>107</sup>



**Figura 9.** Sal de pirilio enlazada a un copolímero compuesto por distintas unidades de metacrilato.



**Esquema 8.** Obtención de sistemas policatiónicos quitosano-triarilpirilio fluorescentes

<sup>105</sup> García-Acosta, F.G; Miguel García, J.; Martínez-Máñez, F.S., San-José, N.; Soto, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2429-2432

<sup>106</sup> Wetzl, B.K.; Yarmoluk, S.M.; Craig, D.B.; Wolfbeis, O.S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5400-5402.

<sup>107</sup> Franconetti, A.; Núñez Franco, R.; Rojas Fernández, A.; Cabrera Escribano, F.; Fluorescent Chitosan-based biomaterials for sensing devices development. *13 th International Conference of the European Chitin Society - 8th Symposium of the Iberoamerican Chitin Society*. Sevilla. **2017**, PO4, p. 100.

### 1.3. Sales de flavilio: reactividad, estrategias sintéticas y aplicaciones

El color es una percepción visual que producen en la retina los rayos de luz reflejados y absorbidos por un cuerpo, según la longitud de onda de los mismos, y es algo que está presente en la vida cotidiana y juega un papel importante en la misma. De la larga lista de colorantes descubiertos por la humanidad, algunos se basan en cromóforos orgánicos naturales.<sup>108,109</sup> Por ejemplo, el índigo y la alizarina son colorantes naturales que tienen un gran valor económico como colorantes textiles. A este respecto, encontramos también en la naturaleza las antocianinas, moléculas que se encuentran en numerosas plantas y son responsables de la amplia gama de colores que toman las mismas, y que se basan en el grupo cromóforo flavilio.

El descubrimiento de la estructura y síntesis de antocianinas tuvo lugar durante los primeros años del siglo XX. Sin embargo, ya en 1664, Robert Boyle había desarrollado cierta curiosidad por las propiedades de este tipo de compuestos, lo que lo llevó a investigar y publicar numerosos artículos sobre los cambios de color que tienen lugar cuando los extractos de las flores son tratados con ácidos o, según ha descrito E. H. Huntress, bases.<sup>110,111</sup> El término “antocianina” como tal, se le acredita al farmacéutico Ludwig Clamor Marquart,<sup>112</sup> que acuñó este nombre en 1835, combinando las palabras griegas flor y azul.

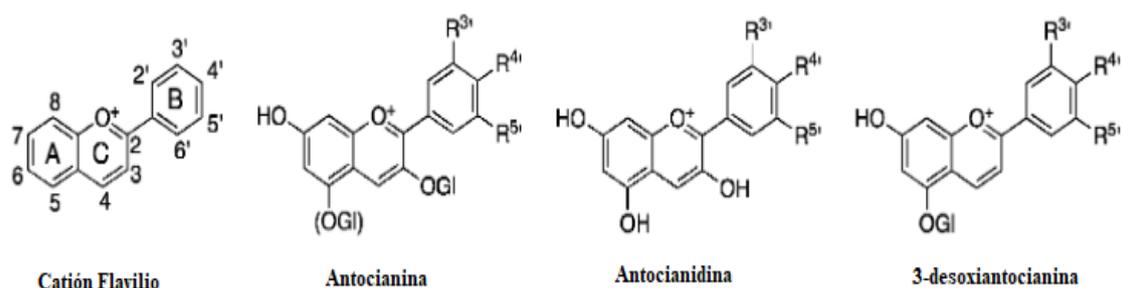


Figura 10. Derivados de flavilio comunes (GI: grupo glicósido)<sup>113</sup>

En este contexto, es necesario señalar que las sales de flavilio sintéticas fueron preparadas antes que las antocianinas, sirviendo éstas como guía para resolver los problemas de dilucidación estructural de las antocianinas, así como para lograr la

<sup>108</sup> Ferreria, E. S. B.; Hulme, A. N.; McNab, H.; Quye, A. *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, *33*, 329–336.

<sup>109</sup> Melo, M.J. *Handbook of Natural Colorants*, ed. T. Bechtold and R. Mussak, John Wiley & Sons, **2009**, pp. 3–18.

<sup>110</sup> Huntress E.H. *J. Chem. Educ.*, **1928**, *5*, 1392–1398.

<sup>111</sup> Huntress E.H., *J. Chem. Educ.*, **1928**, *5*, 1615–1620.

<sup>112</sup> Czapek, F. *Biochemie der Pflanzen*, Gustav Fischer, Jena, Germany, **1922**, vol. I, p. 586.

<sup>113</sup> Pina, F.; Melo, M. J.; Laia, C. A. T.; Parola, J.; Lima, J. C. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 869–908.

síntesis completa de las mismas. Además, los estudios cinético y termodinámico de las sales de flavilio sintéticas han sido muy útiles para la comprensión del comportamiento químico de las antocianinas, ya que ambos grupos siguen una red de reacciones químicas idéntica.

Las sales de flavilio son compuestos aromáticos con estructura de benzopirilio sustituidos en posición 2 con otro anillo de benceno. Entre las características de su reactividad química se puede destacar:

a) *Diácidos débiles*. Debido a la conjugación con el anillo de pirilio que retira electrones, los grupos OH fenólicos del ion flavilio en las posiciones C4', C5 y C7 son bastante ácidos. En términos de relación estructura-acidez, el grupo OH de C7 es el grupo más ácido con un  $pK_{a1}$  de aproximadamente 4, es decir, tiene 6 unidades de  $pK_a$  por debajo del propio fenol. A niveles más altos de pH, se produce una segunda pérdida del protón del grupo hidroxilo de la posición C4' ( $pK_{a2} \approx 7$  para flavilios comunes) que conduce a la formación de una base aniónica con deslocalización de electrones maximizada sobre los tres anillos (Figura 11).<sup>114</sup>

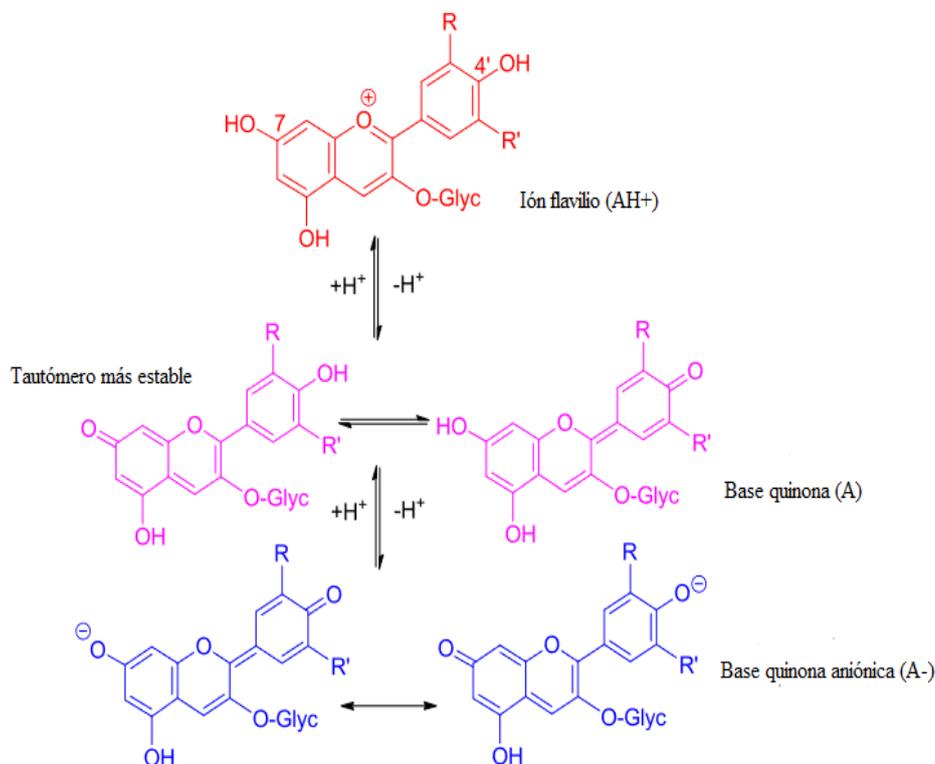
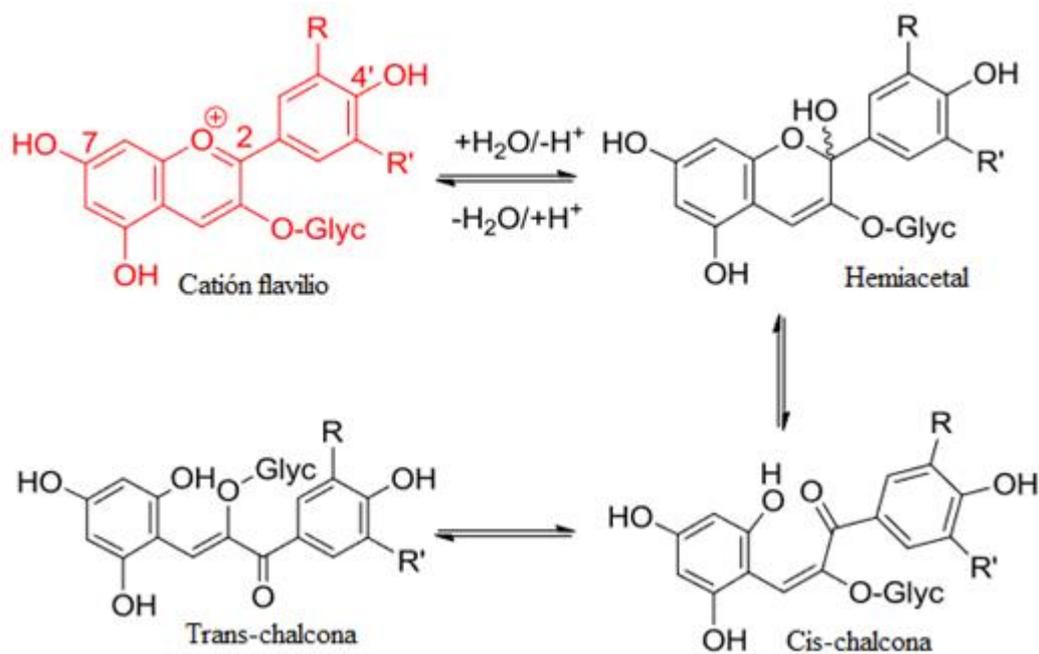


Figura 11. Propiedades diácidas sales de flavilio

<sup>114</sup> Nave, F.; Petrov, V.; Pina, F.; Teixeira, N.; Mateus, N.; de Freitas, V. *J. Phys. Chem.* **2010**, *114*, 13487–13496.

b) *Adición nucleófila en C2 y en C4*. Al igual que ocurría en las sales de pirilio, la carga positiva normalmente situada en el átomo de oxígeno se encuentra muy deslocalizada sobre las posiciones 2 y 4 de la sal de flavilio. La alta deficiencia de electrones característica de las posiciones 2 y 4 puede traducirse en términos de reactividad originando que, en general, los ataques nucleofílicos se produzcan en dichas posiciones (siendo preferente en la posición 2). Además, debido a la baja estabilización aromática, se produce la apertura fácil de una sal de flavilio al ser atacado por un nucleófilo. Un ejemplo de esto lo tenemos en el ataque nucleófilo que se produce en presencia de agua en las antocianinas sobre la posición 2, que conduce a la formación de un hemiacetal, perdiéndose de esta forma el color de la antocianina (Figura 12).<sup>115</sup>

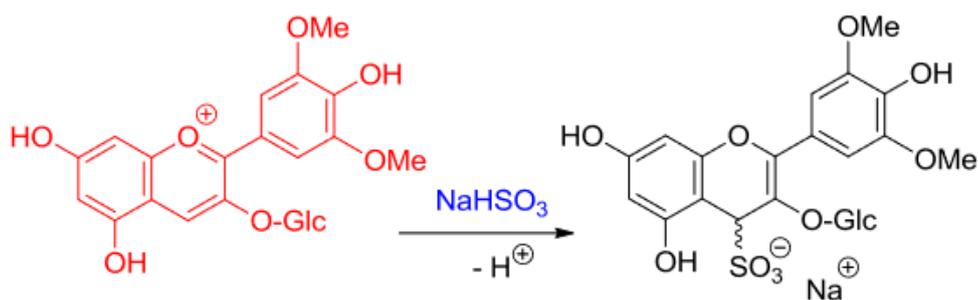


**Figura 12.** Actuación de la sal de flavilio como electrófilo frente al ataque del H<sub>2</sub>O en C<sub>2</sub>

Otro ejemplo distinto, en este caso para la posición 4, fue descrito por Berké et al.,<sup>116</sup> que hicieron reaccionar bisulfito de sodio con una sal de flavilio, formando nuevamente un aducto incoloro con la presencia de un grupo bisulfito debido a que la presencia de este grupo destaca por su conocida actividad antimicrobiana en la industria alimentaria (Figura 13).

<sup>115</sup> Moloney, M.; Robbins, R.J.; Collins, T.M.; Kondo, T.; Yoshida, K.; Dangles, O. *Dyes Pigment.* **2018**, *158*, 342–352.

<sup>116</sup> Berké, B.; Chèze, C.; Vercauteren, J.; Deffieux, G. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5771–5774.



**Figura 13.** Actuación de la sal de flavilio como electrófilo frente al ataque del bisulfito de sodio en C4

c) *Donadores de electrones.* Muchos polifenoles, especialmente aquellos que contienen núcleos ricos en electrones como es el caso del catecol (1,2-dihidroxibenceno) o pirogalol (1,2,3-trihidroxibenceno) son buenos donadores de electrones o H. La transferencia de electrones suele ser más rápida cuando se eleva el pH, es decir, cuando aumenta la fracción de anión fenolato (un donadores de electrones mucho mejor que el fenol original). La transferencia de electrones de los fenoles está involucrada en sus mecanismos de oxidación y también subyace al mecanismo más común de actividad antioxidante, es decir, la reducción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) involucradas en el estrés oxidativo de las plantas a los humanos (Esquema 5).

En referencia a su obtención, las sales de flavilio pueden obtenerse por dos metodologías distintas: extracción o síntesis.

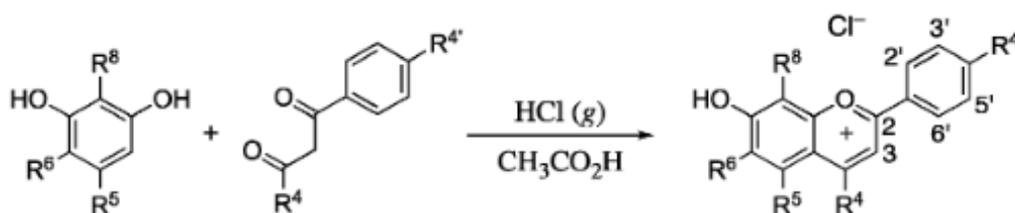
a) *Métodos de extracción.* La extracción con disolventes supone uno de los métodos más comunes para la extracción de diversos compuestos que se encuentran en las frutas, como es el caso de los flavonoides.<sup>117</sup> Las antocianinas son moléculas polares, por lo que los disolventes más utilizados en las extracciones son mezclas acuosas de etanol, metanol o acetona.<sup>118</sup> Estas metodologías implican una extracción conjunta de sustancias no fenólicas como azúcares, ácidos orgánicos y proteínas por lo que requieren de procesos de purificación posteriores, como puede ser una extracción en fase sólida (SPE).

<sup>117</sup> Merken, H. M., Beecher, G. R. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 577-599.

<sup>118</sup> Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Heinonen, M. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 4076-4082.

Entre los métodos más comunes de extracción se encuentran aquellos que usan metanol o etanol acidificados como extractante,<sup>119,120</sup> Siendo la extracción con metanol es la más eficiente.<sup>121</sup>

b) *Métodos sintéticos*. La primera síntesis de sales de flavilio fue diseñada por Bülow y Wagner y se basa en la condensación de  $\beta$ -dicetonas y resorcinolos (Esquema 9).<sup>122,123</sup> Esta síntesis es útil siempre y cuando las sales de flavilio estén sustituidas en la posición 4 con un grupo alquilo o arilo.<sup>124</sup>



**Esquema 9.** Síntesis de sales de flavilio general basada en la metodología de Bülow y Wagner

Más tarde, Robinson y col,<sup>125,126</sup> desarrollaron una ruta importante para la síntesis de sales de flavilio, la cual se basaba en la condensación de 2-hidroxibenzaldehídos y acetofenonas, siendo esta metodología la más empleada actualmente para sintetizar sales de 2-fenilbenzopirilio (Esquema 10). De hecho, este trabajo fue pionero en el desarrollo de la metodología que ha derivado en otras se muchas publicaciones de síntesis de sales de flavilio. Sin embargo, la mayoría de ellas sólo informan de nuevos patrones de sustitución en los reactivos habituales, u optimación de los disolventes y/o ácidos utilizados.<sup>127,128,129</sup> Un trabajo innovador a este respecto fue el de Katritzky y colaboradores,<sup>130</sup> en el que se utilizó como ácido  $\text{HBF}_4$  acuoso y anhídrido acético en lugar del clásico  $\text{HCl}$  gaseoso. Los autores describen este método como especialmente

<sup>119</sup> Amr, A., & Al-Tamimi, E. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **2007**, *42*, 985–991.

<sup>120</sup> Awika, J. M., Rooney, L. W., Waniska, R. D. *Food Chem.*, **2005**, *90*, 293–301.

<sup>121</sup> Kapasakalidis, P. G., Rastall, R. A., Gordon, M. H. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 4016–4021.

<sup>122</sup> Bülow, C.; Wagner, H. *Ber.*, **1901**, *34*, 1782–1806.

<sup>123</sup> Bülow, C; Sicherer, W. *Ber.*, **1901**, *34*, 2368–2385.

<sup>124</sup> Robinson, R.; Walker, J. J. *Chem. Soc.*, **1934**, 1435–1440.

<sup>125</sup> Pratt, D.; Robinson, R. *J. Chem. Soc. Trans.*, **1922**, *121*, 1577–1585.

<sup>126</sup> Robinson, R.; Robertson, R. *J. Chem. Soc.*, **1926**, 1713–1720.

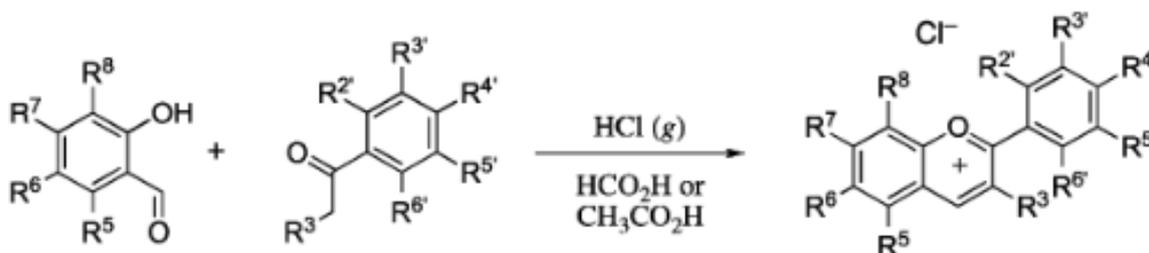
<sup>127</sup> Michaelis, C.; Wizinger, R. *Helv. Chim. Acta*, **1951**, *34*, 1761–1770.

<sup>128</sup> Barcena, H. S.; Chen, P.; Tuachi, A. *SpringerPlus*, **2015**, *4*, 499.

<sup>129</sup> Milan 4, D.; Rejhana, K.; Niko.; Biljana, Š.; Dragan, A.; Krešimir, M. *Food Chemistry*, **2017**, *229*, 688–694

<sup>130</sup> Katritzky, A.; Czerney, P.; Levell, J.; Du, W. *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, 2623–2629.

interesante si se quieren obtener sales de flavilio sin ningún grupo hidroxilo.<sup>131</sup> Sin embargo, cuando hay uno o varios grupos OH presentes en la molécula, como ocurre en la mayoría de los casos, se han desarrollado otras estrategias alternativas basadas en los trabajos iniciales de Johnson.<sup>132</sup>



**Esquema 10.** Síntesis de sales de flavilio general basada en la metodología de Robinson y colaboradores

Finalmente, respecto a la aplicabilidad de las sales de flavilio, sus propiedades son diversas en los distintos sectores.

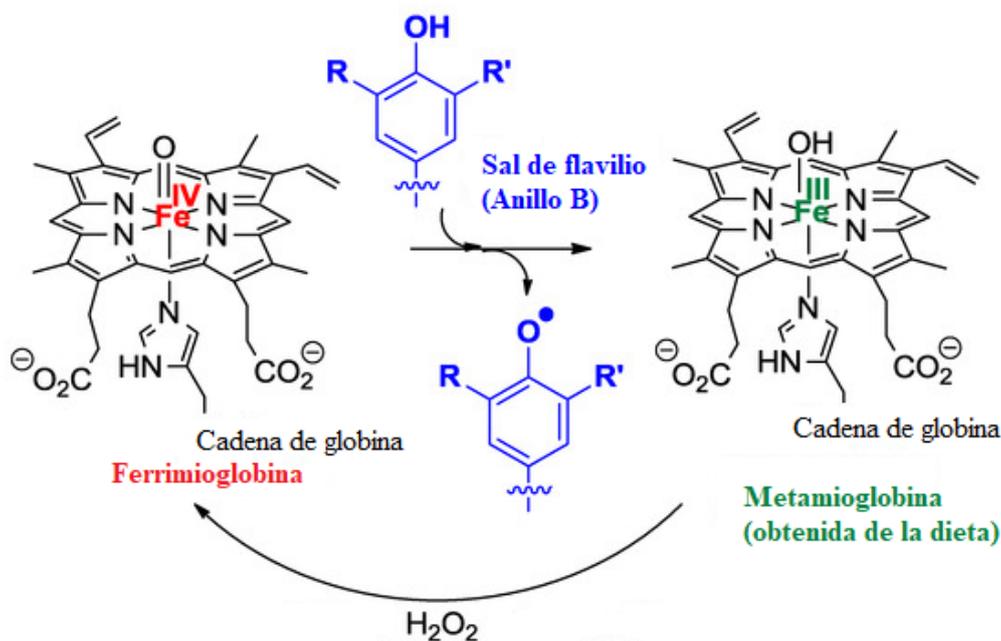
En la industria biomédica, farmacéutica y alimentaria la propiedad más resaltante es su actividad antioxidante.<sup>133</sup> Las antocianinas en su forma nativa de sal de flavilio pueden transferir electrones a las ROS y, por tanto, proporcionar cierta protección a algunas biomoléculas que tienden a ser oxidables en nuestro organismo, como pueden ser los ácidos grasos poliinsaturados, proteínas y ADN. La importancia de esta actividad es quizás mucho mayor en la industria alimentaria, como preservador de alimentos, que en el campo de la salud debido a la conocida biodisponibilidad de las antocianinas. Las sales de flavilio pueden captar un electron de especies oxidantes como por ejemplo el radical estable DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), habiéndose descrito en la bibliografía una relación estructura-actividad que muestra un incremento de esta actividad cuando las posiciones C3' y C5' se encuentran hidroxiladas (Esquema 11), lo que sugiere que es el anillo B situado en la posición 2 el responsable de esta actividad.<sup>134</sup>

<sup>131</sup> Chassaing, S.; Kueny-Stotz, M.; Isorez, G.; Brouillard, R. *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 2438–2448.

<sup>132</sup> J. W. Gramshaw, A. W. Johnson, T. J. King, *J. Chem. Soc.*, **1958**, 4040–4049.

<sup>133</sup> Ullah, R.; Khan, M.; Shah, S. A.; Saeed, K.; Kim, M. O. *Nutrients*, **2019**, *11*, 1195–1213.

<sup>134</sup> Kähkönen, M.P.; Heinonen, M. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 628–633.



**Esquema 11.** Posible mecanismo antioxidante de las antocianinas en la comida y en el tracto gastro-intestinal <sup>135</sup>

Continuando con las propiedades biológicas, estudios epidemiológicos muestran las relaciones entre los alimentos ricos en antocianinas y las enfermedades cardiovasculares, así como la relación entre la ingesta total de antocianinas y el riesgo de desarrollar estas enfermedades cardiovasculares. Las antocianinas también demuestran efecto antitrombótico *in vitro*.<sup>136</sup> El efecto antitrombótico está respaldado por otro estudio en el que se alimentó a ratas con maíz que tenía semillas de antocianina (semillas al 20% en la dieta) y se demostró que durante ocho semanas son menos susceptibles al desarrollo de isquemia y posterior reperusión y consiguen una reducción del tamaño del infarto con un aumento de presencia de la enzima antioxidante.<sup>137</sup>

Las antocianinas han demostrado tener también ciertas propiedades anticancerígenas, así como de antiangiogénesis, demostradas por medio de estudios *in vitro* y de cultivo celular, y modelos animales. La angiogénesis consiste en la transición de tumores de un estado benigno a uno maligno, por lo que es la clave para el desarrollo del cáncer. En la prevención del cáncer, la antiangiogénesis es el proceso que impide la formación de nuevos vasos sanguíneos que suministran oxígeno a las células tumorales. Las antocianinas se han extraído y aislado de diferentes fuentes

<sup>135</sup> Dangles, O.; Fenger, J.A. *Molecules* **2018**, *23*, 1970-1982.

<sup>136</sup> Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. *Food Nutr. Res.*, **2017**, *61*, 1361779.

<sup>137</sup> Toufektsian, M.C.; De Lorgeril, M.; Nagy, N. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 747-752.

vegetales para investigar su capacidad anticancerígena frente al cáncer de esófago, colon, mama, hígado y próstata.<sup>138,139</sup>

Los compuestos polifenólicos, donde se incluyen las antocianinas, poseen actividad antibacteriana contra una amplia gama de microorganismos, especialmente en la inhibición del crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos.<sup>140</sup> Las sales de flavilio exhiben actividad antibacteriana a través de varios mecanismos, como el daño celular inducido por la destrucción de la pared celular, la membrana y la matriz intercelular.<sup>141</sup> Estudios han demostrado que los extractos de plantas ricos en antocianinas, como el arándano, la frambuesa y la fresa inhiben bacterias Gram-positivas pero no Gram-negativas.<sup>142</sup> Esta variación probablemente es debida a los diferentes tipos de estructura de la pared celular entre un tipo de bacteria y otra. Sin embargo, se piensa que estas actividades antimicrobianas de los extractos que contienen antocianinas se deben posiblemente a una sinergia de múltiples mecanismos en los que se encuentran implicados diversos fitoquímicos presentes en los extractos, incluyendo antocianinas, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y multitud de diferentes compuestos. Por tanto, se debería analizar más en profundidad el efecto de las antocianinas aisladas, tal y como se hará en esta tesis.

En otras industrias como la energética, se han empleado las antocianinas en las células solares sensibilizadas por colorantes (DSSC). Se trata de celdas que producen electricidad mediante un principio foto-electro-químico, que transforma la energía lumínica en energía eléctrica. El éxito inicial de estas células llevó a investigar a las antocianinas como sensibilizadores en DSSC,<sup>143</sup> obteniéndose buenos rendimientos de energía solar en eléctrica con diferentes extractos de plantas ricos en antocianinas.<sup>144</sup>

### 1.3. Sales de piridinio y quinolinio derivadas de quitosano

Como se ha visto en los anteriores apartados (1.2. y 1.3.), las posiciones 2 y 6 de los anillos de pirilio y la posición 2 de los anillos de benzopirilio son altamente

---

<sup>138</sup> Lin, B.W.; Gong, C.C.; Song, H.F.; Cui, Y.Y. *Brit. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 1226-1243.

<sup>139</sup> Thibado, S. P.; Thornthwaite, J. T.; Ballard, T. K.; Goodman, B. T. *Mol. Clin. Oncol.*, **2018**, *330-335*.

<sup>140</sup> Cushnie, T.; Lamb, A.J. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2005**, *26*, 343-356.

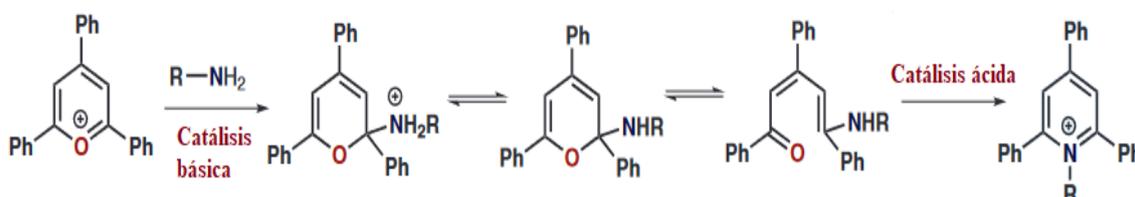
<sup>141</sup> Tang, C.; Xie, B.; Sun, Z. *Journal of Functional Foods*, **2017**, *38*, 454-463.

<sup>142</sup> Puupponen-Pimiä R.; Nohynek, L.; Meier, C. *J Appl Microbiol.* **2001**, *90*, 494-507.

<sup>143</sup> Calogero, G.; G. Di Marco, G.; *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, **2008**, *92*, 1341-1346.

<sup>144</sup> Wongcharee, K.; Meeyoo, V.; Chavadej, S. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, **2007**, *91*, 566-571.

deficientes en electrones, por lo que diversos nucleófilos puedan atacar esas posiciones provocando la apertura del anillo. Así, las sales de pirilio y de benzopirilio pueden condensarse con una amplia variedad de grupos amino primarios para dar lugar a las sales de piridinio y quinolinio correspondientes. El mecanismo de esta condensación ha sido estudiado en detalle por el grupo de Katritzky y colaboradores (Esquema 12), por lo que en la literatura científica es bastante común referirse a las sales de piridinio como las “sales de Katritzky”.<sup>145</sup> La sal de 2,4,6-trifenilpirilio se somete a una apertura por ataque de la amina, para producir una ceto-enamina, la cual después ciclará nuevamente en presencia de un ácido de Lewis.



Esquema 12. Propuesta mecanística realizada por Katritzky y colaboradores

A este respecto, en nuestro grupo de investigación se han preparado complejos piridinio-quitosano fluorescentes cuaternizados de distinta naturaleza electrónica empleando el grupo amino primario del quitosano como nucleófilo para atacar a diferentes sales de 2,4,6-triarilpirilio diversamente sustituidas.<sup>63</sup> Sin embargo, no hay descritos en la bibliografía ningún otro derivado de quitosano-piridinio, ni por supuesto, ningún derivado quitosano-quinolinio.

En este contexto, lo que si hay descrito son otro tipo de derivados de quitosano cuaternizados. Los derivados cuaternizados resultan especialmente interesantes debido a que no sólo mejoran la solubilidad del polímero<sup>146</sup> sino que además muestran un gran poder antimicrobiano debido a la carga positiva permanente. Se ha estudiado en diversos artículos científicos que el quitosano consigue su mayor potencial antioxidante a bajos valores de pH debido a la protonación de los grupos amino, lo que explica que los derivados cuaternizados de quitosano sean más eficaces que el

<sup>145</sup> (a) Katritzky, A. R.; Lloyd, J. M.; Patel, R. C. *Chem. Scr.* **1981**, *18*, 256-265. (b) Katritzky, A. R.; Leahy, D. E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1985**, 171.

<sup>146</sup> Badawy, M. E. I. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *117*, 960-969.

quitosano como tal y el resto de derivados.<sup>147,148</sup> Uno de los mecanismos por los que se piensa que el quitosano presenta su potencial antimicrobiano es la interacción electrostática que se produce entre el biopolímero y las partes aniónicas de los lipopolisacáridos presentes en la membrana celular de las bacterias (Figura 14), lo que explica claramente por qué los derivados cuaternizados presentan un mayor potencial.<sup>149, 150</sup>

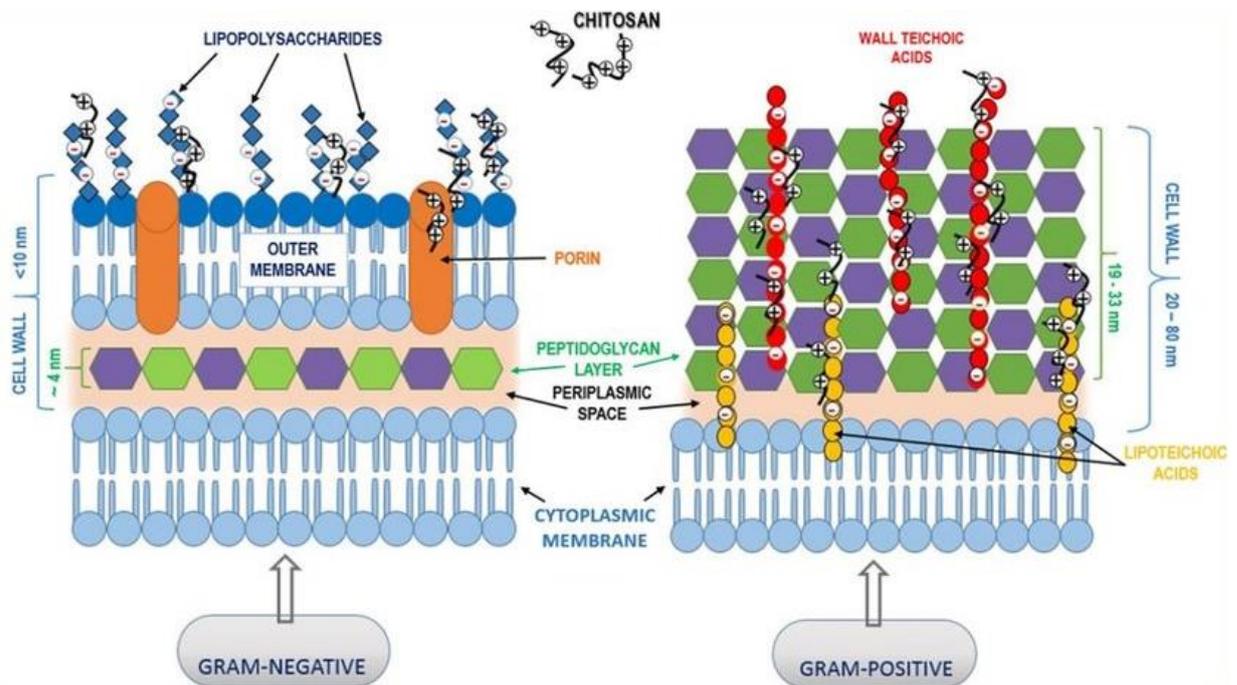


Figura 14. Propuesta de interacción entre el quitosano y la pared bacteriana

Otro tipo de derivados interesantes, son aquellos que presentan unidades polifenólicas en el quitosano, pues han mostrado conservar sus propiedades antioxidantes, antibacterianas y permitir la liberación controlada de estas unidades en el organismo.<sup>151</sup> Además, como en el caso anterior, los polifenoles son conocidos por su excelente solubilidad en agua, lo que permitirá mejorar la escasa solubilidad del biopolímero. Uno de los principales factores por el que se aumenta la solubilidad en agua del polímero es porque los complejos polifenol-quitosano presentan una

<sup>147</sup> De Oliveira Pedro, R.; Takaki, M.; Gorayeb, T. C. C.; Del Bianchi, V. L.; Thomeo, J. C.; Tiera, M. J.; *Microbiol. Res.* **2013**, *168*, 50–55.

<sup>148</sup> Viegas de Souza, R. H.; Takaki, M.; De Oliveira Pedro, R., Dos Santos Gabriel, J., Tiera, M. J.; De Oliveira Tiera, V. A. *Molecules*, **2013**, *18*, 4437–4450.

<sup>149</sup> Liu, H.; Du, Y.; Wang, X.; Sun, L. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *95*, 147–155.

<sup>150</sup> Matica, M. A., Aachmann, F. L., Tøndervik, A., Sletta, H., Ostafe, V. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5889.

<sup>151</sup> Curcio, M.; Puoci, F.; Iemma, F.; Parisi, O. I.; Cirillo, G.; Spizzirri, U. G. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5933–5938.

reducción de la cristalinidad.<sup>152</sup> La mayor actividad antioxidante de los complejos de quitosano polifenólicos ha sido puesta de manifiesto en diversos estudios en los que se ha evaluado la capacidad de estos derivados como secuestradores de radicales libres con respecto al quitosano.<sup>153</sup>

Algunos ejemplos de derivados de quitosano con unidades fenólicas sintetizados son los complejos quitosano-ácido caféico, quitosano-ácido ferúlico o quitosano-ácido salicílico.<sup>154,155</sup> Estos han sido sintetizados mediante la denominada metodología de EDC, empleada por varios autores durante décadas para la síntesis de péptidos y preparación de inmunoconjugados.<sup>156,157</sup> Esta metodología consiste en hacer reaccionar el ácido fenólico con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), un agente acoplante soluble en agua, formando un intermedio denominado O-acilisourea, el cual reacciona con el grupo amino del quitosano dar una unión tipo amida con el compuesto fenólico deseado con altos rendimientos (Esquema 13).

---

<sup>152</sup> Woranuch, S.; Yoksan, R. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *96*, 495–502.

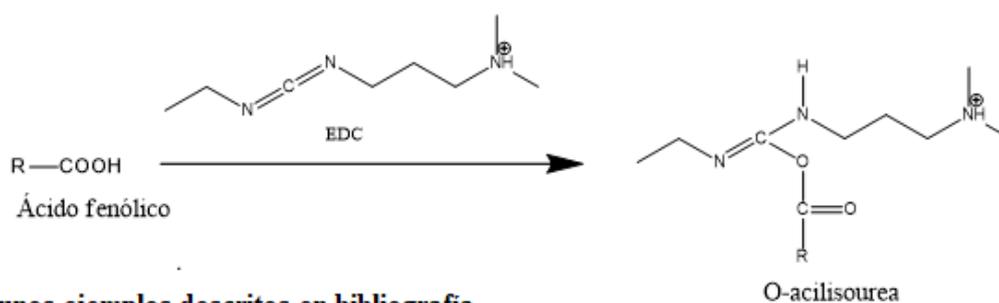
<sup>153</sup> Pasanphan, W., & Chirachanchai, S. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *72*, 169–177.

<sup>154</sup> Wang, X. Y.; Zhang, L., Wei, X. H.; Wang, Q. *Biomaterials*, **2013**, *34*, 1843–1851.

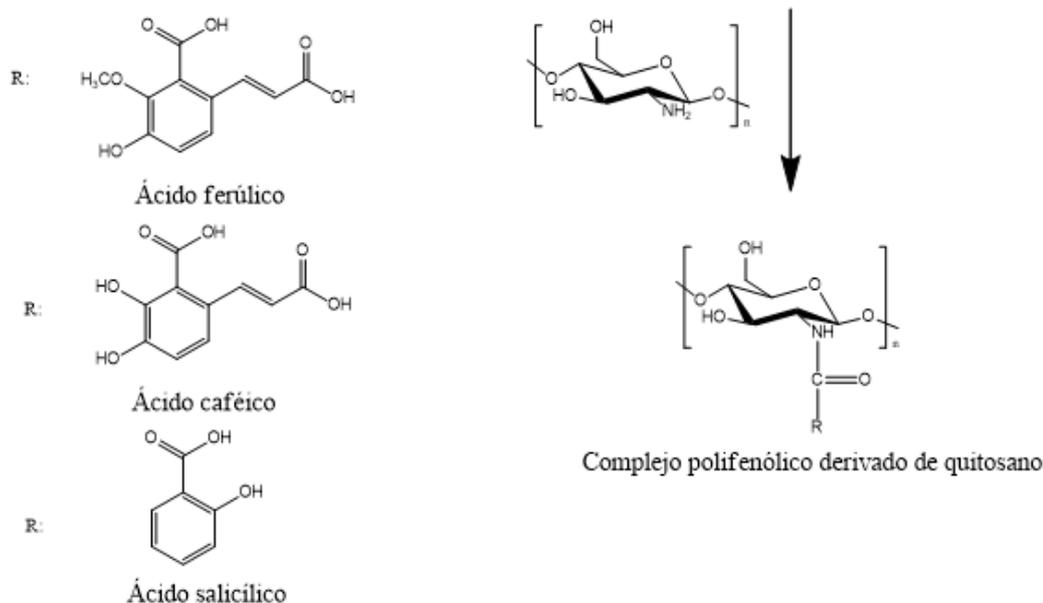
<sup>155</sup> Woranuch, S.; Yoksan, R.; Akashi, M. *Carbohydr. Polym.s* **2015**, *115*, 744–751.

<sup>156</sup> Gao, Y.; Kyratzis, I. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1945–1950.

<sup>157</sup> Franconetti, A.; Jatunov, S.; Borrachero, P.; Gómez-Guillén, M.; Cabrera-Escribano, F. *Org. Biomol.Chem.*, **2013**, *11*, 676–683



**Algunos ejemplos descritos en bibliografía**

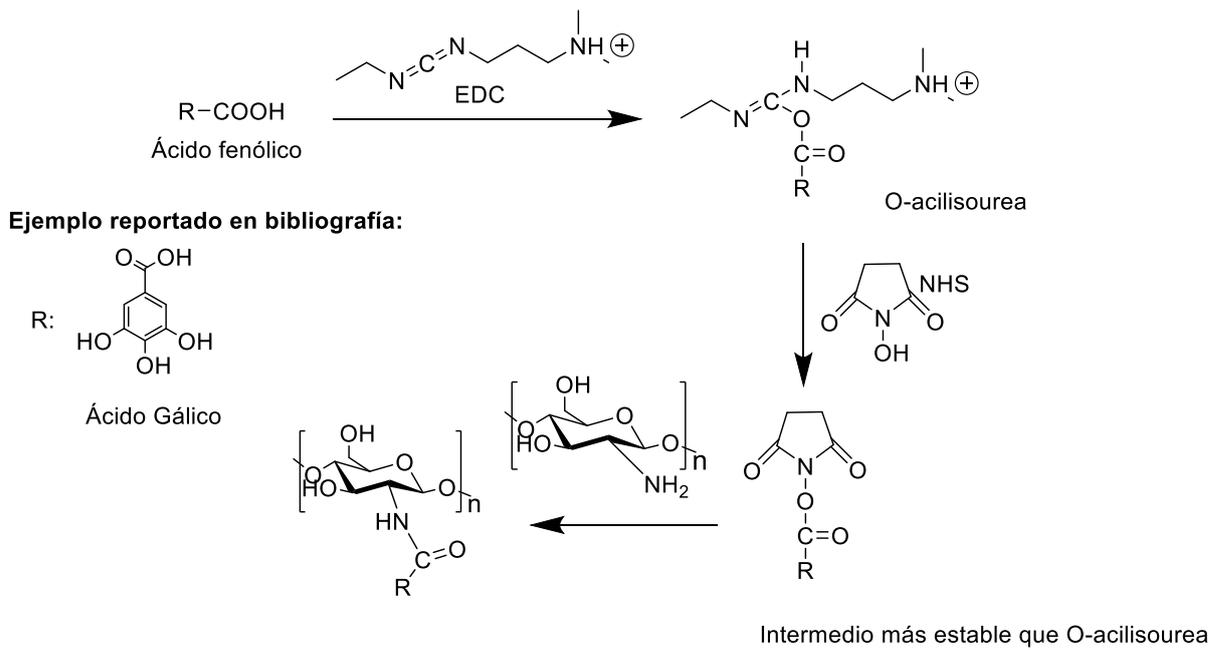


**Esquema 13.** Obtención de complejos polifenólicos derivados de quitosano mediante la metodología EDC

Sin embargo, algunos estudios muestran que el intermedio *O*-acilisourea de la metodología anterior puede sufrir hidrólisis regenerándose el grupo carboxilo.<sup>158</sup> Por ello, distintos autores desarrollaron una variación de esta metodología para obtener complejos de compuestos fenólicos con quitosano que consiste en hacer reaccionar *N*-hidroxisuccinimida (NHS) con EDC con el objetivo de desarrollar un intermedio de tipo éster más estable, que posteriormente reaccionaría con el grupo amino del carbono C2 de la piranosa para formar una amida derivada de quitosano o con el grupo hidroxilo del C6 de la misma para dar lugar a un éster. Así, Schreiber y colaboradores demostraron que era posible obtener un complejo quitosano-ácido gálico con un elevado poder antioxidante y una alta solubilidad en agua (Esquema 14).<sup>159</sup>

<sup>158</sup> Nam, K.; Kimura, T.; Kishida, A. *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 32–37.

<sup>159</sup> Schreiber, S. B.; Bozell, J. J.; Hayes, D. G.; Zivanovic, S. *Food Hydrocolloids*, **2013**, *33*, 207–214.



**Esquema 14.** Obtención de complejos polifenólicos derivados de quitosano mediante la metodología EDC/NHS

## **2. Objetivos específicos**

- 1) Síntesis y caracterización de sales de pirilio polihidroxi y/o polimetoxiladas.
- 2) Síntesis y caracterización de sales de flavilio polihidroxi y/o polimetoxiladas.
- 3) Preparación y caracterización de sistemas policatiónicos derivados de quitosano del tipo piridinio y quinolinio, por reacción del quitosano con las correspondientes sales de pirilio y de flavilio preparadas con anterioridad.
- 4) Evaluación de las propiedades fotofísicas y de las actividades biológicas: antioxidante, antibacteriana y antiproliferativa, de los compuestos previamente preparados.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Síntesis de sales de pirilio y sales de flavilio

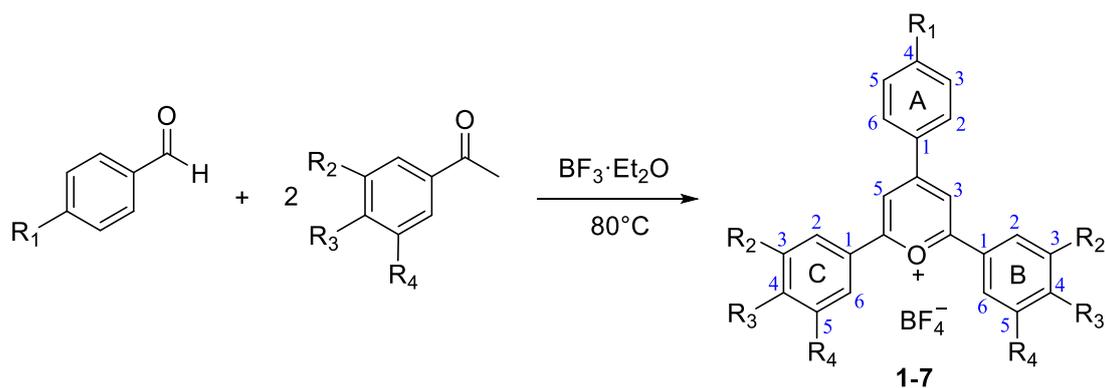
El objetivo de este capítulo en un principio era la obtención de sales de pirilio que contuviesen distinto número de grupos hidroxilo asemejándose de esta forma a los compuestos polifenólicos existentes en la naturaleza. Complejos de tipo pirilio conteniendo sustituyentes con diferente naturaleza electrónica se pueden obtener de manera simple a partir de aldehídos y cetonas aromáticos sustituidos en diversas posiciones mediante la metodología puesta a punto en nuestro grupo de investigación.<sup>93</sup> Para ello, se requiere la presencia de un ácido de Lewis, como puede ser  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  o  $\text{HClO}_4$ , el cual media las etapas de ciclación y deshidratación del compuesto 1,5-dicarbonílico intermedio.

Sin embargo, observamos que en aquellos casos en los que se hacía reaccionar un aldehído aromático con un sustituyente hidroxilo en la posición orto lo que se obtenía era otro tipo de sistema polifenólico distinto a una sal de pirilio, sistema al que se le conoce como sal de flavilio.

Las antocianinas constituyen una clase de metabolitos secundarios bioactivos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Concretamente, pertenecen a la familia de los flavonoides presentan un amplio espectro de propiedades biológicas entre las que se incluyen su actividad antibacteriana, antiinflamatoria o anticancerígena entre otras. Por tanto, dado el interés de este tipo de compuestos sumado al hecho de que se trata de sistemas polifenólicos con aplicación potencial como antioxidantes, decidimos profundizar en su estudio y sintetizar una gama de estos compuestos polifenólicos.

##### 3.1.1. Síntesis de sales de pirilio

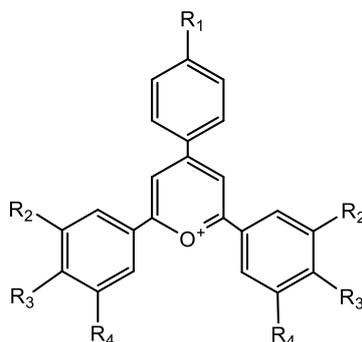
La metodología seguida para la obtención de las sales de pirilio polifenólicas consistió en una reacción *one pot* en la que se hace reaccionar un equivalente de un benzaldehído monosustituido en la posición *para*, con al menos dos equivalentes de una acetofenona mono o polisustituida en las posiciones *orto*, *meta* y/o *para*, en atmósfera inerte de Ar la mezcla  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ .



**Esquema 15.** Síntesis de sales de pirilio simétricas (1-7)

Estas sales de pirilio se obtuvieron con que van de un 3 a un 31 %, siendo bastante superiores para el caso de aquellas sales de pirilio únicamente sustituidas en las posiciones *para* de cada anillo (**1** y **6**, 31 y 25 % respectivamente) (Tabla 1). Los relativamente bajos rendimientos obtenidos se explican debido a que es una reacción en un solo paso que involucraría un total de al menos tres reacciones distintas hasta llegar al compuesto (Esquema 15). Para el caso concreto de los compuestos polisustituídos en los anillos laterales, la presencia de tantos sustituyentes podría ocasionar un alto impedimento estérico que derivase finalmente en una reducción significativa de los rendimientos.

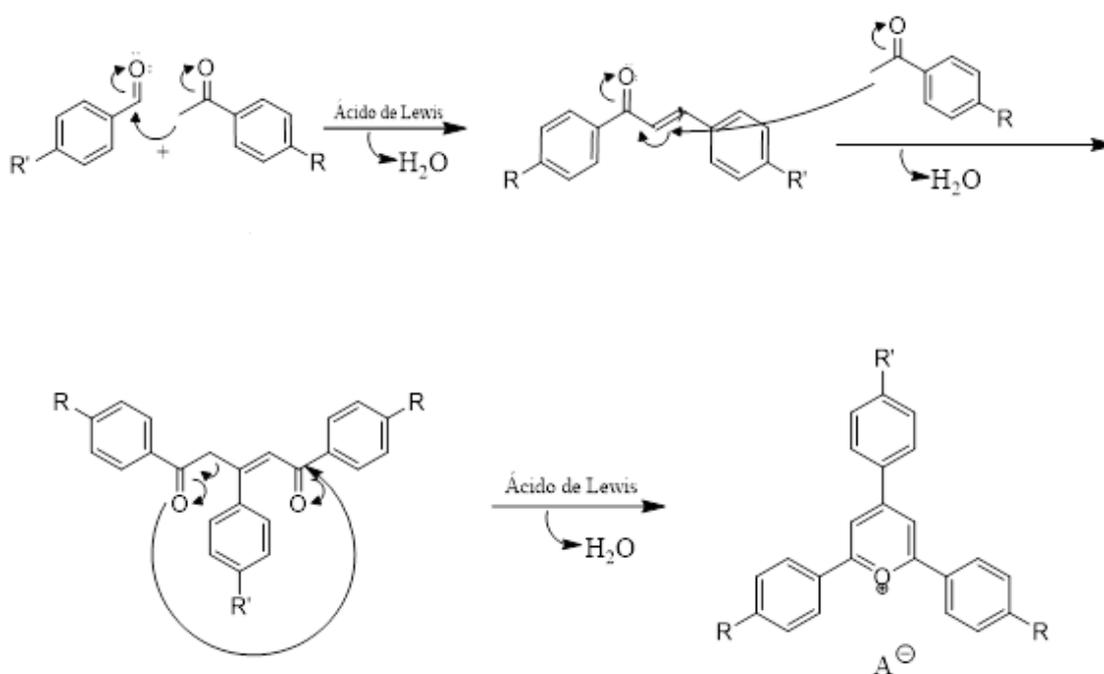
**Tabla 1.** Sales de pirilio sintetizadas con sustituyentes de diferente naturaleza



Sal de pirilio	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Rendimiento (%)
<b>1</b>	OMe	H	OH	H	31
<b>2</b>	OMe	OMe	OMe	H	10
<b>3</b>	OMe	OMe	OMe	OMe	8
<b>4</b>	OH	OMe	OMe	H	7

<b>5</b>	OH	OMe	OMe	OMe	3
<b>6</b>	OH	H	F	H	25
<b>7</b>	F	OMe	OMe	H	10

El mecanismo por el que transcurre esta reacción podría explicarse mediante el Esquema 16. En la primera etapa tiene lugar una condensación de Claisen-Schmidt a la que le sigue una deshidratación, formándose un compuesto carbonílico  $\alpha, \beta$ -insaturado denominado chalcona, otro metabolito perteneciente a la familia de los flavonoides. A este último, mediante una adición de Michael, se le adiciona otra molécula de acetofenona, razón por la que se pone en exceso este último reactivo, que en presencia de un ácido de Lewis evoluciona a su forma enólica y puede actuar como nucleófilo, originando de esta forma un compuesto 1,5-dicarbonílico. Finalmente, se alcanza la formación de la sal de pirilio tras una tautomería ceto-enólica, un ataque intramolecular y la eliminación de una molécula de agua.



**Esquema 26.** Propuesta de mecanismo de formación sales de pirilio

La caracterización de estos compuestos se llevó a cabo mediante  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN y HRMS. Las sales de pirilio simétricas obtenidas **1-7** muestran en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{DMSO-}d_6$  un singulete en el rango de 9.30-8.93 ppm para los dos protones equivalentes H-3 y H-5 del anillo de pirilio. Para los derivados simétricamente sustituidos únicamente en las posiciones *para* de los tres anillos

aromáticos (**1** y **6**) se observan dos dobletes diferentes en el rango de 8.80-8.24 ppm, siendo el más desapantallado el correspondiente a los dos protones en *orto* del anillo de fenilo A, mientras que el segundo doblete, que integra para cuatro protones, se asigna a los protones *orto* de los anillos de fenilo en las posiciones 2 y 6 (anillos B y C, respectivamente). En el caso de aquellos polisustituidos en los anillos B y C (resto de compuestos), se observan singuletes o dobletes dependiendo del número de sustituyentes que tenga el resto aromático. Otra situación diferente aparece cuando se tiene un átomo de flúor presente en la molécula (**6** y **7**), ya que en estos casos se pueden observar dobles dobletes debido al acoplamiento con el átomo de flúor.

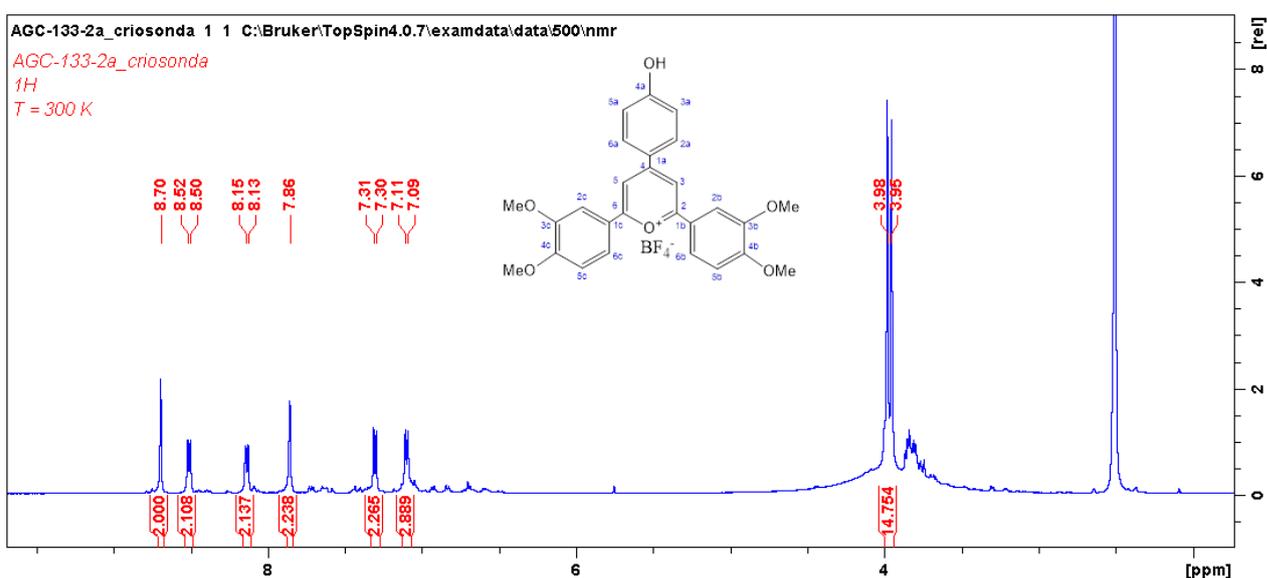


Figura 15.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) de la sal de pirilio **4**

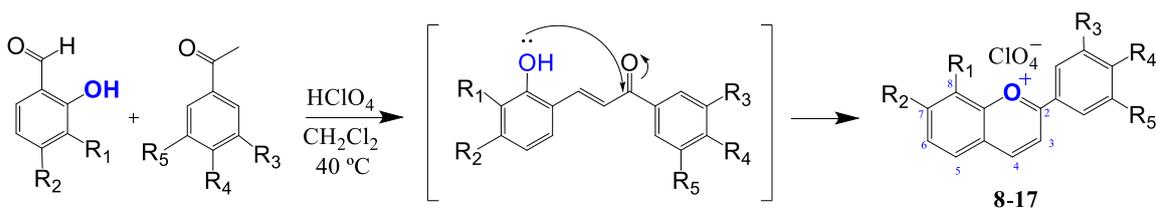
Los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN confirman también la presencia de las sales de pirilio simétricas. Así, en los espectros de las mismas se observan señales en el rango 172.7-167.9 ppm para los carbonos C-2 y C-6, mientras que C-4 aparece en el rango 167.1-164.7 ppm. Por último, los carbonos C-3 y C-5 generan una única señal entre 117.7 y 113.0 ppm.

### 3.1.2. Síntesis de sales de flavilio

Inicialmente la metodología empleada para la obtención de las 3-desoxiantocianinas era equivalente a la empleada para la obtención de las sales de pirilio, ya que como se comentó anteriormente (apartado **3.1.**), la preparación de estos compuestos surgió de manera espontánea en la síntesis de las sales de pirilio

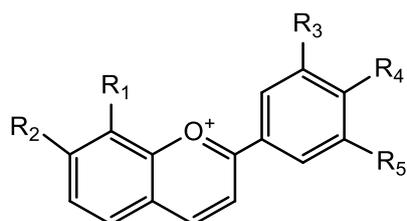
polifenólicas. Posteriormente, estas condiciones se modificaron con objeto de optimizar el proceso de obtención de sales de flavilio, ya que por ejemplo se entendía que no era necesaria la presencia de dos equivalentes de acetofenona en este caso la reacción se llevó a cabo utilizando 1 equivalente de acetofenona por cada equivalente de benzaldehído. Además, la obtención de mejores rendimientos con el  $\text{HClO}_4$  nos llevó a emplear este ácido de Lewis en lugar del  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , usado en el caso de las sales de pirilio.

Por tanto, el procedimiento para la obtención de las sales de flavilio consistió en una reacción *one pot* en la que se hacía reaccionar un equivalente de un benzaldehído polisustituido con al menos un grupo hidroxilo en la posición *orto*, con un equivalente de una acetofenona mono o polisustituida en las posiciones *orto*, *meta* y/o *para*. Seguidamente, se le adicionaba el ácido de Lewis correspondiente, en este caso  $\text{HClO}_4$ , para la obtención final del compuesto (Esquema 17). La primera etapa del proceso de síntesis es equivalente a lo que ocurre en la formación de una sal de pirilio, es decir, tiene lugar una condensación de Claisen-Schmidt a la que le sigue una deshidratación, formándose una chalcona. Sin embargo, a partir de aquí el grupo hidroxilo situado en la posición *orto* del benzaldehído inicial puede reaccionar intramolecularmente dando una adición 1,2 al carbono carbonílico de la chalcona, que origina la correspondiente sal de flavilio.



**Esquema 17.** Formación de sales de flavilio (**8-17**) a partir de un *o*-hidroxibenzaldehído y acetofenas sustituidas

Los rendimientos que se obtuvieron para este tipo de compuestos varían de un desde el 18 al 88 %. Siendo estos rendimientos elevados para aquellas sales de flavilio que presentaban únicamente un sustituyente, concretamente en la posición 4, o ningún sustituyente (**8-13** y **16**) y, por el contrario, menor del 23 % para aquellas otras que tenían más de un sustituyente en ese anillo, que podían ser grupos hidroxilo o metoxilo (**14**, **15** y **17**).

**Tabla 2.** Sales de flavilio sintetizadas con sustituyentes de diferente naturaleza

Sales de flavilio	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	Rendimiento (%)
<b>8</b>	OH	OH	H	CH <sub>3</sub>	H	87
<b>9</b>	OH	OH	H	F	H	85
<b>10</b>	OH	OH	H	Br	H	46
<b>11</b>	OH	OH	H	H	H	57
<b>12</b>	OH	OH	H	Ph	H	48
<b>13</b>	OH	OH	H	OH	H	65
<b>14</b>	OH	OH	OMe	OMe	H	23
<b>15</b>	OH	OH	OMe	OMe	OMe	21
<b>16</b>	OH	H	H	OH	H	88
<b>17</b>	OH	OH	OH	H	OH	18

La caracterización de estos compuestos se llevó a cabo mediante <sup>1</sup>H RMN, <sup>13</sup>C RMN y HRMS.

Desde un punto de vista estructural, la principal característica observable en sus espectros de <sup>1</sup>H RMN es la presencia de un doblete muy desapantallado entre 9.60-9.10 ppm, correspondiente al protón de la posición H-4 del anillo de benzopirilio. En el caso de aquellas sales de flavilio que presentan grupos hidroxilo en las posiciones 7 y 8 (**8-15** y **17**), se observan además 3 dobletes que se asignan a los 3 protones de los anillos de benzopirilio H-3, H-5 y H-6. Por otra parte, la sal de flavilio **16**, aparece un triplete adicional correspondiente al protón H-7 a 7.72 ppm. Sólo en el caso de aquellas sales de flavilio que presentan grupos metilo (**8**) o grupos metoxilo (**14** y **15**) se observan singuletes en la zona alifática correspondientes a la presencia de estos grupos en torno a 2.21 ppm para el metilo y entre 4.07-4.01 ppm para los metoxilos. Además, en el compuesto (**9**) que presenta un átomo de flúor en la posición 4 del anillo de fenilo, se pueden observar un doblete ( $J = 5.4$  Hz y  $J = 9.8$  Hz) para los hidrógenos H-2b/H6b y un triplete ( $J = 9.8$  Hz) para los hidrógenos H-3b/H-5b como consecuencia del acoplamiento con el átomo de flúor.

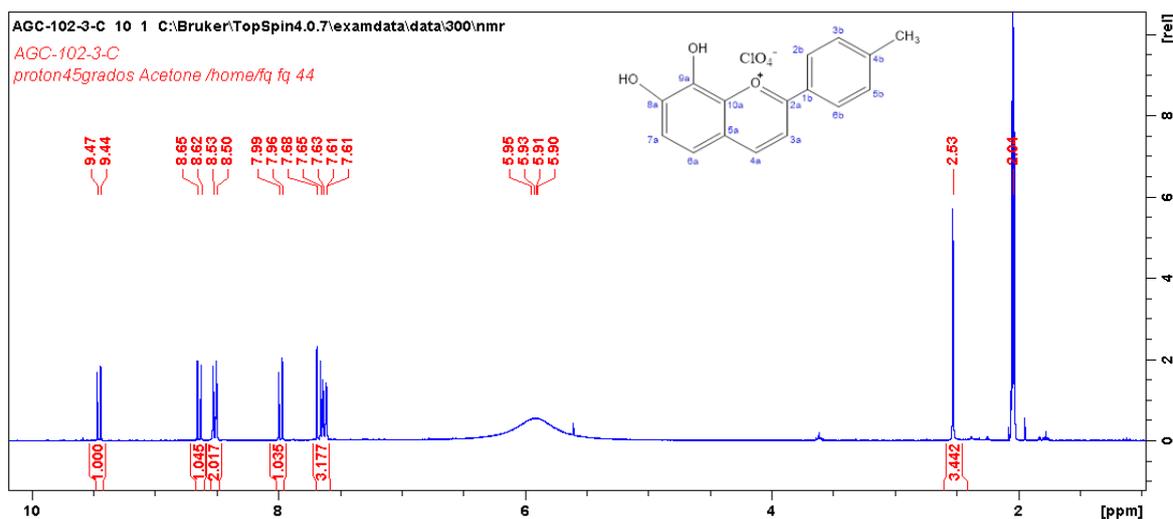


Figura 16. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>) del perclorato de flavilio **8**

Por otra parte, el <sup>13</sup>C RMN permite confirmar también la estructura de sales de flavilio. Así, podemos observar una señal característica de las mismas alrededor de 172 ppm, perteneciente al C-2 del anillo de benzopirilio. El resto de señales de carbono aparecen nuevamente en la zona aromática para todas las sales de flavilio, excepto para aquellas que tienen grupos metilo y metoxilo (**8**, **14** y **15**). Además, estas señales se van despantallando más o menos en función del grupo al que estén unido, como ocurre con el flúor, el hidroxilo y el metoxilo. En el compuesto **9** que presenta un átomo de flúor en la posición 4 del anillo de fenilo, se pueden observar el desdoblamiento a dobletes de los carbonos C-4b, C-3b/C-5b y C2b/C6b con valores de  $J_1 = 257$  Hz,  $J_2 = 22.9$  Hz y  $J_3 = 9.8$  Hz, respectivamente, debidos al acoplamiento carbono-flúor.

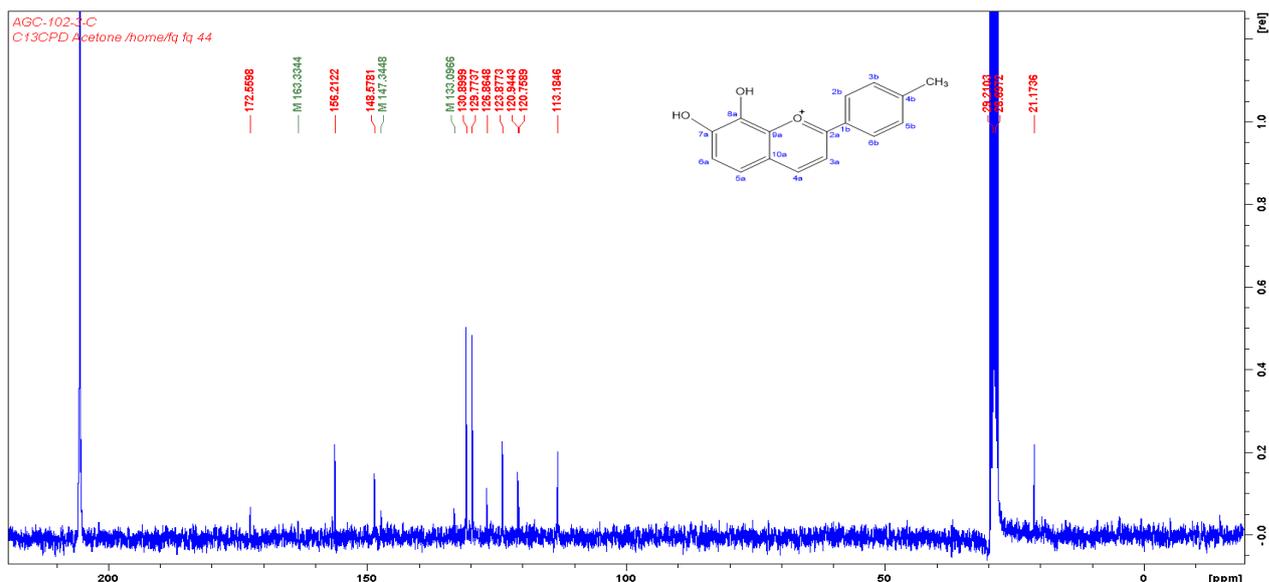


Figura 17.  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del perchlorato de flavilio **8**

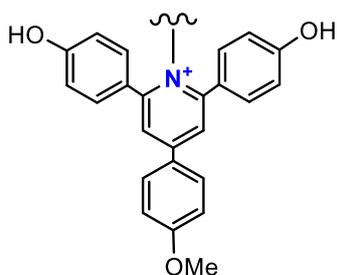
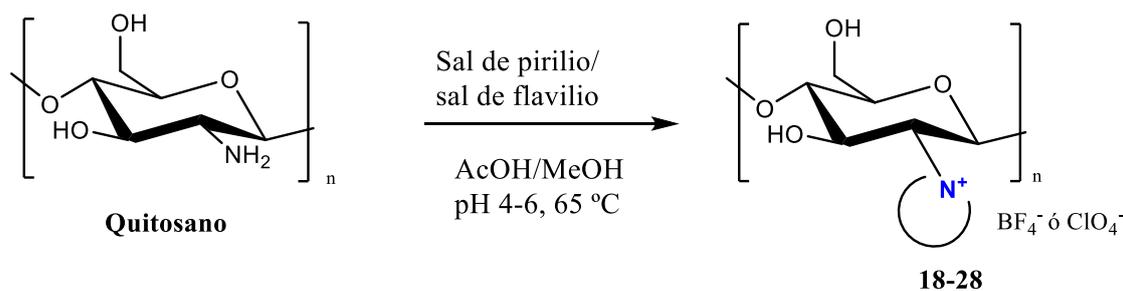
### 3.2. Síntesis de sistemas policationicos derivados de quitosano: sales de piridinio y sales de quinolinio

La síntesis de los complejos derivados de quitosano (Esquema 18) se ha realizado a partir de las sales de pirilio obtenidas en el apartado 3.1.1 y las sales de flavilio obtenidas en el apartado 3.1.2. Se ha utilizado quitosano de bajo peso molecular ( $M_w = 87875$  g/mol) con un grado de desacetilación del 84 %. La metodología seguida está diseñada para obtener un leve grado de sustitución en el esqueleto del biopolímero con el objetivo de preservar las propiedades fisicoquímicas del mismo. De esta manera, este grado de *N*-sustitución o grado de incorporación al biopolímero (DS), que representa una medida del número de unidades que se han incorporado al polímero, en ningún caso superó el 14 %.

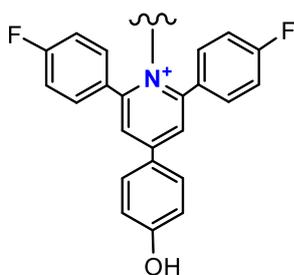
El mecanismo por el que presumiblemente transcurren estas reacciones conlleva el ataque nucleófilo del grupo amino del quitosano sobre la posición C-2 ó C-6 para el caso de las sales de pirilio y C-2 para en el caso de las sales de flavilio y posterior ciclación aprovechando el medio ácido y generando la sal de piridinio (en el caso de que reaccione con una sal de pirilio) o de quinolinio (si reacciona con una sal de flavilio) correspondiente. La formación de este tipo de compuestos se puede evidenciar con facilidad debido a su emisión UV tras unos días de reacción.

El manejo de reacciones con un biopolímero y en concreto con el quitosano requiere de unas condiciones especiales de reacción debido a la baja solubilidad que

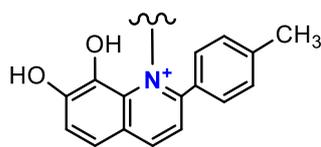
presenta, a pesar de ser bastante más soluble que la quitina. Por tanto, para llevar a cabo estas reacciones se requiere la solubilización previa en medio ácido de este biopolímero a un pH de 4.0-4.6. Una vez solubilizado el mismo, con ayuda de una base, en este caso NaOH, se aumenta el pH hasta un rango de entre 6.2-6.3 aproximadamente. El objetivo de esta metodología es en primer lugar solubilizar el polímero y en segundo lugar aumentar el pH a un límite que no provoque la precipitación del quitosano y a la vez aumente al máximo la nucleofilia del grupo amino del quitosano. Este estudio, de la dependencia del pH con la incorporación de la unidad al biopolímero se ha realizado previamente en el grupo de investigación.<sup>63</sup>



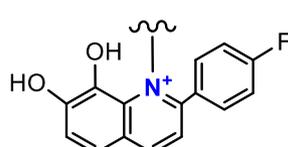
**18** (86 %, DS: 0.5 %)



**19** (78 %, DS: 0.3 %)



**20** (97 %, DS: 14 %)



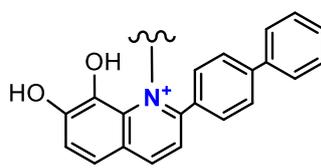
**21** (95 %, DS: 2 %)



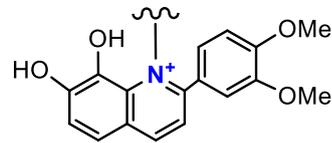
**22** (91 %, DS: 3 %)



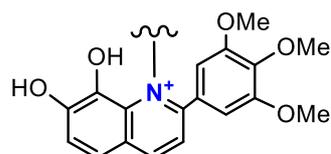
**23** (99 %, DS: 4 %)



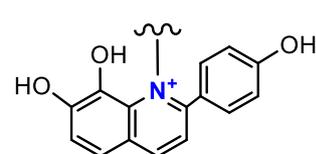
**24** (77 %, DS: 2.3 %)



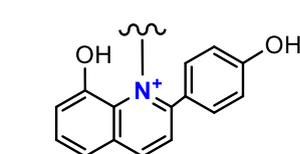
**25** (91 %, DS: 0.3 %)



**26** (83 %, DS: 1.3 %)



**27** (92 %, DS: 3.2 %)



**28** (92 %, DS: 2 %)

**Esquema 18.** Reacción de formación de piridinius/quinolinius derivados de quitosano

La caracterización de los sistemas quitosano-piridinio y quitosano-quinolinio se realizó de igual manera empleando  $^1\text{H}$  RMN con filtro de difusión,  $^{13}\text{C}$  CPMAS RMN en estado sólido y FT-IR.

De manera convencional, muchos autores llevan a cabo la caracterización de los compuestos derivados de quitosano mediante un análisis de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) en comparación con el quitosano no sustituido. Sin

embargo, para los derivados obtenidos en este capítulo el espectro de FT-IR no muestra cambios apreciables en comparación con el quitosano comercial, excepto un cambio ligero para las bandas correspondientes a los enlaces C=C de los anillos aromáticos.

Por otra parte, el análisis mediante  $^1\text{H}$  RMN con filtro de difusión se ha convertido en una herramienta rutinaria en el grupo de investigación para corroborar la presencia de cualquier incorporación con formación de un enlace covalente que se produzca al biopolímero. Esta novedosa técnica analítica se basa en aprovechar la diferencia de velocidad de difusión que presentan las moléculas pequeñas con respecto a las macromoléculas. Las moléculas pequeñas, es decir, de bajo peso molecular, presentan una velocidad de difusión mucho mayor que las moléculas de gran tamaño y masa molecular. Sin embargo, cuando una molécula pequeña se une a una macromolécula adopta las propiedades de la misma entre las que se encuentra su velocidad de difusión. Por tanto, de esta manera se corrobora de forma fácil y simple la incorporación de la unidad de interés al quitosano mediante una unión covalente.

El espectro de  $^1\text{H}$  RMN con filtro de difusión muestra las señales características del quitosano: los protones del grupo *N*-acetilo aparecen en torno a 2.0 ppm. Las señales de entre 3.0-5.0 ppm se asignan a protones del esqueleto del azúcar. En concreto, la señal a 3.2 ppm corresponde a H-2, las señales situadas entre 3.6-4.0 ppm aparecen por la resonancia de los protones H-3, H-4, H-5, H-6 y H-6'. Finalmente, los picos característicos que aparecen a 4.93 y 4.63 ppm corresponden a H-1GluN y H-1GluNAc. Se debe resaltar que no se aprecia ningún cambio significativo en el desplazamiento químico de las regiones asignadas al esqueleto polimérico en ninguno de los derivados sintetizados. El interés del espectro se centra principalmente en que una vez que ocurre la reacción entre el quitosano y las correspondientes sales de piriliosales de flavilio se observan nuevos picos en la región aromática correspondientes a las unidades de piridinio/quinolinio incorporadas. La tendencia general para los compuestos obtenidos es un ensanchamiento de las señales de esta región, hecho que es indicativo de poseer un tiempo de correlación similar al polímero en el cual se ha incorporado. Para el caso del derivado de quinolinio **20**, que presenta un grupo metilo en su molécula, se puede apreciar además la presencia de este grupo metilo a 2.08 ppm muy próximo al grupo *N*-acetilo del quitosano. Sin embargo, en el caso de aquellos compuestos que tienen grupos metoxilo en su molécula (**18**, **25** y **26**)

no se pueden observar las señales correspondientes a este grupo ya que queda solapada por las señales de los protones del esqueleto (H-3 a H-6) de quitosano.

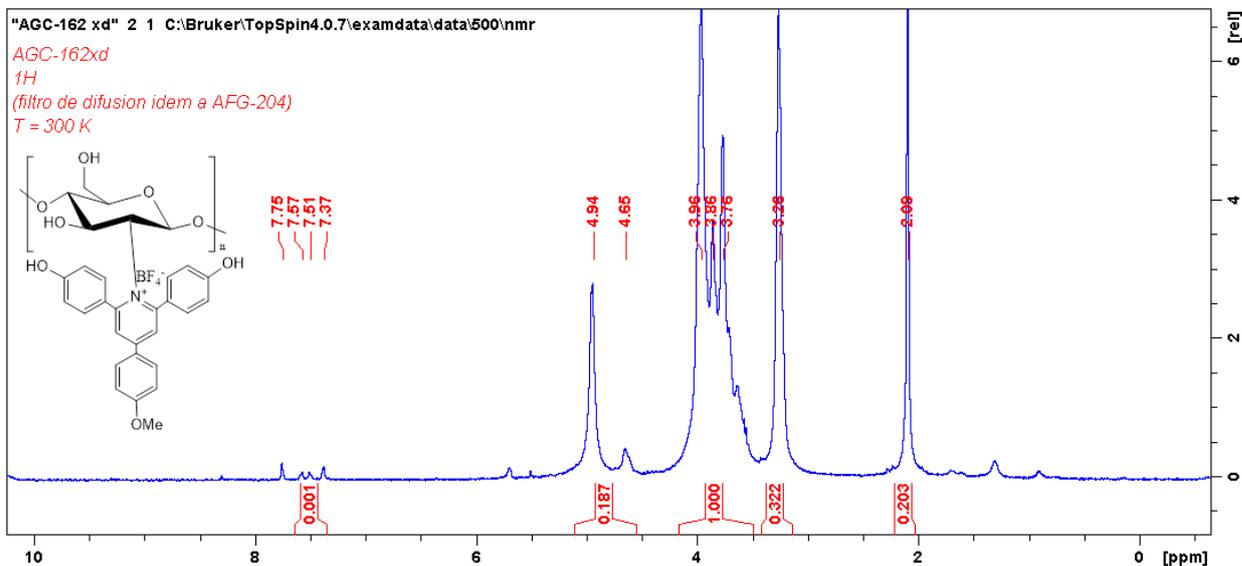


Figura 18.  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, AcOD:D<sub>2</sub>O) con filtro de difusión del complejo piridinio-quitosano 18

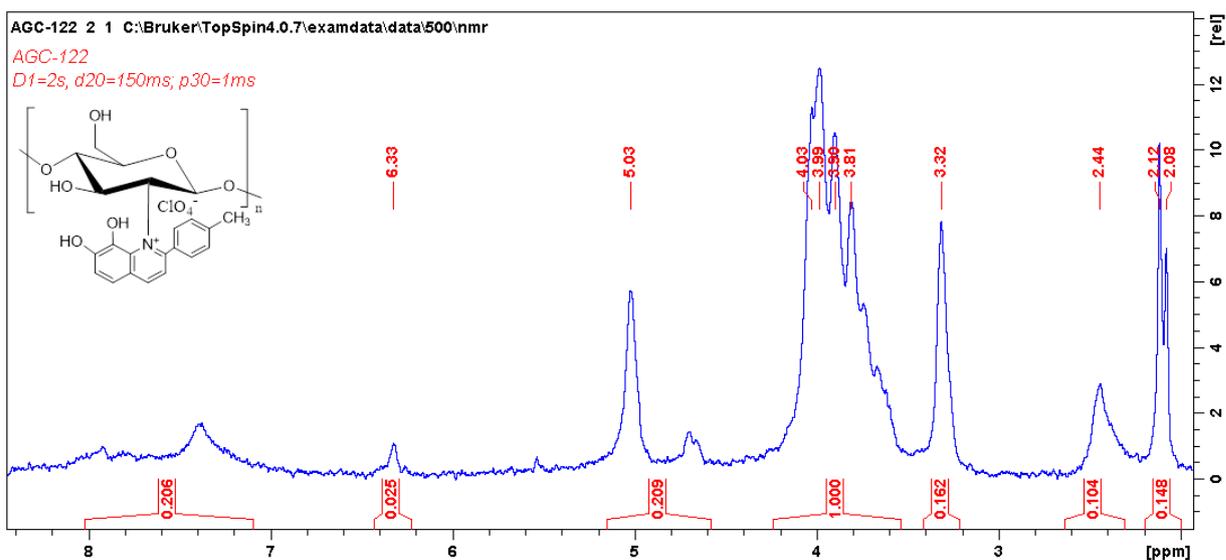


Figura 19.  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, AcOD:D<sub>2</sub>O) con filtro de difusión del complejo quinolinio- quitosano 20

Al igual que ocurre en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN en disolución, en el espectro  $^{13}\text{C}$  CPMAS RMN en estado sólido, para todos los piridinius y quinolinios derivados de quitosano se observan las señales características de carbono del esqueleto de quitosano sin alterar: 23 ppm (NCOCH<sub>3</sub>), 58 ppm (C2), 61 ppm (C6), 76 ppm (C5, C3), 85 ppm (C4), 106 ppm (C1) y 174 ppm (C=O). Así como la presencia de nuevos picos en el

rango de 150-120 ppm correspondientes a los carbonos aromáticos de estos nuevos derivados cuaternizados de quitosano.

Como se puede observar en el Esquema 18, las incorporaciones para los derivados de quinolinio sintetizados son generalmente mayores que para los derivados de piridinio bajo las mismas condiciones. Esto podría explicarse por la mayor dificultad que pueda tener el grupo amino del quitosano para acceder a las posiciones 2 y 6 de las sales de pirilio por el mayor impedimento estérico de los anillos de fenilo que las rodean. De igual forma, se puede apreciar que dentro de las sales de quinolinio, aquellos compuestos con sustituyentes más voluminosos (**22**, **24**, **25** y **26**) presentan menor incorporación de unidad activa que sus homólogos de sustituyentes más livianos (**20**, **21**, **27** y **28**). Este hecho probablemente se pueda atribuir nuevamente al impedimento estérico que ocasiona la presencia de esos grupos voluminosos.

### 3.3. Propiedades fotofísicas

Las sales de pirilio y las sales de flavilio sintetizadas son compuestos altamente coloreados en estado sólido y en disolución, motivo por el cual se ha llevado a cabo el estudio de las propiedades tanto de absorción UV-visible como la de emisión por fluorescencia.

Comenzando por los espectros de absorción, todas las sales de pirilio muestran dos bandas de absorción: una primera banda en la región del UV-visible que abarca desde los 518 a los 420 nm y una segunda banda en la región del UV desde los 380 a los 312 nm (Tabla 3). Trabajos previos realizados por Suresh y col. basados en estudios teóricos han designado estas bandas de absorción en sales de pirilio con la notación “x” e “y”.<sup>160</sup> Esto es debido a que las bandas de UV-vis para dichos compuestos se separan como si de dos cromóforos se tratara. El primero de ellos se correspondería con la banda “x”, que representa los valores más altos de  $\lambda_{\text{abs}}$  y se atribuye a la unidad de 2,6-diarilpirilio, mientras que la banda “y” se corresponde con la unidad 4-arilpirilio y muestra los valores más bajos de  $\lambda_{\text{abs}}$ .

---

<sup>160</sup> Manoj, N.; Ajayakumar, G.; Gopidas, K. R.; Suresh, C. H. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 11338–11345.

La absorbancia y el color que toman los compuestos se debe principalmente a la zona del visible en la que absorben los grupos cromóforos y, pequeños sustituyentes en la molécula pueden desplazar la  $\lambda_{\text{abs}}$  del compuesto. Observando la tabla parece que el sustituyente que más afecta al desplazamiento de  $\lambda_{\text{abs}}$  es el grupo 4 presente en el anillo de benceno A. Cuando las sales de pirilio presentan en dicha posición un grupo hidroxilo, se obtienen valores de  $\lambda_{\text{abs}}$  más altos como se observa para los compuestos **4**, **5** y **6**. Sin embargo, la presencia de un grupo metoxilo o de un átomo de flúor hace bajar la  $\lambda_{\text{abs}}$  como se puede apreciar para los compuestos **1**, **2**, **3** y **7**.

**Tabla 3.** Datos de UV y fluorescencia para las sales de pirilio sintetizadas

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	$\lambda_{\text{absmax}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ems}}(\text{nm})$	IR <sub>ems</sub> <sup>a</sup>
<b>1</b>	OMe	H	OH	H	420, 312	411	594
<b>2</b>	OMe	OMe	OMe	H	433, 320	413	552
<b>3</b>	OMe	OMe	OMe	OMe	436, 317	415	608
<b>4</b>	OH	OMe	OMe	H	518, 380	414	800
<b>5</b>	OH	OMe	OMe	OMe	519, 378	411	850
<b>6</b>	OH	H	F	H	478, 342	412	800
<b>7</b>	F	OMe	OMe	H	467, 340	412	841

<sup>a</sup> Intensidad relativa de emisión; <sup>b</sup> Los espectros de absorción y emisión se han realizado en DMSO

Por otra parte, para las sales de flavilio el caso es ligeramente distinto. Nuevamente, los espectros de absorción de estos compuestos al igual que los anteriores se caracterizan por presentar dos bandas de absorción: la primera en la región del UV visible que abarca de 470-418 nm y la segunda en la región del UV de 285 a 270 nm. Ocurre como en el caso de las sales de pirilio, es decir, las bandas se separan como si de dos cromóforos distintos se tratara. Delgado-Vargas y colaboradores atribuyeron la banda que presentaba valores de  $\lambda_{\text{abs}}$  más altos al anillo de benceno B de la sal de flavilio, mientras que los valores más bajos los atribuía al anillo condensado de cromilio.<sup>161</sup>

**Tabla 4.** Datos de UV y fluorescencia para las sales de flavilio sintetizadas

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	$\lambda_{\text{absmax}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ems}}(\text{nm})$	IR <sub>ems</sub> <sup>a</sup>
<b>8</b>	OH	OH	H	CH <sub>3</sub>	H	430, 270	411	290

<sup>161</sup> Delgado-Vargas, F.; Jiménez-Aparicio, A.; Paredes-Lopez, O. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**, *40*, 173-289.

<b>9</b>	OH	OH	H	F	H	420, 262	416	154
<b>10</b>	OH	OH	H	Br	H	418, 260	414	141
<b>11</b>	OH	OH	H	H	H	429, 277	413	321
<b>12</b>	OH	OH	H	Ph	H	430, 271	414	391
<b>13</b>	OH	OH	H	OH	H	460, 281	412	380
<b>14</b>	OH	OH	OMe	OMe	OMe	470, 285	413	477
<b>15</b>	OH	OH	OMe	OMe	H	466, 282	415	444
<b>16</b>	OH	H	H	OH	H	450, 277	413	300

<sup>a</sup> Intensidad relativa de emisión; <sup>b</sup> Los espectros de absorción y emisión se han realizado en DMSO

Otro hecho que se observó mientras se realizaban los espectros de UV de estos compuestos fue el decrecimiento de las bandas de absorción y aparición de nuevas bandas a otras longitudes de onda con disoluciones de compuestos tras 24 horas de haber sido preparadas. Por tanto, sospechando de una posible degradación de los compuestos en disolución, se le realizó el <sup>1</sup>H RMN a algunas de las antocianinas con las que se trabajaba a dos tiempos distintos: a los 5 minutos de disolver la muestra en el disolvente deuterado y tres horas más tarde de haber sido disueltos. La prueba realizada mostró efectivamente una transformación de los compuestos disueltos a otros distintos en las 3 horas posteriores de haber sido disuelto, a modo de ejemplo podemos ver en la Figura 20 como el compuesto **11** pasa de un protón completamente puro al decrecimiento de las señales propias del compuesto y aparición de nuevas señales a otros desplazamientos químicos como un singulete a 9 ppm, lo que evidencia una clara degradación del compuesto.

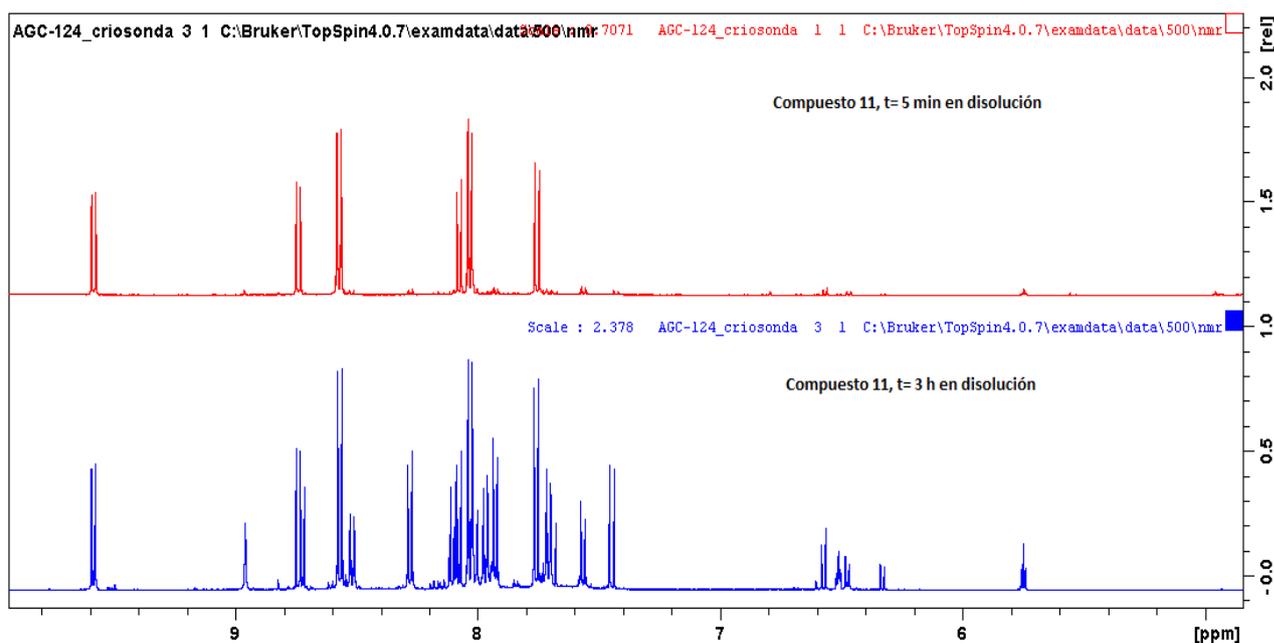
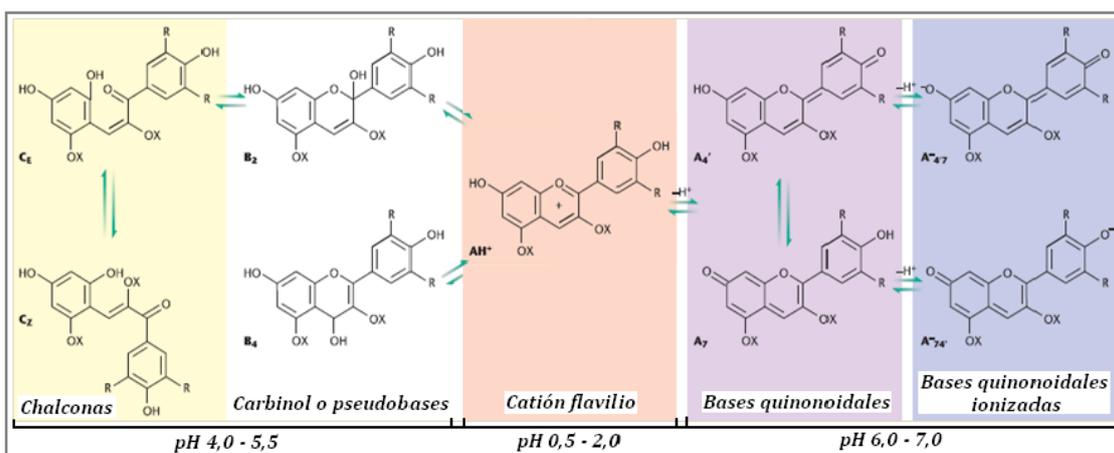


Figura 20. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Acetona) del compuesto **11** a los 5 minutos de ser disuelto y a las 3 horas

Este hecho puede explicarse por el pH del medio (Figura 21). En medios muy ácidos (pH entre 0.5 y 2 aproximadamente), las antocianinas existen predominantemente en la forma de catión flavilio de color rojo. A medida que el pH se eleva, el catión flavilio se hidrata en posición C2, dando lugar al carbinol o pseudobase producida por la eliminación del grupo alcohol (incoloro), el cual alcanza lentamente el equilibrio con la chalcona de color amarillo. Un aumento súbito del pH a 6 o 7 produce la pérdida de un protón generándose las formas de base quinonoidal azules o violetas. <sup>162</sup> Las cantidades de cada forma de equilibrio varían en función del pH y la estructura de la molécula. A pH entre 4 y 5.5 la intensidad del color es más baja debido a la predominancia de las especies incoloras. La base quinonoidal es la única especie coloreada existente a pH superiores a 5, sin embargo, se degrada fácilmente y existe en un porcentaje mínimo. Por tanto, se puede concluir que la pérdida del color de las antocianinas es dependiente del pH debido a la coexistencia de las cuatro formas en equilibrio, de las cuales, el catión flavilio es el más estable y coloreado en medios ácidos.



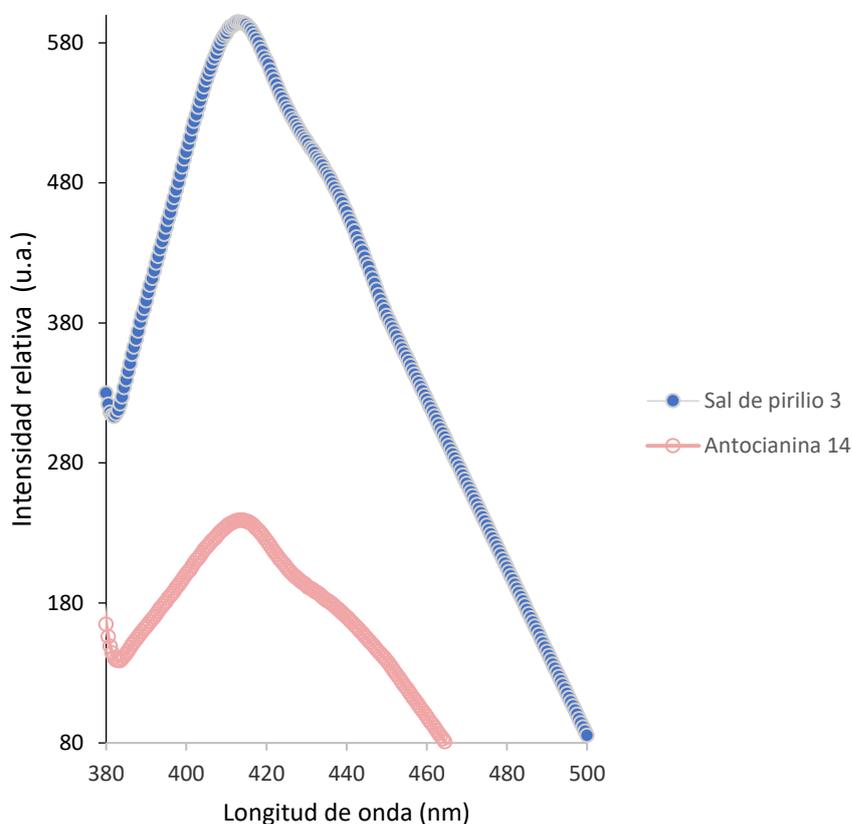
**Figura 21.** <sup>1</sup>H Transformación estructural de las antocianinas en función del pH.<sup>163</sup>

Por otra parte, la fluorescencia suele deberse a la amplia conjugación que presentan los compuestos y al número de anillos aromáticos que tienen en su molécula, aumentando la intensidad de emisión con ambas características. Por ello, todos los

<sup>162</sup> Cavalcanti, R.N.; Santos, D.T.; Meireles, M.A.A. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 499–509.

<sup>163</sup> Andersen, O.M.; Jordheim, M. Anthocyanins. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: Wiley, **2010**

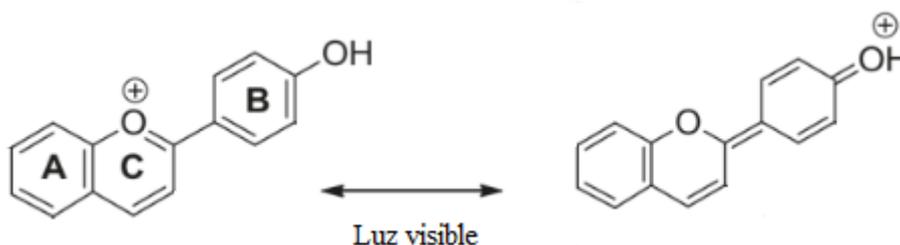
complejos sintetizados poseen una fluorescencia intrínseca gracias a la conjugación  $\pi$  extendida. La longitud de onda a que aparece la banda de emisión para todos los compuestos, tanto sales de pirilio como sales de flavilio, es muy parecida y abarca desde 416 a 411 nm. Sin embargo, la fluorescencia intrínseca de cada tipo de compuesto es bien distinta. Mientras que por un lado las sales de pirilio son compuestos muy fluorescentes alcanzando una intensidad relativa de 850 para el mejor de los casos (compuesto **5**), las antocianinas son intrínsecamente en comparación con los anteriores poco fluorescentes con un valor máximo de intensidad relativa de 477 para la antocianina **14**. Un ejemplo de esto puede ser observado en la Figura 22, donde se compara la fluorescencia intrínseca para la sal de pirilio **3** y para la antocianina **14**, siendo más del doble para la sal de pirilio.



**Figura 22.** Comparativa de espectros de fluorescencia de compuesto **3** y **14**

Como se ha comprobado, aunque la principal función de las antocianinas fotodinámicamente hablando es la de absorber luz visible y expresar color, éstas son pobres en fluorescencia. De hecho, lo que ocurre con las antocianinas después de la

absorción, es decir, una vez en el estado excitado, es una incógnita que solo podrá ser resuelta empleando técnicas rápidas sofisticadas, como la espectroscopía resuelta en el tiempo y la espectroscopía de absorción o emisión transitoria. En la transición del orbital HOMO al orbital LUMO que acompaña a la absorción de la luz visible por el catión flavilio, ocurre una transferencia electrónica del anillo de benceno B al anillo de cromilio (Esquema 19).<sup>164</sup> En el estado excitado, el catión flavilio es un ácido fuerte ( $pK_a < 0$ ) y transfiere un protón al disolvente en la escala de picosegundos.<sup>165,166</sup> En el siguiente paso, la base quinonoidal es desactivada por combinación de procesos de radiación (fluorescencia) y no radiación (calor) y posteriormente captura un protón en el estado fundamental para dar lugar de nuevo al ión flavilio. En otras palabras, la base quinonoidal es la responsable de la relativamente débil fluorescencia observada para las antocianinas incluso estando en una disolución fuertemente acidificada.



Esquema 19. Transferencia electrónica en la transición HOMO-LUMO dando lugar a base quinonoidal.<sup>167</sup>

### 3.4. Actividades biológicas

#### 3.4.1. Actividad antioxidante (método de DPPH)

El método empleado para medir la capacidad antioxidante de los compuestos fue la determinación de captación de radicales libres con el método del DPPH, siguiendo la metodología de Prior y colaboradores,<sup>168</sup> un método estandarizado para obtener esta medida.

Convencionalmente, se asume que un donador de hidrógeno es un reductor y por tanto un antioxidante. La especie 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) es un radical libre estable y comercial que se emplea comúnmente como modelo en la interacción

<sup>164</sup> Anouar, E. H.; Gierschner, J.; Duroux, J.-L.; Trouillas, P. *Food Chem.* **2012**, *131*, 79–89. PASA A.

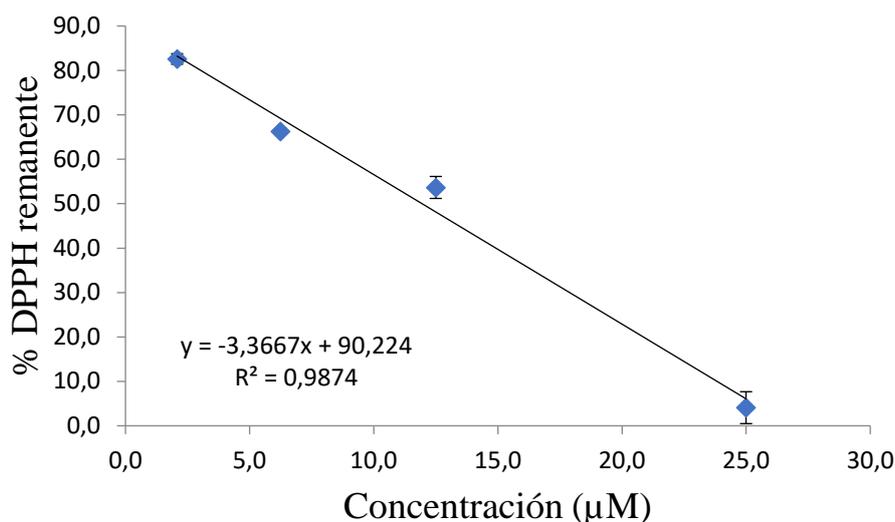
<sup>165</sup> Moreira, P. F.; Giestas, L.; Yihwa, C.; Vautier-Giongo, C.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L.; Lima, J. C. *J. Phys. Chem. A*, **2003**, *107*, 4203–4210.

<sup>166</sup> Ferreira da Silva, P.; Lima, J. C.; Quina, F. H.; Maçanita, A. L. *J. Phys. Chem. A*. **2004**, *108*, 10133–10140.

<sup>167</sup> Dangles, O.; Fenger, J. A. *Molecules*, **2018**, *23*, 1970.

<sup>168</sup> Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302.





**Figura 23.** Ejemplo gráfica obtenida con el método DPPH para compuesto **8**

Para analizar qué compuestos tenían potencial como antioxidantes se realizó un primer barrido entre todas las sales de pirilio y 3-desoxiantocianidinas a una concentración en cubeta de 25 µM con el objetivo de descartar aquellos compuestos que tuviesen una pobre o poco destacable actividad antioxidante. En este primer screening realizado se obtuvo como resultado que las 3-desoxiantocianidinas destruían por completo o casi por completo el DPPH presente en el medio a esa concentración. Sin embargo, se observó que en el mejor de los casos algunas de las sales de pirilio sólo destruían un 15 % del DPPH presente en el medio. Por tanto, se descartó realizar la actividad a las sales de pirilio y se siguió trabajando con las 3-desoxiantocianidinas.

**Tabla 5.** Valores de EC<sub>50</sub> para las 3-desoxiantocianidinas

Compuestos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	EC <sub>50</sub> (µM)
<b>8</b>	OH	OH	H	CH <sub>3</sub>	H	11.9±3.3
<b>9</b>	OH	OH	H	F	H	10.6±0.6
<b>10</b>	OH	OH	H	Br	H	9.1±3.3
<b>11</b>	OH	OH	H	H	H	4.6±0.3
<b>12</b>	OH	OH	H	Ph	H	7.3±2.6
<b>13</b>	OH	OH	H	OH	H	6.2±0.4
<b>14</b>	OH	OH	OMe	OMe	H	6.2±0.5
<b>15</b>	OH	OH	OMe	OMe	OMe	10.2±2.0
<b>16</b>	OH	H	H	OH	H	13.2±1.5
<b>Ác. Ascórbico<sup>a</sup></b>	-	-	-	-	-	16.5

<sup>a</sup>El valor de EC<sub>50</sub> para el Ácido Ascórbico aparece recogido en <sup>172</sup>

<sup>172</sup> Lee, C.Y.; Held, R.; Sharma, A.; Baral, R.; Nanah, C.; Dumas, D.; Jenkins, S.; Upadhaya, S.; Du, W. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 11221-11228.

Como puede observarse en la Tabla 5, todas las 3-desoxiantocianidinas presentan una actividad como captadores de radicales libres superior o igual a la de uno de los antioxidantes más conocidos y potentes usados en la naturaleza, el ácido ascórbico. Pudiendo destacar entre los compuestos las 3-desoxiantocianidinas **11**, **13** y **14**, presentando las mismas una actividad como captador de radicales libres dos veces superior a la que exhibe el ácido ascórbico.

A estos resultados se le podrían dar dos interpretaciones. En primer lugar, las antocianinas con más grupos hidroxilo y metoxilo en su esqueleto, a excepción de la antocianina **15**, son las que presentan una mayor capacidad antioxidante. Por tanto, se podría interpretar que la presencia de grupos hidroxilo y grupos metoxilo en el esqueleto de estos compuestos favorece la captación de radicales libres.

La segunda interpretación posible es que las 3-desoxiantocianidinas que presentan un mayor potencial antirradicalario son aquellas que a su vez presentan mayor número de grupos electrodonantes en la molécula (hidroxilos y metoxilos), nuevamente a excepción del compuesto **15**. Sin embargo, aquellos que han mostrado una más pobre actividad antioxidante exhiben un mayor número de grupos electroatrayentes como el flúor y el bromo, 3-desoxiantocianidinas **9** y **10** respectivamente. Por lo que se podría concluir que de alguna manera la presencia de grupos electrodonantes en la molécula favorece la captación de radicales libres, mientras que por el contrario la existencia de grupos electroatrayentes en la misma hace decrecer dicha actividad.

### **3.4.2. Actividad antiproliferativa y de citotoxicidad**

En la búsqueda de moléculas potencialmente útiles en el tratamiento de cáncer, uno de los principales métodos para el tamizaje *in vitro* de diferentes productos, es el ensayo de citotoxicidad empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos.<sup>173</sup> En estos ensayos comúnmente se aplican diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de forma indirecta el número de células viables, luego de someterlas a tratamiento con diferentes concentraciones de un xenobiótico.

---

<sup>173</sup> Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paul, K.; Vistica, D.; *J Natl Cancer*. **1991**, *83*, 757-766.

La resazurina es un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las células por la conversión de una tinción no fluorescente a un color rojo altamente fluorescente en respuesta a una reducción química del medio de cultivo resultado del crecimiento celular. En particular, este colorante (azul no fluorescente) se reduce en dos pasos, irreversiblemente a resorufina (rosado altamente fluorescente), y en una segunda etapa reversible, a dihidroresorufina, compuesto incoloro y no fluorescente, procesos que se asocian principalmente con la mitocondria de células viables y se indican en la Figura 24.<sup>174</sup>

El crecimiento celular crea un ambiente *reducido* mientras que la inhibición del crecimiento mantiene un entorno *oxidado*. La reducción de la resazurina puede monitorizarse midiendo la fluorescencia o la absorbancia. La fluorescencia o señal colorimétrica generada del ensayo es proporcional al número de células vivientes en la muestra.



**Figura 24.** Conversión de resazurina a resorufina (fluorescente), y posteriormente a dihidroresorufina (no fluorescente) por acción metabólica de células viables.

Se ensayaron por un lado las líneas celulares no tumorales de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCat), es decir, las células predominantes de la epidermis para el estudio de citotoxicidad. Y por otra parte la línea celular de carcinoma de pulmón humano (A549), para obtener un dato de actividad antiproliferativa. Como control positivo se usó el compuesto cisplatino, que es un agente alquilante usado en quimioterapia para el tratamiento de varios tipos de cánceres, entre los que se incluyen sarcomas, algunos carcinomas, linfomas y tumor de células germinales.

<sup>174</sup> Escobar, L.; Aristizabal, F. *Medellín*, 2010, 17, 173-180.

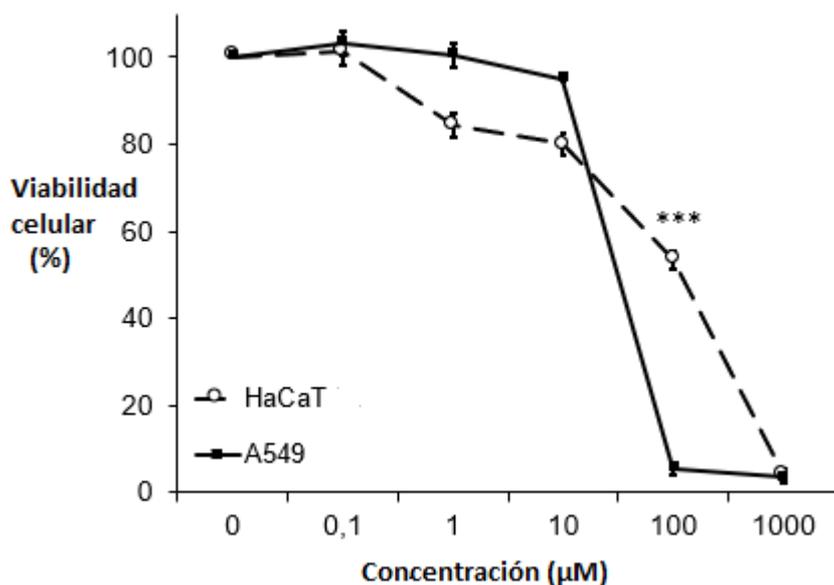
**Tabla 6.** Valores de EC<sub>50</sub> para las 3-desoxiantocianinas y cisplatino (control positivo), en células no tumorales de piel (HaCaT) y células tumorales de pulmón (A549) empleando ensayo de Resazurin.

Compuestos	EC <sub>50</sub> (Medida ± SEM, µM)		SI
	HaCaT (Normal)	A549 (Cancer)	
<b>8</b>	36,60 ± 0,68	71,01 ± 3,46	0,52
<b>9</b>	34,77 ± 1,04	118,86 ± 5,65	0,29
<b>10</b>	110,38 ± 4,47	31,64 ± 0,75	3,49
<b>11</b>	3,79 ± 0,09	5,94 ± 0,30	0,64
<b>12</b>	16,38 ± 0,40	13,24 ± 0,66	1,24
<b>13</b>	5,67 ± 0,11	29,20 ± 1,14	0,19
<b>14</b>	23,79 ± 0,32	13,10 ± 2,08	1,82
<b>15</b>	40,04 ± 1,22	30,93 ± 0,50	1,29
<b>16</b>	3,16 ± 0,99	3,37 ± 0,45	0,94
<b>Cisplatino</b>	0,80 ± 0,03	12,06 ± 0,67	0,07

Los índices de selectividad (SI) fueron calculados dividiendo los valores de EC<sub>50</sub> de las células sanas por aquellos de las células cancerosas.

Los compuestos ensayados en este capítulo fueron las 3-desoxiantocianidinas. Los datos obtenidos del ensayo aparecen registrados en la Tabla 6 para los distintos compuestos. A modo de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos para la antocianina **10** en la Figura 25.

Lo que se planteaba era la búsqueda de compuestos que fueran más selectivos para la destrucción de las células cancerígenas a concentraciones más bajas que para las células sanas. Por tanto, se estableció un índice de selectividad (SI) que representa el cociente entre la concentración de compuesto a la que se destruye el 50 % de las células sanas (EC<sub>50</sub> de HaCaT) y la concentración a la que se destruye el 50 % de las células tumorales (EC<sub>50</sub> de HaCaT), aportando una medida de aquellos compuestos que tienen mayor afinidad a la hora de eliminar células tumorales que células sanas. Por ende, aquellos compuestos que registren un SI superior a la unidad serán compuestos más selectivos de células cancerígenas que tumorales.



**Figura 25.** Ejemplo gráfica obtenida con el método la resazurina para el compuesto **10**

Como se puede observar en la Tabla 6, las 3-desoxiantocianidinas que mostraron un índice de selectividad superior a la unidad, obviando el error de la medida, fueron **10**, **12**, **14** y **15** con valores de 3.49, 1.24, 1.82 y 1.29 respectivamente. La principal diferencia que presentan estas 3-desoxiantocianidinas en su esqueleto es la presencia de un átomo de bromo, un grupo fenilo, dos grupos metoxilos y tres grupos metoxilo respectivamente, por lo que se puede concluir que de alguna manera la presencia de estos grupos funcionales podría aumentar la afinidad con alguno de los componentes de las células tumorales de pulmón que provoque su posterior muerte al unirse con el compuesto y a su vez, reducir la afinidad de los mismos con los componentes de las células sanas sin provocarle ningún tipo de daño a las mismas.

### 3.4.3. Actividad antibacteriana

Entre la gran variedad de metabolitos secundarios de las plantas destacan los compuestos fenólicos; a los cuáles, entre otras propiedades, se les atribuye actividad. Los extractos de té se han asociado a la inhibición de varias cepas bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas entre las que se incluyen *Salmonella typhimurium* y *Vibrio cholerae*. Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides destacan por presentar una alta actividad de este tipo, grupo al que pertenecen las antocianinas (antecedentes).

Además, se ha destacado el potencial que tienen algunos derivados de quitosano como agentes antimicrobianos. Entre ellos destacan los derivados de quitosano cuaternizados, que introducen permanentemente la carga positiva en el biopolímero aumentando su solubilidad en agua y a su vez su potencial como agentes antibacterianos (antecedentes).

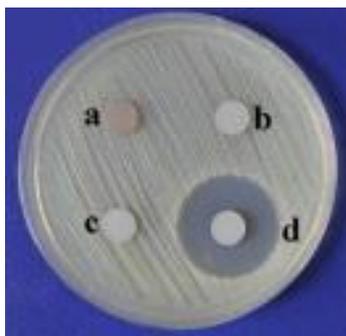
A la vista de los antecedentes, se estudió la actividad antibacteriana de los siguientes compuestos sintetizados en este capítulo: sales de pirilio (**1-7**), sales de flavilio (**8-16**), piridinius y quinolinios derivados de quitosano (**18-28**) y quitosano comercial. Las sales de pirilio y flavilio se ensayaron en disolución a una concentración de 1,5 mM, mientras que los compuestos derivados de quitosano se ensayaron en fase sólida, empleando 2 mg de cada compuesto.

Para el estudio se ensayaron cinco cepas bacterianas distintas: dos Gram-positivas (*Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*) y tres Gram-negativas (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*).

Para determinar la actividad antibacteriana se realizó el método de difusión en agar, el cual está apoyado por datos clínicos y de laboratorio y, presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles.<sup>175</sup> La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer y colaboradores (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. En el método de Kirby-Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37°C. Durante el tiempo de incubación si el microorganismo es sensible al compuesto introducido en el agar, se generará un halo alrededor del pocillo o disco que, representará que ha habido inhibición del crecimiento del microorganismo en esa zona (Figura 26). Por lo que la técnica, permite medir de forma cualitativa la capacidad antimicrobial de los compuestos.

---

<sup>175</sup> Doughari, J.H. *Trop. J. Pharm. Rest.*, **2006**, 5, 597.



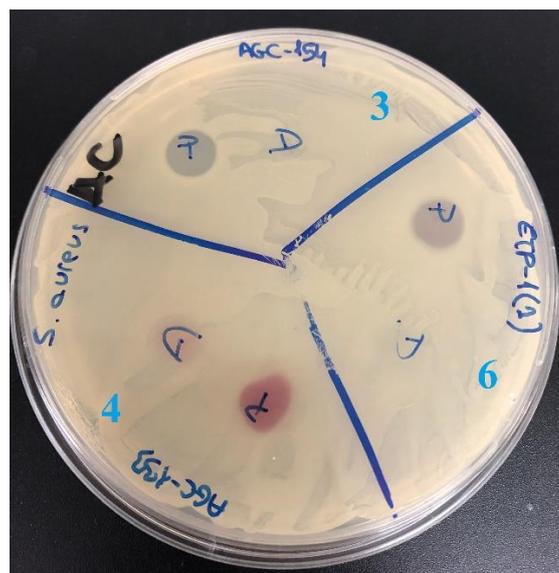
**Figura 26.** Ejemplo de aplicación del método de difusión en agar. El compuesto **d** ha inhibido el crecimiento bacteriano

Como puede apreciarse en la Tabla 7, las sales de pirilio **1**, **4** y **5** no parecen tener ninguna actividad bactericida significativa, ya que no se produjo halo de inhibición para ninguno de estos compuestos, irónicamente los compuestos que tienen grupos hidroxilo en sus moléculas. El cambio del grupo hidroxilo de la posición R<sub>1</sub> por un grupo metoxilo, parece conferirle a los compuestos actividad bactericida contra las cepas Gram-positivas, como ocurre con los compuestos **2** y **3**. Por último, la presencia de flúor en la molécula amplía el espectro incluyendo una de las cepas Gram-negativas, *Salmonella Typhimurium*, para el caso de los compuestos **6** y **7**. Un ejemplo del método de difusión aplicado a las sales de pirilio lo tenemos en la Figura 27, donde se prueban los compuestos **3**, **4** y **6** con la cepa *Staphylococcus aureus*, causando halo de inhibición el compuesto **3** y **6** y, por tanto, siendo activos contra esta cepa ambos compuestos.

**Tabla 7.** Actividad antibacteriana de las sales de pirilio contra las diversas cepas

Sales de pirilio <sup>a</sup>	<i>Bacillus cereus</i> (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	<i>Salmonella Typhimurium</i> (-)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (-)	<i>Escherichia coli</i> (-)
<b>1</b>	NO	NO	NO	NO	NO
<b>2</b>	SI	SI	NO	NO	NO
<b>3</b>	SI	SI	NO	NO	NO
<b>4</b>	NO	NO	NO	NO	NO
<b>5</b>	NO	NO	NO	NO	NO
<b>6</b>	SI	SI	SI	NO	NO
<b>7</b>	SI	SI	SI	NO	NO

<sup>a</sup> Los compuestos se ensayaron en disolución a una concentración de 1,5 mM.



**Figura 27.** Aplicación del método de difusión para las sales de pirilio **3**, **4** y **6** contra la cepa *S.aureus*

Por otro lado, las 3-desoxiantocianidinas parecen exhibir mejor actividad frente a ambos tipos de cepas bacterianas (Tabla 8). Los resultados más notables los tenemos en los compuestos **10**, **15** y **16** que inhiben el crecimiento de las cinco cepas bacterianas ensayadas, siendo las únicas diferencias entre ellas la presencia de un átomo de bromo, tres grupos metoxilo y dos grupos hidroxilo respectivamente. Estos resultados son especialmente interesantes debido a que podrían formar parte de los llamados antibióticos de amplio espectro. El resto de antocianinas probadas exhiben un carácter más diferente a la hora de inhibir las cepas bacterianas en función del tipo de sustituyentes encontrados en las moléculas.

**Tabla 8.** Actividad antibacteriana de las antocianinas contra las diversas cepas

Sales de flavilio <sup>a</sup>	Bacillus cereus (+)	Staphylococcus aureus (+)	Salmonella Typhimurium (-)	Klebsiella pneumoniae (-)	Escherichia coli (-)
<b>8</b>	SI	SI	NO	SI	NO
<b>9</b>	NO	SI	NO	SI	SI
<b>10</b>	SI	SI	SI	SI	SI
<b>11</b>	NO	SI	NO	SI	NO
<b>12</b>	SI	SI	NO	NO	NO
<b>13</b>	SI	SI	NO	SI	SI
<b>14</b>	SI	NO	NO	SI	SI
<b>15</b>	SI	SI	SI	SI	SI
<b>16</b>	SI	SI	SI	SI	SI

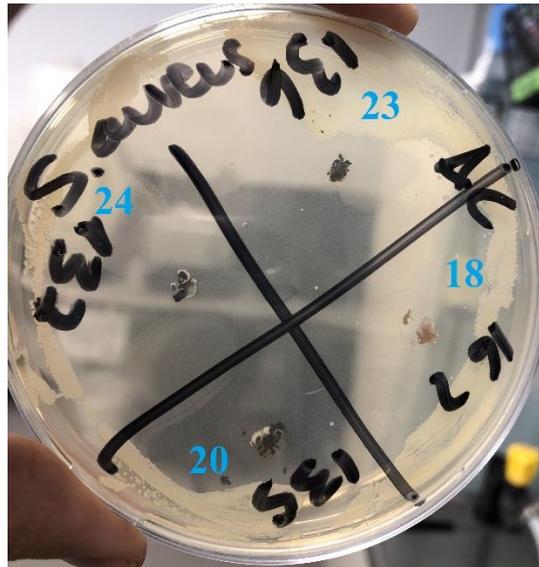
<sup>a</sup> Los compuestos se ensayaron en disolución a una concentración de 1,5 mM.

Por último, los derivados de quitosano parecen tener un espectro más reducido de inhibición, afectando únicamente en algunos casos a las cepas Gram-positivas (Tabla 9). Sin embargo, el halo de inhibición observado para este tipo de compuestos es mucho mayor que en el caso de los anteriores, como se puede ver con los compuestos **18**, **20**, **23** y **24** en la Figura 28, que inhiben el crecimiento prácticamente en toda la placa, lo que exhibe un mayor potencial inhibitorio. Se puede observar que en el caso de los derivados de quitosano **20** y **23**, que son los que tienen los porcentajes de incorporación al biopolímero más elevados: 14 y 4 % respectivamente, se produce la inhibición de las dos cepas Gram positivas ensayadas. Además, el poder bactericida del quitosano nativo ensayado es nulo para todas las cepas probadas, lo que sugiere que la incorporación de unidades cuaternizadas podría mejorarlo. Por ello, podría establecerse una primera aproximación que relacionase el número de unidades incorporadas de quinolinio, o grupos amino cuaternizados, con el poder inhibitorio contra las cepas Gram positivas.

**Tabla 9.** Actividad antibacteriana de los derivados de quitosano contra las diversas cepas

<b>Derivados Quitosano<sup>a</sup></b>	<i>Bacillus cereus</i> (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	<i>Salmonella Typhimurium</i> (- )	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (-)	<i>Escherichia coli</i> (-)
<b>Quitosano</b>	NO	NO	NO	NO	NO
<b>18</b>	NO	SI	NO	NO	NO
<b>19</b>	NO	NO	NO	NO	NO
<b>20</b>	SI	SI	NO	NO	NO
<b>21</b>	SI	SI	NO	NO	NO
<b>22</b>	NO	SI	NO	NO	NO
<b>23</b>	SI	SI	NO	NO	NO
<b>24</b>	NO	SI	NO	NO	NO
<b>25</b>	SI	NO	NO	NO	NO
<b>26</b>	SI	NO	NO	NO	NO
<b>27</b>	NO	NO	NO	NO	NO
<b>28</b>	NO	NO	NO	NO	NO

<sup>a</sup> Los compuestos se ensayaron en fase sólida, empleando 2 mg por compuesto.



**Figura 28.** Aplicación del método de difusión para los derivados de quitosano 18, 20, 23 y 24 contra la cepa *S. aureus*

## 4. Conclusiones

Se han preparado y caracterizado nuevas sales de pirilio y flavilio polihidroxi y/o polimetoxisustituidas aplicando la misma metodología sintética, comprobándose de esta forma que la obtención de una u otra dependerá de la presencia de un grupo hidroxilo en la posición *orto* del benzaldehído de partida. Así pues, si el benzaldehído de partida presenta un grupo hidroxilo en la posición *orto* se obtendrá la sal de flavilio mientras que, si por el contrario no presenta ese grupo funcional, conducirá a la obtención de la sal de pirilio correspondiente.

Se han preparado y caracterizado nuevos sistemas policatiónicos: piridinio-QUITOSANO y quinolinio-QUITOSANO cuaternizados por reacción de este biopolímero con sales de pirilio y sales de flavilio, respectivamente. El grado de *N*-sustitución obtenido en el esqueleto polimérico se mantiene más bajo del 5%, en general, lo que preserva las propiedades fisicoquímicas originales del QUITOSANO.

En relación con las propiedades fotofísicas, se ha comprobado que tanto las sales de pirilio como las sales de flavilio presentan coloración debido a que contienen grupos cromóforos que absorben en la zona del visible, y dependiendo de la influencia electrónica de los sustituyentes la  $\lambda_{\text{abs}}$  se puede desplazar ligeramente cambiando así el color de las distintas sales. Esta propiedad los hace compuestos especialmente interesantes como sensores de pH o de diferentes disolventes orgánicos.

Además, también incidiendo en estas propiedades fotofísicas, puede comprobarse que tanto las sales de pirilio como las sales de flavilio son compuestos fluorescentes, siendo mucho más fluorescentes las sales de pirilio. Esta propiedad hace que los compuestos sintetizados puedan ser utilizados potencialmente en tecnología láser.

Con respecto a la capacidad antioxidante de los compuestos estudiados mediante la metodología de DPPH, puede comprobarse que las sales de flavilio obtenidas son potentes agentes antioxidantes. En concreto destacan los compuestos **11**, **13** y **14**, con un valor de EC<sub>50</sub> dos veces superior al del ácido ascórbico. Sin embargo, también se constata que a pesar de presentar una gran variedad de grupos hidroxilo y metoxilo, las sales de pirilio no se comportan como buenos antioxidantes.

La evaluación de la actividad antiproliferativa de las sales de flavilio frente a la línea cancerígena de pulmón A549 reveló que los compuestos **10**, **14** y **15** pueden

resultar especialmente atractivos como agentes antitumorales dada su alta selectividad a la hora de erradicar células cancerígenas con respecto a sus homólogas sanas.

La actividad antibacteriana frente a cepas Gram-positivas (*Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*) y Gram-negativas (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*) presentó diferentes resultados en función de la gama de compuestos utilizada. Así, las sales de pirilio y los derivados de quitosano mostraron ser únicamente eficaces contra las cepas Gram-positivas, siendo, cualitativamente hablando, más potentes los derivados de quitosano debido a que el halo de crecimiento provocado en la placa Petri era significativamente mayor. Por otra parte, las sales de flavilio mostraron además potencial frente a las cepas Gram-negativas, siendo especialmente interesantes las sales de flavilio **10**, **15** y **16** debido a que inhibieron el crecimiento en todas las cepas estudiadas y podrían, por tanto, ser considerados como posibles candidatos a antibióticos de amplio espectro.

## 5. Parte Experimental

### 5.1. General methods

All reagents have been used as supplied without prior purification. The evaporation of the solvents has been carried out under reduced pressure at temperatures below 40 °C in most cases never exceeding 50 °C. Analytical thin layer chromatography was performed for qualitative purposes using prefabricated aluminum sheets of silica gel (MN ALUGRAM Xtra SIL G / UV 254) 0.2 mm thick. The eluents that have been used are those indicated in each case and as a developer mainly 10% ethanolic H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The purification of the 3-desoxyanthocyanins and pyrilium salts has been carried out by solidification and crystallization. The solvents for most reactions have been used dry or have been purified by standard procedure or used directly from the commercial source.

*Infrared (IR) spectra* have been performed on a JASCO FT/R-4100 spectrophotometer. The UV-visible spectra have been performed on a Jasco V-630 spectrophotometer with a spectral scan of 250 to 800 nm. Fluorescence measurements have been carried out at 298.2 K in a spectrofluorimeter (Hitachi F-2500) at concentrations not exceeding 0.1 absorbance value in the UV-visible spectrum. In all cases, the excitation wavelength corresponds to the maximum absorption of the UV-visible spectra of each of the compounds, the luminescence intensity being recorded between 400-700 nm. Additionally, it has been corroborated that the results obtained in fluorescence are independent of the excitation wavelength in the range from 350 to 550 nm.

*The <sup>1</sup>H (and <sup>13</sup>C) NMR spectra* were acquired at 300 (75.5 for <sup>13</sup>C) and 500 (125.7 and 470 for <sup>13</sup>C) MHz in Advance and Advance III spectrometers. The values of chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm, calibrating with respect to the solvent signals or by internal TMS reference. The data are presented as follows: chemical shift in ppm (multiplicity, number of protons, coupling constants  $J$  in Hz, allocation). The acquisition of 2D spectra was performed using the standard pulse sequence. Experiments COSY, NOESY (mixing times: 400 and 500 ms), <sup>1</sup>H <sup>13</sup>C HSQC and <sup>1</sup>H <sup>13</sup>C HMBC (optimized for a coupling constant of 8 Hz) have been used to carry out the assignments of NMR signals. Mass spectra (MS) were recorded using Electrospray

Ionization (ESI). Mass spectra of High resolution (HRMS) were acquired with a resolution of 10,000 (definition of the valley 5%) using a magnetic sector analyzer.

The assignment of the *E* or *Z* isomer geometry has been carried out using the 3D CLIP-HSQMBC experiment.<sup>176</sup> This experiment makes it possible to clearly observe the <sup>13</sup>C isotopomers without signal interference with the <sup>12</sup>C, unlike conventional HSQMBC, coupling constants exhibit “in-phase” character.

### 5.1.1. NMR Spectroscopy and determination of Degree of N-Substitution (DS)

<sup>1</sup>H NMR Spectra were acquired at 300 K on a Bruker Advance III 500 MHz spectrometer equipped with a 5 mm CPQCI probe. To carry out these spectra, D<sub>2</sub>O/CD<sub>3</sub>COOD solution (1:1 for the most of cases, but could be different for other compounds) with a final concentration of 7 mg/mL has been used. Spectrum referencing was performed using 10 μL of 0.1 mM solution of 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid sodium salt (DSS sodium salt) as internal reference [ $\delta = 2.91$  (t), 1.77 (p), 0.60 (t) y 0.00 (s)]. The degree of deacetylation has been calculated based on a spectrum made in 2 % DCI following a procedure similar to that described in the literature.<sup>177</sup> In connection with the described procedure, acquisition time (AQ) of this experiment has been modified up to 2s. Furthermore, the use of a 3 mm NMR tube has been shown not to cause significant changes in the calculation of DD. Moreover, in order to calculate the DD, the relative area of CH<sub>3</sub> has been used as well as the combined area of protons H-2 and H-3 to H-6 with the purpose of avoiding any invisible fraction of chitosan.<sup>178</sup> On the other hand, for the determination of the degree of N-substitution (DS), it has been optimized a 90 ° pulse of 8.80 μs with a relaxation time (d1) of 10 s and 64 scans. Based on this, that degree of N-substitution is calculated as follows:

$$DS = (I_{Ar}/n) / (I_{H2-H6}/6) \times 100$$

Where  $I_{Ar}$  is the value of the integral of the aromatic protons of the unit incorporated, such as pyridinium unit,  $n$  the number of aromatic protons and  $I_{H2-H6}$

<sup>176</sup> Saurí, J.; Parella, T.; Espinosa, J. F.; *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4473-4478.

<sup>177</sup> Fernandez-Megia, E.; Novoa-Carballal, R.; Quiñoá, E.; Riguera, R.; *Carbohydr. Polym.* **2005**, *61*, 155-161.

<sup>178</sup> Novoa-Carballal, R.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E.; *Mol. Pharmaceutics.* **2013**, *10*, 3225-3231.

represents the area of the peaks for protons H-2 to H-6 of the chitosan skeleton. Additionally, an alternative to this classic way of calculating the DS has been developed from the protons H-1 and H-2, thus obtaining the partial parameters DS1 and DS2 respectively. This strategy is especially useful for derivatives whose chemical shifts overlap with the H-3 to H-6 region of the polymer backbone.

$$DS (\%) = (DS_1 + DS_2)/2$$

$$DS_1 (\%) = I_{Ar} (n \times I_{H1}) \times 100; DS_2 (\%) = I_{Ar} (n \times I_{H2}) \times 100$$

Where  $I_{Ar}$  is the value of the integral of the aromatic protons of the unit incorporated,  $n$  the number of aromatic protons and  $I_{H1}/I_{H2}$  represents the area of the peaks for protons H-1/H-2 of the chitosan backbone.

### 5.1.2. Diffusion experiments: Diffusion filters

Diffusion filter experiments have been acquired on the Bruker Advance 500 MHz spectrometer equipped with a PABBO probe with a 5 mm z-axis. A standar bipolar pulse pair gradient with longitudinal time has been used as pulse sequence in order to fade the *eddy* currents (BPP-LED) corresponding to the Bruker ledbpgsps2 pulse program. The duration of the gradient was adjusted to 3 ms and a time to fade *eddy* currents to 5 ms. The broadcast time was set to 250 ms. For each gradient, it has been accumulated 24 times. Moreover, in the diffusion filters, the force of the gradient was set at the maximum amplitude value (95 %) accumulating during 512 measurements.

### 5.1.3. Yield calculation in chitosan derivatives

The calculation of the yield (%) has been made from a modified procedure with respect to that described in the literature.<sup>179</sup> The main modification consists in making a correction taking into account the relative humidity (9.874%) of the chitosan used, which has been obtained from a TGA / DSC thermal analysis. For this purpose, a temperature range between 20 °C and 400 °C has been optimized with a temperature ramp of 10 °C min<sup>-1</sup>. Moreover, N<sub>2</sub> gas (100 mL min<sup>-1</sup>) was used to cool and purge the sample compartment.

---

<sup>179</sup> Sajomsang, W.; Tantayanon, S.; Tangpasuthadol, V.; Thatte, M.; Daly, W. H.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *43*, 79–87.

#### 5.1.4. Photophysical activity. UV-visible and fluorescence measurements

UV-visible spectra have been performed on a Jasco V-630 spectrophotometer with a spectral scan of 250 to 800 nm. Fluorescence measurements have been carried out at 298.2 K in a spectrofluorimeter (Hitachi F-2500) at concentrations not exceeding 0.1 absorbance value in the UV-visible spectrum. In all cases, the excitation wavelength corresponds to the maximum absorption of the UV-visible spectra of each of the compounds, the luminescence intensity being recorded between 400-700 nm. In addition, it has been confirmed that the results are independent of the excitation wavelength. For the preparation of samples, as well as corresponding dilutions, DMSO has been selected as solvent due to it allows the solubility of all the compounds that have been used.

#### 5.2. Raw materials

The  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{HClO}_4$ , benzaldehydes: 4-methoxybenzaldehyde, 4-hydroxybenzaldehyde, 4-fluorobenzaldehyde, 2,3,4-trihydroxybenzaldehyde and 2,3-dihydroxybenzaldehyde as well as acetophenones: acetophenone, 4-hydroxyacetophenone, 3,4-dimethoxyacetophenone, 3,4,5-trimethoxyacetophenone, 4-fluoroacetophenone, 4-methylacetophenone, 4-bromoacetophenone, 4-phenylacetophenone, 3,4-dimethoxyacetophenone, 3,4,5-trimethoxyacetophenone and 3,5-dihydroxyacetophenone are commercially available from Sigma-Aldrich®. The chitosan used as raw material has been supplied by Sigma-Aldrich® as well. It has a degree of deacetylation (DD) of 84 %, parameter which has been determined by  $^1\text{H-NMR}$ . The molecular weight is 87875 g/mol and it has been calculated by the group as well by HPLC/SEC. The  $M_n$  of chitosan used is 48675 g/mol and its PDI 1.81.

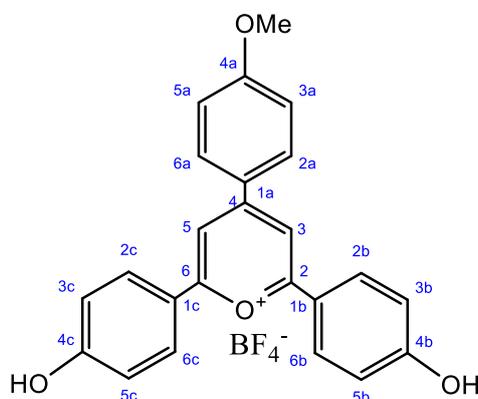
#### 5.3. Synthesis and characterization of pyrylium salts

##### *General procedure*

$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (3 mmol) was added dropwise under a  $\text{N}_2$  atmosphere to a solution of p-substituted benzaldehyde (1 mmol) and mono or poli-substituted acetophenone (3 mmol) in DCM (5 ml). The mixture was heated to 80 °C and monitored by TLC (4:1 Cyclohexane-EtOAc) until the reaction was completed. The residue was eventually treated with EtOH or  $\text{Et}_2\text{O}$ . Crystallization from/ Treatment with 1,2-dichloroethane,

DMC, diethyl ether or acetone afforded the corresponding pure pyrylium tetrafluoroborate.

### 2,6-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)pyrylium tetrafluoroborate (**1**)



Starting reagents: 4-methoxybenzaldehyde (200 mg, 1.4 mmol) and 4-hydroxyacetophenone (571 mg, 4.2 mmol). Reaction time: 24 h. Treatment with 1,2-dichloroethane and subsequent filtration afforded 2,6-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)pyrylium tetrafluoroborate (**1**) (200 mg, 31 %) as a red solid.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, Acetone):  $\delta$  9.86 (s, 2H, OH), 8.71 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.52 (d, 2H,  $J = 9.1$  Hz, H-2a and H-6a), 8.46 (d, 4H,  $J = 8.9$  Hz, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 7.28 (d, 2H,  $J = 9.1$  Hz, H-3a and H-5a), 7.20 (d, 4H,  $J = 8.9$  Hz, H-3b, H-5b, H-3c and H-5c), 4.02 (s, 3H, OMe).

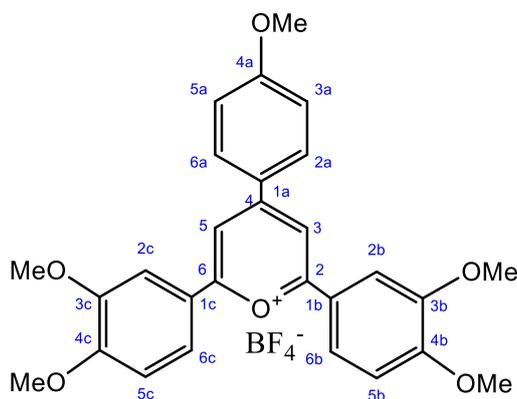
$^{13}\text{C}$  NMR (76 MHz, Acetone):  $\delta$  168.9 (C-2 and C-6), 165.7 (C-4), 163.8 (C-4b and C-4c), 162.7 (C-4a), 131.9 (C-1a), 130.9 (C-2b, C-5b, C-2c and C-5c), 125.1 (C-1b and C-1c), 120.7 (C-2a and C-6a), 116.9 (C-3b, C-5b, C-2c and C-5c), 111.4 (C-3a and C-5a), 110.6 (C-3 and C-5), 55.6 (OMe).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  420, 312 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  411 nm

ESIHRMS:  $m/z$  371.1267, calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{O}_4$ : 371.1278

## 2,6-Bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)pyrylium tetrafluoroborate (2)



Starting reagents: 4-methoxybenzaldehyde (200 mg, 1.4 mmol) and 3,4-dimethoxyacetophenone (788 mg, 4.2 mmol). Reaction time: 24 h. Crystallization from acetone afforded the 2,6-Bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)pyrylium tetrafluoroborate (**2**) (80 mg, 10 %) as an orange solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  8.81 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.61 (d, 2H,  $J$  = 8.6 Hz, H-2a and H-6a), 8.21 (d, 2H,  $J$  = 8.5 Hz, H-6b and H-6c), 7.93 (s, 2H, H-2b and H-2c), 7.35 (d, 2H,  $J$  = 8.8 Hz, H-3a and H-5a), 7.32 (d, 2H,  $J$  = 8.7 Hz, H-5b and H-5c), 4.01 (s, 6H, OMe 3b and 3c), 4.00 (s, 3H, OMe 4a), 3.98 (s, 6H, OMe 4b and 4c).

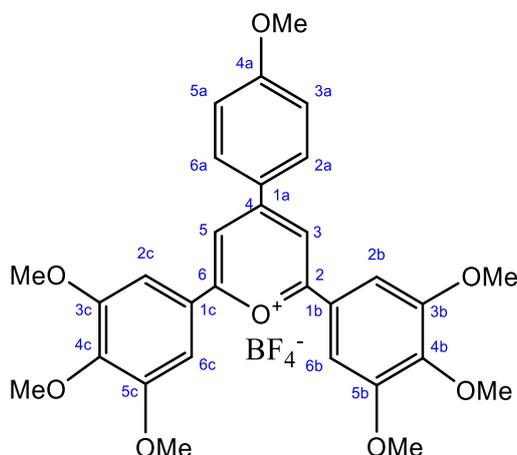
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO):  $\delta$  167.9 (C-2 and C-6), 161.9 (C-4), 154.6 (C-4a), 152.2 (C-3b and C-3c), 149.4 (C-4b and C-4c), 132.4 (C-6b and C-6c), 123.4 (C-1b and C-1c), 121.5 (C-1a), 115.3 (C-2a and C-6a), 112.4 (C-2b and C-2c), 111.5 (C-5b and C-5c), 111.4 (C-3a and C-5a), 110.5 (C-3 and C-5), 56.2 (OMe C-3b and C-3c), 56.1 (OMe C-4a), 56.0 (OMe C-4b and C-4c).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  433, 320 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  413 nm

ESIHRMS:  $m/z$  459.1795, calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{O}_6$ : 459.1802

### 2,6-Bis(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4-methoxyphenyl-pyrylium tetrafluoroborate (3)



Starting reagents: 4-methoxybenzaldehyde (200 mg, 1.4 mmol) and 3,4,5-trimethoxyacetophenone (919 mg, 4.2 mmol). Reaction time: 24 h. Treatment with EtOH and subsequent filtration afforded the 2,6-Bis(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4-methoxyphenyl-pyrylium tetrafluoroborate (**3**) (70 mg, 8 %) as an orange solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  8.92 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.64 (d, 2H,  $J$  = 8.9 Hz, H-2a and H-6a), 7.76 (s, 4H, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 7.36 (d, 2H,  $J$  = 8.9 Hz, H-3a and H-5a), 4.02 (br s, 15H, OMe), 3.89 (br s, 6H, OMe).

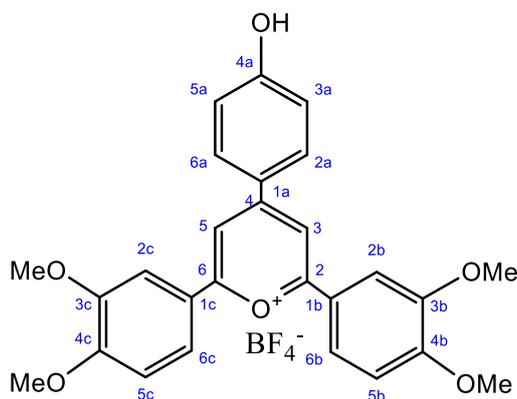
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO):  $\delta$  167.9 (C-2 and C-6), 165.5 (C-4), 162.8 (C-4a), 153.5 (C-3b, C-5b, C-3c and C-5c), 143.4 (C-4b and C-4c), 132.8 (C-1b and C-1c), 124.6 (C-2a and C-6a), 124.0 (C-1a), 115.5 (C-3a and C-5a), 112.9 (C-3 and C-5), 106.2 (C-2b, C-6b, C-2c and C-6c), 60.5 (OMe 4b and 4c), 56.4 (OMe 3b, 5b, 3c and 5c), 56.2 (OMe 4a).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  436, 317 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  415 nm

ESIHRMS:  $m/z$  519.2006, calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{O}_8$ : 519.2013

## 2,6-Bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)pyrylium tetrafluoroborate (**4**)



Starting reagents: 4-hydroxybenzaldehyde (200 mg, 1,7 mmol) and 3,4-dimethoxyacetophenone (956 mg, 5,1 mmol). Reaction time: 24 h. Crystallization from DCM afforded the 2,6-Bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)pyrylium tetrafluoroborate (**4**) (60 mg, 7 %) as a red solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  8.70 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.51 (d, 2H,  $J$  = 8.6 Hz, H-2a and H-6a), 8.14 (d, 2H,  $J$  = 8.2 Hz, H-6b and H-6c), 7.86 (s, 2H, H-2b and H-2c), 7.31 (d, 2H,  $J$  = 8.7 Hz, H-3a and H-5a), 7.10 (d, 2H,  $J$  = 8.6 Hz, H-5b and H-5c), 3.98 (s, 6H, OMe), 3.95 (s, 6H, OMe).

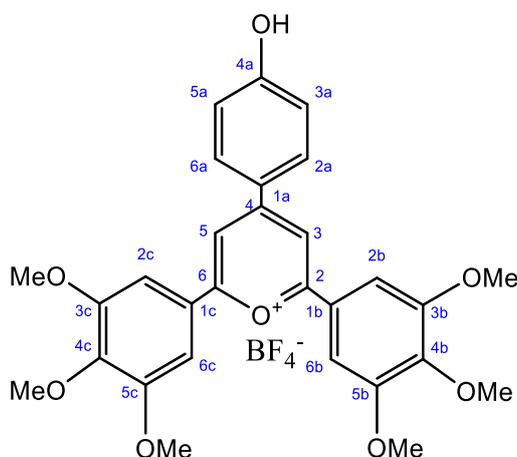
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO):  $\delta$  167.9 (C-2 and C-6), 165.2 (C-4), 162.2 (C-4a), 154.90 (C-3b and C-3c), 149.8 (C-4b and C-4c), 133. (C-6b and C-6c), 123.6 (C-1b and C-1c), 121.9 (C-1a), 117.3 (C-2a and C-5a), 112.9 (C-2b and C-2c), 112.8 (C-5b and C-5c), 111.1 (C-3a and C-5a), 110.7 (C-3 and C-6), 56.6 (OMe 3b and 3c), 56.4 (OMe 4b and 4c).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  518, 380 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  414 nm

ESIHRMS:  $m/z$  445.1636, calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{O}_6$ : 445.1646

**2,6-Bis(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)-pyrylium tetrafluoroborate**  
**(5)**



Starting reagents: 4-hydroxybenzaldehyde (200 mg, 1,7 mmol) and 3,4,5-trimethoxyacetophenone (1115 mg, 5,1 mmol). Reaction time: 24 h. Crystallization from acetone afforded the Bis(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)-pyrylium tetrafluoroborate (5) (30 mg, 3 %) as a red solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  8.85 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.58 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz, H-2a and H-6a), 7.75 (s, 4H, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 7.16 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz, H-3a and H-5a), 4.02 (s, 12H, OMe 3b, 5b, 3c and 5c), 3.88 (s, 6H, OMe 4b and 4c).

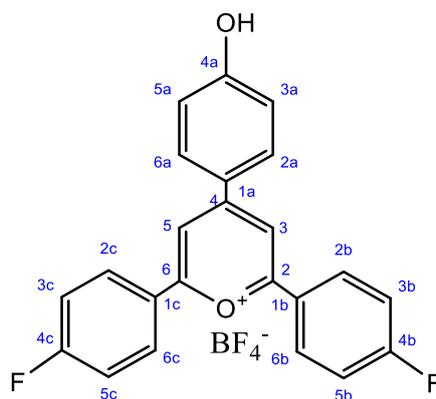
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO):  $\delta$  167.5 (C-2 and C-6), 165.3 (C-4), 162.6 (C-4a), 153.5 (C-3b, C-5b, C-3c and C-5c), 143.2 (C-4b and C-4c), 133.3 (C-1b and C-1c), 124.1, (C-2a and C-6a), 123.0 (C-1a), 117.0 (C-3a and C-5a), 112.2 (C-3 and C-5), 106.0 (C-2b, C-6b, C-3c and C-6c), 60.5 (OMe 3b, 5b, 3c and 5c), 56.4 (OMe 4a).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  519, 378 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  411 nm

ESIHRMS:  $m/z$  505.1849, calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{O}_8$ : 505.1857

## 2,6-Bis(4-fluorophenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)pyrylium tetrafluoroborate (**6**)



Starting reagents: 4-hydroxybenzaldehyde (200 mg, 1,7 mmol) and 4-fluoroacetophenone (1115 mg, 5,1 mmol). Reaction time: 24 h. Crystallization from DCM afforded the 2,6-Bis(4-fluorophenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)pyrylium tetrafluoroborate (**6**) (190 mg, 25 %) as an orange solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  8.9 (s, 2H, H-3 and H-6), 8.6 (m, 6H, H-2a, H-6a, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 7.6 (t, 4H,  $J = 8.7$  Hz, H-3b, H-5b, H-3c and H-5c), 7.1 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz, H-3a and H-5a).

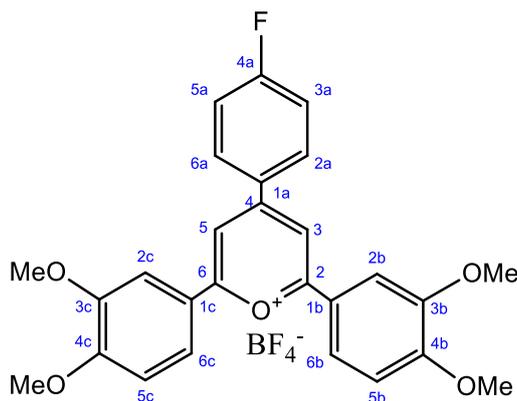
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  167.4 (C-2 and C-6), 165.7 (C-4), 164.7-163.4 (d,  $J = 8.7$  Hz, C-4b and C-4c), 160.4 (C-4a), 133.5 (C-2a and C-6a), 131.5-131,4 (d,  $J = 9.9$  Hz, C-2b, C-2c, C-6b and C-6c), 130.2 (C-1a), 126.0 (d,  $J = 2.9$  Hz, C-1b and C-1c), 122.8 (C-3a and C-5a), 117.1-116.9 (d,  $J = 22.3$  Hz, C-3b, C-5b, C-3c and C-5c), 112.3 (C-3 and C-5).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  478, 342 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  412 nm

ESIHRMS:  $m/z$  361.1032, calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{F}_2$ : 361.1035

## 2,6-Bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-(4-fluorophenyl)pyrylium tetrafluoroborate (7)



Starting reagents: 4-fluorobenzaldehyde (216  $\mu$ l, 2 mmol) and 3,4-dimethoxyacetophenone (1125 mg, 6 mmol). Reaction time: 24 h. Treatment with EtOH and subsequent filtration afforded the 2,6-Bis(3,4-dimethoxyphenyl)-4-(4-fluorophenyl)pyrylium tetrafluoroborate (**7**) (110 mg, 10 %) as a red solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  8.85 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.60 (dd, 2H,  $J = 5.5$ ,  $J = 9.0$  Hz, H-2a and H-6a), 8.22 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, H-6b and H-6c), 7.91 (s, 2H, H-2b and H-2c), 7.65 (t, 2H,  $J = 8.0$  Hz, H-3a and H-5a), 7.35 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz, H-5b and H-5c), 4.00 (s, 6H, OMe), 3.98 (s, 6H, OMe).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  169.2 (C-2 and C-6), 167.5-165.5 (d,  $J = 255.3$  Hz, C-4a), 162.2 (C-4), 155.4 (C-3b and C-3c), 149.9 (C-4b and C-4c), 133.2-133.1 (d,  $J = 9.7$  Hz, C-2a and C-6a), 129.9 (d,  $J = 2.7$  Hz, C-1a), 124.3 (C-1b and C-1c), 121.8 (C-6b and C-6c), 117.4-117.2 (C-3a and C-5a), 113.4 (C-5b and C-5c), 112.9 (C-2b and C-2c), 110.9 (C-3 and C-5), 56.7 (OMe 3b and 3c), 56.4 (OMe 4b and 4c).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\max}$  467, 340 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\max}$  412 nm

ESIHRMS:  $m/z$  447.1569, calcd for C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>F: 447.1602

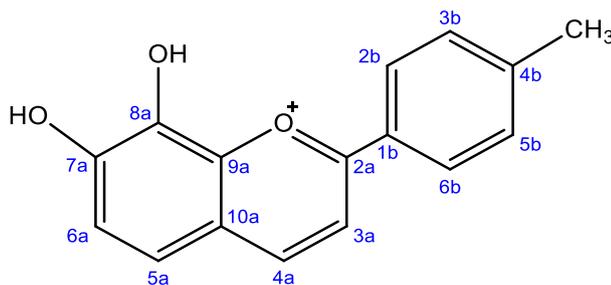
### 5.4. Synthesis and characterization of 3-desoxyanthocyanins

#### General procedure

HClO<sub>4</sub> (4 mmol) was added dropwise to a solution of mono or poli-substituted *o*-hydroxybenzaldehyde (1.3 mmol) and mono or poli-substituted acetophenone (1.3

mmol) in DCM (5 ml). The mixture was heated to 80 °C and monitored by TLC (4:1 Cyclohexane-EtOAc) until the reaction was completed. Treatment with 1,2-dichloroethane, DMC, diethyl ether or acetone and subsequent filtration afforded the corresponding pure 3-desoxyanthocyanin.

### 7,8-Dihydroxy-2-(p-tolyl)chromenylium perchlorate (8)



Starting reagents: 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyde (200 mg, 1.3 mmol) and 4-methylacetophenone (174  $\mu$ l, 1.3 mmol). Reaction time: 24 h. Treatment with DCM and subsequent filtration afforded the 7,8-Dihydroxy-2-(p-tolyl)chromenylium perchlorate (**8**) (400 mg, 87 %) as a red solid.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, Acetone):  $\delta$  9.33 (d, 1H,  $J$  = 8.7 Hz, H-4a), 8.52 (d, 1H,  $J$  = 8.8 Hz, H-3a), 8.39 (d, 2H,  $J$  = 8.9 Hz, H-3b and H-5b), 7.86 (d, 1H,  $J$  = 8.7 Hz, H-6a), 7.55 (d, 1H,  $J$  = 8.9 Hz, H-5a), 7.50 (d, 2H,  $J$  = 8.1 Hz, H-2b and H-6b).

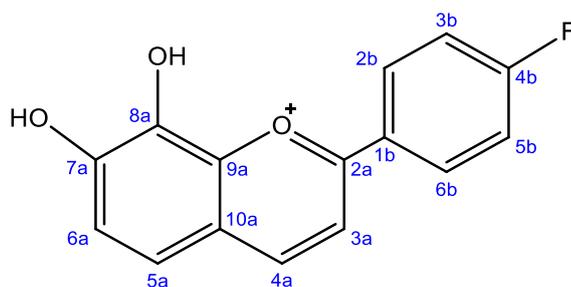
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.5 (C-2a), 163.3 (C-4b), 156.2 (C-7a), 148.5 (C-8a), 147.3 (C-9a), 133.1 (C-4a), 130.9 (C-2b and C-6b), 129.7 (C-10a), 126.8 (C-1b), 123.8 (C-5a), 120.9 (C-6a), 120.7 (C-3b and C-5b), 113.1 (C-3a), 21.1 ( $\text{CH}_3$ ).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  430, 270 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  411 nm

ESIHRMS:  $m/z$  253.0856, calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_3$ : 253.0859

### 2-(4-Fluorophenyl)-7,8-dihydroxychromenylium perchlorate (9)



Starting reagents: 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyde (200 mg, 1.3 mmol) and 4-fluoroacetophenone (121  $\mu$ l, 1.3 mmol). Reaction time: 24 h. Treatment with DCM and subsequent filtration afforded the 2-(4-Fluorophenyl)-7,8-dihydrochromenylium perchlorate (**9**) (398 mg, 85 %) as a dark green solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Acetone):  $\delta$  9.55 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, H-4a), 8.76 (dd, 2H,  $J_1 = 5.4$  Hz,  $J_2 = 8.9$  Hz, H-2b and H-6b), 8.70 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, H-3a), 8.05 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, H-6a), 7.74 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz, H-5a), 7.62 (t, 2H,  $J = 8.7$  Hz, H-3b and H-5b).

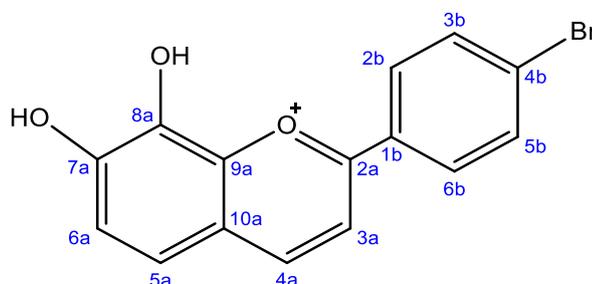
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Acetone):  $\delta$  171.3 (C-2a), 168.5-166.4 (d,  $J = 257.0$  Hz, C-4b), 166.4 (C-7a), 156.7 (C-8a), 147.6 (C-9a), 132.9-132.8 (d,  $J = 9.8$  Hz, C-2b and C-6b), 129.9 (C-4a), 126.3 (C-10a), 126.2 (d,  $J = 2.7$  Hz, C-1a), 124.2 (C-1b), 121.3 (C-5a), 121.0 (C-6a), 117.5-117.4 (d,  $J = 22.9$  Hz, C-3b and C-5b), 113.4 (C-3a).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  420, 262 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  416 nm

ESIHRMS:  $m/z$  257.0606, calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_3\text{F}$ : 253.0608

### 2-(4-Bromophenyl)-7,8-dihydrochromenylium perchlorate (**10**)



Starting reagents: 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyde (200 mg, 1.3 mmol) and 4-bromoacetophenone (259 mg, 1.3 mmol). Reaction time: 24 h. Treatment with 1,2-

dicloroethane and subsequent filtration afforded the 2-(4-Bromophenyl)-7,8-dihydroxychromenylium perchlorate (**10**) (250 mg, 46 %) as a red solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Acetone):  $\delta$  9.60 (d, 1H,  $J$  = 8.6 Hz, H-4a), 8.75 (d, 1H,  $J$  = 8.6 Hz, H-3a), 8.58 (d, 2H,  $J$  = 8.8 Hz, H-2b and H-6b), 8.08 (d, 1H,  $J$  = 8.9 Hz, H-6a), 8.04 (d, 2H,  $J$  = 8.8 Hz, H-3b and H-5b), 7.76 (d, 1H,  $J$  = 8.9 Hz, H-5a).

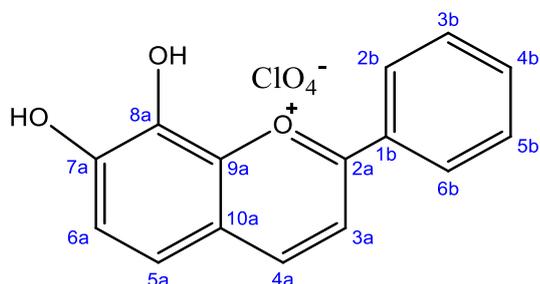
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Acetone):  $\delta$  171.3 (C-2a), 156.9 (C-7a), 133.4 (C-2b and C-6b), 132.9 (C-8a), 131.7 (C-9a), 131.0 (C-3b and C-5b), 129.6 (C-4a) 128.7 (C-1b), 126.4 (C-10a), 124.3 (C-4b), 121.4 (C-5a), 113.6 (C-6a), 113.5 (C-3a).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  418, 260 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  414 nm

ESIHRMS:  $m/z$  316.9807, calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_3\text{Br}$ : 316.9808

### 7,8-Dihydroxy-2-phenylchromenylium perchlorate (**11**)



Starting reagents: 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyde (200 mg, 1.3 mmol) and acetophenone (151  $\mu\text{l}$ , 1.3 mmol). Reaction time: 24 h. Treatment with diethyl ether and subsequent filtration afforded the 7,8-Dihydroxy-2-phenylchromenylium perchlorate (**11**) (250 mg, 57 %) as a red solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Acetone):  $\delta$  9.57 (d, 1H,  $J$  = 8.6 Hz, H-4a), 8.74 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, H-3a), 8.65 (d, 2H,  $J$  = 8.9 Hz, H-2b and H-6b), 8.07 (d, 1H,  $J$  = 8.9 Hz, H-6a), 7.94 (t, 1H,  $J$  = 7.4 Hz, H-4b), 7.84 (t, 2H,  $J$  = 7.8 Hz, H-3b and H-5b), 7.75 (d, 1H,  $J$  = 8.9 Hz, H-5a).

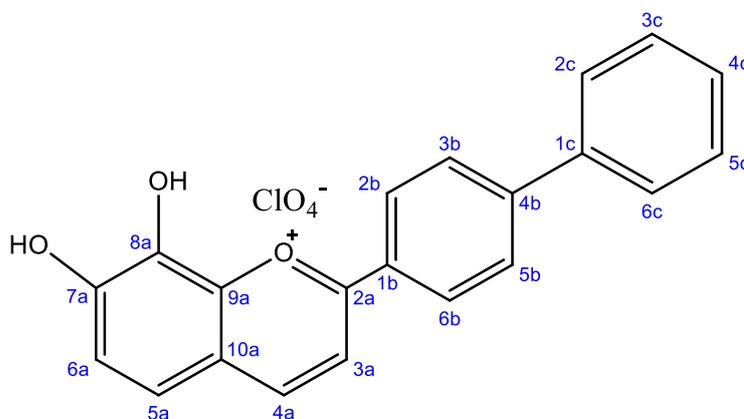
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Acetone):  $\delta$  172.4 (C-2a), 156.8 (C-7a), 147.7 (C-8), 133.1 (C-9a), 130.1 (C-2b and C-6b), 129.6 (C-3b and C-5b), 128.5 (C-4a) 128.0 (C-1b), 127.9 (C-10a), 124.1 (C-4b), 121.3 (C-5a), 121.2 (C-6a), 113.5 (C-3a).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  429, 277 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  413 nm

ESIHRMS:  $m/z$  239.0699, calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_3$ : 239.0703

### 2-(Biphenyl-4-yl)-7,8-dihydroxychromenylium perchlorate (**12**)



Starting reagents: 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyde (200 mg, 1.3 mmol) and 4-phenylacetophenone (254 mg, 1.3 mmol). Reaction time: 24 h. Treatment with diethyl ether and subsequent filtration afforded the 2-(Biphenyl-4-yl)-7,8-dihydroxychromenylium perchlorate (**12**) (260 mg, 48 %) as a dark green solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Acetone):  $\delta$  9.52 (d, 1H,  $J = 8.6$  Hz, H-4a), 8.75 (d, 1H,  $J = 8.6$  Hz, H-3a), 8.73 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz, H-2b and H-6b), 8.14 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz, H-3b and H-5b), 8.04 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz, H-6a), 7.88 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, H-2c and H-6c), 7.72 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz, H-5a), 7.58 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz, H-3c and H-5c), 7.52 (t, 1H,  $J = 7.3$  Hz, H-4c).

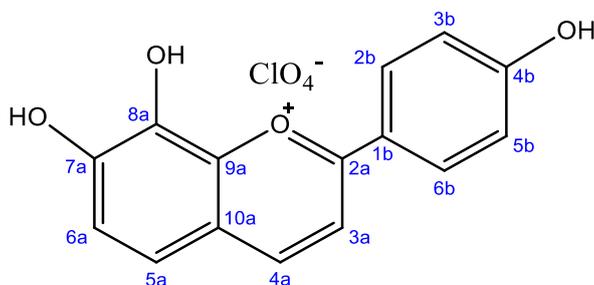
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Acetone):  $\delta$  172.0 (C-2a), 156.2 (C-7a), 148.4 (C-8a), 147.5 (C-9a), 138.5 (C-2b and C-6b), 130.4 (C-3b and C-5b), 129.3 (C-4b) 129.2 (C-2b and C-6b), 129.1 (C-1c), 129.0 (C-4c), 128.2 (C-2c and C-6c), 128.1 (C-4a), 127.3 (C-3c and C-6c), 124.0 (C-10a), 121.1 (C-5a), 121.0 (C-6a), 113.5 (C-3a).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  430, 271 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\max}$  414 nm

ESIHRMS:  $m/z$  315.1017, calcd for  $C_{21}H_{15}O_3$ : 315.1016

### 7,8-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromenylium perchlorate (13)



Starting reagents: 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyde (200 mg, 1.3 mmol) and 4-hydroxyacetophenone (200 mg, 1.3 mmol). Reaction time: 24 h. Treatment with diethyl ether and subsequent filtration afforded the 7,8-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromenylium perchlorate (13) (300 mg, 65 %) as a red solid.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, Acetone):  $\delta$  9.12 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, H-4a), 8.44 (d, 2H,  $J = 8.9$  Hz, H-3b and H-5b), 8.35 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, H-3a), 7.73 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, H-6a), 7.44 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz, H-5a), 7.09 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, H-2b and H-6b).

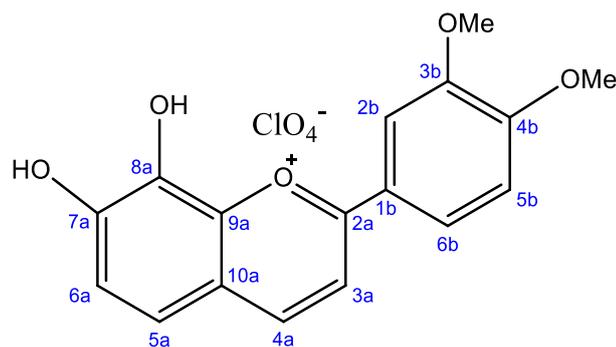
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.5 (C-2a), 166.1 (C-4b), 155.6 (C-7a), 154.5 (C-8a), 146.4 (C-9a), 133.2 (C-2b and C-6b), 133.1 (C-4a), 123.2 (C-10a), 120.6 (C-1b), 119.9 (C-5a), 119.5 (C-6a), 117.5 (C-3b and C-5b), 112.6 (C-3a).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\max}$  460, 281 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\max}$  412 nm

ESIHRMS:  $m/z$  255.0653, calcd for  $C_{15}H_{11}O_4$ : 255.0652

### 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-7,8-dihydroxychromenylium perchlorate (14)



Starting reagents: 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyde (200 mg, 1.3 mmol) and 3,4-dimethoxyacetophenone (233 mg, 1.3 mmol). Reaction time: 24 h. Treatment with diethyl ether and subsequent filtration afforded the 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-7,8-dihydroxychromenylium perchlorate (**14**) (120 mg, 23 %) as a red solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Acetone):  $\delta$  9.28 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, H-4a), 8.60 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, H-3a), 8.36 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, H-6a), 8.07 (s, 1H, H-2b), 7.90 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, H-5a), 7.61 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, H-5b), 7.38 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, H-6b), 4.07 (s, 3H, OMe), 4.04 (s, 3H, OMe).

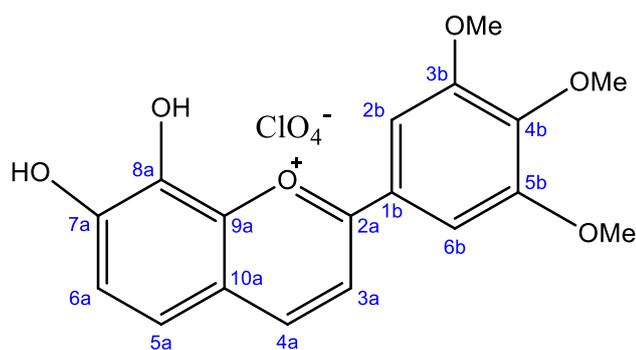
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Acetone):  $\delta$  172.1 (C-2a), 157.7 (C-3b), 154.5 (C-4b), 150.4 (C-7a), 146.7 (C-8a), 126.2 (C-9a), 123.4 (C-4a), 121.5 (C-10a), 121.4 (C-6b), 120.1 (C-2b), 119.7 (C-1b), 113.1 (C-5a), 112.6 (C-6a), 111.4 (C-5b), 111.3 (C-3a), 56.1 (C-OMe), 55.81 (C-OMe).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  466, 282 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  415 nm

ESIHRMS:  $m/z$  299.0912, calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_5$ : 299.0914

### 7,8-Dihydroxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromenylium perchlorate (**15**)



Starting reagents: 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyde (200 mg, 1.3 mmol) and 3,4,5-trimethoxyacetophenone (272 mg, 1.3 mmol). Reaction time: 24 h. Treatment with diethyl ether and subsequent filtration afforded the 7,8-Dihydroxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromenylium perchlorate (**15**) (115 mg, 21 %) as a red solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Acetone):  $\delta$  9.41 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, H-4a), 8.73 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, H-3a), 7.98 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz, H-6a), 7.95 (s, 2H, H-2b and H-5b), 7.67 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, H-5a), 4.06 (s, 6H, OMe (3b and 5b)), 4.01 (s, 3H, OMe (4b)).

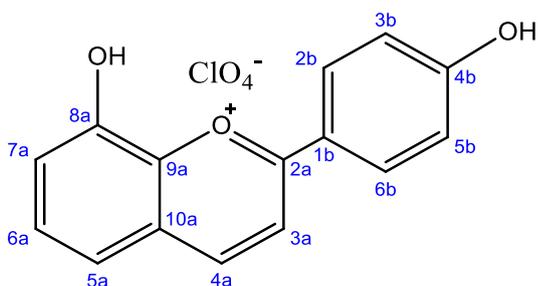
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Acetone):  $\delta$  171.9 (C-2a), 156.4 (C-4b), 155.4 (C-7a), 154.1 (C-3b and C-5b), 147.3 (C-8a), 146.5 (C-9a), 132.9 (C-4a), 123.8 (C-2b and C-6b), 120.7 (C-10a), 120.4 (C-5a), 113.70 (C-6a), 107.8 (C-2b and C-6b), 105.9 (C-3a), 60.50 (OMe 4b), 56.2 [(OMe (positions 3b and 5b))]

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  470, 285 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  413 nm

ESIHRMS:  $m/z$  329.1018, calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_6$ : 329.1020

### 8-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromenylium perchlorate (**16**)



Starting reagents: 2,3-Dihydroxybenzaldehyde (200 mg, 1.4 mmol) and 4-hydroxyacetophenone (196 mg, 1.4 mmol). Reaction time: 24 h. Treatment with DCM and subsequent filtration afforded the 8-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromenylium perchlorate (**16**) (390 mg, 88 %) as a red solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  9.33 (d, 1H,  $J = 9.3$  Hz, H-4a), 8.78 (d, 1H,  $J = 8.6$  Hz, H-3a), 8.56 (d, 2H,  $J = 9.1$  Hz, H-3b and H-5b), 7.72 (m, 2H,  $J = 5.1$  Hz, H-7a and H-6a), 7.65 (q, 1H,  $J = 2.9$  Hz, H-5a), 7.18 (d, 2H,  $J = 8.6$  Hz, H-2b and H-6b).

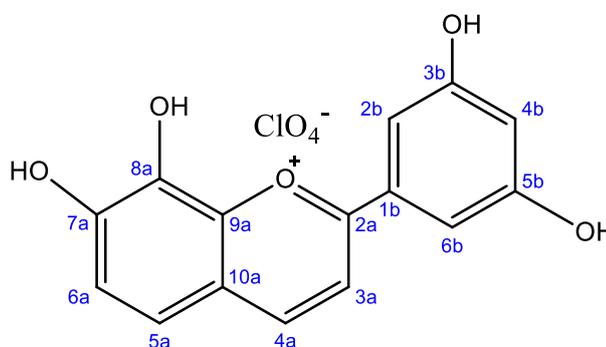
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, Acetone):  $\delta$  174.4 (C-2a), 167.4 (C-4b), 154.8 (C-8a), 134.4 (C-2b and C-6b), 130.6 (C-9a), 130.0 (C-4a), 125.0 (C-10a), 123.0 (C-1b), 120.6 (C-5a), 120.4 (C-6a), 117.9 (C-3b and C-6b), 117.2 (C-3b and C-7a), 115.0 (C-3a).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  458, 281 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  413 nm

ESIHRMS:  $m/z$  255.0653, calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_4$ : 255.0652

### 2-(3,5-Dihydroxyphenyl)-7,8-dihydrochromenylium perchlorate (**17**)



Starting reagents: 2,3,4-Trihydroxybenzaldehyde (200 mg, 1.3 mmol) and 3,5-dihydroxyacetophenone (197 mg, 1.3 mmol). Reaction time: 24 h. Treatment with 1,2-dichloroethane and subsequent filtration afforded the 2-(3,5-Dihydroxyphenyl)-7,8-dihydrochromenylium perchlorate (**17**) (88 mg, 18 %) as a red solid.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, Acetone):  $\delta$  9.50 (d, 1H,  $J = 8.6$  Hz, H-4a), 8.59 (d, 1H,  $J = 8.6$  Hz, H-3a), 8.03 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz, H-6a), 7.73 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz, H-5a), 7.55 (d, 4H,  $J = 2.1$  Hz, 2H, H-2b and H-6b), 6.90 (t, 1H,  $J = 2.1$  Hz, H-4b).

ESIHRMS:  $m/z$  271.0605, calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_5$ : 271.0601

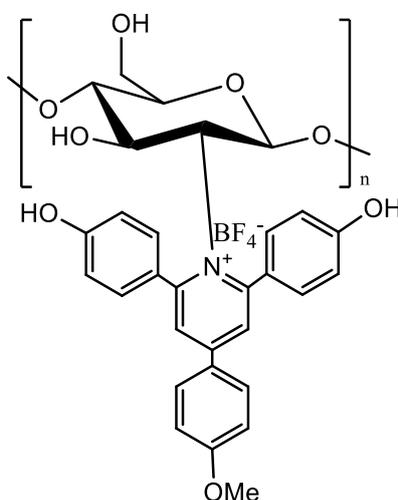
## 5.5. Synthesis and characterization of quinolinium and pyridinium salts derived of chitosan

### General procedure

To a solution of CS (100 mg) in aqueous acetic solution (25 ml, pH 4.0-4.6), a solution of pyrylium salt /3-desoxyanthocyanin (0,30 mmol) in MeOH (50 ml) was

added. The resulting solution was heated to 65° C until it was noted by TLC (using MeOH as eluent) absorption at UV (254 nm) at the origin, that indicating the incorporation of the aromatic unit to the polymer. After completion, the reaction mixture was left to reach the room temperature and then was treated with 4 M NaOH (pH 11.8-12.5). The resulting solid was filtered off and successively washed with H<sub>2</sub>O (2x2 mL), EtOH (2x2 mL), DCM (2x3 mL) and acetone (2x2 mL) to afford the corresponding chitosan-pyridinium/quinolinium salt.

***N*-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-2,6-bis(4-hydroxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)pyridinium tetrafluoroborate (**18**)**



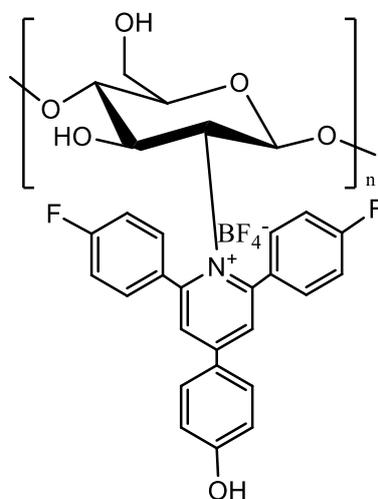
Application of the general procedure to **CS** and pyridinium tetrafluoroborate salt **1**, after 1 week, afforded *N*-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-2,6-bis(4-hydroxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)pyridinium tetrafluoroborate (**18**) (77 mg, 86 %) as a pale yellow solid.

<sup>1</sup>H NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1): δ 9.31 (s, 2H, H-3' and H-5'), 8.30-7.37 (m, 8H, H<sub>Ar</sub>), 4.94 (m, 1H, H-1), 4.10-3.49 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b and OMe), 3.26 (s, 1H, H-2), 2.09 (s, 1H, NCOCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C CPMAS NMR (150.9 MHz): δ 174.7 (C=O, NAc), 153.1-1277.1 (C<sub>Ar</sub>), 105.3 (C1), 88.1-71.0 (C3-C6), 60.1 (C2 and OMe), 23.9 (NCOCH<sub>3</sub>).

(DS by <sup>1</sup>H NMR: 0,46 %)

***N*-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-2,6-bis(4-fluorophenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)pyridinium tetrafluoroborate (19)**



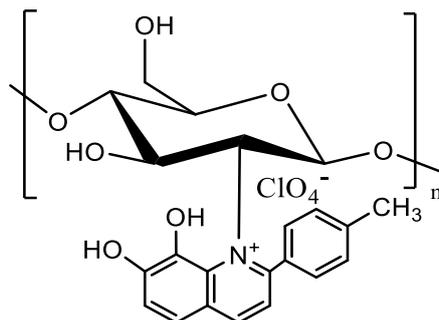
Application of the general procedure to **CS** and pyridinium tetrafluoroborate salt **6**, after 1 week, afforded *N*-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-2,6-bis(4-fluorophenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)pyridinium tetrafluoroborate (70 mg, 78 %) as a pale yellow solid.

<sup>1</sup>H NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1): δ 9.30-8.26 (m, 14H, H<sub>Ar</sub>), 4.91 (m, 1H, H-1), 4.22-3.42 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 3.22 (s, 1H, H-2), 2.09 (s, 1H, NCOCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C CPMAS NMR (150.9 MHz): δ 174.7 (C=O, NAc), 153.1-130.1 (C<sub>Ar</sub>), 104.2 (C1), 90.3-70.2 (C3-C6), 59.2 (NCOCH<sub>3</sub>).

(DS by <sup>1</sup>H NMR: 0,3 %)

***N*-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-7,8-dihydroxy-2-(*p*-tolyl)quinolinium perchlorate (20)**



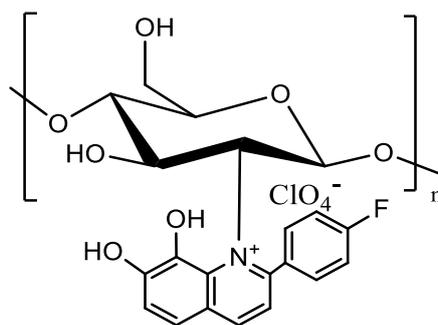
Application of the general procedure to **CS** and 3-desoxyanthocyanin **8**, after 1 week, afforded N-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-7,8-dihydroxy-2-(p-tolyl)quinolinium perchlorate (**20**) (87 mg, 97%) as a brown solid.

<sup>1</sup>H NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1): δ 8.00-6.30 (m, 8H, H<sub>Ar</sub>), 5.03 (m, 1H, H-1), 4.19-3.53 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 3.32 (s, 1H, H-2), 2.08 (s, 1H, CH<sub>3</sub>(Nac)), 2.08 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C CPMAS NMR (150.9 MHz): δ 174.9 (C=O, NAc), 151.0-124.3 (C<sub>Ar</sub>), 105.1 (C1), 89.1-68.0 (C3-C6), 61.8 (C2), 21.6 (CH<sub>3</sub> of -NCOCH<sub>3</sub> and CH<sub>3</sub> of anthocyanin).

(DS by <sup>1</sup>H NMR: 14 %)

**N-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-2-(4-fluorophenyl)-7,8-dihydroxyquinolinium perchlorate (21)**



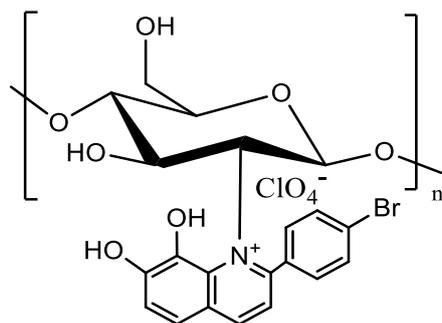
Application of the general procedure to **CS** and 3-desoxyanthocyanin **9** after 1 week, afforded N-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-2-(4-fluorophenyl)-7,8-dihydroxyquinolinium perchlorate (**21**) (85 mg, 95 %) as a brown solid.

<sup>1</sup>H NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1): δ 7.56-7.00 (m, 8H, H<sub>Ar</sub>), 4.97 (m, 1H, H-1), 4.09-3.55 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 3.27 (s, 1H, H-2), 2.10 (s, 1H, NCOCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C CPMAS NMR (150.9 MHz): δ 174.3 (C=O, NAc), 168.0-115.3 (C<sub>Ar</sub>), 105.2 (C1), 89.1-68.0 (C3-C6), 61.8 (C2), 23.7 (NCOCH<sub>3</sub>).

(DS by <sup>1</sup>H NMR: 2 %)

**N-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydroxyquinolinium perchlorate (22)**



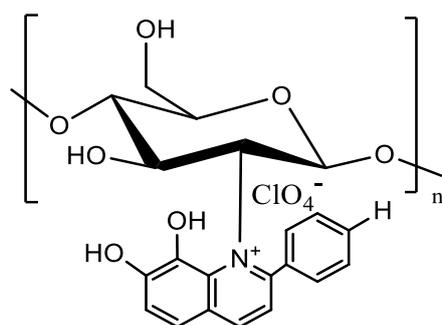
Application of the general procedure to **CS** and 3-desoxyanthocyanin **10**, after 1 week, afforded *N*-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydroxyquinolinium perchlorate (**22**) (82 mg, 91 %) as a brown solid.

<sup>1</sup>H NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1): δ 8.07-7.52 (m, 8H, H<sub>Ar</sub>), 4.99 (m, 1H, H-1), 4.27-3.50 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 3.29 (s, 1H, H-2), 2.11 (s, 1H, NCOCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C CPMAS NMR (150.9 MHz): δ 174.1 (C=O, NAc), 142.0-124.1 (C<sub>Ar</sub>), 105.3 (C1), 89.1-68.0 (C3-C6), 61.8 (C2), 23.4 (NCOCH<sub>3</sub>).

(DS by <sup>1</sup>H NMR: 2,5 %)

*N*-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-7,8-dihydroxy-2-phenylquinolinium perchlorate (**23**)



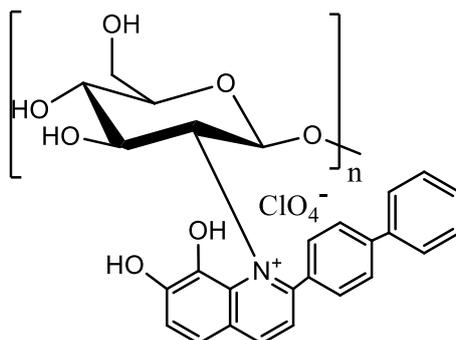
Application of the general procedure to **CS** and 3-desoxyanthocyanin **11**, after 1 week, afforded compound *N*-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-7,8-dihydroxy-2-phenylquinolinium perchlorate (**23**) (88 mg, 99%) as a brown solid.

<sup>1</sup>H NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1): δ 7.89-7.16 (m, 9H, H<sub>Ar</sub>), 4.99 (m, 1H, H-1), 4.22-3.52 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 3.30 (s, 1H, H-2), 2.12 (s, 1H, NCOCH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  CPMAS NMR (150.9 MHz):  $\delta$  174.2 (C=O, NAc), 145.0-124.3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 105.2 (C1), 91.1-68.0 (C3-C6), 61.2 (C2), 23.4 (NCOCH<sub>3</sub>).

(DS by  $^1\text{H}$  NMR: 4 %)

***N*-[(1 $\rightarrow$ 4)-2-Desoxy- $\beta$ -D-glucanyl]-2-([biphenyl]-4-yl)-7,8-dihydroxyquinolinium perchlorate (**24**)**



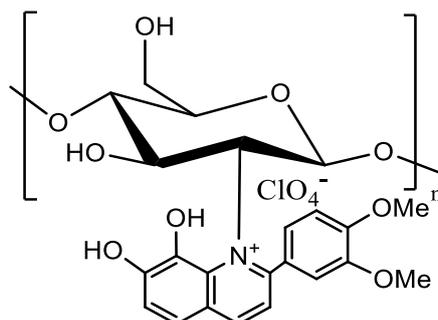
Application of the general procedure to **CS** and 3-desoxyanthocyanin **12**, after 1 week, afforded *N*-[(1 $\rightarrow$ 4)-2-Desoxy- $\beta$ -D-glucanyl]-2-([biphenyl]-4-yl)-7,8-dihydroxyquinolinium perchlorate (**24**) (70 mg, 77%) as a brown solid.

$^1\text{H}$  NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1):  $\delta$  8.00-7.33 (m, 13H, H<sub>Ar</sub>), 4.99 (m, 1H, H-1), 4.22-3.79 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 3.30 (s, 1H, H-2), 2.12 (s, 1H, NCOCH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  CPMAS NMR (150.9 MHz):  $\delta$  174.3 (C=O, NAc), 146.0-123.0 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 105.2 (C1), 89.1-68.0 (C3-C6), 61.8 (C2), 23.7 (NCOCH<sub>3</sub>).

(DS by  $^1\text{H}$  NMR: 2,3 %)

***N*-[(1 $\rightarrow$ 4)-2-Desoxy- $\beta$ -D-glucanyl]-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-7,8-dihydroxyquinolinium perchlorate (**25**)**



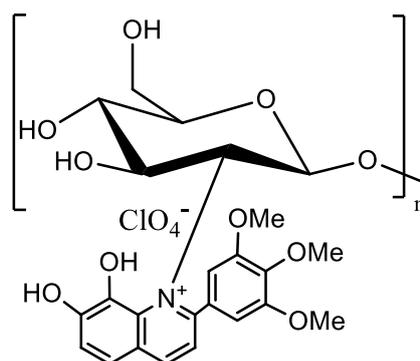
Application of the general procedure to **CS** and 3-desoxyanthocyanin **14**, after 1 week, afforded N-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-7,8-dihydroxy perchlorate (**25**) (72 mg, 80%) as a black solid.

<sup>1</sup>H NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1): δ 7.41-7.0 (m, 7H, H<sub>Ar</sub>), 4.95 (m, 1H, H-1), 4.24-3.47 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b and 2 OMe), 3.26 (s, 1H, H-2), 2.10 (s, 1H, NCOCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C CPMAS NMR (150.9 MHz): δ 174.3 (C=O, NAc), 157.0-146.0 (C<sub>Ar</sub>), 105.3 (C1), 90.1-68.0 (C3-C6), 57.8 (C2 and OMe), 25.7 (NCOCH<sub>3</sub>).

(DS by <sup>1</sup>H NMR: 0,28 %)

**N-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-7,8-dihydroxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)quinolinium perchlorate (26)**



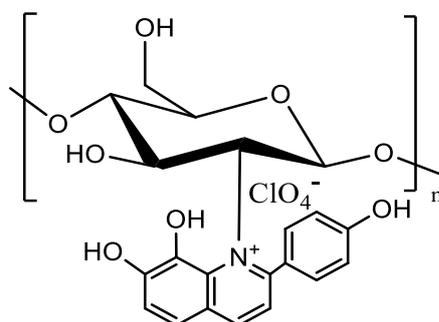
Application of the general procedure to **CS** and 3-desoxyanthocyanin **15**, after 1 week, afforded N-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-7,8-dihydroxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)quinolinium perchlorate (**26**) (75 mg, 83 %) as a brown solid.

<sup>1</sup>H NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1): δ 7.51-7.00 (m, 6H, H<sub>Ar</sub>), 4.95 (m, 1H, H-1), 4.19-3.58 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b and 3 OMe), 3.26 (s, 1H, H-2), 2.10 (s, 1H, NCOCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C CPMAS NMR (150.9 MHz): δ 174.3 (C=O, NAc), 154.1-130.0 (C<sub>Ar</sub>), 104.3 (C1), 90.1-68.0 (C3-C6), 59.1 (C2 and OMe), 25.7 (NCOCH<sub>3</sub>).

(DS by <sup>1</sup>H NMR: 1,3 %)

***N*-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-7,8-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)quinolinium perchlorate (27)**



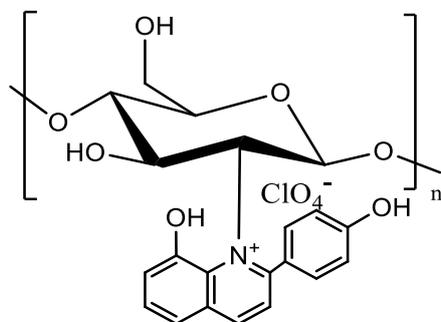
Application of the general procedure to **CS** and 3-desoxyanthocyanin **13**, after 1 week, afforded *N*-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-7,8-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)quinolinium perchlorate (**27**) (83 mg, 92%) as a black solid.

<sup>1</sup>H NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1): δ 8.30-6.89 (m, 8H, H<sub>Ar</sub>), 4.94 (m, 1H, H-1), 4.22-3.46 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 3.25 (s, 1H, H-2), 2.09 (s, 1H, NCOCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C CPMAS NMR (150.9 MHz): δ 174.8 (C=O, NAc), 165.1-118.1 (C<sub>Ar</sub>), 105.7 (C1), 88.1-71.0 (C3-C6), 60.1 (C2 and OMe), 23.7 (NCOCH<sub>3</sub>).

(DS by <sup>1</sup>H NMR: 3,2 %)

***N*-[(1→4)-2-Desoxy-β-D-glucanyl]-8-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)quinolinium perchlorate (28)**



Application of the general procedure to **CS** and 3-desoxyanthocyanin **16**, after 1 week, afforded N-[(1→4)-2-Desoxi-β-D-glucanyl]-8-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)quinolinium perchlorate (**28**) (83 mg, 92%) as a black solid.

<sup>1</sup>H NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1): δ 9.31-7.00 (m, 9H, H<sub>Ar</sub>), 4.94 (m, 1H, H-1), 4.20-3.45 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 3.25 (s, 1H, H-2), 2.09 (s, 1H, NCOCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C CPMAS NMR (150.9 MHz): δ 174.3 (C=O, NAc), 160.1-140.0 (C<sub>Ar</sub>), 104.3 (C1), 90.1-68.0 (C3-C6), 60.1 (C2 and OMe), 25.7 (NCOCH<sub>3</sub>).

(DS by <sup>1</sup>H NMR: 2 %)

## 5.6. Biological activity

### 5.6.1. Antioxidant activity (DPPH method)

The antiradical activity of the 3-desoxyanthocyanins and pyrylium salts were measured using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) following the procedure reported by Prior, Wu, and Schaich (2005).<sup>168</sup> The assays were performed in a Hitachi U-2900 spectrophotometer (Tokio, Japan), using PS cuvettes. To a 60 μM methanolic solution of DPPH (HPLC-grade, 1.17 ml) was added the methanolic solution of the extract (30 μl, 7 different concentrations), or pure methanol as the control was added. The corresponding mixtures were kept in the darkness at rt for 30 min and then, the absorbance was measured at 515 nm against a blank (MeOH). Plotting the values of DPPH remaining vs. extract concentration allows a straight line from which the EC<sub>50</sub> (the concentration of the antioxidant required to reduce the concentration of the DPPH to 50% of its initial value) is calculated. All measurements were carried out in triplicate. The remaining DPPH concentration was calculated using the expression:

$$\%DPPH \text{ remaining} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A<sub>sample</sub> and A<sub>control</sub> refer to the absorbances at 515 nm of DPPH in the sample and control solutions, respectively.

### 5.6.2. Antiproliferative activity and cytotoxicity

Cell Lines. A549 cell line (human non-small cell lung cancer) was purchased from European Collection of Cell Cultures. HaCaT cell line (human keratinocyte) was generously provided by Dr. Motilva. Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 10% fetal bovine serum. All cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

*Cell Proliferation Assay.* The resazurin assay is a colorimetric/fluorometric technique used for the quantitative determination of cell viability. Viable cells have the capability to transform the blue compound resazurin into the pink, fluorescent product resorufin. Exponentially growing cells were seeded into 96-well plates. Twenty-four hours after plating, cells were treated with the tested drugs for 72 hr. After treatment, medium was removed, and 150 µL resazurin (20 µg/mL in medium) were added to each well for 5 h. After that, optical densities were measured at 540 nm and 620 nm on a multi-well plate spectrophotometer reader. Results were expressed as percentage of cell viability in relation to controls. All data were averaged from three independent experiments and were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

### 5.6.3. Antibacterial activity

Five different bacterial strains were used throughout the present work:

a) Gram positive bacteria: *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*.

b) Gram negative bacteria: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*.

The compounds analyzed in this study were pyrylium salts (**1-7**), flavylium salts (**8-16**), pyridinium and quinolinium salts derived of chitosan (**18-28**) and commercial chitosan described in raw materials. Stock solution of 15 mM in DMSO was previously prepared for each pyrylium and flavylium salts. Then, it was diluted until concentration 1,5 mM, adding 2 µL of mother solution in 18 µL of water. Control negative was prepared in the same way, adding 2 µL of DMSO in 18 µL of water.

To determine the antibacterial activity of the different compounds, the bacteria were cultivated in common agar medium with agitation for 24 hours at 37 °C. Subsequently, 100 µL of the grown cultures diluted 1/10 with sterile distilled water were spread on the surface of a Petri dish containing solid common agar medium (common agar medium + 2% agar). Once dry, the plates were divided in different zones and a 5 µL drop of 1,5 mM solution, for each compound, was added. Moreover, a drop of the solvent used as a control was included in each plate to check that there were no contaminations and, in the case of DMSO, that it had no inhibitory effect on microbial growth. In the case of chitosan and pyrylium and flavylium salts derived of it, 2 mg of each compound was added in the plate. Once the drop was dry, the plates were incubated at 37 °C for 24 hours. After incubation time, bacterial growth inhibition halos around the drop were analyzed. The trials were performed at least in duplicate.

# CAPÍTULO 2

*Desarrollo de compuestos organoselénicos  
con aplicación farmacológica potencial*

## 1. Antecedentes

### 1.1. Propiedades y beneficios del selenio

El selenio es un elemento traza esencial en pequeñas cantidades para el ser humano y los animales, pero como todos los elementos esenciales puede ser tóxico a niveles más elevados. A diferencia de las plantas, la mayoría de los animales requieren selenio para el funcionamiento correcto de un cierto número de enzimas dependientes del mismo, denominadas selenoproteínas. La ingesta diaria recomendada actualmente de este compuesto, establecida por el Instituto de Medicina de los EE.UU. es de 55 µg/día para adolescentes y adultos, siendo el nivel máximo de ingesta tolerable de 400 µg/día.

El selenio ha pasado, en pocos años, de considerarse un elemento tóxico a atribuírsele notables efectos para la salud humana, desde funciones antioxidantes y de regulación hormonal de tiroides a efectos anticancerígenos constatados. Fue descubierto en 1817 por Berzelius y Gahn.<sup>180</sup> En los años 30 era considerado como un metal pesado tóxico, que en grandes cantidades podía conducir a la muerte de organismos vivos.<sup>181</sup> En 1943, Nelson y colaboradores publicaron que las altas dosis de este elemento podían tener efectos cancerígenos en la salud humana,<sup>182</sup> pero unos cuantos años más tarde Clayton y Baumann encontraron que la administración de suplementos de selenio en dosis adecuadas reducía el número de casos tumorales.<sup>183</sup> El rol de selenio como elemento traza esencial se publicó por primera vez en 1957 mediante un estudio en el que la adición de selenio en la comida de ratas, objeto del experimento, previno la necrosis de su hígado.<sup>184</sup> La relación entre el selenio y las enzimas fue estudiada en 1973<sup>185</sup> y a partir de ahí surgieron más estudios como: el hallazgo de la glicina reductasa y la glutatión peroxidasa encontrada en mamíferos y bacterias<sup>186</sup> y la identificación de la selenocisteína como un aminoácido organoselénico.<sup>187</sup>

---

<sup>180</sup> Tóth, R. J.; Csapó, J. *Acta Univ. Sapientiae, Aliment.* **2018**, *11*, 128-144.

<sup>181</sup> Vernie, L.N. *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, *738*, 203-217.

<sup>182</sup> Nelson, A. A.; Fitzhugh, O.; Calvery, H. *Cancer Res.* **1943**, *3*, 230-236.

<sup>183</sup> Clayton, C. C.; Bauman, C. A. *Cancer Res.* **1949**, *9*, 575-580.

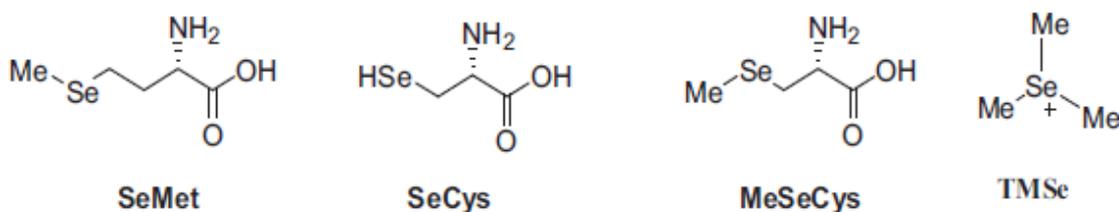
<sup>184</sup> Schwarz, K.; Foltz, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3292-3296.

<sup>185</sup> Turner, D. C.; Stadtman, T. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *154*, 366-381.

<sup>186</sup> Rotruck, J. T.; Pope, A. L.; Ganther, H. E.; Swanson, A. B.; Hafeman, D. G.; Hoekstra, W. G. *Science* **1973**, *179*, 588-590.

<sup>187</sup> Cone, J.E.; Del Rio, M. R.; Davis, J. N.; Stadtman, T. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1973**, *73*, 2659-2663.

La biodisponibilidad del selenio es variada: en los alimentos se encuentra principalmente como selenometionina (SeMet), selenocisteína (SeCys) y metilselenocisteína (MeSeCys) (Figura 29), que forman parte de proteínas, mientras que las formas inorgánicas selenito ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) o selenato ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ), se encuentran en cantidades más bajas.<sup>188,189</sup> El organismo utiliza ambas formas con la misma eficacia en la biosíntesis de selenoproteínas, pero se incorporan en diferentes puntos de la ruta metabólica.



**Figura 29.** Formas orgánicas del selenio en los alimentos

Desde un punto de vista biológico, estudios epidemiológicos en humanos, así como ensayos de laboratorio, apoyan el papel protector del selenio frente al desarrollo del cáncer.<sup>190,191</sup> Resultados han demostrado que un suplemento de selenio en la dieta de 200  $\mu\text{g}/\text{día}$  inhibe la proliferación de células cancerígenas, induce la apoptosis de células tumorales, suprime la metástasis en animales<sup>192</sup> y reduce el riesgo de cáncer de próstata (en un 63 %),<sup>193</sup> de pulmón, de pecho y colorrectal en humanos.<sup>194</sup> También se ha demostrado su carácter preventivo sobre algunas patologías relacionadas con la edad debido a su carácter antioxidante, antiinflamatorio y descontaminante de metales pesados.<sup>195</sup>

Sin embargo, pese a los estudios mostrados con anterioridad, existen ciertas contradicciones sobre el selenio y el cáncer. Por una parte, existe la idea original de que el selenio podría ayudar a prevenir el cáncer ya que éste, al ser parte de las enzimas

<sup>188</sup> Finley, J. W. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 1620-1629.

<sup>189</sup> Suzuki, K. T.; Kurasaki, K.; Ogawa, S.; Suzuki, N. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *215*, 189-197.

<sup>190</sup> Thomson, C. D. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2004**, *58*, 391-402.

<sup>191</sup> Terazawa, R.; Garud, D. R.; Hamada, N.; Fujita, Y.; Itoh, T.; Nozawa, Y.; Nakan, K.; Deguchi, T.; Koketsu, M.; Ito, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7001-7008.

<sup>192</sup> Ibáñez, E.; Plano, D.; Font, M.; Calvo, A.; Prior, C.; Palop, J. A.; Sanmartín, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 265-274.

<sup>193</sup> Clark, L. C.; Combs, G. F., Jr.; Turnbull, B. W.; Slate, E. H.; Chalker, D. K.; Chow, J. *et al. J. Am. Med. Assoc.* **1996**, *276*, 1957-1963.

<sup>194</sup> Tanaka, T.; Kohno, H.; Murakami, M.; Kagami, S.; El-Bayoumy, K. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3713-3716.

<sup>195</sup> Duntas, L. H.; Hubalewska-Dydejczyk, A. *US Endocrinology.* **2015**, *11*, 97-102.

antioxidantes, podría ayudar a prevenir el daño oxidativo al ADN provocado por los radicales libres y las ROS, evitando de esta forma que se origine el cáncer. Sin embargo, el selenio también puede usarse como arma contra el cáncer empleando un mecanismo totalmente opuesto, como sería la generación de esas especies oxidativas. Los selenatos, selenitos y ácido metanoselénico son especies oxidantes que pueden reaccionar con el oxígeno molecular para producir superóxido, y el superóxido puede empujar a la célula cancerosa a un “ambiente oxidativo” en el cuál la célula no pueda recuperarse, sufriendo finalmente la apoptosis. Por tanto, se pueden apreciar “dos caras del selenio”, como antioxidante y como oxidante frente al cáncer.<sup>196</sup>

Desde un punto de vista químico, las propiedades de los compuestos de azufre y sus análogos de selenio han llamado la atención de muchos químicos interesados en el selenio, a menudo con la intención de identificar propiedades químicas que pudieran hacer que los compuestos de selenio fueran útiles. En muchos aspectos, el azufre y el selenio tienen propiedades físicas y químicas muy similares: comparten los mismos estados de oxidación y tipos de grupos funcionales, y sus estructuras son a menudo tan similares que los compuestos análogos pueden cristalizarse de manera sencilla. Sin embargo, estos dos anfígenos presentan también diferencias químicas muy significativas:

La mayoría de las diferencias existentes entre el selenio y el azufre son consecuencia de los cambios habituales que tienen lugar al pasar de elementos más ligeros a más pesados en el mismo grupo de la tabla periódica. Los elementos más pesados son más polarizables (“más blandos”) que aquellos más livianos, y esto generalmente conduce a que se produzcan sustituciones electrofílicas y nucleofílicas más rápidas en el elemento. La mayoría de los enlaces de selenio son más débiles que los del azufre, y esto tiene como consecuencia que aquellas reacciones que involucran la ruptura de estos enlaces se den sustancialmente más rápido en el caso del selenio. Además, los enlaces más débiles de selenio implican que el orbital  $\sigma^*$  del enlace Se-X es menor en energía que el enlace S-X y, por tanto, más reactivo como aceptor de electrones. Por ello, todos los estados de oxidación del selenio son mucho más electrofílicos en comparación con los análogos del azufre. Además, el aumento de la polarización, unido al aumento del tamaño y a la formación de enlaces de hidrógeno

---

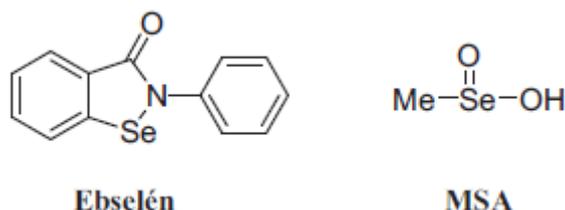
<sup>196</sup> Reich, H.J.; Hondal, R.J. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 4, 821–841.

más débiles conduce a una basicidad sustancialmente menor de los selenolatos frente a los tiolatos de entre 3 y 4 unidades de  $pK_a$ , que a su vez deriva en una mejor habilidad de los selenolatos como grupos saliente. Otro hecho destacable es que el mayor tamaño del selenio con respecto al azufre (el radio atómico del selenio es de 115 pm mientras que el de azufre es de 100 pm) da lugar a orbitales híbridos más grandes que, sumado a la mayor longitud de enlace conduce a un menor solapamiento  $\pi$ . También se observa generalmente que los estados de oxidación más altos se vuelven relativamente menos estables para los elementos más pesados, y esto ocurre también para el caso del selenio y el azufre. Asimismo, los elementos más pesados son también más susceptibles a dar lugar a enlaces hipervalentes.

Finalmente, la mayor diferencia entre la química del selenio y el azufre se produce en las reacciones redox de ambos elementos, tanto para los procesos que involucran el intercambio de dos electrones como para los de un electrón. Como se comentó con anterioridad, una de las consecuencias de la mayor longitud de enlace de los elementos pesados es una menor habilidad para formar enlaces  $\pi$  de todos los tipos. Tanto el azufre como el selenio son buenos nucleófilos que reaccionan con ROS y, al hacerlo, se oxidan. Los S-óxidos y los Se-óxidos que se forman en este proceso presentan diferencias muy notables en cuanto a sus reactividades químicas, debido en gran parte a un enlace  $\pi$  muy débil en el Se-óxido. Como consecuencia de este enlace tan débil, los Se-óxidos tienen una capacidad mucho mayor para reducirse más rápidamente que los análogos de azufre. La capacidad del selenio para oxidarse rápidamente y luego reducirse también de forma rápida se ha denominado la “paradoja del selenio”. La evidencia de esta paradoja proviene de la funcionalidad que el selenio confiere a las selenoenzimas naturales y artificiales, ya que les confiere resistencia a la inactivación por oxidación como lo demuestran numerosos estudios.

En el campo de la Síntesis Orgánica, el selenio comienza a recibir atención a partir de la década de los 70, cuando se empieza a emplear en un amplio número de transformaciones dentro de la química de los alcaloides, esteroides, terpenoides, antibióticos y carbohidratos, a raíz de que se comenzasen a demostrar sus efectos positivos en el organismo. Sin embargo, anteriormente la atención estaba puesta en los compuestos de azufre, debido a que la estabilidad de los compuestos organoselénicos era menor, siendo característico en muchos de ellos su deposición como selenio rojo como consecuencia de la exposición continuada a la luz.

En las últimas décadas existen numerosos ejemplos que confirman las interesantes propiedades biológicas de los compuestos organoselénicos, entre los que cabe destacar el ebselén<sup>197</sup> y el ácido metilselenínico (MSA) (Figura 30). Ambos compuestos son considerados potenciales agentes anticancerígenos.<sup>198,199</sup> Además, el ebselén ha mostrado citoprotección de corazón<sup>200</sup> y cerebro,<sup>201,202</sup> y utilidad en el tratamiento de la apoplejía isquémica.<sup>203</sup> Se ha demostrado también que el ebselén actúa como mimético de las enzimas glutatión peroxidasa y de la fosfolípido-hidroperóxido-glutatión peroxidasa<sup>204</sup> eliminando hidroperóxidos y lipoperóxidos.



**Figura 30.** Estructuras químicas de ebselén y ácido metilselenínico

Otros compuestos organoselénicos que han sido sintetizados más recientemente con marcada actividad biológica son: selenoazúcares, selenoureas, selenohidantoínas y selenocarbamatos.<sup>205,206</sup>

## 1.2. Sales de selenopirilio: reactividad, estrategias sintéticas y aplicaciones

A pesar de la estrecha relación entre el selenio y el azufre en la química y biología, la síntesis de los heterociclos que contienen selenio apenas ha sido explorada en comparación con aquellos que contienen azufre.<sup>207</sup> Esto puede deberse a la alta

<sup>197</sup> Noguchi, N. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *595*, 109–112.

<sup>198</sup> Yamaguchi, K.; Uzzo, R. G.; Pimkina, J.; Makhov, P.; Golovine, K.; Crispen, P.; Kolenko, V. M. *Oncogenesis* **2005**, *24*, 5868–5877.

<sup>199</sup> Abdulah, R.; Miyazaki, K.; Nakazawa, M.; Koyama, H. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2005**, *19*, 141–150.

<sup>200</sup> Maulik, N.; Yoshida, T.; Das, D. K. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *24*, 869–875.

<sup>201</sup> Steinmetzer, T.; Pilgram, O.; Wenzel, B. M.; Wiedemeyer, S. J. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 1445–1472.

<sup>202</sup> Takasago, T.; Peters, E. E.; Graham, D. I.; Masayasu, H.; Macrae, I. M. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 1251–1256.

<sup>203</sup> Seo, J. Y.; Lee, C. H.; Cho, J. H.; Choi, J. H.; Yoo, K. Y.; Kim, D. W.; Park, O. K.; Li, H.; Choi, S. Y.; Hwang, I. K.; Won, M. H.; *J. Neurol. Sci.* **2009**, *285*, 88–94.

<sup>204</sup> Müller, A.; Cadenas, E.; Graf, P.; Sies, H. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 3235–3239.

<sup>205</sup> Olsen, J.I.; Plata, G.; Padrón, J.M.; López, O.; Bols, M.; Fernández-Bolaños, J.G. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *123*, 155–160.

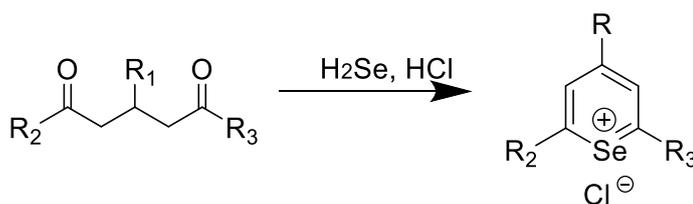
<sup>206</sup> Bartolini, D.; Sancineto, L.; Fabro de Bem, A.; Tew, K.D.; Santi, C.; Radi, R.; Toquato, P.; Galli, F. *Adv. Cancer Res.* **2017**, *136*, 259–302.

<sup>207</sup> Devillanova, F. A.; du Mont, W.W. *Handbook of Chalcogen Chemistry: New Perspectives in Sulfur, Selenium and Tellurium.* RSC Publishing, Cambridge, UK, **2013**.

toxicidad y menor estabilidad de muchos reactivos de selenio. Sin embargo, esto ha cambiado significativamente en las últimas tres décadas y ha dado como resultado el desarrollo de una amplia gama de productos más estables y menos tóxicos, lo que permite un más fácil acceso a diferentes familias de compuestos organoselénicos.<sup>208</sup>

Las sales de selenopirilio son compuestos aromáticos de seis miembros con un átomo de selenio cargado positivamente y un contraión bien definido. Al igual que ocurre en el caso de la sal de pirilio, la simple sustitución de un enlace C-H en el benceno por un átomo de selenio provocará un importante efecto en su estructura electrónica: será altamente electrófilo y los enlaces estarán muy polarizados. Sin embargo, sobre la reactividad de estos compuestos apenas aparecen datos en la bibliografía, por lo que esto no es más que una extrapolación de la reactividad de los pirilios a los selenopirilios, y ello no es completamente exacto, debido a la diferencia de electronegatividad entre los elementos del mismo grupo.

Como se ha comentado anteriormente, las metodologías sintéticas y el número de compuestos existentes de este tipo son escasos. La primera metodología encontrada en la bibliografía para la síntesis de estos compuestos ha sido desarrollada por Kuthan y colaboradores y se basa en otra existente para la síntesis de las sales de tiopirilio que consiste en la heterociclación de 1,5-dicetonas empleando hidruro de selenio gaseoso ( $H_2Se$ ) y ácido clorhídrico ( $HCl$ ) (Esquema 21).<sup>209</sup> Sin embargo, las condiciones altamente tóxicas y complejas que conlleva el uso de seleniuro de hidrógeno en estado gaseoso junto con  $HCl$  no hacen que la metodología resulte atractiva.

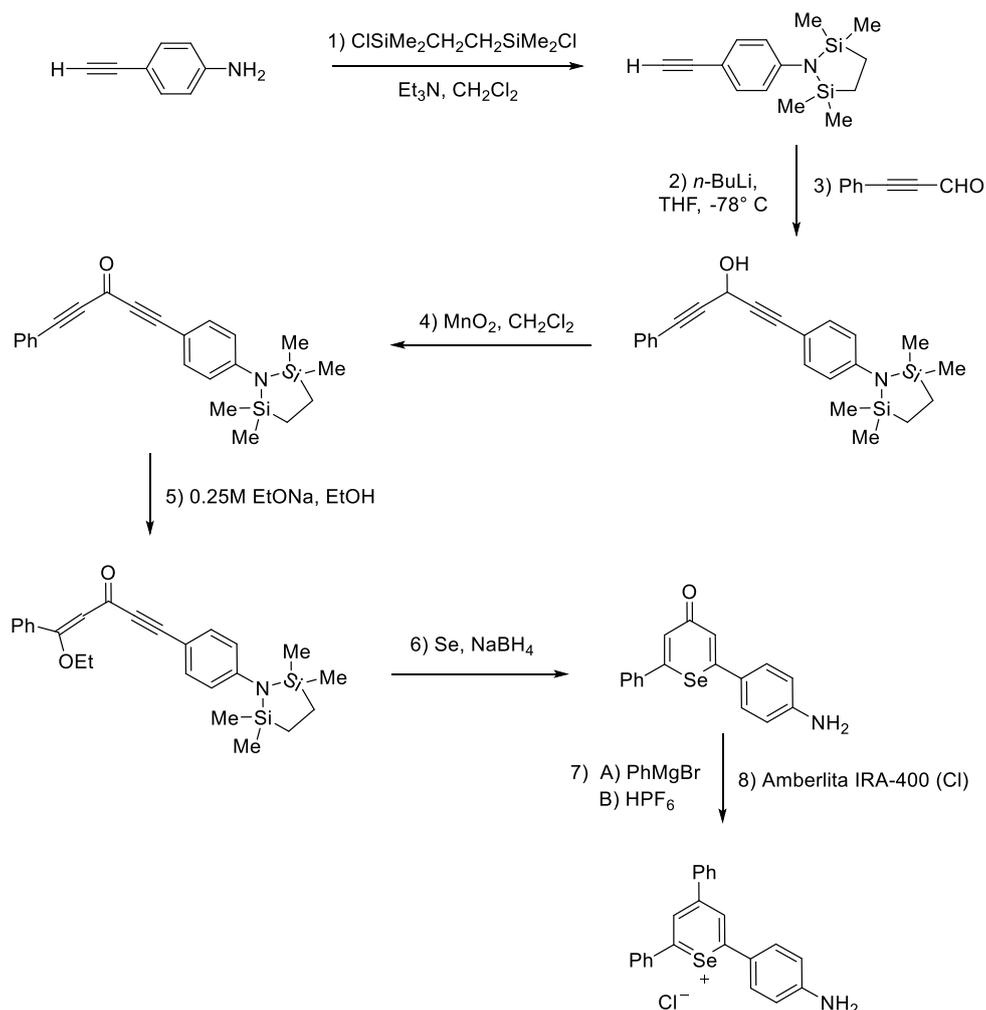


**Esquema 21.** Primera síntesis de sales de selenopirilio llevada a cabo por Kuthan y col.

<sup>208</sup> Zhang, S.; Koe, A.; Heintz, C.; Senior, A.; Jin, J. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 260-263.

<sup>209</sup> Kuthan, J.; Šcebek, P.; Böuhm, S. Developments in the Chemistry of Thiopyrans, Selenopyrans, and Telluropyrans, Editor(s): Alan R. Katritzky, *Advances in Heterocyclic Chemistry, Academic Press*, **1994**, *59*, 179-244.

Se han descrito otras estrategias para la síntesis de sales de selenopirilio como la adición de reactivos organometálicos a selenopiroas (Esquema 22).<sup>210,211</sup>



**Esquema 22.** Ruta sintética de sal de selenopirilio descrita por Elsherbini y col.

Cabe decir que estas rutas no resultan, en nuestra opinión, tan atractivas por la implicación del uso de metales en la síntesis de este tipo de compuestos, ya que no sería recomendable su empleo en aplicaciones médicas y farmacéuticas.

Debido al escaso número de compuestos sintetizados de este tipo, a la falta de información de las propiedades de los mismos y al empleo de metodologías complejas que implicaban el uso de reactivos peligrosos, nos propusimos la búsqueda de una

<sup>210</sup> Sawada, G.A.; Raub, T.J.; Higgins, J.W.; Brennan, N.K.; Moore, T.M.; Tomblin, G.; Detty, M.R.; *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9745-9756.

<sup>211</sup> Elsherbini, M.; Hamama, W.S.; Zoorob, H.H. *Coordin. Chem. Rev.* **2017**, *330*, 110-126.

metodología que incluyera la utilización de un reactivo no organometálico de fácil acceso y que no presentase toxicidad alguna.

El reactivo de Woollins es un compuesto orgánico que contiene fósforo y selenio en su molécula. Es análogo al reactivo de Lawesson, reactivo empleado comúnmente como agente nucleófilo de azufre. Debe su nombre a su descubridor John Derek Woollins que lo sintetizó por primera vez en el año 1990.<sup>212</sup> Este reactivo se trata de un dímero (PhPSe<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, que en determinadas condiciones de reacción se descompone en el monómero PhPSe<sub>2</sub>, que es el auténtico reactivo nucleófilo y agente selenante. La forma monomérica de WR tiene una coordinación inusual desde el punto de vista del fósforo debido a que este elemento se encuentra en su estado de oxidación formal +5, pero solo tricoordinado. Por tanto, como la esfera de coordinación  $\sigma^3\lambda^5$  del fósforo no está completamente saturada presenta un comportamiento de ácido de Lewis fuerte. Recientemente se ha demostrado que es posible estabilizar estas formas monoméricas del WR empleando piridina.<sup>213</sup>

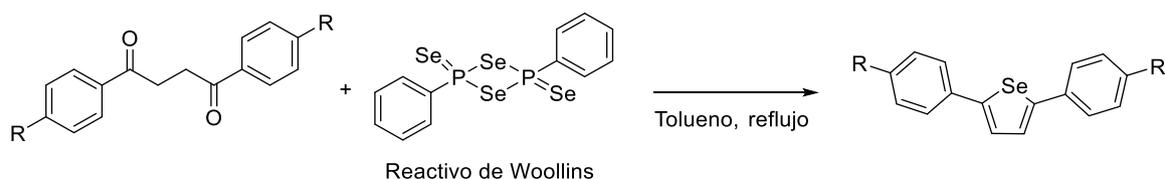
El reactivo de Woollins ataca nucleofílicamente a carbonos electrófilos, como se ha comprobado que son los carbonos C2 y C6 de las sales de pirilio (Capítulo 1, apartado 1.2.). El comportamiento como ácido de Lewis fuerte del átomo de fósforo en el reactivo de Woollin es la razón por la que reacciona fácilmente con nucleófilos como, entre otras cosas, metanol, alquinos o dienos. Además, puede sufrir fácilmente un ataque nucleófilo del átomo de oxígeno del grupo carbonilo. Como resultado, conduce a la sustitución del átomo de oxígeno con un átomo de selenio y da como resultado un compuesto de selenocarbonilo. Un ejemplo de ello lo tenemos en el estudio realizado por Hua et al, en el que obtienen un selenofurano por reacción de 1,4-dicetonas con el reactivo de Woollins (Esquema 23).<sup>214</sup>

---

<sup>212</sup> Pilkington, M. J.; Slawin, A. M. Z.; Williams, D. J.; Wood, P. T.; Woollins, J. D. *Heteroatom Chem.*, **1990**, *1*, 351-355.

<sup>213</sup> Asherl L.; Nordheider A.; Arachchige K. S. A.; Cordes D. B.; Karaghiosoff K.; Buhl M.; Slawin A. M.; Woollins D. J. *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 6214 – 6216.

<sup>214</sup> Hua, G.; Henry, J. B.; Li, Y.; Mount, A. R.; Slawin, A. M.; Woollins, J. D. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1655-1660.



**Esquema 23.** Obtención de selenofuranos por reacción de 1,4-dicetona con WR

Una de las aplicaciones más prometedora y por la que se decidió llevar a cabo la síntesis de las sales de selenopirilio fue por su potencial aplicación en terapia fotodinámica debido a que son compuestos que absorben a una elevada longitud de onda.<sup>212</sup>

La terapia fotodinámica (“Photodynamic therapy”, PDT) es una técnica segura y no invasiva para el tratamiento de cánceres de varios tipos y ubicaciones diferentes, así como de enfermedades no oncológicas. El hecho de que se hayan obtenido buenos resultados terapéuticos y la posibilidad de la aplicación paralela de la PDT con otras terapias hacen este método más común en muchos campos de la medicina. La PDT se ha utilizado con éxito en dermatología, oncología, ginecología y urología.<sup>215</sup>

La PDT consiste en la aplicación local o sistémica de un compuesto fotosensible (el fotosensibilizador), que se acumula principalmente en los tejidos patológicos. Las moléculas fotosensibles absorben la luz de la longitud de onda adecuada, iniciando los procesos de activación que conducen a la destrucción selectiva de las células tumorales. La PDT es bien tolerada por los pacientes debido a su acción selectiva. Los protocolos fotodinámicos son indoloros, y la simplicidad de su aplicación permite su uso ambulatorio. La PDT también se utiliza en el tratamiento de la inflamación crónica y es una alternativa interesante en el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a los medicamentos. A pesar del éxito de la PDT, todavía se están investigando nuevos compuestos y métodos innovadores que son necesarios para mejorar su uso efectivo en oncología clínica. Estudios previos han llevado a una extensión significativa de las posibles aplicaciones de la PDT contra las células cancerosas y contra la enfermedad de Alzheimer.<sup>216, 217</sup>

<sup>215</sup> Luo, D.; Carter, K. A., Miranda, D.; Lovell, J. F. *Adv. Sci.* **2017**, *4*, 1600106.

<sup>216</sup> Schmitt, F.; Juillerat-Jeanneret, L. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2012**, *12*, 500–525.

<sup>217</sup> Lee, B.I.; Chung, Y.J.; Park, C.B. *Biomaterials* **2019**, *190–191*, 121–132

El mecanismo molecular de la terapia fotodinámica se basa en tres componentes no tóxicos, que producen los efectos deseados dentro de los tejidos patológicos sólo mediante interacciones mutuas entre ellos. Estos tres componentes son:

- Fotosensibilizador (PS).
- Longitud de onda adecuada.

Oxígeno disuelto en las células.

La fotosensibilización es el fenómeno empleado en fotoquímica para generar moléculas en estado excitado o activado, es decir, con exceso de energía, lo que las convierte en mucho más reactivas. En este capítulo nos centramos concretamente en el uso de la fotosensibilización para la producción de oxígeno singlete, que se trata del estado excitado del oxígeno molecular,  $^1\text{O}_2$  enfocado concretamente en generar estrés oxidativo dentro de las células cancerígenas para combatir la enfermedad del cáncer, aunque hay que destacar que existen otras aplicaciones del mismo entre las que destaca la desinfección de aguas.<sup>218</sup>

El fenómeno de la fotosensibilización requiere del empleo de unos compuestos conocidos como fotosensibilizadores (PS). Para comprender cómo funcionan es necesario entender ciertos conceptos básicos de fotoquímica que se expondrán a continuación:

Cada átomo o molécula en su estado natural, tiene una configuración o distribución electrónica de menor energía que se conoce como *estado energético fundamental*. Cuando éstas absorben energía, normalmente en forma de luz, se forman lo que se conoce como los *estados energéticos excitados*, en los cuales las moléculas presentan configuraciones electrónicas distintas y de mayor energía que en el *estado energético fundamental*. Además, estos estados excitados son de duración limitada, por lo que pasado un corto período de tiempo vuelven a su estado fundamental, a este lapso de tiempo se le conoce como tiempo de vida media.

Se dice que un átomo o molécula manifiesta un estado energético de carácter *singlete* siempre que sus dos electrones más externos de valencia estén apareados, es decir, tengan números cuánticos de espín opuestos. Por otra parte, una molécula

---

<sup>218</sup> García-Fresnadillo, D. *ChemPhotoChem* **2018**, 2, 512– 534.

presenta un estado energético de carácter triplete cuando los dos electrones más externos de valencia están desapareados, es decir, tienen números cuánticos de espín similares. Dicho esto, la mayoría de las moléculas presentan un estado fundamental de carácter singlete ( $S_0$ ), mientras que los estados excitados pueden ser tanto *singlete* ( $S_1$ ) como *triplete* ( $T_1$ ) (Figura 31). Un estado energético excitado *singlete* es siempre superior energéticamente a su correspondiente estado excitado *triplete* debido a la energía de apareamiento electrónico necesaria para que ambos electrones externos tengan espines antiparalelos.<sup>219</sup>

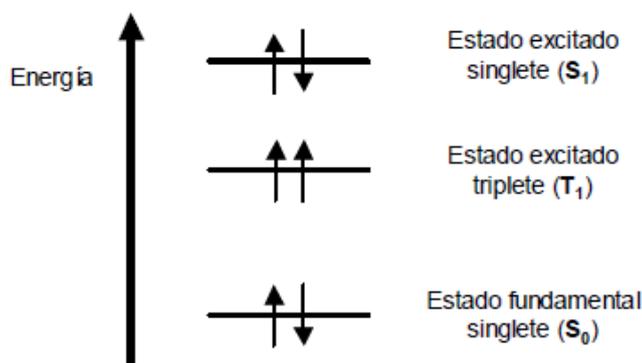


Figura 31. Estructuras químicas de ebselén y ácido metilselenénico

Toda molécula que absorbe un fotón de luz de una longitud de onda adecuada normalmente puede alcanzar sus estados excitados, sin embargo, la mecánica cuántica establece que la probabilidad de absorción de un fotón para que suceda la excitación es muy baja. Por ello, en estos casos se recurre a los fotosensibilizadores, los cuáles transfieren la energía de excitación electrónica a la molécula que se desea excitar promoviendo que la misma evolucione a un estado excitado. Por tanto, la fotosensibilización consiste en la generación, mediante absorción de luz del estado excitado de un compuesto, que es el fotosensibilizador, de manera que éste, durante el tiempo en el que permanece excitado, puede transferir su exceso energético a otra molécula presente en el medio para que ésta finalmente evolucione a un estado excitado. Finalmente, esta última puede reaccionar también con otras especies químicas presentes en el medio, dando lugar a otros productos de reacción o, si no lo hace, regresando a su estado fundamental.

<sup>219</sup> García-Fresnadillo, D. *Solar Safe Water*, 2005, 14, 242-257.

Enfocando lo anteriormente comentado al caso del oxígeno molecular,  $O_2$ , se sabe que éste tiene un estado fundamental con dos electrones desapareados, por lo que se trata de un estado de multiplicidad *tripleto* ( $^3O_2$ ). Sin embargo, su estado excitado de menor energía es el oxígeno *singleto* ( $^1O_2$ ). El oxígeno *singleto* no puede generarse mediante absorción directa de la luz por la molécula de oxígeno, por lo que ahí entra el juego el papel del fotosensibilizador. En primer lugar, una molécula de fotosensibilizador absorbe un fotón de luz UV o visible, generándose entonces su estado *singleto*. Este estado se transforma velozmente a un estado excitado *tripleto* más estable y de tiempo de vida más largo, el cual a su vez puede colisionar con una molécula de oxígeno en su estado fundamental. En el choque que se produce, se genera el oxígeno *singleto* mediante un proceso de transferencia energética por intercambio electrónico, volviendo el fotosensibilizador a su estado fundamental (Figura 32). El exceso energético del oxígeno *singleto* respecto a su estado fundamental hace que esta especie presente una elevada reactividad química como agente oxidante durante su tiempo de vida media, que deriva en las diferentes aplicaciones como la generación de estrés oxidativo de células cancerosas o la desinfección de aguas comentada con anterioridad.<sup>220</sup>

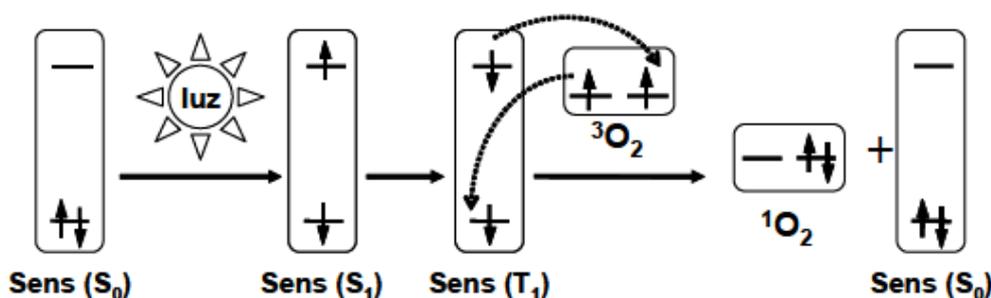


Figura 32. Estructuras químicas de ebselén y ácido metilselenénico

En la aplicación concreta de la PDT, hay dos mecanismos principales de la reacción fotodinámica. Ambos dependen estrechamente de las moléculas de oxígeno del interior de las células. La primera etapa de ambos mecanismos es similar. Un fotosensibilizador, después de entrar en la célula, es irradiado con una longitud de onda que coincide con el máximo de absorción del PS y éste pasa del estado de energía

<sup>220</sup> Jiménez-Hernández, M. E.; Manjón, F.; Garcia-Fresnadillo D.; Orellana, G. *Solar Energy*, **2005**, *80*, 1382–1387.

fundamental de singlete ( $S^0$ ), al estado de singlete excitado ( $S^1$ ), debido a la absorción de fotones. Parte de la energía absorbida se irradia en forma de un flujo cuántico de fluorescencia, y la energía restante se dirige a otra molécula fotosensibilizadora que pasa a un estado de triplete excitado ( $T^1$ ), que es la forma terapéutica apropiada de los compuestos.

Las reacciones fotocitotóxicas se producen únicamente dentro de los tejidos patológicos, en el área de distribución del fotosensibilizador, permitiendo la destrucción selectiva. Los fotosensibilizadores se acumulan en concentraciones significativamente más altas en las células cancerosas, que en las células normales. La razón de tal biodistribución es la tendencia de los fotosensibilizadores a combinarse preferentemente con lipoproteínas de baja densidad (LDL). La función de las LDL es suministrar a los tejidos el colesterol necesario para crear membranas durante la división celular. Las células cancerosas que se dividen velozmente muestran una mayor captación de lipoproteínas LDL, que actúan como un "transportador" del fotosensibilizador a los tejidos cancerosos.<sup>221</sup> Además, los tejidos con una mayor actividad mitótica revelan una expresión excesiva de los receptores de lipoproteínas LDL en la superficie celular.

La afinidad de los fotosensibilizadores con las lipoproteínas séricas, en particular con las LDL, desempeña un papel importante en la administración de estos fármacos al tejido tumoral.<sup>222</sup> La terapia fotodinámica afecta el sistema vascular del tumor y estimula el sistema inmunológico.

Uno de los tres elementos cruciales de la PDT como ya se ha comentado anteriormente, además de la luz y el oxígeno, es la presencia de fotosensibilizadores. Estos compuestos se definen como sustancias capaces de absorber la luz con una longitud de onda específica, desencadenando reacciones fotoquímicas o fotofísicas. Como en cada grupo de medicamentos, un conjunto de características y condiciones describen el fotosensibilizador.<sup>223, 224</sup>

- Alto grado de pureza química y estabilidad a temperatura ambiente.

---

<sup>221221</sup> Cruz, P.M.R.; Mo, H.; McConathy, W.J.; Sabnis, N.; Lacko, A.G. *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*, 119.

<sup>222</sup> Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Sackzo, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlinska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. *Biomed Pharmacother.* **2018**, *106*, 1098-1107.

<sup>223</sup> Benov, L. *Med. Princ. Pract.* **2015**, *24*, 14–28.

<sup>224</sup> Robertson, C.A.; Evans, D.H.; Abrahamse, H. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2009**, *96*, 1–8.

- Efecto fotosensible sólo en presencia de una longitud de onda específica.

- Alta reactividad fotoquímica; la máxima absorción de la luz debe estar en longitudes de onda de 600 nm a 800 nm. Absorción de la luz a una longitud de onda superior a 800 nm no proporciona suficiente energía para estimular el oxígeno en su estado de singlete y la producción de otras especies reactivas de oxígeno.

- Absorción mínima en el rango de 400 nm a 600 nm. Esto previene la posible fotosensibilidad excesiva causada por la luz solar. Las bandas de absorción no deben solaparse con la banda de absorción de otras sustancias en el cuerpo, incluidos los colorantes endógenos como melatonina, hemoglobina u oxihemoglobina.

- Mínima citotoxicidad en la oscuridad y fácil solubilidad en los tejidos del cuerpo.

- Alta selectividad para tejidos neoplásicos (tejidos tumorales): el fotosensibilizador se debe retirar lentamente de las zonas afectadas permaneciendo al menos durante varias horas, mientras que para los tejidos sanos el fotosensibilizador se elimina rápidamente, por consiguiente, esto minimiza los efectos secundarios fototóxicos de la terapia.

- Síntesis simplificada, económica y fácil disponibilidad.

La mayoría de los fotosensibilizadores son compuestos cíclicos. Entre las familias de fotosensibilizadores más representativas desarrolladas se encuentran, las porfirinas (como ejemplos la hematoporfirina y benzoporfirina), las clorinas (como ejemplo temoporfirina) y los colorantes (como ejemplo la naftalocianina).<sup>225</sup>

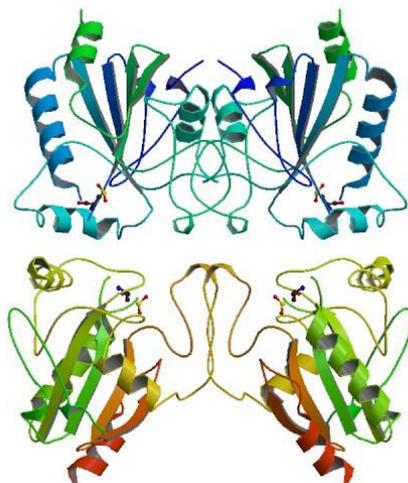
### **1.3. Función selenourea. Selenoureas derivadas de quitosano**

Como se ha observado anteriormente, los compuestos organoselénicos han cobrado un gran interés en los últimos años. Desde 1950, el Se es considerado un nutriente esencial puesto que se encuentra presente en los centros activos de más de 25 selenoproteínas, entre las que se pueden destacar la glutatión peroxidasa (Figura 33) o la tiorredoxin reductasa, implicadas como se ha visto en los antecedentes en

---

<sup>225</sup> Abrahamse, H.; Hamblin, M.R. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 347–364.

procesos de defensa contra las especies ROS y el estrés oxidativo,<sup>226</sup> y la yodotironina desyodinasas, implicada en la activación y desactivación de las hormonas tiroideas.<sup>227</sup>



**Figura 33.** Estructura de la enzima glutatión peroxidasa (GP1) obtenida de Protein Data Bank (PDB)

Entre los compuestos orgánicos que incluyen selenio en su estructura, se pueden destacar las selenoureas, que presentan notables propiedades desde un punto de vista sintético y de propiedades biológicas.

Desde un punto de vista sintético, el uso de selenoureas y de isoselenocianatos ha demostrado ser el método más eficiente para la introducción de selenio en los heterociclos, ya que permite obviar la utilización de reactivos de selenio tóxicos y de difícil manejo y almacenamiento.<sup>228</sup> El especial interés de estos compuestos *heterocíclicos organoselénicos radica en la amplia gama de potencial biológico que* presentan, destacando entre sus actividades: la antioxidante, antiinflamatoria, antiviral o antimicrobiana.<sup>229, 230, 231</sup>

Con respecto a la actividad biológica de las selenoureas, se ha descrito el uso de selenoureas principalmente como agentes antioxidantes, atrapadores de ROS y, por

<sup>226</sup> Wessjohann, L. A.; Schneider, A.; Abbas, M.; Brandt, W. *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 997–1006.

<sup>227</sup> Naithani, R. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 657–668.

<sup>228</sup> M. Koketsu, M.; Otsuka, T.; Swenson, D.; Ishihara, H. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 613-616 .

<sup>229</sup> Alcolea, V.; Plano, D.; Encio, V.; Palop, A.; Sharma, K. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, *123*, 407-418.

<sup>230</sup> Braga, A.L.; Rafique, L. *Chem. Org. Selenium Tellurium Compd.*, **2013**, *4*, 1053-1117.

<sup>231</sup> Miao, Q.; Xu, J.; Lin, A.; Wu, A.; Xie, W. *Curr. Med. Chem.*, **2018**, *25*, 2009-2033.

tanto, reductores del estrés oxidativo,<sup>232,233,234</sup> y como como compuestos despigmentantes, debido a su capacidad de inhibición de la tirosinasa.<sup>235</sup>

A lo largo del tiempo, se han descrito numerosos métodos para la preparación de estos derivados organoselénicos, se destacarán algunos de ellos:

En 1956 se prepararon selenopirimidinas y selenopurinas haciendo reaccionar selenourea con hidrogenoseleniuro de sodio y las correspondientes cloropirimidinas y cloro purinas (Esquema 24a y b).<sup>236</sup> En 1959 se emplearon selenoureas como precursores para la síntesis de diversos derivados de ácidos selenobarbitúricos con el objetivo de reemplazar el oxígeno del ácido barbitúrico, incrementando así la solubilización lipídica de los compuestos y que de esta forma pudiesen cruzar la barrera hematoencefálica entre la sangre y el cerebro (Esquema 24c).<sup>237</sup>

También se han preparado tetrametilselenoureas partiendo de tetrametiltioureas con buenos rendimientos empleando como reactivos yoduro de metilo y etanol como disolvente (Esquema 24d).<sup>238</sup>

---

<sup>232</sup> Ruberte, A.C.; Ramos-Inza, S.; Aydillo, C.; Talavera, I.; Encío, I.; Plano, D.; Sanmartín, C. *Antioxidants* **2020**, *9*, 55.

<sup>233</sup> Takahashi, H.; Nishina, A.; Fukumoto, R.-H.; Kimura, H.; Koketsu, M.; Ishihara, H. *Life Sci.* **2005**, *76*, 2185-2192.

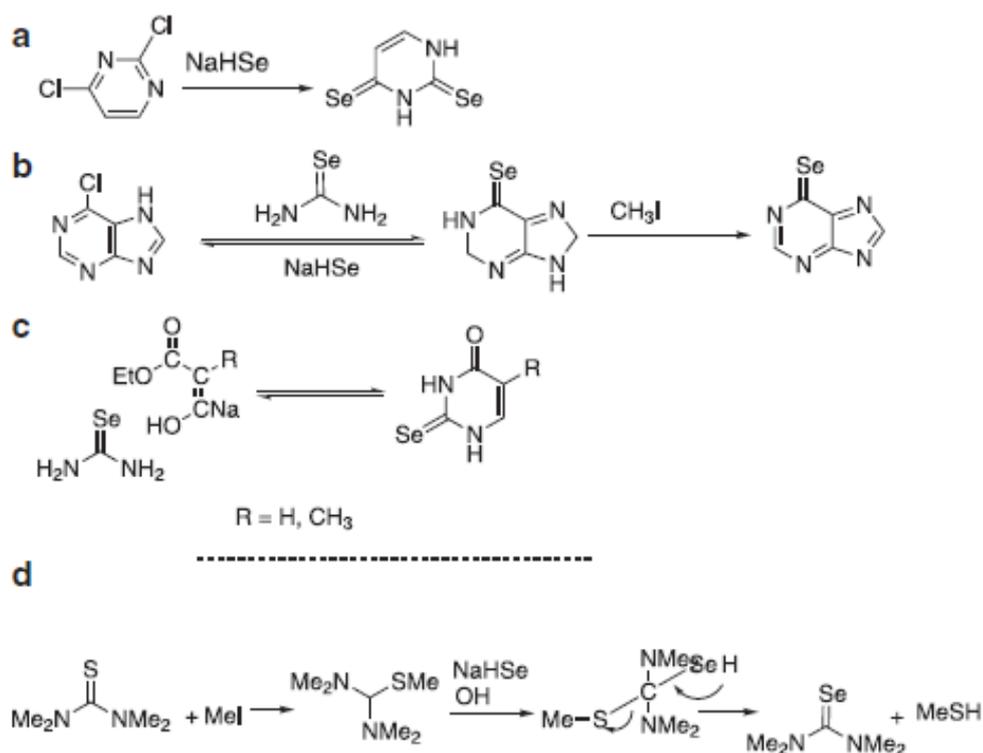
<sup>234</sup> Fernández-Bolaños, J. G.; López, O.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fuentes, J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4081-4084.

<sup>235</sup> Ha, S. K.; Koketsu, M.; Lee, K.; Choi, S. Y.; Park, J.-H.; Ishihara, H.; Kim, S. Y. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 838-840.

<sup>236</sup> Mautner, H.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 5292.

<sup>237</sup> Mautner, H.G.; Clayto, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 6270-6273.

<sup>238</sup> Klayman, D.L.; Shine, R.J. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3549-3551.

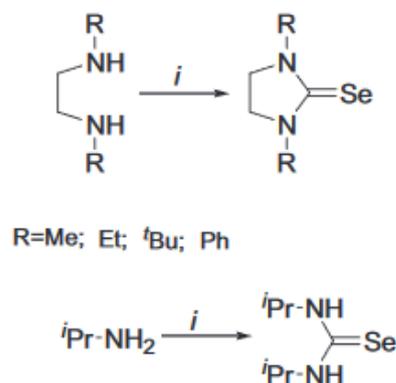


**Esquema 24.** Síntesis de a) selenopirimidinas, b) selenopurinas, c) ácidos selenobarbitúricos y d) tetrametilselenoureas mediante diferentes metodologías<sup>239</sup>

Otra metodología para la síntesis de selenoureas se fundamenta en una reacción de condensación entre tres compuestos: ortoformiato de trietilo, selenio y aminas primarias o secundarias. Esta reacción se lleva a cabo sin disolvente a 180-190 °C y presenta la ventaja que los reactivos empleados, al igual que ocurre con las selenoureas en la síntesis de heterocíclicos organoselénicos, son menos tóxicos y térmicamente estables (Esquema 25).<sup>240</sup>

<sup>239</sup> Hussain, R.A.; Badshah, A.; Shan, A. *Appl. Organomet. Chem.* **2014**, *28*, 61-73.

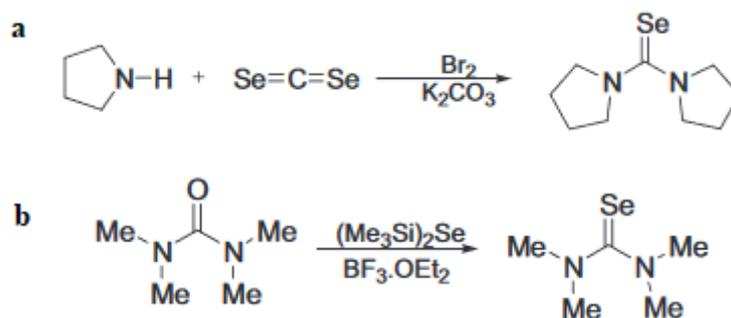
<sup>240</sup> Zhou, Y.; Denk, M.K. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1295-1299.



*i*: Ortoformiato de trietilo, Se, 190 °C, 8 h.

**Esquema 25.** Síntesis de selenoureas empleando ortoformiato de trietilo y selenio

Henriksen y colaboradores han descrito la síntesis de selenoureas simétricas empleando aminas secundarias y diseleniuro de carbono,<sup>241</sup> así como de selenoureas simétricas o asimétricas por reacción de ureas y seleniuro de bis(trimetilsililo) en presencia de trifluoruro de boro eterato (Esquema 26).<sup>242</sup>



**Esquema 26.** Ejemplos de síntesis de selenoureas simétricas por dos metodologías diferentes

Sin embargo, puede comprobarse en bibliografía que el método más generalizado y con mejores resultados para la obtención de las selenoureas consiste en la reacción de isoselenocianatos con aminas (Esquema 27), el cual utilizaremos en esta tesis.<sup>243, 244, 245</sup> Para la obtención previa de los isoselenocianatos uno de los métodos más

<sup>241</sup> Henriksen, L. *Synthesis* **1982**, 773-776.

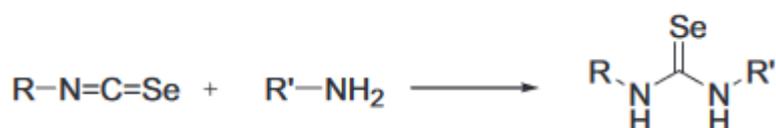
<sup>242</sup> Takikawa, Y.; Watanabe, H.; Sasaki, R.; Shimada, K. *Bull. Chem. Soc. Japan* **1994**, 67, 876-878.

<sup>243</sup> López, O.; Maza, S.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J. G. *Tetrahedron*, **2009**, 65, 2556-2566.

<sup>244</sup> Koketsu, M.; Suzuki, N.; Ishihara, H. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 6473-6475.

<sup>245</sup> Garud, D. R.; Koketsu, M.; Ishihara, H. *Molecules* **2007**, 12, 504-535.

eficientes fue desarrollado por Barton y colaboradores, y consistía en el tratamiento de la formamida correspondiente con fosgeno, para dar isonitrilo, que posteriormente se hacía reaccionar con selenio elemental en presencia de trietilamina.<sup>246</sup> Esta misma metodología, con el paso del tiempo ha sido optimizada por Bolaños y colaboradores,<sup>243</sup> que sustituyen el fosgeno por el trifosgeno, un reactivo más manejable y mucho menos tóxico que el fosgeno de partida, además utilizan unas condiciones de reacción más livianas intercambiando el tolueno por diclorometano a reflujo y evitando así la presencia de reacciones secundarias. Así, se puede comprobar que diversos autores en la actualidad siguen usando esta metodología para la síntesis de las selenoureas.<sup>247</sup>



**Esquema 27.** Método más generalizado para la síntesis de selenoureas

Dada la experiencia previa del grupo en síntesis de otros derivados de quitosano como ureas, iminas, aminas y sales de piridinio<sup>248,161</sup> y, empleando la metodología sintética de Bolaños y colaboradores, nos propusimos la obtención de unos compuestos novedosos no reportados con anterioridad en bibliografía como son las selenoureas derivadas de quitosano, con claro interés biológico potencial por las interesantes propiedades del quitosano, comentadas con anterioridad en esta memoria, unidas a las que le aportará el selenio y en concreto, la función selenourea.

<sup>246</sup> Barton, D. H. R.; Parekh, S. I.; Tajbakhsh, M.; Theodorakis, E. A.; Tse, C.L. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 639-654.

<sup>247</sup> Hua, G.; Du, J.; Carpenter-Warren, C.; Cordes, D.; Slawin, A.; Woollins, D. *New Journal of Chemistry*, **2019**, *43*, 7035-7043.

<sup>248</sup> S. Jatunov Santamaría, *Nuevos derivados de Quitosano funcionalizados en el grupo amino, de alto valor añadido*, Tesis Doctoral dirigida por F. Cabrera Escribano, US, **2015**.

## **2. Objetivos específicos**

1) Síntesis y caracterización de sales de selenopirilio monocatiónicas mediante una metodología que no involucre reactivos organometálicos y evaluación de sus propiedades fotofísicas para su posible aplicación como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica.

2) Obtención de sales de selenopirilio policatiónicas soportadas sobre el esqueleto polimérico del quitosano implicando la formación de puentes de tipo imina y/o amida.

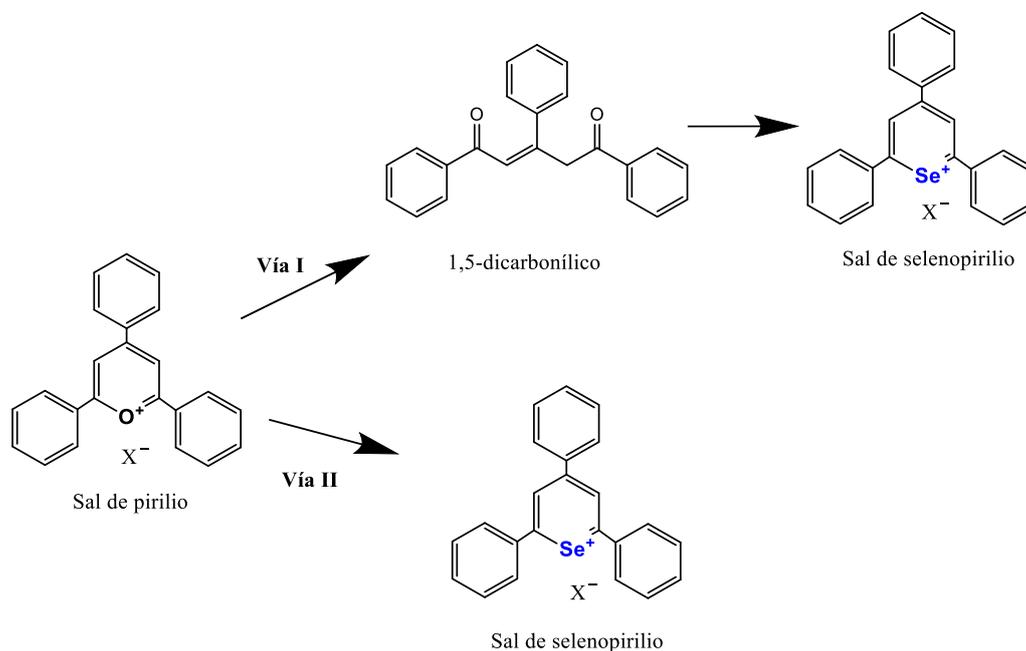
3) Preparación y caracterización de las primeras selenoureas derivadas de quitosano y estudio de su potencial biológico como agentes antioxidantes y miméticos de la enzima Glutación Peroxidasa (GPx).

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Síntesis de sales de selenopirilio

La obtención de sales de selenopirilio ha sido un proceso laborioso, ya que, aunque la química de selenio ha avanzado mucho en estos últimos años, su reactividad no es tan conocida como la del carbono.

El planteamiento inicial para la síntesis de estos compuestos contemplaba dos vías diferentes. En ambas, se utilizaba como material de partida la sal de pirilio correspondiente. La primera alternativa consistía en transformar la sal de pirilio en un compuesto 1,5-dicarbonílico mediante ataque por un nucleófilo apropiado en las posiciones 2 y 6 del anillo de pirilio y, posteriormente hacer reaccionar este compuesto bajo las condiciones apropiadas con un reactivo nucleófilo de selenio para obtener la sal de selenopirilio deseada. La segunda vía se diferenciaba de la primera en que se transformaría directamente en un paso de reacción la sal de pirilio en la sal de selenopirilio empleando un reactivo de selenio apropiado (Esquema 28).



Esquema 28. Planteamiento sintético por dos vías distintas de las sales de selenopirilio

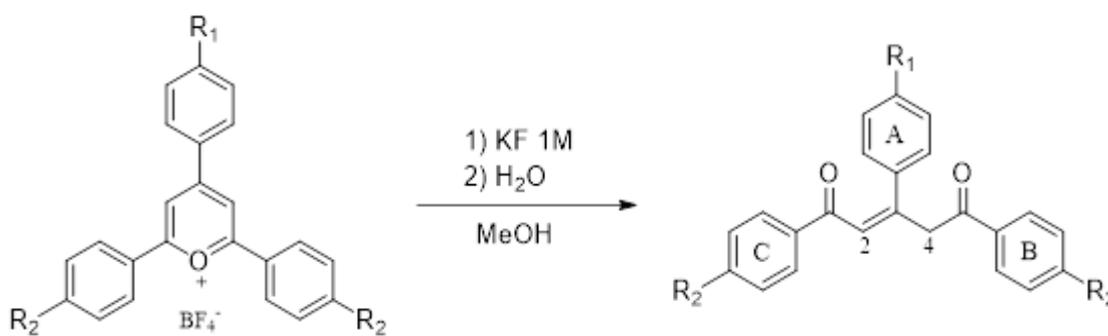
##### 3.1.1. Vía I: Síntesis de sales de selenopirilio a partir de compuestos 1,5-dicarbonílicos

### 3.1.1.1. Síntesis de precursores: pent-2-en-1,5-dionas

El primer paso consiste evidentemente para ambas vías en la síntesis de la sal de pirilio, para ello se empleará la metodología aplicada en el capítulo 1 partiendo del benzaldehído y la acetofenona *p*-sustituídos correspondientes.

Una vez se ha obtenido la sal de pirilio, el siguiente paso es obtener el precursor que dará lugar a la sal de selenopirilio, es decir, una 1,5-pent-2-en-diona. Se ha descrito en la bibliografía<sup>249,93</sup> la síntesis de 1,5-pent-2-en-dionas, mediante apertura nucleófila del anillo de pirilio promovida por fluoruro potásico (KF), azidas (N<sub>3</sub><sup>-</sup>), cianuros (CN) y molibdatos (MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). La estrategia se basa en hacer uso de un reactivo nucleófilo que ataque las posiciones 2 y 6 del anillo de pirilio y provoque la apertura del compuesto.

Se han sintetizado diferentes 1,5-pent-2-en-dionas (**30-35**) que portan diferentes sustituyentes con diferentes propiedades electrónicas (Tabla 10) por reacción de la sal de pirilio apropiada (**68-73**) en MeOH con fluoruro potásico y la posterior adición de H<sub>2</sub>O. Se obtiene de esta manera la 1,5-pent-2-en-diona correspondiente pura (Esquema 29) con rendimientos que oscilan entre el 45 y el 98%, dependiendo de los sustituyentes.



Esquema 29. Síntesis de pent-2-en-1,5-dionas a partir de sales de pirilio

Tabla 10. Naturaleza electrónica de los sustituyentes de los compuestos sintetizados

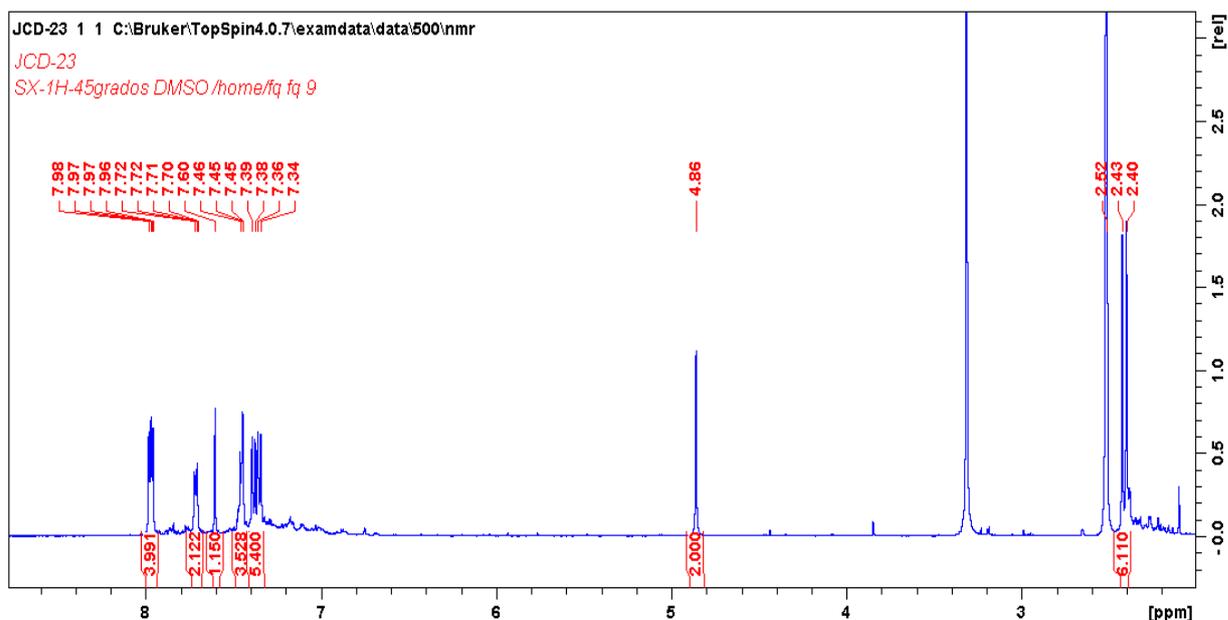
Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Rdto (%)
<b>30</b>	H	H	97
<b>31</b>	F	H	72
<b>32</b>	H	Me	45
<b>33</b>	Ph	Me	55

<sup>249</sup> Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. *Coordin. Chem. Rev.* **2006**, 250, 3081-3093.

<b>34</b>	OMe	F	98
<b>35</b>	NO <sub>2</sub>	H	53

A la vista de los resultados se podría concluir que las pent-2-en-1,5-dionas con sustituyentes en R<sub>1</sub> aceptores de electrones (**31** y **35**) se obtienen con un rendimiento moderado (72% y 53% respectivamente). Esto se debe a que el átomo de flúor para el compuesto **31** y el grupo nitro para el compuesto **35** generan una mayor electrofilia a los carbonos C-1 y C-5 de la pent-2-en-1,5-dionas, siendo estos dos carbonos probablemente los más susceptibles de un ataque nucleófilo. Por el contrario, para el aquellos que presentan grupos donadores de electrones, como se puede observar el caso del compuesto **34** que presenta en el sustituyente R<sub>1</sub> un grupo metoxilo, disminuye la electrofilia de ambos carbonos siendo por tanto menos susceptibles de un ataque nucleófilo. Tal es así, que este compuesto **34** es el que se obtiene con mayor rendimiento (98%).

Para comprobar y confirmar la estructura de todos los compuestos obtenidos se han realizado experimentos de <sup>1</sup>H RMN en DMSO-*d*<sub>6</sub> a 500 MHz. En todos los espectros obtenidos aparece un singulete en torno a 7.76-7.60 ppm que se asigna al protón del C-2 de la pent-2-en-1,5-dionas, y un singulete en torno a 4.92-4.86 ppm para dos protones que se asigna al metileno del C-4.



**Figura 34.** <sup>1</sup>H-RMN del compuesto **32** a 500 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>).

Los espectros de <sup>13</sup>C RMN de todos los compuestos (**30-35**) presentan dos señales una en torno a 196.0-194.9 ppm y otra sobre 190.3-189.2 ppm, cada señal corresponde a

los carbonos carbonílicos 1 y 5. Además se observa en los espectros de todos estos compuestos otras dos señales en torno a 125.9-120.2 ppm y otra sobre 42.2-41.8 ppm que se asignan a los carbonos 2 y 4, respectivamente de nuestro compuesto. Para los compuestos **32** y **33** se observa una señal a 21.1 ppm que corresponde a los dos carbonos del grupo metilo situados en la posición 4 de los anillos de fenilo **B** y **C**. Para el compuesto **34** aparece una señal en torno a 55.5 ppm que corresponde al carbono del grupo metoxilo situado en la posición 4 del anillo de fenilo **A**. Finalmente, para todos los compuestos (**30-35**) se observan señales en torno a 165.9-132.9 ppm que se asignan a los carbonos cuaternarios de nuestro compuesto, como son el carbono 3 y los carbonos aromáticos 1 y 4 (el carbono 4 sólo en los compuestos **32**, **33** y **34**, ya que están sustituidos en esa posición) de los anillos de fenilo **A**, **B** y **C**. Mientras, se observan señales sobre 133.3-114.3 ppm que corresponden a los carbonos aromáticos 2, 3, 5 y 6 de los anillos de fenilo **A**, **B** y **C**.

La determinación de la configuración *E/Z* en alquenos trisustituídos se llevó a cabo a partir de las constantes de acoplamiento heteronucleares  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$  ( $^nJ_{\text{CH}}$ ). Esta constante de acoplamiento varía en función del patrón de sustitución del alqueno, siendo  $^3J_{\text{trans}} > ^3J_{\text{cis}}$ .<sup>250</sup> Para la determinación de esta configuración en las pent-2-en-1,5-dionas sintetizadas es necesario obtener previamente la constante de acoplamiento entre el protón olefínico H-2 y los carbonos vecinales (C-1a y C-4). Se han descrito diversas estrategias para la obtención de estas constantes en función de la naturaleza del átomo de carbono estudiado (protonado o no protonado). Mientras que para carbonos protonados se emplean experimentos tales como HECAD<sup>251</sup> o  $\alpha/\beta$ -HSQC-TOCSY<sup>252</sup>, en el caso de carbonos no protonados es necesario recurrir a experimentos tipo HMBC<sup>253</sup> o HSQMBC.<sup>254</sup> No obstante, la medida de este tipo de acoplamientos en este tipo de experimentos en la dimensión F2 no resulta fácil, debido al carácter de antifase del acoplamiento heteronuclear, el cual puede provocar una cancelación parcial o completa de los picos complicando su interpretación.

---

<sup>250</sup> (a) Inokuchi, T.; Kawafuchi, H. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 947-953. (b) Prokoflev, E.D.; Karpeiakaya, E. I.; *Tetrahedron Lett.* **1979**, *8*, 737-740. (c) Kingsbury, C. A.; Draney, D.; Sopchik, A.; Rissler, W.; Durham, D. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3863-3868.

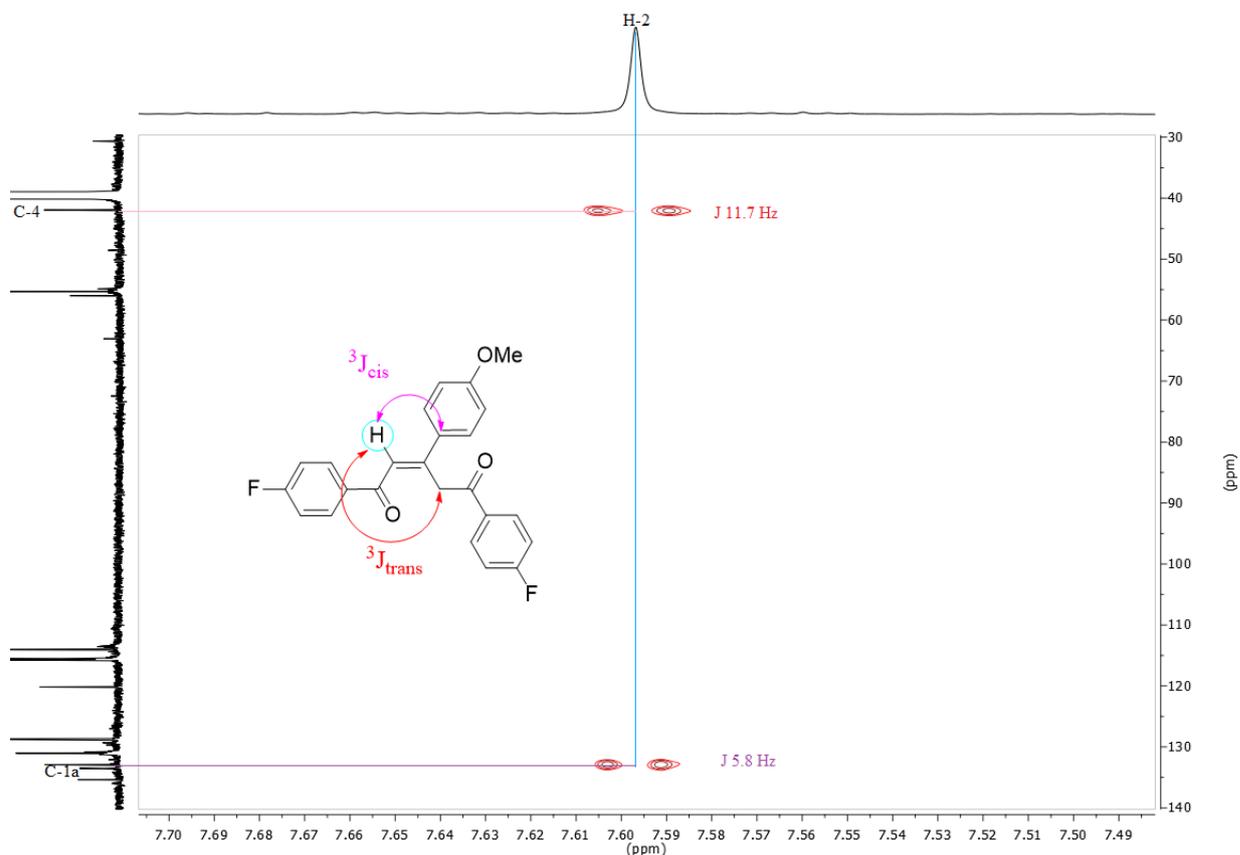
<sup>251</sup> Kozminski, W.; Bednarek, E.; Bocian, W.; Sitkowski, J.; Hansen, P. E.; Kwiedien, B.; Kozerski, L. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 839-844.

<sup>252</sup> Pagano, K.; Fogolari, F.; Corazza, A.; Viglino, P.; Esposito, G.; *J. Biomol. NMR.* **2007**, *39*, 213-222.

<sup>253</sup> Pendrill, R.; Sorensen, O. W.; Widmalm, G.; *Magn. Reson. Chem.* **2014**, *52*, 82-86.

<sup>254</sup> Castañar, L.; Saurí, J.; Nolis, P.; Virgili, A.; Parella, T.; *J. Magn. Reson.* **2014**, *238*, 63-69.

Por este motivo, la asignación de la geometría del isómero *E* o *Z* se ha llevado a cabo mediante el experimento 2D CLIP-HSQMBC.<sup>255</sup> Este experimento permite observar de forma clara los isotopómeros de <sup>13</sup>C sin interferencias de las señales con el isotopómero de <sup>12</sup>C ya que a diferencia del HSQMBC convencional, las constantes de acoplamiento exhiben carácter "en fase".



**Figura 35.** Experimento CLIP-HSQMBC para el compuesto **34**.

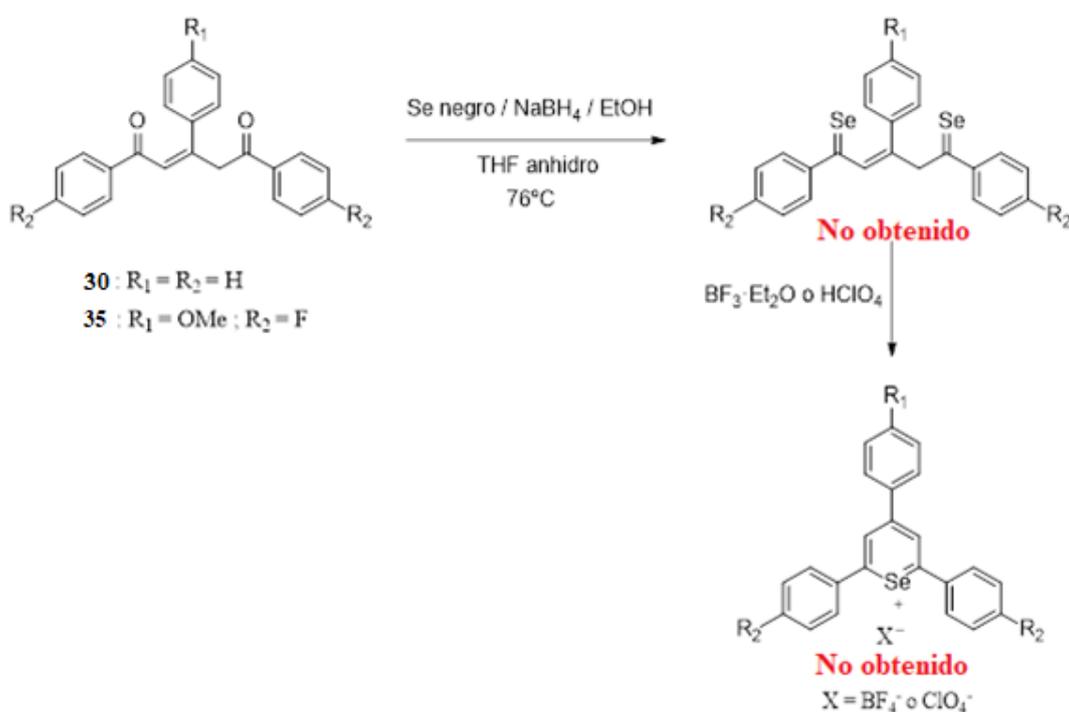
En la Figura 35 se muestra el resultado del experimento realizado para el 1,5-di-(4-fluorofenil)-3-(4-metoxifenil)pent-2-en-1,5-diona (**34**) en DMSO-*d*<sub>6</sub> y de cual se concluyó que se trataba del isómero *E*. En ambos espectros aparece en una dimensión la correlación de <sup>1</sup>H (Dimensión F2) en otra dimensión la correlación de <sup>13</sup>C (Dimensión F1). En la Figura 35 se observa un mayor acoplamiento entre H-2 y el C-4 ( $J_{\text{H,C-4}}$  11.7 Hz) que con el carbono 1-a ( $J_{\text{H,C-1a}}$  5.8 Hz). Por tanto, el isómero existente en esta molécula presenta geometría *E*.<sup>256</sup>

<sup>255</sup> Saurí, J.; Parella, T.; Espinosa, J. F.; *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4473-4478.

<sup>256</sup> Franconetti, A.; Dominguez-Rodríguez, P.; Lara-García, D.; Prado G., R.; Cabrera-Escribano, F. *Appl. Catal. A.* **2016**, *517*, 176-186.

### 3.1.1.2. Transformación del compuesto 1,5-dicarbonílico en sal de pirilio

La primera estrategia ensayada para transformar el compuesto 1,5-dicarbonílico en la sal de selenopirilio correspondiente fue hacerlo reaccionar con una disolución previamente preparada por tratamiento de selenio negro con borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ) en EtOH bajo atmósfera de argón con el objetivo de obtener in situ  $\text{Na}_2\text{Se}$ , que en teoría sería la especie nucleófila que sustituiría los átomos de oxígeno del compuesto 1,5-dicarbonílico por átomos de selenio. Posteriormente, mediante la adición de un ácido de Lewis ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) o un ácido de Bronsted ( $\text{HClO}_4$ ) se pretendía promover la ciclación del supuesto intermedio formado, para formar el producto deseado (Esquema 30).



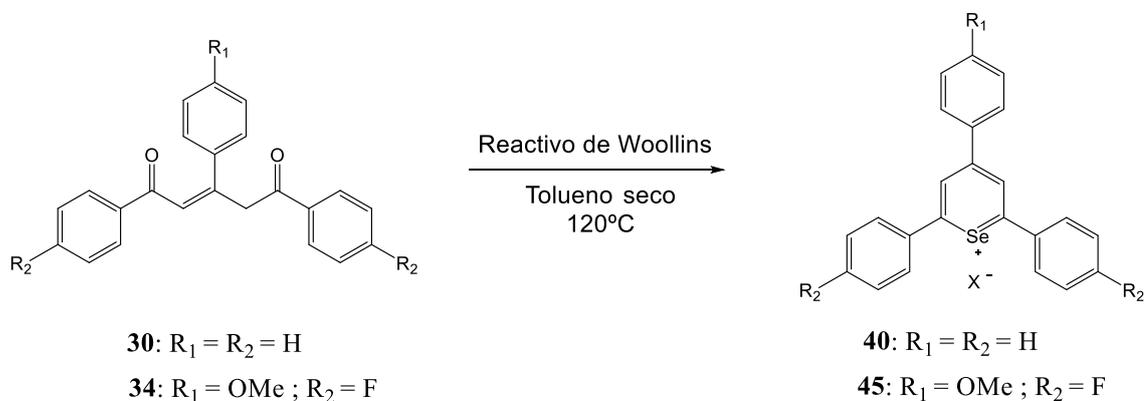
**Esquema 30.** Planteamiento teórico de estrategia ensayada para obtener sales de selenopirilio a partir de los compuestos 1,5-dicarbonílicos empleando  $\text{Na}_2\text{Se}$

El resultado de esta metodología no condujo ni a la formación del intermedio, ni a la formación de la sal de selenopirilio, tanto los espectros de  $^1\text{H}$  RMN como la espectrometría de masas indicaban la formación de las correspondientes sales de pirilio.

Dado que la anterior metodología no dio el resultado esperado, se ensayó una nueva estrategia de síntesis. Ésta consistía en hacer reaccionar la pent-2-en-1,5-dionas en tolueno seco con el reactivo de Woollins a reflujo.

El resultado de esta metodología fue la obtención de las sales de selenopirilio **40** y **45** pero en una cantidad inapreciable, hasta el punto de que no se detectaban las señales de

estos compuestos en los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y por consecuencia, tampoco se podía determinar el rendimiento con exactitud ni trabajar con los mismos. La única forma en la que se comprobó que se habían obtenido fue mediante HRMS.



**Esquema 31.** Estrategia ensayada para obtener sales de selenopirilio a partir de 1,5-dicarbonílicos empleando el reactivo de Woollins

Por tanto, mediante esta primera vía, empleando dos metodologías distintas sólo se consiguió obtener las sales de selenopirilio deseadas con rendimientos muy pobres y difíciles incluso de cuantificar.

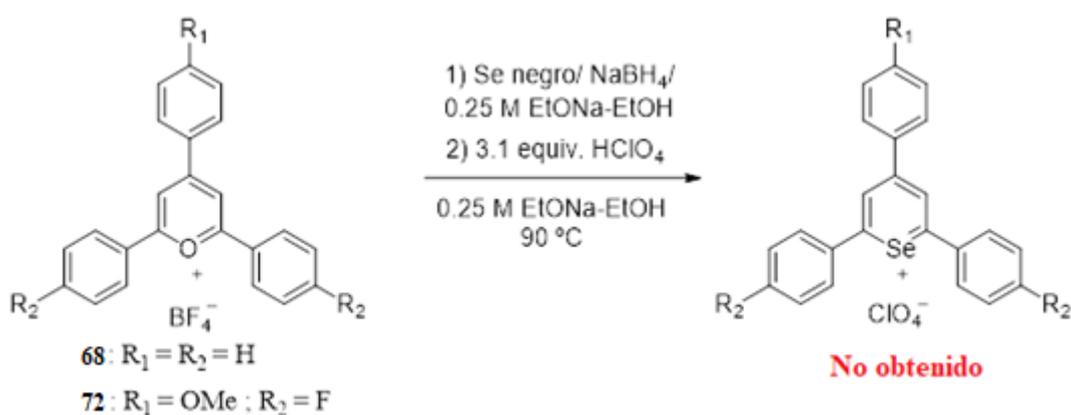
### 3.1.2. Vía II: Síntesis de sales de selenopirilio directamente a partir de sales de pirilio

La segunda vía consiste en hacer reaccionar la sal de pirilio con los reactivos adecuados para que en un en un proceso *one pot* se obtuviese la sal de selenopirilio deseada.

Las metodologías probadas en este caso fueron análogas a las que se usaron con los compuestos 1,5-dicarbonílicos con la diferencia de que el producto de partida en este caso se trataría de la sal de pirilio.

Por tanto, la primera estrategia consistió en hacer reaccionar la sal de pirilio disuelta en acetonitrilo con  $\text{Na}_2\text{Se}$  formado *in situ* mediante reacción de selenio negro con borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ) en agua y posterior calentamiento a reflujo bajo atmósfera de argón en la oscuridad. Esta mezcla se hizo reaccionar en acetonitrilo. Se empleó  $\text{HClO}_4$  para volver a ciclar *in situ* el compuesto por si esto sucedía.

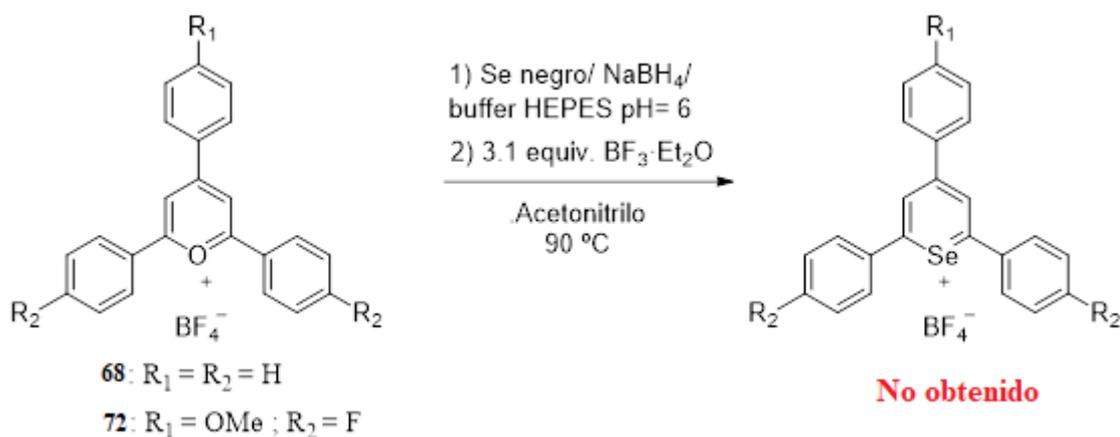
Siguiendo metodologías de síntesis relacionadas<sup>213</sup> y dado que la metodología anterior no dio resultado, se hicieron reaccionar las sales de pirilio **68** y **72**, disueltas en una solución 0.25 M de EtONa-EtOH, con una disolución de Na<sub>2</sub>Se previamente formada. Esta última se preparó por calentamiento de una disolución de EtONa-EtOH 0.25 M conteniendo selenio negro y borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>). La mezcla de reacción se calentó a 90 °C, y se dejó reaccionando a la oscuridad bajo atmósfera inerte de argón hasta la desaparición de los reactivos de partida (se hizo un seguimiento de la reacción mediante c.c.f (hexano–AcOEt 4:1). Al finalizar la reacción, se adicionaron 3.1 equivalentes de HClO<sub>4</sub> (Esquema 32).



**Esquema 32.** Metodología ensayada para la síntesis de selenopirilios haciendo reaccionar sales de pirilio con Na<sub>2</sub>Se

Nuevamente esta metodología no originó las sales de selenopirilio deseadas, sino que se recuperaron las sales de pirilio de partida correspondientes.

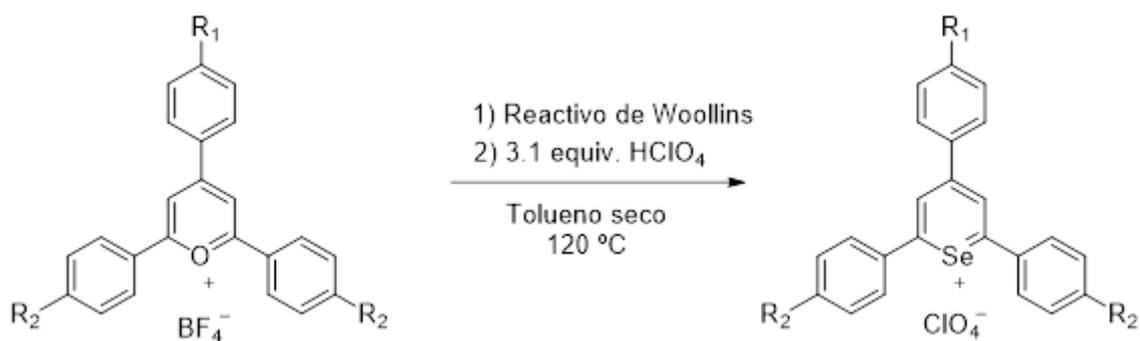
Con el mismo planteamiento de reacción y sospechando que ésta no transcurriera correctamente por el pH del medio, se hicieron reaccionar las sales de pirilio **16** y **20** en acetonitrilo, con selenio negro y borohidruro sódico, en las mismas condiciones, pero añadiendo un buffer para mantener el pH de la reacción a 6 (Esquema 33).



**Esquema 33.** Metodología ensayada para la síntesis de selenopirilios haciendo reaccionar pirilios con Na<sub>2</sub>Se y usando HEPES

Sin embargo, el resultado de esta metodología fue el mismo de la anterior, la recuperación del correspondiente producto de partida.

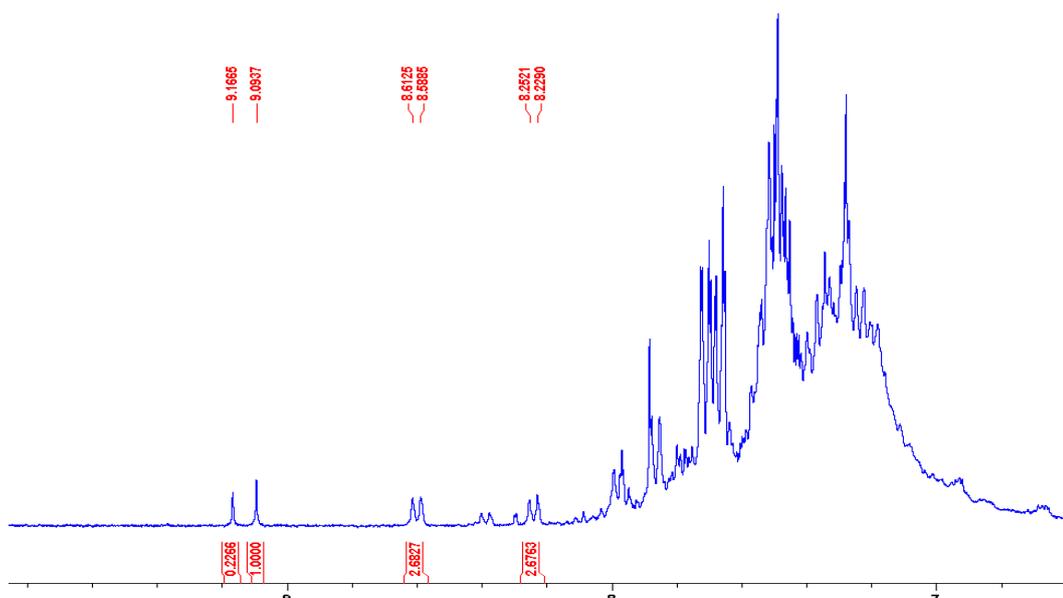
Observando la negativa de los resultados, se propuso la segunda metodología ya empleada en los 1,5-dicarbonílicos que consistía en hacer reaccionar cada una de las sales de pirilio disueltas en tolueno seco con el reactivo de Woollins a reflujo (Esquema 34).



**Esquema 34.** Obtención de selenopirilios por reacción de la sal de pirilio con WR

El resultado de esta metodología superó los resultados obtenidos anteriormente y dio lugar a los productos deseados **40**, **41** y **42**. Estos resultados se confirmaron mediante experimentos de <sup>1</sup>H RMN en DMSO y espectrometría de masas de alta resolución.

Para el espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto **40** (Figura 36) se observaron dos singuletes en torno a 9.17 y 9.09 ppm para dos protones cada uno, lo que correspondía a los protones equivalentes 3 y 5 del anillo de selenopirilio y pirilio respectivamente.



**Figura 36.**  $^1\text{H}$  RMN del compuesto **40** a 300 MHz (DMSO- $d_6$ )

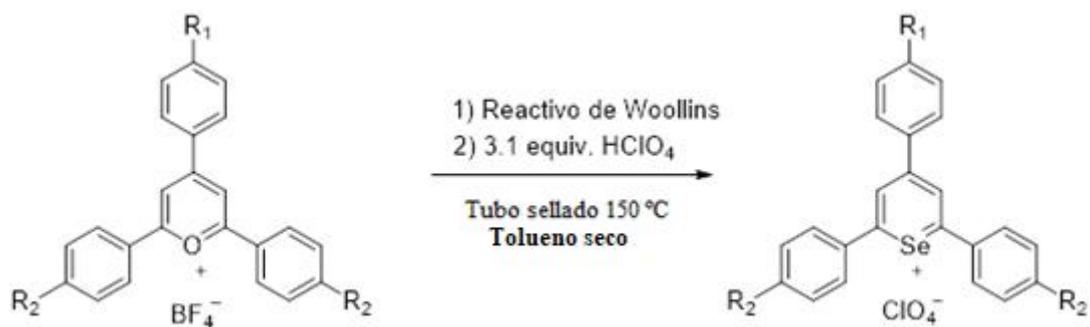
Por otra parte, como ya se comentó con anterioridad se utilizó la espectrometría de masas de alta resolución para investigar la estructura de los compuestos obtenidos, encontrándose en los tres casos el pico  $[\text{M}]^+$  correspondiente a la sal de selenopirilio.

Sin embargo, los rendimientos de las sales de selenopirilio obtenidas eran muy bajos lo que dificultaba en gran parte purificar y aislar el compuesto. No obstante, era la metodología que más resultados positivos había proporcionado, por lo que se decidió optimizarla como se describirá a continuación.

#### *Metodología optimizada para la obtención de sales de selenopirilio*

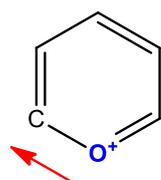
Esta metodología sintética es, en realidad, una optimización de la descrita en el anterior apartado. La optimización de la misma se basó en el empleo de un tubo sellado que permitiese elevar la temperatura de la reacción hasta 150 °C, derivando esto en una mayor transformación del producto de partida a selenopirilio y, por tanto, un mayor rendimiento de este último.

Por tanto, la metodología consistió en hacer reaccionar la sal de pirilio correspondiente con el reactivo de Woollins en tolueno seco y en tubo sellado. Tras 24 horas de reacción, se añade a la disolución  $\text{HClO}_4$  con la intención de volver a ciclar el compuesto nuevamente a selenopirilio (Esquema 35).

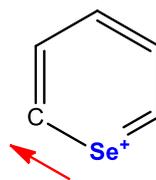


**Esquema 35.** Obtención de sales de selenopirilios por reacción de la sal de pirilio con WR en tubo sellado

Es necesario aclarar que el proceso de aislamiento de estos compuestos es complejo, puesto que se trata de moléculas muy similares a sus precursores, las sales de pirilio, presentando propiedades químicas muy parecidas que dificultan su separación. El proceso se basó en la diferencia de polaridad de los compuestos al contener un anillo de pirilio y un anillo de selenopirilio. Para el caso de las sales de pirilio debido a la presencia de oxígeno en la molécula se comprobaba experimentalmente que la polaridad de estos compuestos, independientemente de los sustituyentes que tuviese la molécula, era mayor que para los selenopirilios. Este hecho se comprende bien si se consultan las electronegatividades de los átomos de C, O y Se según la escala de Pauling y se calcula el momento dipolar del enlace C-O y C-Se cómo se representa en la Figura 37, ya que se trata de la única parte de la molécula que difiere entre sí. Por tanto, se realizó una primera purificación mediante precipitación o cristalización de la sal de pirilio con un disolvente apolar tipo eter dietílico y una vez separado del medio esta sal de pirilio, se llevó a cabo una segunda purificación con la misma metodología, pero empleando un disolvente un poco más polar para separar la sal de selenopirilio de los productos de partida. Los rendimientos obtenidos para las sales de selenopirilios sintetizadas abarcan desde un 37 (66) hasta un 52 % (38 %) (Tabla 11).



Electronegatividad (C) = 2.5  
 Electronegatividad (O) = 3.4  
 Polaridad enlace =  $3.4 - 2.5 = 0.9$



Electronegatividad (C) = 2.5  
 Electronegatividad (Se) = 2.4  
 Polaridad enlace =  $2.5 - 2.4 = 0.1$

**Figura 37.** Diferencia de polaridad entre enlaces C-O y C-Se usando la escala de electronegatividades de Pauling.

**Tabla 11.** Sales de selenopirilio sintetizadas

Selenopirilio	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Rto en % (Conversión %) <sup>a</sup>
<b>40</b>	H	H	50 (50)
<b>41</b>	F	H	46 (47)
<b>42</b>	Ph	Me	37 (66)
<b>43</b>	H	Me	52 (38)
<b>44</b>	Ph	Ph	-
<b>45</b>	OMe	F	-

<sup>a</sup> La conversión de pirilio en selenopirilio es obtenida dividiendo el valor de la integral de H-3 y H-5 del selenopirilio entre la suma de las integrales de los protones H-3 y H-5 de ambos (pirilio y selenopirilio)

Las sales de selenopirilio **40**, **41**, **42** y **43** fueron caracterizadas por <sup>1</sup>H RMN, <sup>13</sup>C RMN y HRMS. Las sales de selenopirilio **44** y **45** fueron detectadas por HRMS, pero no pudieron aislarse.

De hecho, con el fin de distinguir las señales de las sales de pirilio y selenopirilio, se realizaron análisis comparativo de los espectros de <sup>1</sup>H RMN en el mismo disolvente respecto de la sal de pirilio de partida durante el proceso de purificación (Figura 38).

Complementariamente, para diferenciar los compuestos durante el proceso de purificación dada la complejidad del caso, utilizamos HRMS-ESI, que nos permitía distinguir entre los cationes de la sal de pirilio y de selenopirilio como puede observarse en la Figura 39.

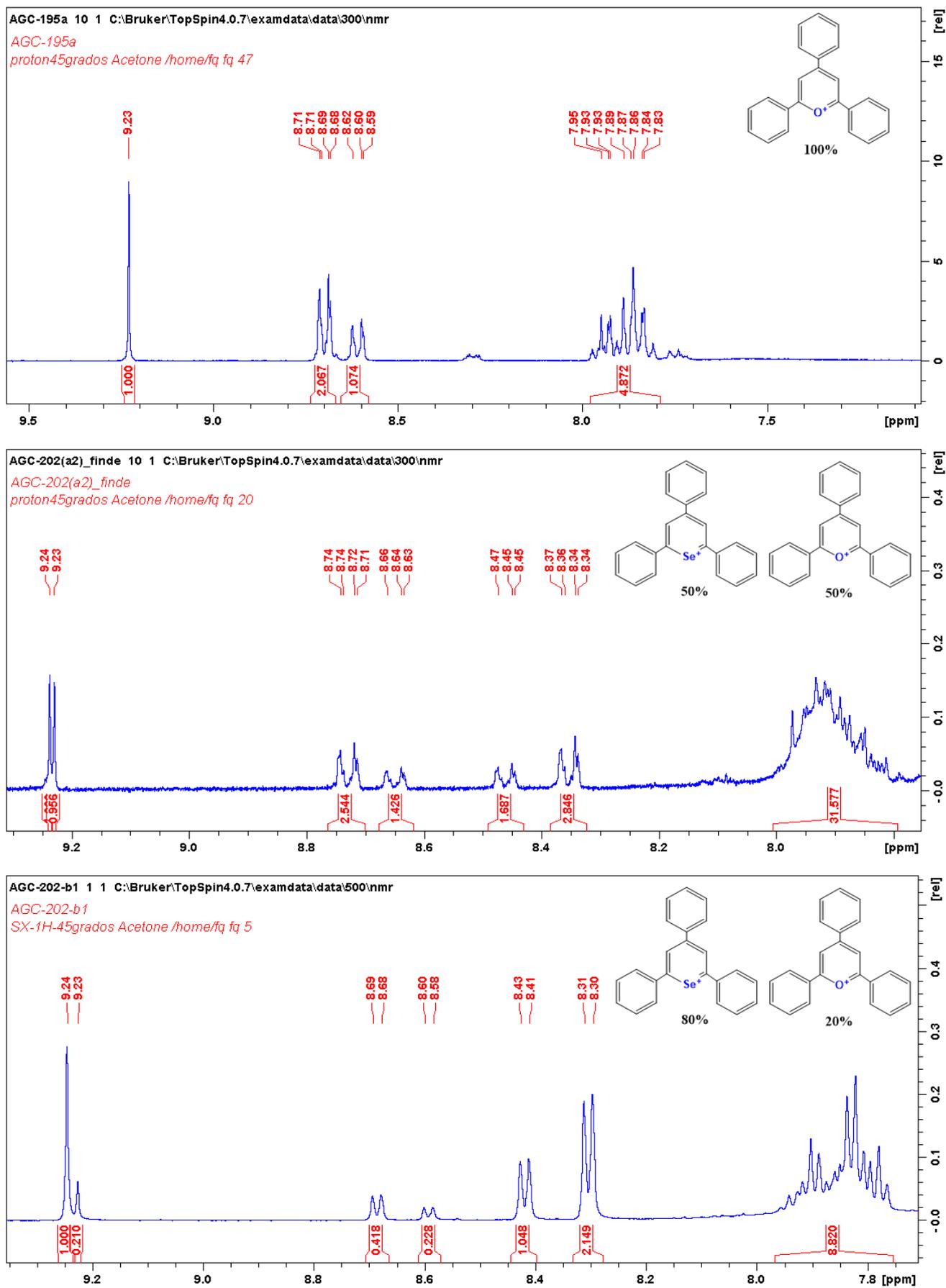
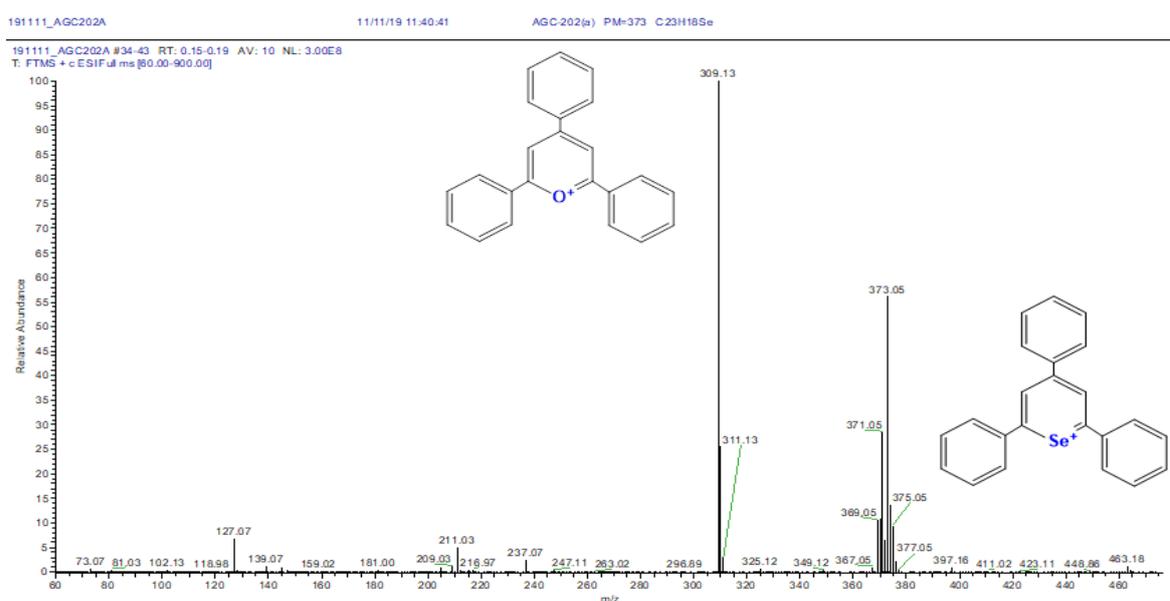


Figura 38. Comparativa de espectros de pirilios y selenopirilios con distinta pureza en Acetona-d<sub>6</sub>

El espectro de  $^1\text{H}$  RMN permitió cuantificar la proporción que había de sal de selenopirilio con respecto al pirilio de partida mediante integración de las señales de protón H-3 y H-5 (Figura 38). Comparativamente con la sal de pirilio, se puede apreciar que los protones desapantallados correspondientes a las posiciones H-3 y H-5 del anillo de chalcogenopirilio tan característicos de estas sales, aparecen ligeramente más desapantallados para el caso de las sales de selenopirilio, siendo por ejemplo para la sal de selenopirilio **40** el valor del desplazamiento de 9.24 ppm y para su homólogo sal de pirilio **68** 9.23 ppm en acetona. Sin embargo, como se puede apreciar también en el ejemplo, las señales correspondientes a H-2 y H-6 de los anillos A, B y C de la sal de selenopirilio aparecen más apantalladas que en el caso del pirilio y, además el orden de las señales es el inverso, es decir, para la sal de pirilio primero aparecen los 4 protones equivalentes de H-2 y H-6 de los anillos B y C y seguidamente los 2 protones de H-2 y H-6 del anillo A y en el caso del selenopirilio aparecen inversamente, primero los 2 protones de H-2 y H-6 del anillo A y posteriormente los 4 protones de H-2 y H-6 de los anillos B y C.

Los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN confirman también la presencia de las sales de selenopirilio. Así, en los espectros de las mismas se observan señales en el rango 169.7-163.3 ppm para los carbonos C-2 y C-6, mientras que C-4 aparece en el rango 164.1-162.7 ppm. Por último, los carbonos C-3 y C-5 generan una única señal entre 116.7 y 112.0 ppm.

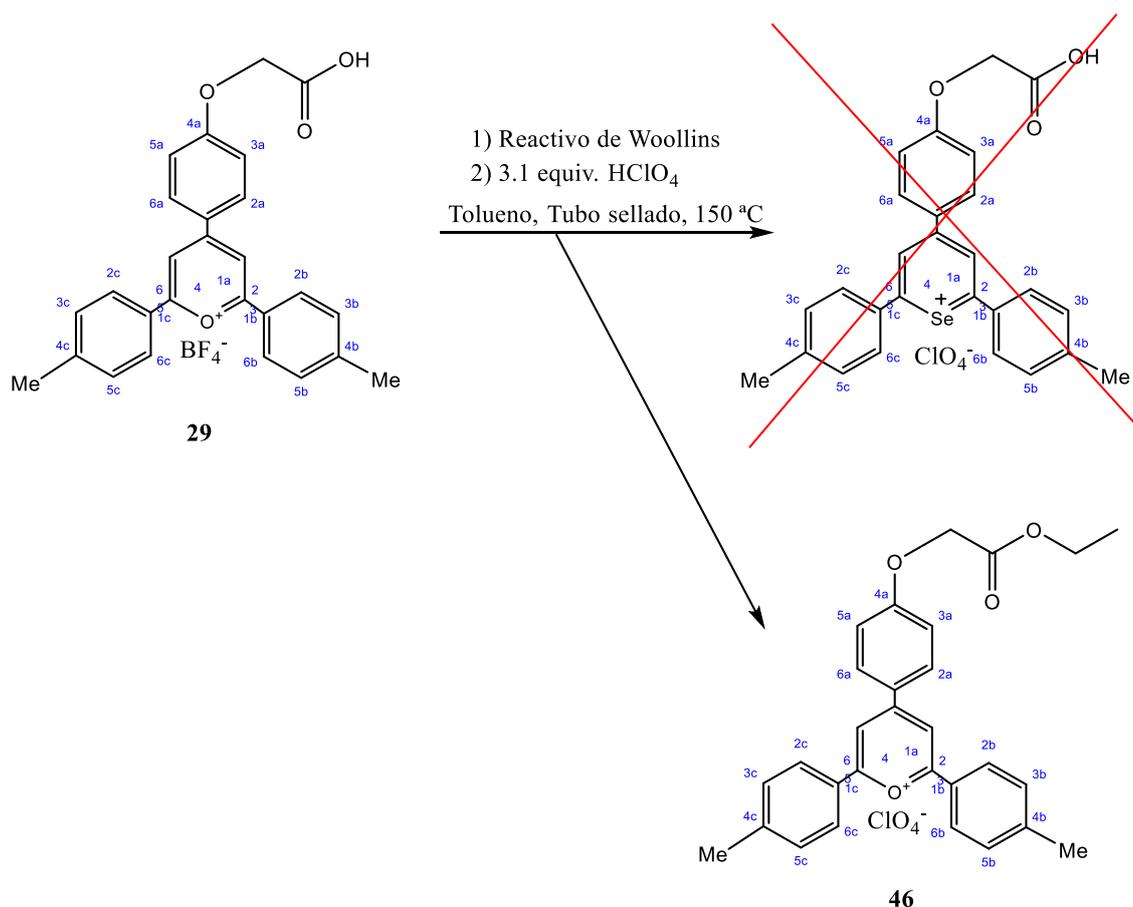


**Figura 39.** Comparativa mediante HRMS-ESI entre el Ion molecular del pirilio X y del selenopirilio X.

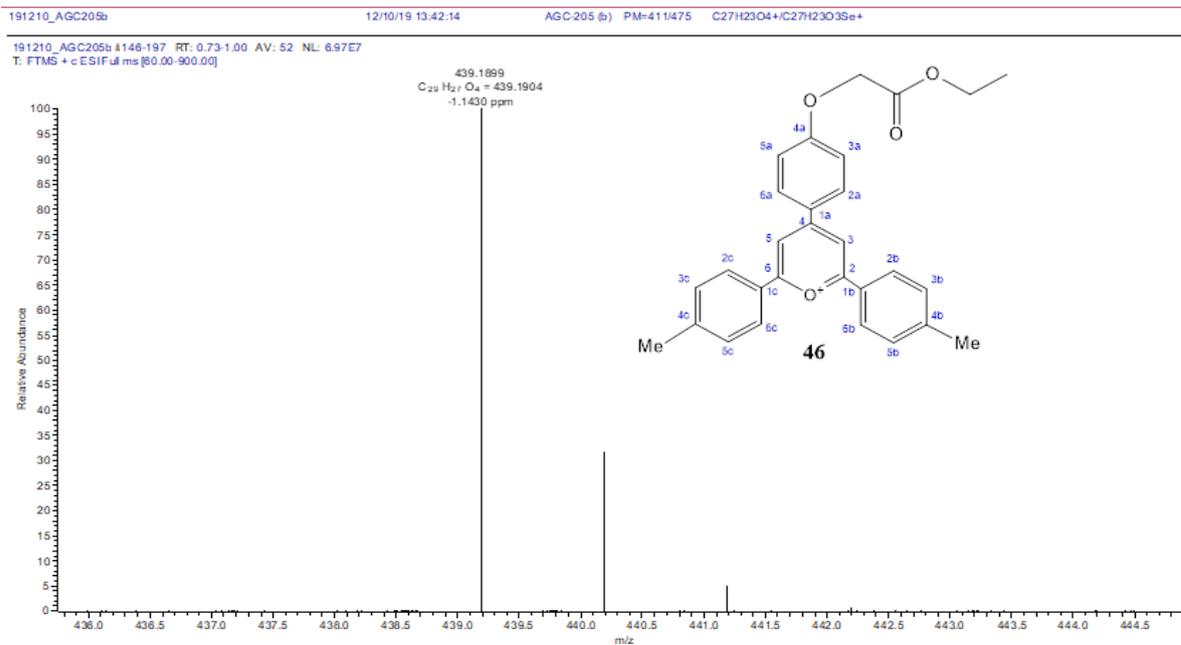
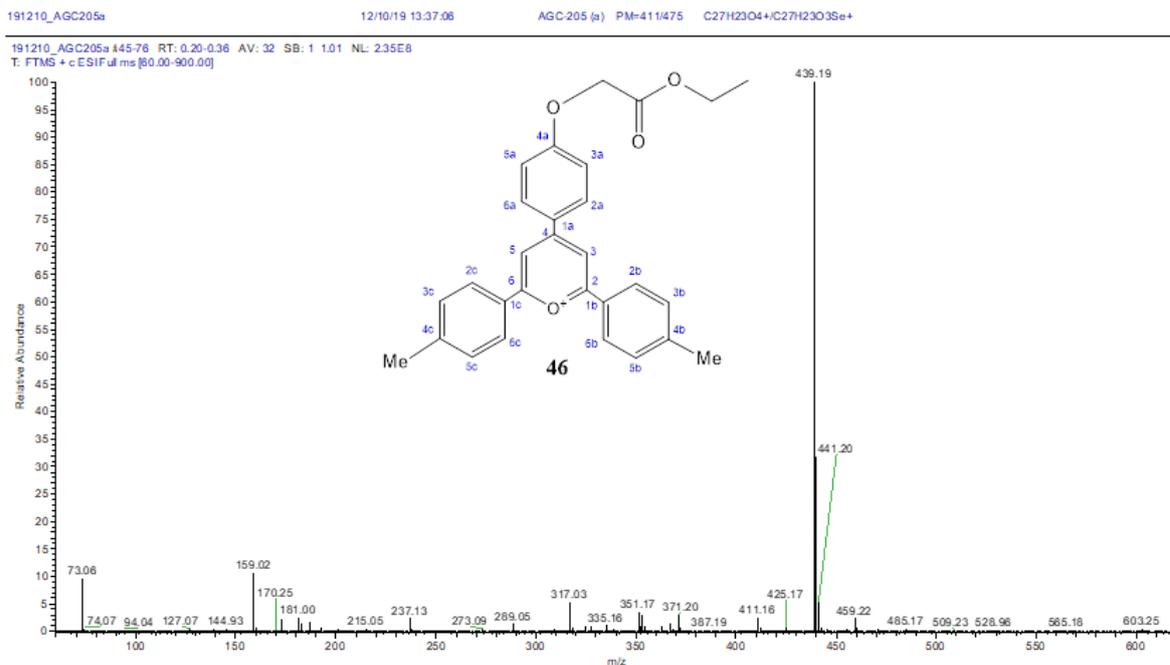
### 3.1.3. Sal de selenopirilio policatiónica anclada a quitosano

Con el fin de sintetizar sales de selenopirilio policatiónicas ancladas al esqueleto de quitosano, preparamos la sal de pirilio funcionalizada de estructura **29**. La idea inicial era transformar este compuesto en una sal de selenopirilio, la cual posteriormente se anclaría al quitosano por reacción del grupo carboxílico del compuesto **29** con el grupo amino del biopolímero, dando lugar así a una función amida.

La metodología aplicada para obtener la sal de selenopirilio fue análoga a la utilizada para la obtención de las sales de selenopirilio **40-45**, empleando tolueno seco con el reactivo de Woollins en tubo sellado. Si bien, el compuesto resultante no fue la sal de selenopirilio funcionalizada deseada, sino el éster etílico **46** de la sal de pirilio de partida (Esquema 36).



Esquema 36. Reacción de la sal de pirilio funcionalizada **29** con WR en tubo sellado.



**Figura 40.** Identificación mediante HRMS-ESI del compuesto **46**

Este hecho se comprobó en un primer momento mediante el análisis HRMS-ESI del crudo que, no solo no mostraba la presencia del compuesto deseado, sino que además mostraba el pico del ión molecular correspondiente al compuesto **46** a alta intensidad. Seguidamente, los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN permitieron confirmar la presencia de este compuesto mostrando señales exclusivas del mismo como son un cuartete en

protón a 3.80 ppm, correspondiente con el metileno de la cadena lateral transesterificada, y un triplete a 1.80 ppm del grupo metilo de esta misma cadena lateral.

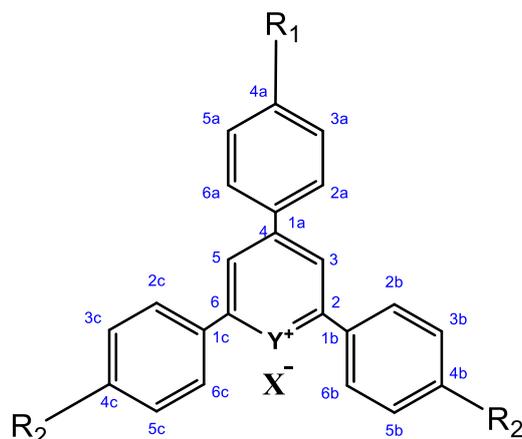
Así pues, no ha podido alcanzarse este objetivo inicialmente planteado.

### 3.2. Propiedades fotofísicas

Las sales de selenopirilio son compuestos altamente coloreados tanto en estado sólido como en disolución, al igual que ocurría con las sales de pirilio, por lo que se esperaba que también tuviesen unas propiedades fotofísicas interesantes.

Los datos de absorción de UV-Visible para las sales de selenopirilio **40-43** se encuentran recogidos en la Tabla 12. Tal y como ocurría en el caso de las sales de pirilio, las sales de selenopirilio **41-43** presentan dos bandas de absorción, con la diferencia de que ambas bandas aparecen en este caso en la región del UV-visible, mientras que para el caso de las sales de pirilio la primera banda aparecía en la región del UV-Visible y la segunda en la región del UV. El fenómeno de que aparezcan dos bandas de absorción para estos compuestos podemos atribuirlo a la misma razón por la cuál sucedía en las sales de pirilio: las bandas de UV-visible para dichos compuestos se separan como si de dos cromóforos se tratara. El primero de ellos se correspondería con la banda “x”, que representa los valores más altos de  $\lambda_{\text{abs}}$  y se atribuye a la unidad de 2,6-diarilselenopirilio, mientras que la banda “y” se corresponde con la unidad 4-arilselenopirilio y muestra los valores más bajos de  $\lambda_{\text{abs}}$ . Con respecto a la tercera banda de absorción que aparece en la sal de selenopirilio **40**, podría achacársele este valor a la presencia de impureza de sal de pirilio contenida en el compuesto dada la dificultad de su purificación ya que, como puede apreciarse en la tabla, el valor obtenido de la tercera  $\lambda_{\text{abs}}$  (402) concuerda muy bien con el valor obtenido para esa misma sal de pirilio (408) por nuestro grupo de investigación.

**Tabla 12.** Datos de absorción UV y fluorescencia para las sales de selenopirilio sintetizadas



Compuesto	Y	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Disolvente	λ <sub>absmax</sub> (nm)
<b>40</b>	Se	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	H	H	DMSO	735, 726, 402
<b>41</b>	Se	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	F	H	DMSO	735, 727
<b>42</b>	Se	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Ph	Me	DMSO	734, 726
<b>43</b>	Se	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	H	Me	DMSO	735, 727
-	O	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	H	H	Acetona	408, 357 <sup>a</sup>
-	O	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	F	H	Acetona	406, 359
-	O	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Ph	Me	Acetona	417
-	O	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	H	Me	CH <sub>3</sub> CN	428, 360

<sup>a</sup> Los valores de las tres primeras sales de pirilio han sido obtenidas previamente por nuestro grupo de investigación.<sup>93</sup> El valor de la última sal de pirilio ha sido recogido del estudio del grupo de Kubinsk y colaboradores.<sup>257</sup>

Un hecho significativo que hay que resaltar de la Tabla 12 son los desplazamientos de los máximos de absorción. Las sales de selenopirilio sintetizadas presentan el primer máximo de absorción entre 735 y 734 nm y un segundo máximo de absorción entre 727 y 726 nm, mientras que las sales de pirilio homólogas descritas, tanto por nuestro grupo de investigación como por el grupo de Kubinks y colaboradores, presentan su primer máximo de absorción entre 428 y 406 nm y la segunda banda de absorción entre 360 y 357 nm. Si bien estas últimas pruebas no están realizadas en el mismo disolvente, estos últimos valores descritos en la bibliografía concuerdan con los valores obtenidos en el capítulo 1 de esta tesis doctoral para el resto de sales de pirilio sintetizadas (1-7) empleando DMSO como disolvente, donde la primera banda aparece en una región que abarca desde los 518 a los 420 nm y la segunda banda en una región desde los 380 a los 312 nm.

<sup>257</sup> Heyes, D.; Menon, R.S.; C. Watt, I.F.; Wiseman, J.; Kubinsk, P J. *Phys. Org. Chem.* **2002**, *15* (10), 689-700.

Estos valores permiten concluir que el intercambio del calcógeno oxígeno por el selenio en este tipo de sales orgánicas desplaza ambos máximos de absorción en más de 300 nm, por lo que se podría afirmar que el aumento en el tamaño del átomo de calcógeno en la estructura conduce a un desplazamiento de  $\lambda_{\text{absmax}}$  hacia la zona del rojo en el UV-visible. Esta variación de la  $\lambda_{\text{abs}}$  se ha descrito por otros autores en diferentes estudios como es el del grupo de Okuma y colaboradores, donde intercambian átomos de azufre por átomos de selenio en los heteroaracenos dicatiónicos que sintetizan, consiguiendo de esta forma un mayor desplazamiento de los máximos de absorción.<sup>258</sup> También, el grupo de Sancenón y colaboradores observan este hecho en su estudio, donde al intercambiar el átomo de oxígeno por un átomo de azufre en estas mismas sales de 2,4,6-triarilpirilio consiguen también un aumento significativo en los máximos de absorción.<sup>259</sup> Otros muchos estudios refuerzan esta hipótesis para diferentes estructuras que incluyen átomos de calcógenos como calcogenopirilios, calcogenoxantilium y otros sistemas heterocíclicos.<sup>260, 261, 262, 263</sup>

Otro hecho destacable es que los sustituyentes incorporados en este caso: H, F, Me y Ph, no hacen variar significativamente los valores de los máximos de absorción.

### 3.3. Estudio de interacciones no covalentes en sales de selenopirilio usando cálculos teóricos

---

<sup>258</sup> Nagahora, N.; Kushida, T.; Shioji, K.; Okuma, K. *Organometallics*, **2019**, *38*, 1800–1808

<sup>259</sup> Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250* (23-24), 3081-3093.

<sup>260</sup> Detty, M. R.; McKelvey, J. M.; Luss, H. R. *Organometallics* **1988**, *7*, 1131–1147.

<sup>261</sup> Detty, M. R.; Murray, B. J. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 5235–5259.

<sup>262</sup> Calitree, B. D.; Donnelly, D. J.; Holt, J. J.; Gannon, M. K., II; Nygren, C.; Sukumaran, D. K.; Autschbach, J.; Detty, M. R. *Organometallics* **2007**, *26*, 6248–6257.

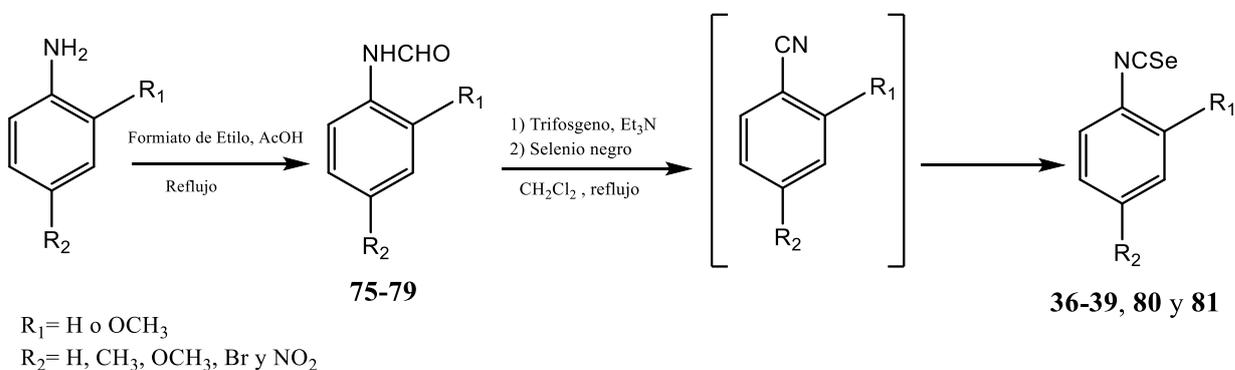
<sup>263</sup> Jahnke, A. A.; Seferos, D. S. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 943–951.

### 3.4. Síntesis de selenoureas derivadas de quitosano

La síntesis de selenoureas derivadas de quitosano se llevó a cabo mediante reacción de isoselenocianatos aromáticos con quitosano nativo. El objetivo era anclar al biopolímero unidades de tipo selenourea, que puedan conferir interesantes propiedades biológicas a los compuestos preparados. Además, se llevó a cabo un estudio sencillo de estructura-actividad para valorar la influencia del átomo selenio, así como la influencia de la naturaleza electrónica de los sustituyentes en las propiedades antioxidantes de los productos finales.

El quitosano nativo empleado es comercial perteneciente al grupo de quitosanos de bajo peso molecular ( $M_w = 87875$  g/mol) y grado de desacetilación de un 84 %.

Para proceder a la preparación de los isoselenocianatos hemos llevado a cabo una modificación de la metodología descrita por Barton y colaboradores<sup>246</sup> que ha sido desarrollada por Fernández-Bolaños y colaboradores<sup>264,243</sup>. En primer lugar, se llevó a cabo la transformación de las aril aminas en las correspondientes formamidas mediante tratamiento con formiato de etilo, en presencia de ácido acético como catalizador (Esquema 37).



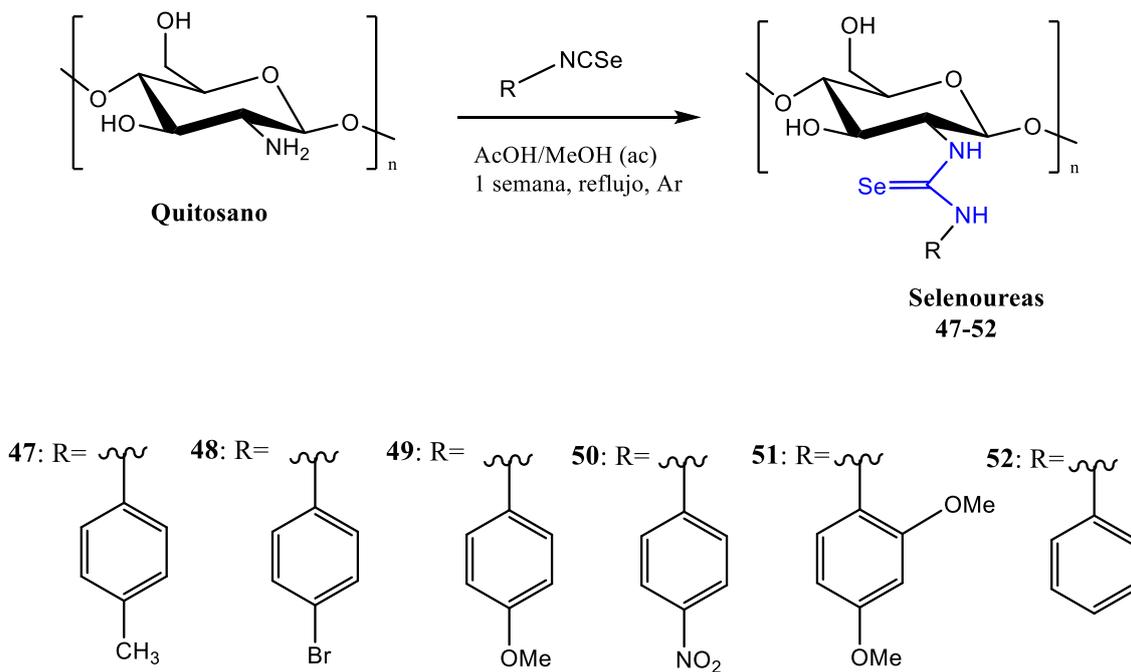
**Esquema 37.** Obtención de isoselenocianatos aromáticos partiendo de aminas aromáticas

A continuación, las formamidas preparadas fueron transformadas en isoselenocianatos mediante un procedimiento *one pot* en dos etapas; en la primera etapa se genera un isonitrilo intermedio por deshidratación de las formamidas

<sup>264</sup> Fernández-Bolaños, J. G.; López, O.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fuentes, J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4081-4084.

promovida por el empleo de trifosgeno y, seguidamente, dicho isonitrilo se transforma en isoselenocianato mediante reacción con selenio negro elemental (Esquema 37), cabe destacar que el trifosgeno es un sustituto eficaz del fosgeno, sin la toxicidad y riesgo inherente a éste. De este modo se sintetizaron las formamidas **75-79** (la *N*-fenilformamida es comercial) y los isoselenocianatos **36, 37, 38, 39, 80 y 81**.

Finalmente, una vez se prepararon los isoselenocianatos, se procedió al anclaje de los mismos al quitosano mediante reacción de éstos con el biopolímero. En todos los casos, se empleó ácido acético para solubilizar el polímero debido a la protonación de grupos amino ( $pK_a \sim 6.5$ ). El valor de pH utilizado en las síntesis (pH 5.0) se eligió para asegurar que los grupos amino conservan sus propiedades nucleofílicas sin que se produzca la precipitación del polímero. En estas condiciones, los grados de sustitución en el grupo amino (DS) son lo esperado por el valor de pH. Aplicando las condiciones descritas en el Esquema 38 se obtienen las selenoureas derivadas de quitosano **47-52** con unos rendimientos que oscilan entre el 77 y el 97 % y unos porcentajes de incorporación al biopolímero de entre un 1.4 y un 27 % (Tabla 13).



**Esquema 38.** Síntesis de selenoureas derivadas de quitosano

**Tabla 13.** Rendimientos y DS obtenidos para las selenoureas sintetizadas

Selenourea	R1	R2	DS (%) <sup>a</sup>	Rendimiento (%)
<b>47</b>	H	Me	25	97
<b>48</b>	H	Br	12	95
<b>49</b>	H	OMe	27	93

<b>50</b>	H	NO <sub>2</sub>	1.4	88
<b>51</b>	OMe	OMe	11.5	77
<b>52</b>	H	H	22	94

<sup>a</sup> El grado de *N*-sustitución (DS) fue calculado por el valor de integral relativa del espectro de <sup>1</sup>H NMR como se indica a continuación: DS % = [(I<sub>Ar</sub>/n)/(I<sub>H2-H6</sub>/6)] x 100 Donde I<sub>Ar</sub> es la integral relativa correspondiente a los protones aromáticos incorporados al biopolímero y I<sub>H2-H6</sub> corresponde a la integral de los protones de H-2 hasta H-6 del anillo de piranosa del quitosano

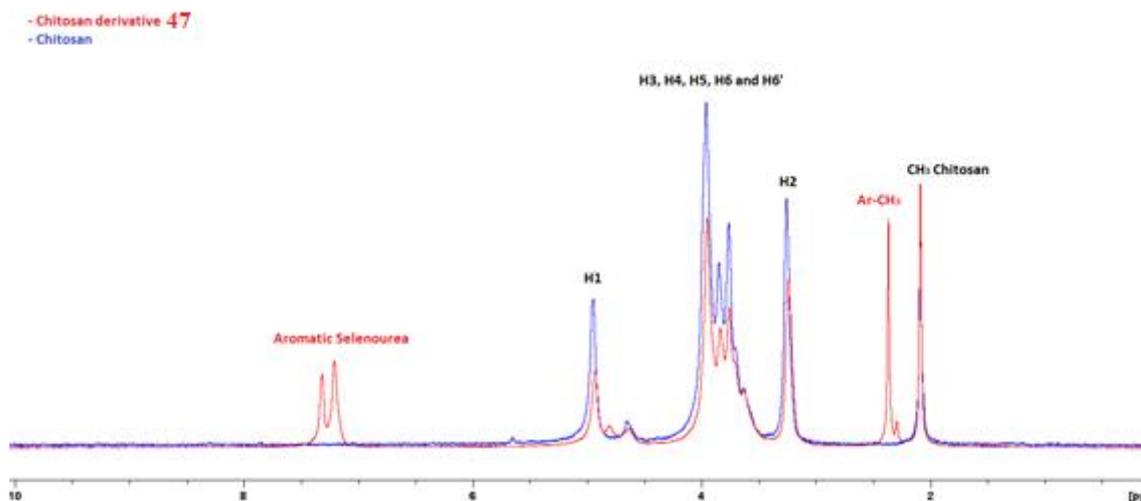
La caracterización de las selenoureas preparadas se llevó a cabo mediante FT-IR, <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C CPMAS RMN en estado sólido.

De manera convencional, la caracterización de los compuestos derivados de quitosano obtenidos se realiza mediante un análisis de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) en comparación con el quitosano no sustituido. El quitosano comercial presenta las bandas típicas a 3326 cm<sup>-1</sup> correspondientes a la vibración de tensión de los O–H y N–H de los grupos hidroxilo y amino implicados en enlaces de hidrógeno intermoleculares. Por otro lado, la banda a 2873 cm<sup>-1</sup> se asigna a la tensión de los enlaces C–H presentes en el esqueleto del carbohidrato. También, se observan las bandas de amida I y II a 1648 y 1575 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Otras bandas menos importantes, observadas en el quitosano, son las bandas a 1417, 1372 y 1313 cm<sup>-1</sup> correspondientes a la tensión de vibración del CH<sub>2</sub>, al modo de flexión del C–H y a la banda de amida III, respectivamente. Las bandas más interesantes del quitosano desde un punto de vista estructural son la tensión asimétrica del enlace C–O–C a 1151 cm<sup>-1</sup> así como las bandas de tensión de los grupos hidroxilos C–O tanto secundarios a 1061 cm<sup>-1</sup> como primarios a 1025 cm<sup>-1</sup>. A partir de la relación entre los picos de absorbancia de estas vibraciones A<sub>1025</sub>/A<sub>1061</sub> se puede obtener información sobre la *N*- y *O*-sustitución.<sup>265</sup> Si esta relación se mantiene inalterada, en comparación con el quitosano de partida, tras llevar a cabo la reacción sobre el polímero implica una regioselectividad sobre la *N*-sustitución. Por último, la banda a 894 cm<sup>-1</sup> se asigna al enlace glucosídico C–O–C del quitosano. Para los derivados de quitosano sintetizados los espectros de FT-IR muestran una banda en el rango de 1558-1450 cm<sup>-1</sup> que indica la existencia de C=C pertenecientes a la parte aromática de la molécula. Por último, el espectro de IR de los derivados obtenidos muestra la aparición de una nueva banda entre 1557 y 1544 cm<sup>-1</sup>, inexistente en el espectro del quitosano comercial, que podría

<sup>265</sup> Koutroumanis, K. P.; Avgoustakis, K.; Bikiaris, D. *Carbohydr. Polym.* **2010**, 82, 181–188.

corresponderse con el enlace C=Se de la unidad selenourea, como respaldan otros autores.<sup>266</sup>

Como se explicó en el capítulo anterior, los experimentos de <sup>1</sup>H RMN con filtro de difusión suponen una herramienta rutinaria para corroborar cualquier incorporación de forma covalente al quitosano. Las señales entre 3.0 y 5.0 ppm se asignan a los protones del esqueleto del quitosano. Concretamente, la señal que aparece a 3.2 ppm representa el protón H-2, el mutiplete que aparece en la zona de 3.6-4.0 ppm se asigna a los protones H-3, H-4, H-5, H-6 y H-6', y la señal a 5.0 ppm se asigna al hidrógeno de H-1. Tras producirse la reacción entre el quitosano y el correspondiente isoselenocinato aparecen nuevos picos en el espectro, indicando el anclaje de estos últimos al biopolímero. Los protones aromáticos H-2, H-3, H-4 (sólo para el caso del compuesto **52**), H-5 y H-6 aparecen entre 8.0 y 6.5 ppm para todas las selenoureas sintetizadas. Además, para la selenourea **47** se observa una nueva señal a 2.3 ppm, la cual es atribuible a los protones del grupo metilo (Figura 41).



**Figura 41.** Mejor: Comparativa del espectro de <sup>1</sup>H NMR del quitosano puro (azul) con el <sup>1</sup>H NMR con filtro de difusión de la selenourea derivada de quitosano **47** (rojo)

Con respecto al análisis de <sup>13</sup>C RMN, otros autores ya han descrito previamente el espectro <sup>13</sup>C CPMAS RMN en estado sólido para el quitosano puro, observándose las siguientes señales: a 23 ppm (-CH<sub>3</sub>), 58 ppm (C2), 61 ppm (C6), 76 ppm (C5,C3), 85 ppm(C4), 106 ppm (C1), 174 ppm (C=O). Tras la reacción del biopolímero con los

<sup>266</sup> Díaz, M.; de Lucio, H.; Moreno, E.; Espuelas, S.; Aydillo, C.; Jiménez-Ruiz, A.; Toro, M. Á.; Gutiérrez, K. J.; Martínez-Merino, V.; Cornejo, A.; Palop, J. A.; Sanmartín, C.; & Plano, D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e02200-18.

isosenocianatos se puede observar la aparición de nuevas señales en el rango de 150-120 ppm, correspondientes a los carbonos aromáticos de las selenoureas sintetizadas. Además, se puede observar la presencia de un nuevo pico que aparece entre 179.1-180.9 ppm, cerca del carbonilo propio del quitosano, que se atribuye al enlace C=Se de estos nuevos compuestos obtenidos.

### 3.5. Actividades biológicas

#### 3.5.1. Actividad antioxidante (método de DPPH)

El método usado para medir la capacidad antioxidante fue la determinación de captación de radicales libres con el método del DPPH, ya descrito con anterioridad en el apartado 3.4.1 del capítulo 1 de la tesis. Los compuestos estudiados en este capítulo son las selenoureas derivadas de quitosano.

**Tabla 14.** Actividad antirradicalaria mediante el método del DPPH de las selenoureas sintetizadas

Selenourea	R1	R2	EC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
Ácido ascórbico	-	-	16.5
Quitosano	-	-	No activo <sup>a</sup>
<b>47</b>	H	Me	5.13 ± 2.55
<b>48</b>	H	Br	7.45 ± 2.45
<b>49</b>	H	OMe	3.91 ± 1.61
<b>50</b>	H	NO <sub>2</sub>	No activo <sup>a</sup>
<b>51</b>	OMe	OMe	6.08 ± 3.77
<b>52</b>	H	H	13.89 ± 3.99

<sup>a</sup> El quitosano y el derivado **50** no mostraron actividad para concentraciones de 50 μM

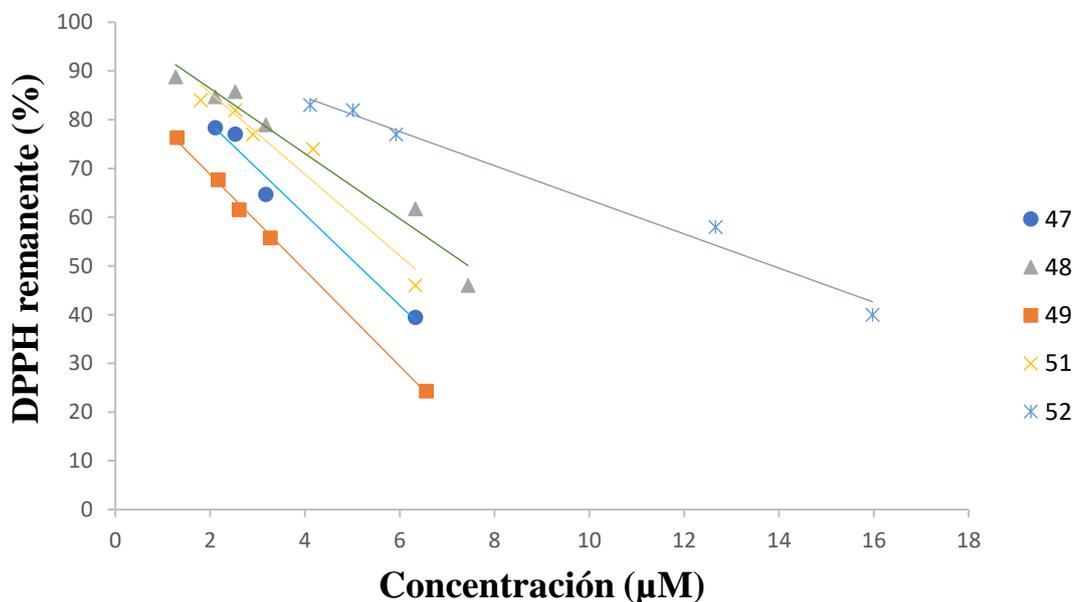
<sup>b</sup> El valor de EC<sub>50</sub> para el ácido ascórbico se encuentra recogido en <sup>267</sup>

La Tabla 14 recoge los valores de la actividad antirradicalaria de los compuestos preparados para una concentración fija de DPPH de 58.5 μM. Como se comentó anteriormente, la actividad fue cuantificada en términos de EC<sub>50</sub>, la concentración requerida para reducir la concentración de DPPH al 50 % de su valor inicial. Como puede apreciarse en esta tabla así como en la Figura 42, los compuestos que mostraron una mayor actividad resultaron ser las selenoureas **49**, **47** y **51** con valores de EC<sub>50</sub> de 3.91, 5.13 y 6,08 μM respectivamente, valores que superaron la actividad del ácido ascórbico, usado como control positivo. Los derivados **48** y **49** (EC<sub>50</sub> = 7.45 y 13.89 μM respectivamente) mostraron también una interesante actividad antirradicalaria comparable a la del ácido ascórbico e incluso ligeramente superior. Sin embargo, la

<sup>267</sup> Lee, C.Y.; Held, R.; Sharma, A.; Baral, R.; Nanah, C.; Dumas, D.; Jenkins, S.; Upadhaya, S.; Du, W. J. *Org. Chem.* **2013**, 78, 11221-11228.

selenourea **50** y el quitosano nativo sin unidad selenourea no mostraron ninguna actividad a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$ , por lo que obviamente no fueron ensayados a concentraciones menores.

El análisis de la tabla anterior podría permitir establecer algunas conclusiones: la actividad antioxidante de estos compuestos podría depender de dos factores: la naturaleza electrónica de los sustituyentes presentes en el anillo de fenilo de la unidad selenourea y el grado de incorporación al biopolímero (DS). En primer lugar, respecto a los sustituyentes presentes en el anillo de fenilo de la selenourea, se observó una mayor actividad antirradicalaria para aquellos derivados que poseían grupos con efectos electrón-donador en el anillo aromático (**47**, **49** y **51**), sin embargo, se observaba un pronunciado descenso de la misma con aquellos derivados que poseían un grupo electrón-atractor (**48** y **50**). No obstante, no puede realizarse una comparativa detallada de los sustituyentes debido a los diferentes valores de DS que tienen los distintos derivados. La segunda interpretación que se podría dar es que para aquellos compuestos que presentan una mayor incorporación de unidad activa, es decir con mayores DS, mostraban una mejor actividad antioxidante, como es el caso de los derivados **47** y **49**.



**Figura 42.** Comparativa de la actividad antirradicalaria de todas las selenoureas en comparación con el quitosano

### 3.5.2. Actividad como miméticos de la glutatión peroxidasa

Se han estudiado una amplia gama de compuestos organoselénicos que actúan como miméticos de la enzima glutatión peroxidasa *in vitro*, como es el caso de selenoazúcares, selenoureas o selenocarbamatos.<sup>268,269</sup>

Las glutatión peroxidadas (GPxs) son un conjunto de enzimas que contienen selenio en su centro activo y de entre las diferentes funciones que realizan, destaca su actuación frente a especies reactivas de oxígeno (ROS), como puede ser el caso del  $H_2O_2$ , por medio de un ciclo catalítico redox en el que intervienen grupos tioles como cofactores y selenio (Figura 43).<sup>270, 271</sup>

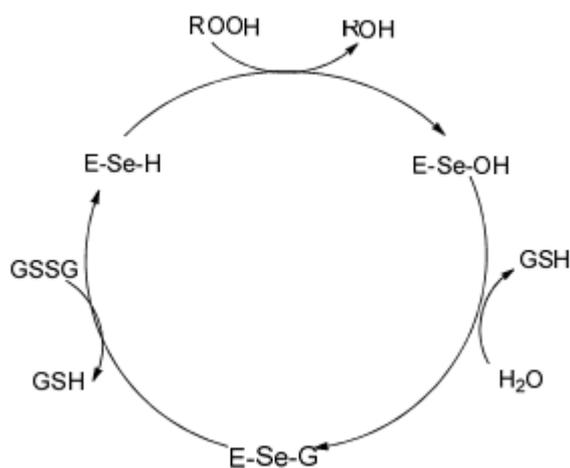


Figura 43. Mecanismo catalítico de actuación de la GPx

En este ciclo, la enzima glutatión peroxidasa se encarga de reducir al  $H_2O_2$  por medio de un centro activo que contiene selenocisteína, y por tanto, un grupo selenol ( $E-Se-H$ ). El átomo de selenio interviene en un proceso redox en el cual el selenolato se oxida a ácido selénico al reducir tanto al peróxido de hidrógeno como a diversos peróxidos orgánicos. Este selenolato reacciona con el glutatión ( $GSH$ ) para formar un aducto selenosulfuro ( $E-Se-G$ ). Una segunda unidad de glutatión se encarga de la regeneración de la forma activa de la enzima atacando al aducto para formar glutatión oxidado, con un grupo disulfuro ( $GSSG$ ).

<sup>268</sup> Merino-Montiel, P.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J. G. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3591-3595.

<sup>269</sup> Merino-Montiel, P.; Maza, S.; Martos, S.; López, Ó.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J. G. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2013**, *48*, 582.

<sup>270</sup> Arthur, J.R. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1825-1835.

<sup>271</sup> Muges, G.; Singh, H. B. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 347-357.

La actividad como mimético de la glutatión peroxidasa ha sido cuantificada empleando el modelo previamente descrito por Iwaoka y colaboradores.<sup>272</sup> En este modelo se emplea el PhSH como cofactor, sustituyendo al GSH. Los antioxidantes, en este caso las selenoureas, toman el papel de los catalizadores que convertían el PhSH en el correspondiente disulfuro en presencia de un exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hemos comparado las actividades obtenidas con la reacción llevada a cabo sin catalizador (control). Adicionalmente, se ha calculado un índice de selectividad (SI), dividiendo la velocidad de la reacción en presencia de los diferentes compuestos entre la velocidad de la reacción sin añadir ningún catalizador. Así, este SI indica cuanto aumenta la velocidad de la reacción la presencia del catalizador.

**Tabla 15.** Actividad como mimético de la GPx de las selenoureas sintetizadas como miméticos de la GPx

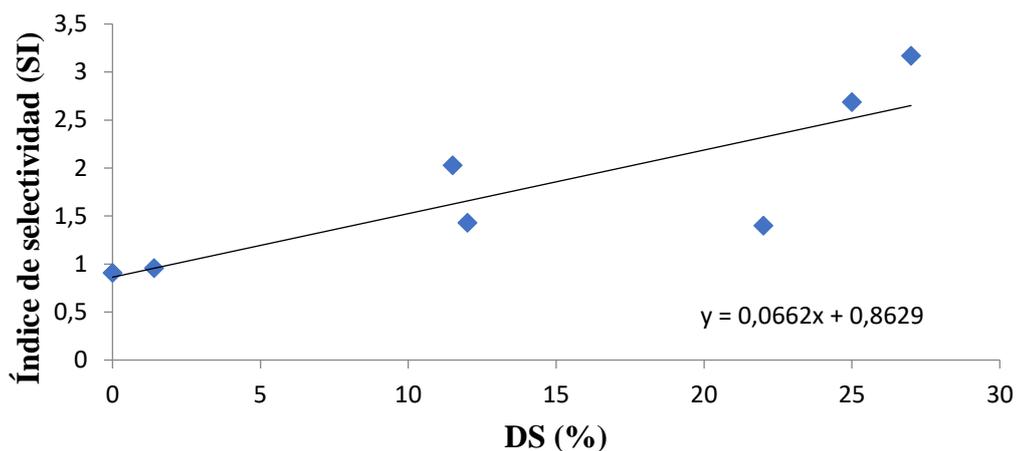
Selenourea	R1	R2	v (μM/min) <sup>a</sup>	SI <sup>b</sup>
<b>Control</b>	-	-	3.56 ± 0.91	-
<b>Quitosano</b>	-	-	3.25 ± 0.42	0.91
<b>47</b>	H	Me	9.60 ± 0.25	2.69
<b>48</b>	H	Br	5.10 ± 0.60	1.43
<b>49</b>	H	OMe	11.30 ± 0.35	3.17
<b>50</b>	H	NO <sub>2</sub>	3.44 ± 0.61	0.96
<b>51</b>	OMe	OMe	7.26 ± 1.41	2.03
<b>52</b>	H	H	5.00 ± 0.65	1.40

<sup>a</sup> Condiciones de reacción: [PhSH] = 25.0 mM; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 260.0 mM; [Antioxidante] = 0.5 μM.

<sup>b</sup> Índice de selectividad (SI): se calcula dividiendo la velocidad de reacción de los diferentes compuestos entre el control.

Como se puede apreciar en la Tabla 15, casi todos las selenoureas sintetizadas se comportaron como buenos miméticos de la enzima glutatión peroxidasa. Sin embargo, bajo estas condiciones el quitosano y la selenourea **50** mostraron una velocidad de reacción similar a la del control, es decir, aquella que se daba sin presencia del catalizador. Por otra parte, se puede destacar el papel del derivado **49**, que triplica la velocidad del control, y del derivado **47** que consigue que sea más del doble. En menor medida, actúan también el resto de selenoureas **48**, **51** y **52**.

<sup>272</sup> Iwaoka, M.; Kumakura, F.; *Phosphorous, Sulphur Silicon Relat. Elem.* **2008**, *183*, 1009-1017.



**Figura 44.** Correlación entre el DS y el SI de las diferentes selenoureas derivadas de quitosano

A la vista de los resultados obtenidos puede establecerse que aquellos compuestos con una mayor incorporación de la unidad activa de selenourea, es decir mayor DS: **49** (27 %) y **47** (25 %) tienen la mayor actividad como miméticos de la glutatión peroxidasa, con índices de selectividad de un 3.17 y 2.69 respectivamente. Por otra parte, aquellas selenoureas con menores DS (**50**, 1.4 %) e incluso el quitosano comercial, que evidentemente no tiene ninguna unidad incorporada, no muestran ninguna actividad. Estas observaciones sugieren que podría existir una correlación entre el DS de los compuestos y la actividad como miméticos de la glutatión peroxidasa tal y como se muestra en la Figura 44.

## 4. Conclusiones

Se han preparado y caracterizado nuevas sales de selenopirilio mediante dos metodologías distintas: partiendo de pent-2-en-1,5-dionas y partiendo de sales de selenopirilio. Así, se ha comprobado que la metodología más eficiente es aquella que parte de sales de pirilio puesto que supone un menor número de pasos de reacción y a su vez, ofrece rendimientos significativamente mayores.

Se han preparado y caracterizado nuevas pent-2-en-1,5-dionas utilizando una metodología sencilla que involucra la apertura de las respectivas sales de pirilio. Estos compuestos son intermedios versátiles en síntesis orgánica por la polifuncionalidad y gran diversidad que presentan.

En relación con las propiedades fotofísicas, se ha comprobado que las sales de selenopirilio **40-43** presentan máximos de absorción a longitudes de onda comprendidas entre 720 y 740 nm. Esta propiedad hace de ellos sistemas prometedores como fotosensibilizadores potenciales en terapia fotodinámica.

Se han preparado y caracterizado nuevas selenoureas derivadas de quitosano mediante la reacción sin precedentes en este biopolímero con isoselenocianatos de tipo aromático.

Respecto a la capacidad antioxidante de las selenoureas derivadas de quitosano estudiadas mediante la metodología de DPPH, hemos demostrado que este tipo de compuestos son potentes agentes antioxidantes. En concreto destacan los compuestos **47, 49 y 51**, con un valor de  $EC_{50}$  dos veces superior al del ácido ascórbico.

La evaluación como miméticos de la enzima Glutación Peroxidasa de las selenoureas derivadas de quitosano revela que los compuestos que presentaban una mayor incorporación de la unidad activa selenourea, tienen una mayor actividad como miméticos de la GPx, destacando los compuestos **49 y 47**.

## 5. Parte Experimental

### 5.1. General methods

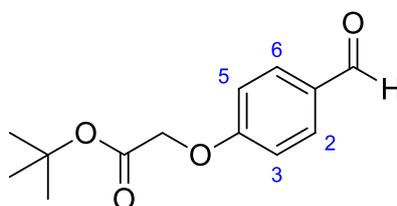
The general methods used are equivalent to those used in Chapter 1.

### 5.2. Raw materials

The commercial raw materials such as  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{HClO}_4$ , Woollins' reagent (WR), benzaldehydes: 4-(methoxyphenyl)-benzaldehyde, 4-nitrobenzaldehyde, 4-fluorobenzaldehyde, 4-methylbenzaldehyde and 4-phenylbenzaldehyde; acetophenones: acetophenone, 4-phenylacetophenone, 4-fluoroacetophenone, 4-methylacetophenone, 4-bromoacetophenone, 4-phenylacetophenone, 3,4-dimethoxyacetophenone, 3,4,5-trimethoxyacetophenone and 3,5-dihydroxyacetophenone, as well as different anilines: aniline, 4-bromoaniline, 4-methylaniline, 4-methoxyaniline and 2,4-dimethoxyaniline are commercially available from Sigma-Aldrich®. The chitosan used as raw material has been supplied by Sigma-Aldrich® as well. It has a degree of deacetylation (DD) of 84 %, parameter which has been determined by  $^1\text{H-NMR}$ . The molecular weight is 87875 g/mol and it has been calculated by the group as well by HPLC/SEC. The  $M_n$  of chitosan used is 48675 g/mol and its PDI 1.81.

In regard to synthetical raw materials:

#### Tert-butyl 2-(4-formylphenoxy)acetate (67)



The compound was obtained by the literature procedure.<sup>273</sup>  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):  $\delta = 9.90$  (s, 1H, CHO), 7.84 (d, 2H,  $J = 8.7$  Hz, H-2, H-6), 7.00 (d, 2H,  $J = 8.7$  Hz, H-3 and H-5), 4.60 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ) y 1.485 (s, 9H, 3- $\text{CH}_3$ ).

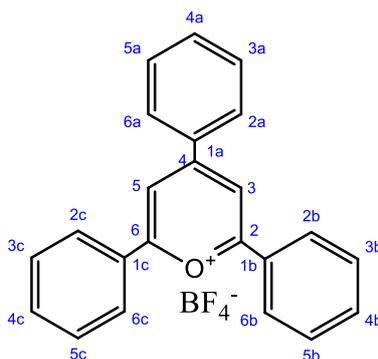
<sup>273</sup> Soriano, A.; Ventura, R.; Molero, A.; Hoen, R.; Casado, V.; Cortes, A.; Fanelli, F.; Albericio, F.; Lluís, C.; Franco, R.; Adenosine  $A_{2A}$  receptor-antagonist/dopamine  $D_2$  receptor-agonist bivalent ligands as pharmacological tools to detect  $A_{2A}$ - $D_2$  receptor heteromers. *J. Med. Chem.* **2009**, 53(18), 5590-5602.

### 5.2.1. Synthesis of pyrylium salts

#### *General procedure*

**BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (3 mmol)** was added dropwise under a **N<sub>2</sub>** atmosphere to a solution of p-substituted benzaldehyde (1 mmol) and mono or poli-substituted acetophenone (3 mmol) in DCM (5 ml). The mixture was heated to 80 °C until the reaction was completed, monitored by TLC (4:1 Cyclohexane-EtOAc). The residue was eventually treated with EtOH or Et<sub>2</sub>O. Crystallization from/ Treatment with 1,2-dichloroethane, DMC, diethyl eter or acetone afforded the corresponding pure pyrylium tetrafluoroborate.

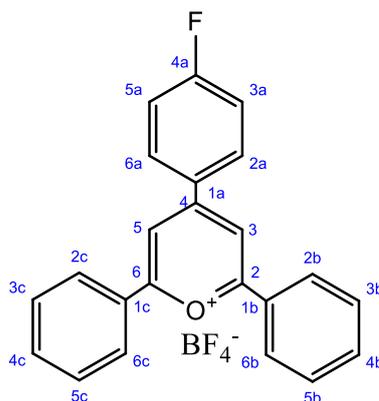
#### **2,4,6-Triphenylpyrylium tetrafluoroborate (68)**<sup>153</sup>



Starting reagents: benzaldehyde (1.02 ml, 10.1 mmol) and acetophenone (2.4 ml, 20,8 mmol). Reaction time: 24 h. Crystallization from 1,2-dichloroethane afforded the compound **68** (1.49 g, 37 %) as a yellow solid.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.17 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.60 (d, 6H, *J* = 7.5 Hz, H-2a, H-6a, H-2b, 6b, H-2c and H-6c), 7.88 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, H-4a, H-4b and H-4c), 7.81 (t, 6H, *J* = 8.0 Hz, H-3a, H-5a, H-3b, H-5b, H-3c and H-5c).

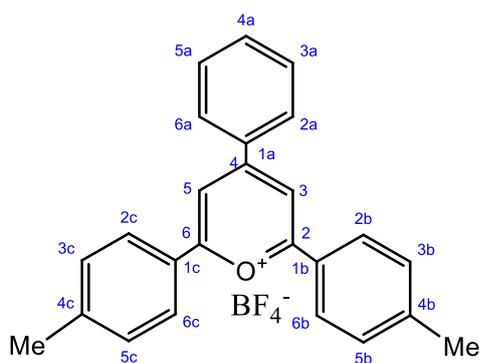
#### 4-(4-Fluorophenyl)-2,6-diphenylpyrylium tetrafluoroborate (**69**)<sup>153</sup>



Starting reagents: 4-fluorobenzaldehyde (432  $\mu$ l, 4.0 mmol) and acetophenone (940  $\mu$ l, 8.0 mmol). Reaction time: 24 h. Crystallization from acetone afforded the compound **69** (599 mg, 36 %) as a yellow solid.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  9.16 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.73 (dd, 2H, *J* = 5.4, *J* = 9.0 Hz, H-2a and H-6a), 8.59 (d, 4H, *J* = 7.5, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 7.88 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-4b and H-4c), 7.80 (t, 4H, *J* = 8.0 Hz, H-3b, H-5b, H-3c and H-5c), 7.68 (t, 2H, *J* = 8.8 Hz, H-3a and H-5a).

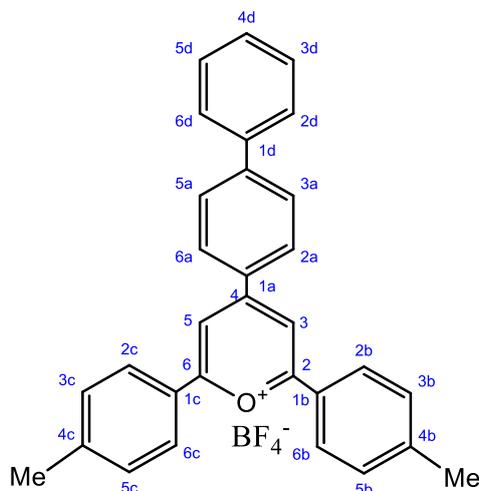
#### 4-Phenyl-2,6-di-*p*-tolylpyrylium tetrafluoroborate (**70**)<sup>153</sup>



Starting reagents: benzaldehyde (476  $\mu$ l, 4.7 mmol) and 4-methylacetophenone (943  $\mu$ l, 7.0 mmol). Reaction time: 9 h. Crystallization from acetone afforded the compound **70** (505 mg, 22 %) as a yellow solid.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  9.05 (s, 2H, H-3 y H-5), 8.56 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-2a and H-6a), 8.48 (d, 4H, *J* = 8.3 Hz, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 7.86 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, H-4a), 7.77 (t, 2H, *J* = 8.0 Hz, H-3a and H-5a), 7.61 (d, 4H, *J* = 8.1 Hz, H-3b, H-5b, H-3c and H-5c), 2.51 (s, 6H, CH<sub>3</sub>).

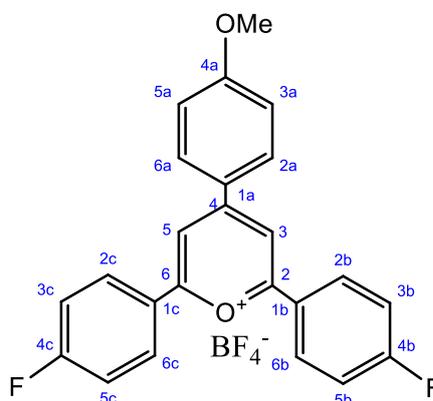
#### 4-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-2,6-di-*p*-tolylpyrylium tetrafluoroborate (**71**)<sup>153</sup>



Starting reagents: 4-phenylbenzaldehyde (500 mg, 2.7 mmol) and 4-methylacetophenone (732  $\mu$ l, 5.5 mmol). Reaction time: 4 h. Crystallization from acetone afforded the compound **71** (296 mg, 22 %) as a red solid.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  9.09 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.70 (d, 2H,  $J = 8.6$  Hz, H-2a and H-6a), 8.49 (d, 4H,  $J = 8.3$  Hz, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 8.09 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, H-3a and H-5a), 7.92 (d, 2H,  $J = 8.6$  Hz, H-2d and H-6d), 7.61 (d, 4H,  $J = 8.3$  Hz, H-3b, H-5b, H-3c and H-5c), 7.58 (t, 2H,  $J = 7.8$  Hz, H-3d and H-5d), 7.51 (t, 1H,  $J = 7.3$  Hz, H-4d), 2.52 (s, 6H, CH<sub>3</sub>).

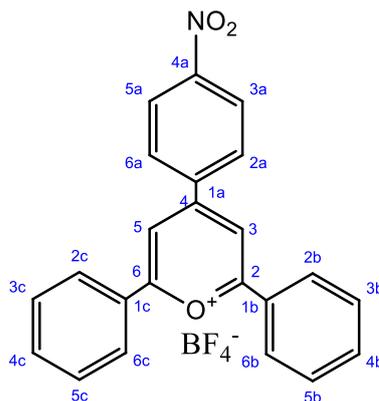
#### 2,6-Bis(4-fluorophenyl)-4-(4-methoxyphenyl)pyrylium tetrafluoroborate (**72**)<sup>153</sup>



Starting reagents: *p*-anysaldehyde (445  $\mu$ l, 3.7 mmol) and 4-fluoroacetophenone (891  $\mu$ l, 7.3 mmol). Reaction time: 6 h. Crystallization from 1,2-dichloroethane afforded the compound **72** (260 mg, 19 %) as an orange solid.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  9.02 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.70 (d, 2H,  $J = 9.1$  Hz, H-2a and H-6a), 8.64 (dd, 4H,  $J = 5.3$ ,  $J = 8.9$  Hz, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 7.64 (t, 4H,  $J = 8.9$  Hz, H-3b, H-5b, H-3c and H-5c), 7.33 (d, 2H,  $J = 9.1$  Hz, H-3a and H-5a), 4.00 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

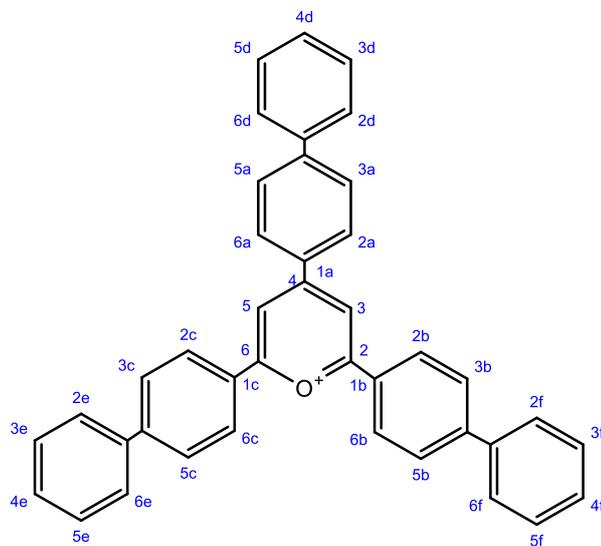
#### 4-(4-Nitrophenyl)-2,6-diphenylpyrylium tetrafluoroborate (**73**)<sup>153</sup>



Starting reagents: 4-nitrobenzaldehyde (500 mg, 3.3 mmol) and acetophenone (579  $\mu\text{l}$ , 4.9 mmol). Reaction time: 19 h. Crystallization from 1,2-dichloroethane afforded the compound **73** (84 mg, 16 %) as an orange solid.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  9.28 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.78 (d, 2H,  $J = 8.7$  Hz, H-2a and H-6a), 8.63 (d, 4H,  $J = 7.4$  Hz, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 8.57 (d, 2H,  $J = 8.9$  Hz, H-3a and H-5a), 7.91 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz, H-4b and H-4c), 7.83 (t, 4H,  $J = 8.0$  Hz, H-3b, H-5b, H-3c and H-5c).

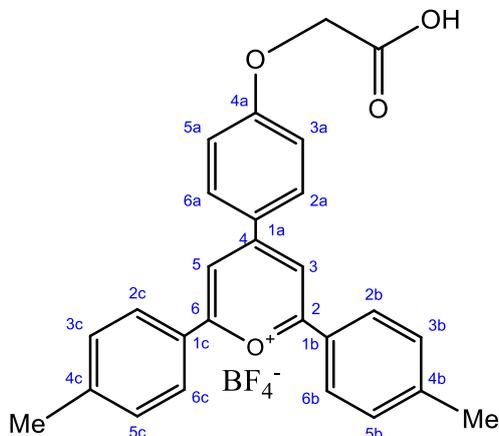
## 2,6-Di-(4-biphenyl)-4-biphenylpyrylium tetrafluoroborate (74)



Starting reagents: biphenyl-4-carboxaldehyde (400 mg, 2.2 mmol) and 4-phenylacetophenone (1.08 g, 5.5 mmol). Reaction time: 23 h. Crystallization from DC afforded the compound **73** (558 mg, 41 %) as a red solid.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (s, 2H, H-3 y H-5), 8.73 (d, 2H,  $J = 8.6$  Hz, H-2a y 6a), 8.66 (d, 4H,  $J = 8.6$  Hz, H-2b, 6b, 2c y 6c), 8.09 (d, 4H,  $J = 8.6$  Hz, H-3b, 5b, 3c y 5c), 8.08 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz, H-3a y 5a), 7.91 (d, 2H,  $J = 7.3$  Hz, H-2d y 6d), 7.88 (d, 4H,  $J = 7.2$  Hz, H-2e, 6e, 2f y 6f), 7.57 (t, 6H,  $J = 7.0$  Hz, H-3d, 5d, 3e, 5e, 3f y 5f) y 7.51 (t, 3H,  $J = 8.4$  Hz, H-4d, 4e y 4f).

## 4-(4-(Carboxymethoxy)phenyl)-2,6-di-*p*-tolylpyrylium tetrafluoroborate (29)



Starting reagents: tert-butyl-2-(4-formylphenoxy)acetate (**67**) (680.3 mg, 2.9 mmol) and *p*-methylacetophenone (809  $\mu$ l, 5.7 mmol). Reaction time: 4 h. Crystallization from diethyl ether afforded the compound 4-(4-(Carboxymethoxy)phenyl)-2,6-di-*p*-tolylpyrylium tetrafluoroborate (**29**) (86 mg, 10 %) as brown solid.

IR  $\nu_{\max}$  3331, 2930, 2854, 2361, 1647, 1585, 1246, 1182, 1053, 820 y 732  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, Acetone- $d_6$ ):  $\delta$  8.97 (s, 2H, H-3 and 5), 8.59 (d, 2H,  $J=9.0$  Hz, H-2a and H-6a), 8.47 (d, 4H,  $J=8.1$  Hz, H-2b, H-6b, H-2c and 6c), 7.61 (d, 4H,  $J=8.1$  Hz, H-3c, 5c, 3b y 5b), 7.32 (d, 2H,  $J=9.0$  Hz, H-3a and H-5a), 5.01 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ) and 2.53 (6H, s,  $\text{PhCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz, Acetone- $d_6$ ):  $\delta$  170.8 (COOH), 169.3 (C-2 and C-6), 165.4 (C-4), 165.2 (C-4a), 133.3 (C-3a and 5a), 131.5 (C-3c, C-5c, C-3b and 5b), 129.4 (C-2b, C-6b, C-2c and 6c), 127.7 (C-1a), 117.1 (C-3b, C-5b, C-3c and 5c), 113.8 (C-3 and C-5), 65.6 ( $\text{CH}_2\text{COOH}$ ) and 21.8 ( $\text{PhCH}_3$ ).

Absorption UV-Vis (AcOH/H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1:2):  $\lambda_{\max}$  408 nm

Emission (DMSO):  $\lambda_{\max}$  347 nm

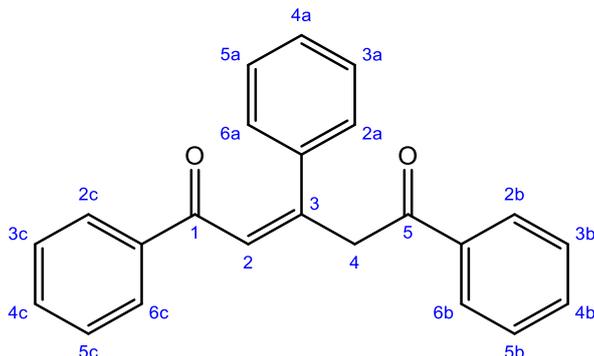
ESIHRMS:  $m/z$  411.1580, calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{O}_4$ : 411.1591

### 5.2.2. Synthesis of 1,5-dicarbonyl compounds

#### *General procedure*

To a dispersion of pyrylium salt (200 mg) in MeOH (10 ml) was added KF (581 mg, 1mmol) until the concentration of solution was 1 M. The mixture was stirred at 65 °C for 2 h or until completion of the reaction (TLC analysis). Then, H<sub>2</sub>O (5 ml) was added to the mixture causing the precipitation of a solid, which was filtered off, affording by this way the desired compound.

### 1,3,5-Triphenylpent-2-ene-1,5-dione (**30**)



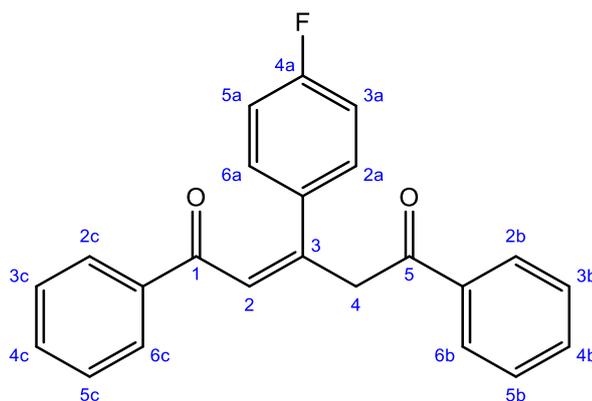
Starting reagents: pyrylium salt **68** (200 mg, 0,5 mmol) and KF (581mg, 10 mmol). Reaction time: 2 h. Treatment with H<sub>2</sub>O (5 ml) and subsequent filtration afforded the 1,3,5-Triphenylpent-2-ene-1,5-dione (**30**) (160 mg, 97 %) as a white solid.

$R_f$  (Hex/AcOEt 4:1): 0.58;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8.06 (ddd, 4H,  $J = 13.5$ ,  $J = 7.3$ ,  $J = 1.7$  Hz, H-2b, H-2c, H-6b and H-6c), 7.73 (dd, 2H,  $J = 7.4$ ,  $J = 2$  Hz, H-2a and 6a), 7.69-7.66 (m, 2H, H-4c and H-4b), 7.63 (s, 1H, H-2), 7.59-7.51 (m, 4H, H-3b, H-5b and H-3c and H-5c), 7.46-7.43 (m, 3H, H-3a, H-4a, H-5a), 4.88 (s, 2H, H-4 y H-4')

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz, DMSO)  $\delta$  195.98 (CO in C-5 or in C-1), 190.15 (CO in C-5 or in C-1), 152.28 (C-3), 141.04 (C-1b or C-1c), 138.44 (C-1b or C-1c), 136.74 (C-4b or C-4c), 133.20 (C-4b or C-4c), 132.97 (C-1a), 129.43 (C-4a), 128.96 (C-3b and C-5b or C-3c and C-5c), 128.74 (C-3b and C-5b or C-3c and C-5c), 128.72 (C-3a and C-5a), 128.64 (C-2b and C-6b or C-2c and C-6c), 128.23 (C-2b and C-6b or C-2c and C-6c), 128.05 (C-2a and C-6a), 126.97 (C-2), 42.18 (C-4).

ESIHRMS:  $m/z$  349.1202, calcd for C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>+Na: 349.1199.

### 3-(4-Fluorophenyl)-1,5-diphenylpent-2-ene-1,5-dione (31)



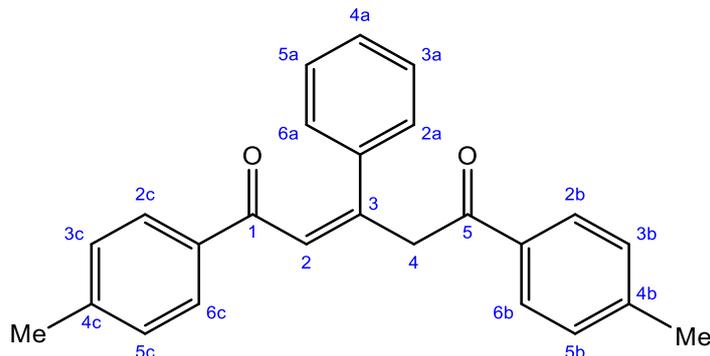
Starting reagents: pyrylium salt **69** (200 mg, 0,48 mmol) and KF (581mg, 10 mmol). Reaction time: 2 h. Treatment with H<sub>2</sub>O (5 ml) and subsequent filtration afforded the 3-(4-Fluorophenyl)-1,5-diphenylpent-2-ene-1,5-dione (**31**) (121 mg, 72 %) as a white solid.

*R<sub>f</sub>* (Hex/AcOEt 4:1): 0.62; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.07 (t, 4H, *J* = 5.4, *J* = 8.4 Hz, H-2b, H-2c, H-6b and H-6c), 7.82 (dd, 2H, *J* = 5.6, *J* = 8.7 Hz, H-2a and H-6a), 7.63 (s, 1H, H-2), 7.61-7.53 (m, 5H, H-3a, H-5a, H-3b, H-4b and H-5b or H-3a, H-5a, H-3c, H-4c and H-5c), 7.29 (t, 3H, *J* = 8.7 Hz, H-3b, H-4b and H-5b or H-3c, H-4b and H-5c), 4.89 (s, 2H, H-4 and H-4’);

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO) δ 196.01 (CO in C-5 or in C-1), 190.12 (CO in C-5 or in C-1), 162.83 (d, *J* = 247.0 Hz, C-4a), 151.14 (C-3), 138.39 (C-1b or C-1c), 137.45 (d, *J* = 3.6 Hz, C-1a), 136.70 (C-1b or C-1c), 133.11 (C-4b or C-4c), 129.37 (d, *J* = 8.4 Hz, C-2a and C-6a), 128.72 (C-4b or C-4c), 128.26 (C-3b and C-5b or C-3c and C-5c), 128.07 (C-3b and C-5b or C-3c and C-5c), 125.86 (C-2b and C-6b or C-2c and C-6c), 124.85 (C-2b and C-6b or C-2c and C-6c), 122.73 (C-2), 115.48 (d, *J* = 21.7 Hz, C-3a and C-5a), 42.18 (C-4).

ESIHRMS: *m/z* 367.1096, calcd for C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>F+Na: 367.1105.

### 3-Phenyl-1,5-di-p-tolylpent-2-ene-1,5-dione (32)



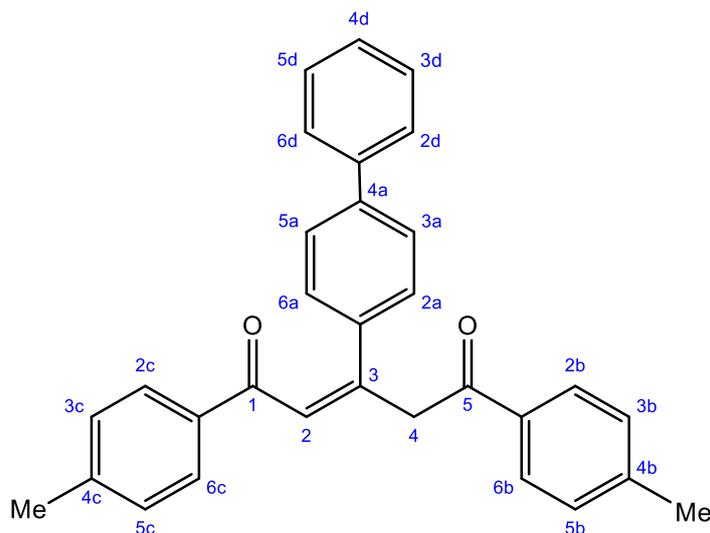
Starting reagents: pyrylium salt **70** (200 mg, 0,5 mmol) and KF (581mg, 10 mmol). Reaction time: 2 h. Treatment with H<sub>2</sub>O (5 ml) and subsequent filtration afforded the 3-Phenyl-1,5-di-p-tolylpent-2-ene-1,5-dione (**32**) (75 mg, 45 %) as a brown solid.

$R_f$  (Hex/AcOEt 4:1): 0.56;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.97 (dd, 4H,  $J = 4.5$ ,  $J = 8.1$  Hz, H-2b, H-2c, H-6b and H-6c), 7.73-7.70 (m, 2H, H-2a and H-6a), 7.6 (s, 1H, H-2), 7.47-7.44 (m, 3H, H-4a, H-3a and H-5a) 7.38 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, H-3b and H-5b or H-3c and H-5c), 7.35 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, H-3c and H-5c or H-3b H-5b), 4.86 (s, 2H, H-4 and H-4'), 2.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>);

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz, DMSO)  $\delta$  195.54 (CO in C-5 or in C-1), 189.67 (CO in C-5 or in C-1), 151.94 (C-3), 143.53 (C-1b or C-1c), 143.36 (C-1b or C-1c), 141.15 (C-4b or C-4c), 135.99 (C-4b or C-4c), 134.29 (C-1a), 129.30 (C-4a), 129.29 (C-3b and C-5b or C-3c and C-5c), 129.22 (C-3b and C-5b or C-3c and C-5c), 128.61 (C-3a and C-5a), 128.37 C-2b and C-6b or C-2c and C-6c), 128.16 (C-2b and C-6b or C-2c and C-6c), 126.91 C-2a and C-6a), 122.77 (C-2), 41.96 (C-4), 21.15 (Me), 21.13 (Me).

ESIHRMS:  $m/z$  377.1502, calcd for C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>+Na: 377.1512.

### 3-(Biphenyl-4-yl)-1,5-di-p-tolylpent-2-ene-1,5-dione (**33**)



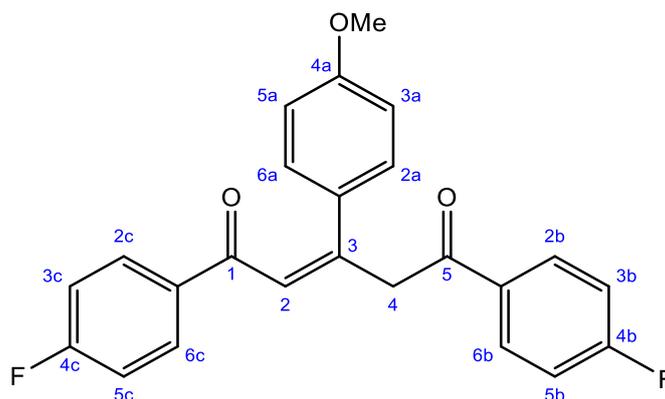
Starting reagents: pyrylium salt **71** (200 mg, 0,39 mmol) and KF (581mg, 10 mmol). Reaction time: 2 h. Treatment with H<sub>2</sub>O (5 ml) and subsequent filtration afforded the 3-(Biphenyl-4-yl)-1,5-di-p-tolylpent-2-ene-1,5-dione (**33**) (93 mg, 55 %) as a white solid.

$R_f$  (Hex/AcOEt 4:1): 0.57;  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.99 (dd, 4H,  $J = 5.4$ ,  $J = 8.1$  Hz, H-2b, H-2c, H-6b and H-6c), 7.83 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, H-2a and H-6a), 7.77-7.72 (m, 4H, H-2a', H-6a', H-5a and H-3a), 7.68 (s, 1H, H-2), 7.51 (t, 3H,  $J = 7.7$  Hz, H-3a', H-4a' and H-5a'), 7.40 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz, H-3c and H-5c or H-3b and H-5b), 7.38 (d, 2H,  $J = 8$  Hz, H-3c and H-5c or H-3b and H-5b), 4.91 (s, 2H, H-4 and H-4'), 2.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>);

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  195.62 (CO in C-5 or in C-1), 189.67 (CO in C-5 or in C-1), 151.43 (C-3), 143.57, 143.36, 140.04, 139.30, 136.04, 134.29, 129.30, 129.25, 129.04, 129.01, 128.39, 128.19, 127.83, 127.57, 126.82, 126.67 (Aromatic carbon), 122.57 (C-2), 41.78 (C-4), 21.16 (Me), 21.14 (Me). CRMN POR MI: AQUÍ HABRÍA 19 SEÑALES

ESIHRMS:  $m/z$  453.1814, calcd for C<sub>31</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>+Na: 453.1825.

**1,5-Bis(4-fluorophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)pent-2-ene-1,5-dione (34)<sup>238(a)</sup>**



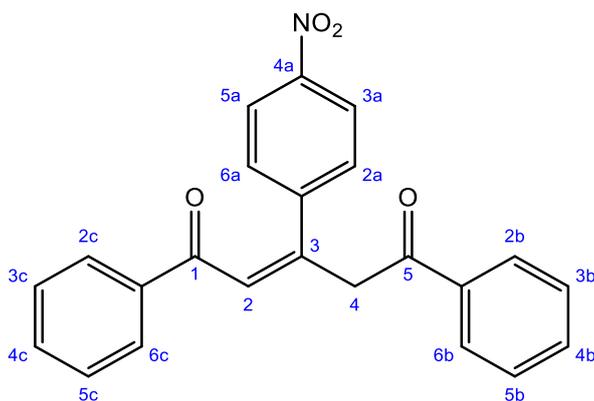
Starting reagents: pyrylium salt **72** (200 mg, 0,53 mmol) and KF (581mg, 10 mmol). Reaction time: 2 h. Treatment with H<sub>2</sub>O (5 ml) and subsequent filtration afforded the 1,5-Bis(4-fluorophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)pent-2-ene-1,5-dione (**34**) (204 mg, 98 %) as a white solid.

*R<sub>f</sub>* (Hex/AcOEt 4:1): 0.55; <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.17 (dd, 2H, *J* = 5.4, *J* = 8.9 Hz, H-2b and H-6b or H-2c and H-6c), 8.15 (dd, 2H, *J* = 5.4, *J* = 8.9 Hz, H-2c and H-6c or H-2b and 6b), 7.74 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz, H-2a and H-6a), 7.60 (s, 1H, H-2), 7.41 (t, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-3b and H-5b or H-3c and H-5c), 7.35 (t, 2H, *J* = 8.7 Hz, H-3c and 5c or H-3b and H-5b), 7.02 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz, H-3a and H-5a), 4.87 (s, 2H, H-4 and H-4'), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 194.9 (CO in C-5 or in C-1), 189.2 (CO in C-5 or in C-1), 165.9 (d, *J* = 254.3 Hz, C-4b or C-4c), 165.5 (d, *J* = 254.0 Hz, C-4c or C-4b), 161.0, 152.8, 135.7 (d, *J* = 2.9 Hz, C-1b or C-1c), 134.0, 133.6 (d, *J* = 2.9 Hz, C-1c or C-1b), 131.0 (d, *J* = 9.5 Hz, C-2b and 6b or C-2c and 6c), 130.9 (d, *J* = 9.5 Hz, C-2c and 6c or C-2b and 6b), 128.4 (C-2a and 6a), 121.3 (C-2), 115.8 (d, *J* = 21.9 Hz, C-3b and 5b or C-3c and 5c), 115.7 (d, *J* = 21.8 Hz, C-3c and 5c or C-3b and 5b), 114.3 (C-3a and 5a), 55.5 (OMe) y 42.8 (C-4).

ESIHRMS: *m/z* 415.1108, calcd for C<sub>24</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>F<sub>2</sub>+Na: 415.1116.

### (Z)-3-(4-nitrophenyl)-1,5-diphenylpent-2-ene-1,5-dione (**35**)



Starting reagents: pyrylium salt **73** (200 mg, 0,45 mmol) and KF (581mg, 10 mmol). Reaction time: 2 h. Treatment with H<sub>2</sub>O (5 ml) and subsequent filtration afforded the (Z)-3-(4-nitrophenyl)-1,5-diphenylpent-2-ene-1,5-dione (**35**) (92 mg, 53 %) as a white solid.

$R_f$  (Hex/AcOEt 4:1): 0.41; <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  8.29 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, H-2b and H-6c or H-2c and H-6c), 8.08 (d, 2H,  $J = 7.7$  Hz, H-2a and H-6a), 8.02 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, H-2b and H-6c or H-2c and H-6c), 7.76 (s, 1H, H-2), 7.73-7.66 (m, 2H, H-3a and H-5a), 7.61-7.54 (m, 6H, H-3c, H-4c, H-5c, H-3b, H-4b and H-5b), 4.92 (s, 2H, H-4 and H-4');

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  195.90 (CO in C-5 or in C-1), 190.31 (CO in C-5 or in C-1), 149.50 (C-3), 147.60 (C-4a), 147.56 (C-1a), 137.97 (C-1b or C-1c), 136.50 (C-1b or C-1c), 133.37 (C-4b or C-4c), 133.33 (C-4b or C-4c), 129.13 (C-2a and C-6a), 128.79 (C-3b and C-5b or C-3c and C-5c), 128.75 (C-3b and C-5b or C-3c and C-5c), 128.42 (C-2b and C-6b or C-2c and C-6c), 128.11 (C-2b and C-6b or C-2c and C-6c), 125.95 (C-2), 123.62 (C-3a and C-5a), 48.57 (C-4).

ESIHRMS:  $m/z$  394.1046, calcd for C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>N+Na: 394.1050.

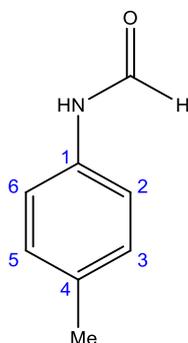
### 5.2.3. Synthesis of formamides

#### *General procedure*

A solution of the corresponding aryl amine (9.48 mmol) in ethyl formate (10 mL) and AcOH (0.55 mL, 9.48 mmol) was refluxed until disappearance of the starting material. Concentration to dryness, followed by column chromatography

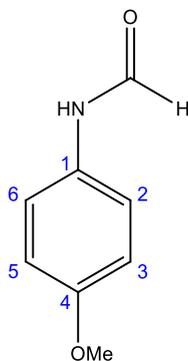
(hexane→EtOAc gradient) afforded formamides (**X-X**) in a 69-98% yield.<sup>247</sup> Formamide **1f** was commercially available.

***N*-(4-Methylphenyl) formamide (75)**<sup>274</sup>:



White solid, <sup>1</sup>H NMR(500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 50:50 (cis/trans), δ 8.60 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, trans), 8.52 (br, 1H, trans), 8.31 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, cis), 7.92 (br, 1H, cis), 7.42 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, cis), 7.13 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, trans), 7.10 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, cis), 6.98 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, trans), 2.31 (s, 3H, trans), 2.29 (s, 3H, cis).

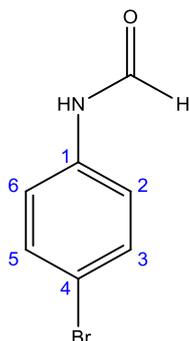
***N*-(4-Methoxyphenyl) formamide (76)**<sup>3</sup>:



White solid, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 20:80 (cis/trans), δ 8.33 (s, 1H, cis), 7.99 (br, 1, cis), 7.47 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, trans), 7.06 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, trans), 6.79 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 6.69 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 3.79 (s, 3H).

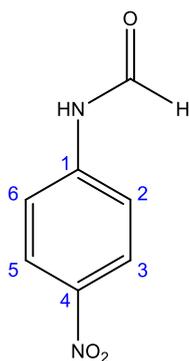
<sup>274</sup> Mamani, L.; Sheykhani, M.; Heydari, A.; Faraji, M.; Yamini, Y. *Appl. Catal. A: Gen.* **2010**, 377, 64-69.

***N*-(4-Bromophenyl) formamide (77)<sup>275</sup>:**



White Solid, <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.21 (brs, 1H, trans), 8.46 (d, 1H, *J*=11.32, trans), 8.23 (s, 1H, cis), 8.15 (brs, 1H cis), 7.39-7.45 (m, 2H, Ar-H), 6.93-6.99 (m, 2H, Ar-H);

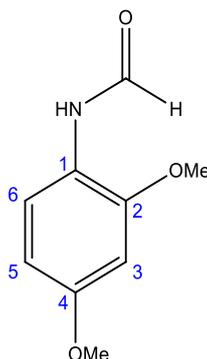
***N*-(4-Nitrophenyl) formamide (78)<sup>3</sup>:**



Yellow solid, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 80:20 (cis/trans), δ 10.80 (s, 1H, cis), 10.69 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz, trans), 9.04 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz, trans), 8.39 (s, 1H, cis), 8.20 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.81 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz).

<sup>275</sup> Hosseini-Sarvari, M.; Sharghi, H. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 6652–6654

### ***N*-(2,4-dimethoxy) formamide (79)<sup>276</sup>:**



Violet solid, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 80:20 (cis/trans), δ 10.80 (s, 1H, cis), 10.69 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz, trans), 9.04 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz, trans), 8.39 (s, 1H, cis), 8.20 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.81 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz).

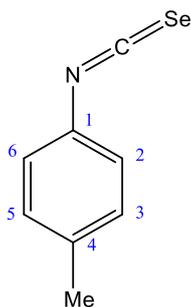
#### **5.2.4. Synthesis of isoselenocyanates**

##### *General procedure*

To a refluxing mixture of formamides (**75-79**) (1.5 mmol), Et<sub>3</sub>N (6.4 mmol), and 4 Å molecular sieves in dry dichloromethane (5 mL) a solution of triphosgene (0.8 mmol) in dry dichloromethane (2 mL), was dropwise added under Ar, over a period of 1 h. The resulting mixture was refluxed for 2.5 h and then black selenium powder (3.0 mmol) was added and refluxed for 4–18 h. After cooling, the mixture was filtered off and the filtered was evaporated under vacuum and purified by column chromatography affording isoselenocyanates (**37**, **38**, **39**, **80** and **81**).

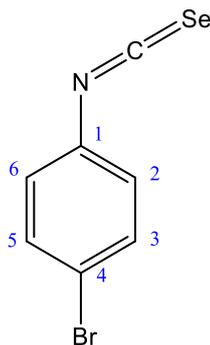
<sup>276</sup> Innocenti, P.; Woodward, H. L.; Solanki, S.; Naud, S.; Westwood, I. M.; Cronin, N.; Hayes, A.; Roberts, J.; Henley, A. T.; Baker, R.; Faisal, A.; Mak, G. W.; Box, G.; Valenti, M.; De Haven Brandon, A.; O'Fee, L.; Saville, H.; Schmitt, J.; Matijssen, B.; Burke, R.; van Montfort, R. L.; Raynaud, F. I.; Eccles, S. A.; Linardopoulos, S.; Blagg, J.; Hoelder, S. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 3671–3688

***N*-(4-methylphenyl) isoselenocyanate (36):**



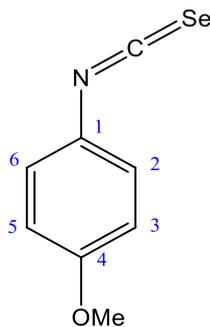
Crystalline yellow solid (yield 85%)  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.15 (m, 4H,  $J = 22.0$  Hz, H-2, H-3, H-5 and H-6), 2.29 (s, 3H, Me).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  138.5 (C-4), 130.1 (C-2, C-6), 126.9 (C=Se), 125.9 (C-3, C-5), 21.3 ( $\text{CH}_3$ ). EHRMS:  $m/z$  196.9736, calcd for  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NSe}$ : 196.9738

***N*-(4-bromophenyl) isoselenocyanate (37):**



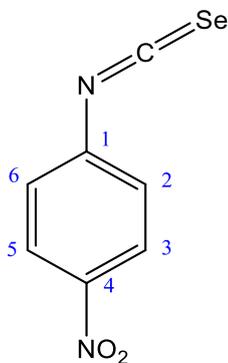
Crystalline red solid (yield 80%)  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.40 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-2 and H-6), 7.10 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-3 and H-5).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  132.8 (C-2, C-6), 127.5 (C-3, C-5), 121.7 (C=Se).

***N*-(4-methoxyphenyl) isoselenocyanate (80)<sup>246</sup>:**



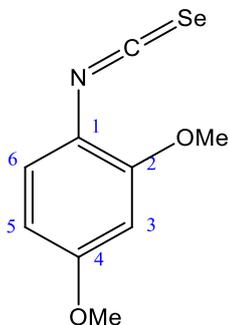
Crystalline white solid, (yield 77%)  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.25 (d, 2H,  $J=10$  Hz, H-2 and H-6), 6.85 (d, 2H,  $J=10$  Hz, H-3 and H-5), 3.81 (s, 3H, OMe).

**N-(4-nitrophenyl) isoselenocyanate (38):**



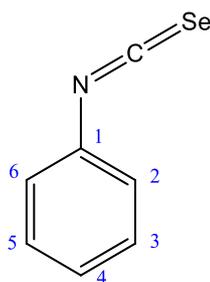
Yellow solid (yield 60%),  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.29 (d, 2H,  $J = 9.2$  Hz, H-2 and H-6), 7.45 (d, 2H,  $J = 9.2$  Hz, H-3 and H-5).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  146.2 (C-4), 135.8 (C-2, C-6), 126.8 (C=Se), 125.3 (C-3, C-5).

**N-(2,4-dimethoxyphenyl) isoselenocyanate (39):**



Crystalline green solid (yield 80%),  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.06 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, H-6), 6.38 (d, 1H,  $J = 2.6$  Hz, H-5), 6.35 (dd, 1H,  $J = 8.7$  Hz, 2.6 Hz, H-3), 3.81 (s, 3H, OMe), 3.74 (s, 3H, OMe).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  159 (C-2), 156 (C-4), 126 (C=Se), 111 (C-3), 104 (C-5), 98 (C-6), 55 (OMe), 54 (OMe).  
EIHRMS:  $m/z$  242.9798, calcd for  $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_2\text{NSe} + \text{H}$ : 242.9793

**N-(phenyl) isoselenocyanate (81)<sup>246</sup>:**



Yellow oil (yield 80 %),  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.25-7.4 (m, 5H, H-2, H-3, H-4, H-5 and H-6).

### 5.3. Synthesis and characterization of selenopyrylium salts

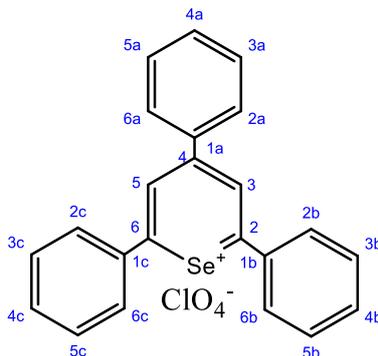
*General procedure A (starting from the corresponding pyrylium salt)*

To a solution of pyrylium tetrafluoroborate salt (1 mmol) previously solved in toluene (5 ml) and prepared in a sealed tube, Woollins' reagent (1 mmol) was added. The mixture was stirred at 150 °C for 24 h, monitored by TLC (4:1 – Cyclohexane:EtOAc). After cooling, the resulting mixture was filtered off and the rest in the tube was washed with EtOH (2x10 ml) and filtered as well. The solvent of the filtered was then coevaporated with EtOH under vacuum. The resulting solid was redissolved in DCM (5 ml) and  $\text{HClO}_4$  (50  $\mu\text{l}$ ) was added dropwise, leaving the mixture stirring during 1 h. The mixture was then cooled in the fridge until the precipitation of a solid, which was filtrated. The solvent of the filtrated is then evaporated under reduced pressure and subsequently purified by treatment with pure Diethyl Ether or mixture (1:10 – DCM: Diethyl Ether) affording a precipitate which is collected by filtration.

*General procedure B (starting from the corresponding pent-2-en-1,4-dione)*

To a suspension of pent-2-en-1,4-dione (1 mmol) in dry toluene (10 mL) under Ar atmosphere, Woollins' reagent (1 mmol) was added. The mixture was stirred at 120 °C in the darkness until the reaction was completed, monitored by TLC (4:1 Cyclohexane-EtOAc). Subsequently, the residue was concentrated and the product purified by column chromatography or silica gel thin layer preparative chromatography to give the desired product.

## 2,4,6-Triphenylselenopyrylium perchlorate (**40**)



Application of the general procedure A to pyrylium salt **68** (100 mg, 0.25 mmol). Refluxing time: 24 h. Firstly, treatment with diethyl ether (10 mL) and cooling in the fridge during 1 h led to the formation of a precipitate which was filtered off and it led the separation of pyrylium (solid) and selenopyrylium salt (filtrate). After that, evaporation of filtrate and treatment with DCM (10 mL) and cooling again in the fridge during 1 h led to the separation of the rest of subproducts (solvent) and the desired 2,4,6-Triphenylselenopyrylium perchlorate (**40**) (30 mg, 25 %) as an orange solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Acetone)  $\delta$  9.24 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.42 (d, 2H,  $J = 7.4$  Hz, H-2a and H-6a), 8.30 (d, 4H,  $J = 7.4$  Hz, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 7.82 (m, 9H, H-3a, H-4a, H-5a, H-3b, H-4b, H-5b, H-3c, H-4c and H-5c).

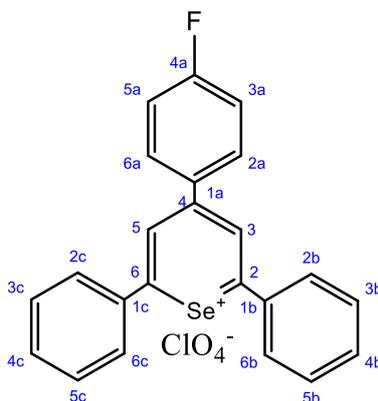
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Acetone)  $\delta$  163.3 (C-2 and C-6), 154.2 (C-4), 134.6 (C-4b and C-4c), 133.9 (C.4a), 132.4 (C-1a), 131.3 (C-2b, C-5b, C-2c and C-5c), 130.9 (C-2a and C-6a), 130.9 (C-3b, C-5b, C-2c and C-5c), 130.7 (C-3a and C-6a), 129.8 (C-1b and C-1c), 129.7 (C-3 and C-5).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  735, 726, 402 nm

ESIHRMS:  $m/z$  373.0482, calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{Se}$ : 373.0490.

Application of the general procedure B to 1,3,5-triphenylpent-2-en-1,5-dione **30** (100 mg, 0,31 mmol). It was obtained the desired product **40** and pyrylium salt **68**. Refluxing time: 4 h. ESIHRMS:  $m/z$  373.0490, calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{Se}^+$ : 373.0484. ESIHRMS:  $m/z$  309.1273, calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{O}^+$ : 309.1274.

#### 4-(4-Fluorophenyl)-2,6-diphenylselenopyrylium perchlorate (**41**)



Application of the general procedure A to **pyrylium salt 69** (100 mg, 0.24 mmol). Refluxing time: 24 h. Firstly, treatment with DCM (10 mL) and cooling in the fridge during 1 h led to the formation of a precipitate which was filtered off and it led the separation of pyrylium (solid) and selenopyrylium salt (filtrate). After that, evaporation of filtrate and treatment with mixture DCM:diethyl ether (1:100) (10 mL) and cooling again in the fridge during 1 h led to the separation of the rest of subproducts (solvent) and the desired 4-(4-Fluorophenyl)-2,6-diphenylselenopyrylium perchlorate (**41**) (25 mg, 21 %) as a yellow solid.

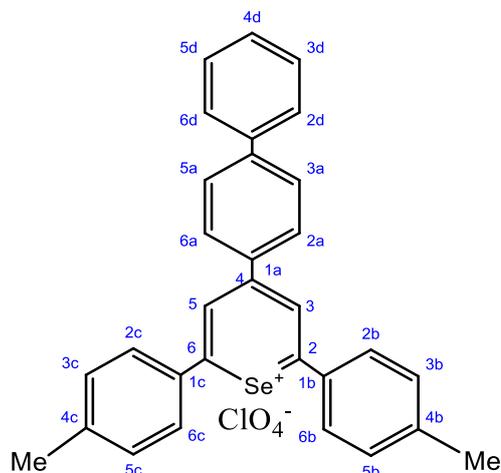
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Acetone)  $\delta$  9.27 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.29 (d, 4H,  $J = 7.5$  Hz, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 7.85 (m, 10H,  $J = 8.3$  Hz, H-2a, H-6a, H-3a, H-4a, H-5a, H-3b, H-4b, H-5b, H-3c, H-4c and H-5c).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Acetone)  $\delta$  167.3 (C-2 and C-6), 164.9-162.8 (d,  $J = 255.3$  Hz, C-4a), 162.2 (C-4), 134.7 (C-4b and C-4c), 132.3-131.3 (d,  $J = 9.7$  Hz, C-2a and C-6a), 130.1 (C-2b, C-6b, C-2c and C-6c), 129.7 (d,  $J = 2.7$  Hz, C-1a), 118.0 (C-1b and C-1c), 117.4-117.2 (d,  $J = 24.7$ , C-3a and C-5a), 116.3 (C-3 and C-5).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  735, 727 nm

ESIHRMS:  $m/z$  391.0392, calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{OFSe}$ : 391.0396

#### 4-Biphenyl-2,6-di-(4-methylphenyl)selenopyrylium perchlorate (**42**)



Application of the general procedure to pyrylium salt **71** (100 mg, 0.20 mmol). Refluxing time: 24 h. Firstly, treatment with DCM (10 mL) and cooling in the fridge during 1 h led to the formation of a precipitate which was filtered off and it led the separation of pyrylium (solid) and selenopyrylium salt (filtrate). After that, evaporation of filtrate and treatment with mixture DCM:diethyl ether (1:100) (10 ml) and cooling again in the fridge during 1 h led to the separation of the rest of subproducts (solvent) and the desired 4-Biphenyl-2,6-di-(4-methylphenyl)selenopyrylium perchlorate (**42**) (28 mg, 24 %) as an orange solid.

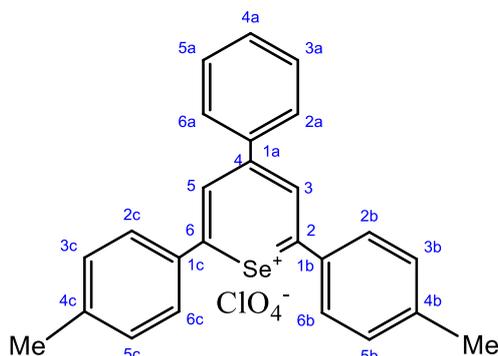
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Acetone)  $\delta$  9.04 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.40 (d, 4H,  $J = 8.3$  Hz, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 8.05 (d, 4H,  $J = 8.0$  Hz, H-3b, H-5b, H-3c and H-5c), 7.43 (m, 11H, H-2a, H-3a, H-5a, H-6a, H-2d, H-3d, H-4d, H-5d and H-6d), 2.37 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Acetone)  $\delta$  169.7 (C-2 and C-6), 156.6 (C-4), 137.4, 133.8, 132.2, 131.6, 131.1, 129.7, 129.6, 128.01, 127.2, 125.4, 30.0.

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  734, 726 nm

ESIHRMS:  $m/z$  477.1119, calcd for  $\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{Se}$ : 477.1116

### 2,6-Di-(4-methylphenyl)-4-phenylselenopyrylium perchlorate (43)



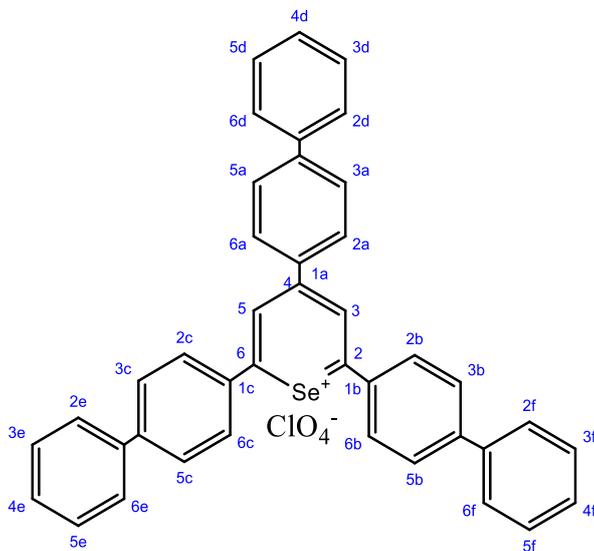
Application of the general procedure A to pyrylium salt **70** (100 mg, 0.25 mmol). Refluxing time: 24 h. Treatment with mixture DCM:diethyl ether (1:100) (10 ml) afforded pure compound 2,6-Di-(4-methylphenyl)-4-phenylselenopyrylium perchlorate (**43**) (X mg, X %) as an orange solid.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, Acetone- $d_6$ ,  $\delta$  ppm):  $\delta$  = 9.08 (s, 2H, H-3 y H-5), 8.36 (d, 2H,  $J$  = 8.2 Hz, H-2a and H-6a), 8.20 (d, 4H,  $J$  = 8.3 Hz, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 7.86 (t, 1H,  $J$  = 7.4 Hz, H-4a), 7.77 (t, 2H,  $J$  = 8.0 Hz, H-3a and H-5a), 7.64 (d, 4H,  $J$  = 8.1 Hz, H-3b, H-5b, H-3c and H-5c), 2.50 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ).

Absorption UV-Vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  735, 727 nm

ESIHRMS:  $m/z$  401.0797, calcd for  $\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{Se}$ : 401.0803.

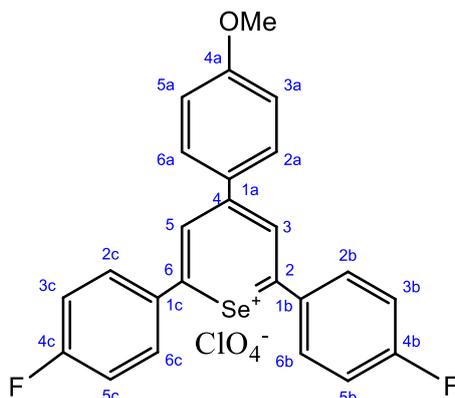
### 2,6-Di-(4-biphenyl)-4-biphenylselenopyrylium perchlorate (44)



Application of the general procedure to pyrylium salt **74** (100 mg, 0.16 mmol).  
Refluxing time: 24 h.

ESIHRMS: m/z 477.1425, calcd for C<sub>41</sub>H<sub>29</sub>Se: 601.1429

### 2,6-Di-(4-fluorophenyl)-4-methoxyphenylselenopyrylium perchlorate (**45**)

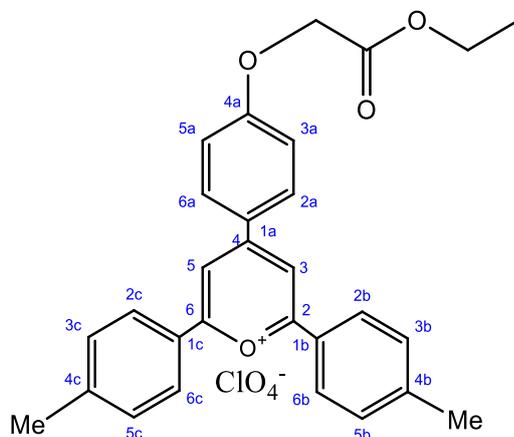


Application of the general procedure A to pyrylium salt **72** (200 mg, 0.43 mmol).  
Refluxing time: 46 h. Treatment with diethyl ether afforded a mixture of compound  
2,6-Di-(4-fluorophenyl)-4-methoxyphenylselenopyrylium perchlorate **45** and pyrylium  
salt **72**. ESIHRMS: m/z 439.0407, calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>OF<sub>2</sub>Se<sup>+</sup>: 439.0399. ESIHRMS:  
m/z 375.1191, calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>F<sub>2</sub><sup>+</sup>: 375.1185.

Application of the general procedure B to 1,5-di-(4-fluorophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)pent-2-en-1,5-dione **34** (70 mg, 0.18 mmol). It was obtained the  
desired product **45** and pyrylium salt **72**. Refluxing time: 22 h. ESIHRMS: m/z  
373.0490, calcd for C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>Se<sup>+</sup>: 373.0484. ESIHRMS: m/z 439.0407, calcd. for  
C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>OF<sub>2</sub>Se<sup>+</sup>: 439.0396. ESIHRMS: m/z 375.1191, calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>F<sub>2</sub><sup>+</sup>:  
375.1185.

**Reaction of pyrylium salt **29** with WR to obtain 4-(4-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)phenyl)-2,6-di-p-tolylpyrylium perchlorate (**46**)**

**4-(4-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)phenyl)-2,6-di-p-tolylpyrylium perchlorate (**46**)**



To a solution of pyrylium tetrafluoroborate salt **29** (1 equiv.) previously solved in toluene (5 ml) and prepared in a sealed tube, Woollins' reagent (1 equiv.) was added. The mixture was stirred at 150 °C for 24 h, monitored by TLC (4:1 – Cyclohexane:EtOAc). After cooling, the resulting mixture was filtered off and the rest in the tube was washed with EtOH (2x10 ml) and filtered as well. The solvent of the filtered was then coevaporated with EtOH under *vacuum*. The resulting solid was redissolved in DCM (5 ml) and HClO<sub>4</sub> (50 μl) was added dropwise, leaving the mixture stirring during 1 h. The mixture was then cooled in the fridge until the precipitation of a solid, which is filtrated affording transesterification product (50 mg, 20 %) as an orange solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Acetone) δ 8.70 (s, 2H, H-3 and H-5), 8.40 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, H-2a, and H-6a), 8.21 (d, 4H, *J* = 8.0 Hz, H-2b, H-6b, H-2c and H-6c), 7.70 (m, 6H, H-3a, H-5a, H-3b, H-5b, H-3c and H-5c), 4,64 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.80 (q, 2H, *J* = 6.8 Hz, OCH<sub>2</sub>), 2.37 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

ESIHRMS: *m/z* 439.1899, calcd for C<sub>29</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub>: 439.1904

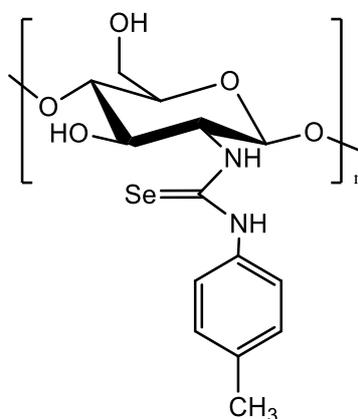
## 5.4. Computational calculations

## 5.5. Synthesis and characterization of chitosan-supported selenoureas

### *General procedure*

One homogenous solution of chitosan (100 mg) in a 0.12 M acetic acid solution in MeOH (40 mL), at a pH value around 5.0, was vigorously stirred at room temperature under argon atmosphere until the chitosan was partially dissolved. To this stirred solution the corresponding isoselenocyanate (0,42 mmol) was slowly added (48-52). The mixture was vigorously stirred for 1 week at room temperature under argon atmosphere and the end was evaluated by TLC using pure MeOH as eluent and observing UV absorption (254 nm) at the origin. The resultant product was filtered off, washed twice with both MeOH and DCM (2x5 ml) and dried in vacuo.

### ***N*-(4-Methylphenylselenocarbamoyl) chitosan (47):**



Application of the general procedure to **CS** and isoselenocyanate **36**, after 1 week, afforded *N*-(4-Methylphenylselenocarbamoyl) chitosan (**47**) (88 mg, 97 %) as a yellow solid.

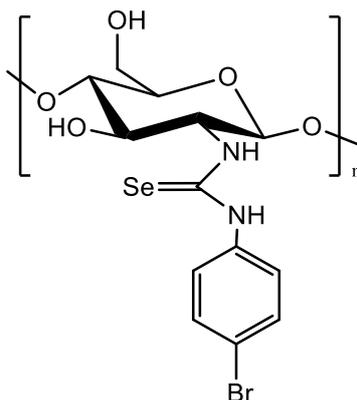
IR ( $\nu_{\max}$ ): 3230, 2913, 2890, 1656, 1542, 1050, 1022  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR with diffusion filter (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$  1:1):  $\delta$  7.30 (m, 4H, H-2', H-3', H-5' and H-6'), 4.91 (m, 1H, H-1), 4.00-3.55 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 3.26 (s, 1H, H-2), 2.32 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 2.08 (s, 1H,  $\text{NCOCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  CPMAS NMR (150.9 MHz):  $\delta$  179.1 (C=Se), 173.9 (C=O, NCOCH<sub>3</sub>), 150.7-120.3 (C1'-C6'), 105.0 (C1), 90.1-70.2 (C3-C6), 60.0 (C2), 20.1 [(NCOCH<sub>3</sub>) and -CH<sub>3</sub>].

(DS by  $^1\text{H}$  NMR: 25 %)

***N*-(4-Bromophenylselenocarbamoyl) chitosan (48):**



Application of the general procedure to **CS** and isoselenocyanate **37**, after 1 week, afforded *N*-(4-Bromophenylselenocarbamoyl) chitosan (**48**) (86 mg, 95 %) as a yellow solid.

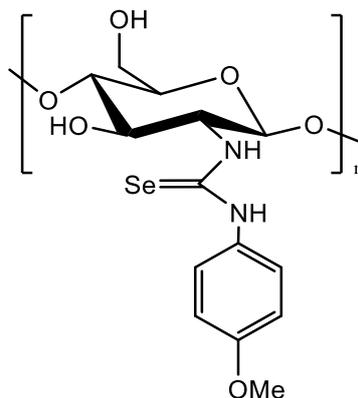
IR ( $\nu_{\text{max}}$ ): 3351, 2919, 2871, 1735, 1646, 1542, 1052, 1021  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1):  $\delta$  7.62-7.20 (m, 4H, H-2', H-3', H-5' and H-6'), 4.91 (m, 1H, H-1), 4.00-3.56 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 3.20 (s, 1H, H-2), 2.07 (s, 1H, NCOCH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  CPMAS NMR (150.9 MHz):  $\delta$  179.1 (C=Se), 173.9 (C=O, NCOCH<sub>3</sub>), 140.2-128.3 (C1'-C6'), 105.1 (C1), 90.1-70.0 (C3-C6), 60.1 (C2), 20.1 (NCOCH<sub>3</sub>).

(DS by  $^1\text{H}$  NMR: 12 %)

***N*-(4-Methoxyphenylselenocarbamoyl) chitosan (49):**



Application of the general procedure to **CS** and isoselenocyanate **80**, after 1 week, afforded *N*-(4-Methoxyphenylselenocarbamoyl) chitosan (**49**) (84 mg, 93 %) as a yellow solid.

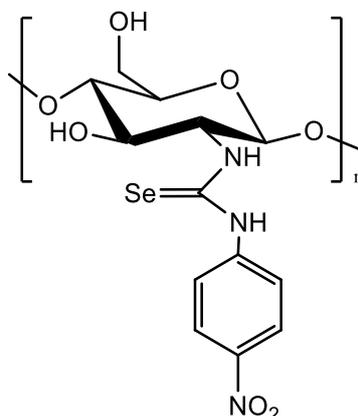
IR ( $\nu_{\max}$ ): 3275, 2911, 2868, 1652, 1541, 1050, 1020  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR with diffusion filter (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$  1:1):  $\delta$  7.20-7.00 (m, 4H, H-2', H-3', H-5' and H-6'), 4.91 (m, 1H, H-1), 4.65 (s, 3H, OMe), 4.00-3.56 (m, 8H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b of chitosan and OMe), 3.20 (s, 1H, H-2), 2.01 (s, 1H,  $\text{NCOCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  CPMAS NMR (150.9 MHz):  $\delta$  180.0 (C=Se), 172.5 (C=O,  $\text{NCOCH}_3$ ), 140.3-128.2 (C1'-C6'), 105.1 (C1), 90.1-70.0 (C3-C6), 65.7-54.1 (C2 and C-OMe), 20.2 ( $\text{NCOCH}_3$ ).

(DS by  $^1\text{H}$  NMR: 27 %)

***N*-(4-Nitrophenylselenocarbamoyl) chitosan (50):**



Application of the general procedure to **CS** and isoselenocyanate **38**, after 1 week, afforded *N*-(4-Nitrophenylselenocarbamoyl) chitosan (**50**) (80 mg, 88 %) as a yellow solid.

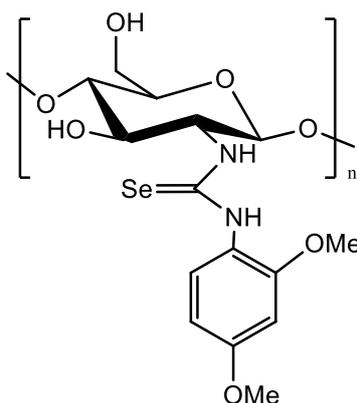
IR ( $\nu_{\max}$ ): 3319, 2923, 2871, 1642, 1544, 1380, 1057, 1029  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR with diffusion filter (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$  1:1):  $\delta$  8.40-7.60 (m, 4H, H-2', H-3', H-5' and H-6'), 4.91 (m, 1H, H1), 4.00-3.56 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 3.20 (s, 1H, H-2), 2.01 (s, 1H,  $\text{NCOCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  CPMAS NMR (150.9 MHz):  $\delta$  180.1 (C=Se), 174.2 (C=O,  $\text{NCOCH}_3$ ), 147.2-122.3 (C1'-C6'), 105.1 (C1), 90.1-70.0 (C3-C6), 59.1 (C2), 20.1 ( $\text{NCOCH}_3$ ).

(DS by  $^1\text{H}$  NMR: 1.4 %)

#### ***N*-(2,4-Dimethoxyphenylselenocarbamoyl) chitosan (51):**



Application of the general procedure to **CS** and isoselenocyanate **39**, after 1 week, afforded *N*-(2,4-Dimethoxyphenylselenocarbamoyl) chitosan (**51**) (70 mg, 77 %) as a yellow solid.

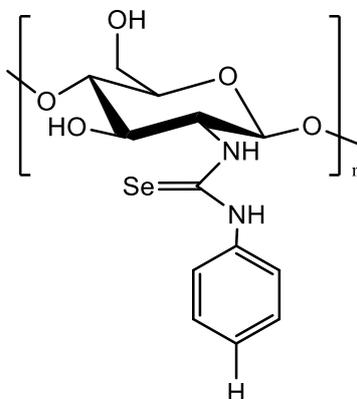
IR ( $\nu_{\max}$ ): 3303, 2925, 2879, 1638, 1543, 1374, 1307, 1203, 1057, 1029  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR with diffusion filter (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$  1:1):  $\delta$  7.10-6.50 (m, 4H, H-2', H-3', H5' and H-6'), 4.91 (m, 1H, H-1), 4.04-3.56 (m, 11H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b of chitosan and OMe), 3.20 (s, 1H, H-2), 2.01 (s, 1H,  $\text{NCOCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  CPMAS NMR (150.9 MHz):  $\delta$  180.0 (C=Se), 172.5 (C=O,  $\text{NCOCH}_3$ ), 140.3-128.2 (C1'-C6'), 105.1 (C1), 90.1-70.0 (C3-C6), 65.7-54.1 (C2 and C-OMe), 20.2 ( $\text{NCOCH}_3$ ).

(DS by  $^1\text{H}$  NMR: 11.5 %)

***N*-(Phenylselenocarbamoyl) chitosan (52):**



Application of the general procedure to **CS** and isoselenocyanate **81**, after 1 week, afforded *N*-(Phenylselenocarbamoyl) chitosan (**52**) (85 mg, 94 %) as a brown solid.

IR (vmax): 3301, 2935, 2882, 1648, 1544, 1375, 1311, 1057, 1029  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR with diffusion filter (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$  1:1):  $\delta$  7.58-7.10 (m, 5H, H-2',H-3', H-4',H-5' and H-6'), 4.91 (m, 1H, H-1), 4.00-3.44 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 3.20 (s, 1H, H-2), 2.07 (s, 1H,  $\text{NCOCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  CPMAS NMR (150.9 MHz):  $\delta$  180.9 (C=Se), 175.5 (C=O,  $\text{NCOCH}_3$ ), 141.3-120.2 (C1'-C6'), 105.1 (C1), 90.1-70.0 (C3-C6), 58.9 (C2), 23.4 ( $\text{NCOCH}_3$ ).

(DS by  $^1\text{H}$  NMR: 22 %)

## 5.6. Biological activity

### 5.6.1. Antioxidant activity (DPPH method)

The antiradical activity of the 3-desoxyanthocyanins and pyrylium salts were measured using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) following the procedure reported by Prior, Wu, and Schaich (2005).<sup>168</sup> The assays were performed in a Hitachi U-2900 spectrophotometer (Tokio, Japan), using PS cuvettes. To a 60  $\mu\text{M}$  methanolic solution of DPPH (HPLC-grade, 1.17 ml) the methanolic solution of the extract (30  $\mu\text{l}$ , 7 different concentrations), or pure methanol as the control was added. The corresponding mixtures were kept in the darkness at room temperature for 30 min and then, the absorbance was measured at 515 nm against a blank (MeOH). Plotting

the values of DPPH remaining vs. extract concentration allows a straight line from which the EC<sub>50</sub> (the concentration of the antioxidant required to reduce the concentration of the DPPH to 50% of its initial value) is calculated. All measurements were carried out in triplicate. The remaining DPPH concentration was calculated using the expression:

$$\% \text{DPPH remaining} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A<sub>sample</sub> and A<sub>control</sub> refer to the absorbances at 515 nm of DPPH in the sample and control solutions, respectively.

### 5.6.2. GPx mimic activity

The evaluation of GPx mimic activity was carried out following the method of Iwaoka and Tomoda.<sup>277</sup> In this method, PhSH is used as a cofactor, replacing GSH. Antioxidants, in this case selenoureas **47-52**, take the role of catalysts that convert PhSH into the corresponding disulfide in the presence of excess H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

PhSH oxidation (10.0 mM) with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (41.6 mM) in the presence of the GPx mimetic (selenoureas, 0.5 μM) was spectroscopically followed by monitoring the appearance of (PhS)<sub>2</sub> at 305 nm, using for this purpose quartz cuvettes. Reaction rates, after correction with the blank, were obtained by plotting Absorbance vs Time, during a total time of 180 s.

---

<sup>277</sup> Iwaoka, M.; Tomoda, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 2557-2561.

## CAPÍTULO 3

*Desarrollo de híbridos tacrina-quitosano para su uso frente a la enfermedad de Alzheimer*

# 1. Antecedentes

## 1.1. Enfermedad de Alzheimer

La esperanza de vida media en los diferentes países desarrollados, entre los que se incluye España se ha duplicado en los últimos 100 años, debido a las vacunas, a los antibióticos, al saneamiento de las aguas y a la higiene en todos los ámbitos. Este incremento de la esperanza de vida ha conducido a una mayor incidencia de las enfermedades ligadas al envejecimiento. Entre ellas, se encuentran las enfermedades neurodegenerativas, que provocan un enorme deterioro de la calidad de vida de los pacientes y unos gastos sanitarios muy elevados. Las demencias asociadas a la edad afectan a unos 50 millones de personas a nivel mundial y se prevé que este número aumente a cerca de 82 millones en 2030 y a casi el triple en 2050 (152 millones).<sup>278</sup> La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más frecuente en personas de más de 65 años, representando entre el 60-70% del total de los casos.

La Organización Mundial de la Salud define la EA como “un síndrome debido a una enfermedad del cerebro, generalmente de naturaleza crónica o progresiva, en la que hay déficits de múltiples funciones corticales superiores que repercuten en la actividad cotidiana del enfermo”.<sup>279</sup>

A nivel histológico, se observan dos lesiones características que sirven para diagnosticar de forma definitiva la enfermedad: las placas seniles (acumulación de  $\beta$ -amiloide)<sup>280</sup> y los ovillos neurofibrilares.<sup>281</sup> También se observa una reducción en el número de neuronas, que afecta principalmente al sistema colinérgico. Concretamente, los exámenes postmortem de enfermos de Alzheimer han demostrado que existe una pérdida superior al 75% de las neuronas colinérgicas de la corteza cerebral.<sup>282</sup> Todo esto deriva en una disminución del volumen cerebral de forma progresiva (Figura 45).

---

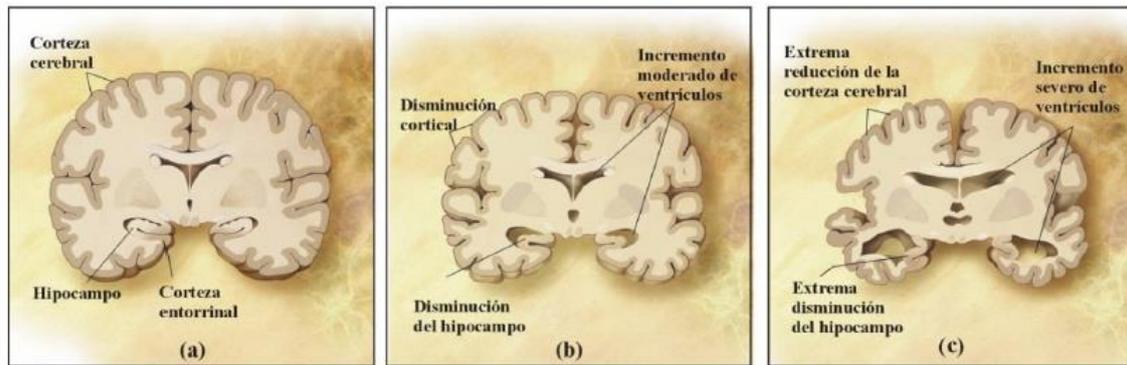
<sup>278</sup> Organización Mundial de la Salud (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>).

<sup>279</sup> Fundación Alzheimer España (<http://www.alzfae.org/fundacion/135>).

<sup>280</sup> (a) Neve, R. L.; McPhie, D. L.; Chen, Y. *Brain Res.* **2000**, 886, 54-66 (b) Egensperger, R.; Weggen, S.; Ida, N.; Multhaup, G; Schnabel, R.; Beyreuther, K.; Bayer, T. A. *Acta Neuropathol.* **1999**, 97, 113-118.

<sup>281</sup> (a) Crowther, R. A.; Goedert, M. *J. Struct. Biol.* **2000**, 130, 271-279. (b) Iqbal, K.; Del Alonso, A. D.; Gondal, J. A.; Gong, C. X.; Haque, N.; Katoon, S.; Sengupta, A.; Wang, J. Z.; Grundke-Iqbal, I. Mechanism of neurofibrillary degeneration and pharmacologic therapeutic approach; *Advances in Dementia Research*, Jellinger K., Schmidt R., Windisch M. (eds). Springer, Vienna. 213-222.

<sup>282</sup> Whitehouse, P.; Priece, D. L.; Struble, R. G.; Clark, A.; Coyle, J. T; Delon, M. R. *Science.* **1982**, 215, 1237-1239.



**Figura 45.** Comparación de la morfología del cerebro sano (a) y del afectado por la enfermedad de Alzheimer de forma leve (b) o severa (c)<sup>283</sup>

Las placas seniles, también denominadas placas amiloides, son agregados insolubles de aproximadamente 45 kDa y de 10 a 120  $\mu\text{m}$  de diámetro, localizados en el espacio extracelular. Se trata de conglomerados anulares de cuerpos y prolongaciones neuronales degeneradas, en torno a un depósito central de un péptido de longitud variable (de 40-42 aminoácidos) llamado péptido amiloide ( $\beta\text{A}$ ).<sup>284</sup> Este péptido es un subproducto del metabolismo normal de una glicoproteína de transmembrana denominada proteína precursora del amiloide, PPA (amyloid precursor protein).<sup>285</sup> Esta proteína presenta un gran segmento *N*-terminal en el espacio extracelular, un dominio de transmembrana y un pequeño segmento *C*-terminal en el espacio intracelular<sup>286</sup> y es degradada por tres proteasas:  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas.<sup>287</sup>

En la llamada ruta no-amiloidogénica, que corresponde con un estado no-patológico, la PPA es inicialmente degradada por la  $\alpha$ -secretasa, generando el fragmento soluble sPPA $\alpha$  y un residuo de 83 aminoácidos (C83). Posteriormente, C83 es degradado por la  $\gamma$ -secretasa originando un péptido pequeño de 3 kDa (p3), que contiene la región *C*-terminal del  $\beta\text{A}$ .<sup>288</sup> El fragmento sPPA $\alpha$  presenta conformación de hélice  $\alpha$ , y tiene efectos neuroprotectores y neurotróficos.<sup>289</sup>

<sup>283</sup> Imágenes tomadas de Alzheimer's disease: unraveling the mystery. Ed. U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, NIH Publication Number: 02-3782. Diciembre, **2003**.

<sup>284</sup> Gorman, P. M.; Chakrabarty, A. *Peptide Science*. **2001**, *60*, 381-394.

<sup>285</sup> Wolfe, M. S.; Guénette, S. Y. *J. Cell. Sci.* **2007**, *120*, 3157-3161.

<sup>286</sup> Numan, J.; Small, D. H. *FEBS Lett.* **2000**, *483*, 6-10.

<sup>287</sup> Gralle, M.; Ferreira, S. T. *Prog. Neurobiol.* **2007**, *82*, 11-32.

<sup>288</sup> Russo, C.; Venezia, V.; Repetto, E.; Nizzari, M.; Violani, E.; Carlo, P.; Schettini, G. *Brain Res. Rev.* **2005**, *48*, 257-264.

<sup>289</sup> Hooper, N. M. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 335-338.

Sin embargo, en condiciones patológicas, la llamada ruta amiloidogénica aumenta su importancia en detrimento de la hidrólisis vía  $\alpha$ -secretasa. La PPA es degradada en el extremo *N*-terminal por la  $\beta$ -secretasa (también denominada BACE-1, Asp2 o memapsina2)<sup>290</sup> generando el fragmento soluble de sPPA $\beta$  y un fragmento de 99 aminoácidos (C99). Posteriormente, C99 es sustrato de la  $\gamma$ -secretasa, enzima capaz de degradarlo en diferentes puntos originando fragmentos heterogéneos de péptidos  $\beta$ A de longitud variable (entre 39-43 aminoácidos) y dominios intracelulares de la proteína precursora del amiloide.<sup>291</sup> Las presenilinas PS1 y PS2 se encuentran fundamentalmente en el sitio catalítico de la  $\gamma$ -secretasa, y son las responsables de la producción de los  $\beta$ A de longitud variable.<sup>292</sup> Por último, los fragmentos de  $\beta$ A de 42 y 43 aminoácidos tienden a agregarse originando las placas amiloides.<sup>293</sup> Cuando el  $\beta$ A se deposita en las arterias de mediano y pequeño calibre se origina la angiopatía amiloide.

Estos hallazgos han dado lugar a la denominada “Hipótesis Amiloide de la EA”, que propugna que las placas amiloides provocan efectos neurotóxicos que desencadenan cascadas patológicas neurodegenerativas.<sup>294</sup> Posteriormente, se descubrió que la toxicidad del  $\beta$ A se encuentra principalmente en formas intermedias prefibrilares, oligómeros solubles y protofibrillas, de forma que los grandes agregados de proteínas podrían ser simplemente inactivos o incluso un intento por parte de la neurona de inactivar las especies neurotóxicas y deshacerse de ellas.<sup>295</sup>

Otra lesión característica de la EA son los ovillos neurofibrilares, que están compuestos por restos de neuronas muertas y agregados de proteína *tau* en un estado anómalo de hiperfosforilación. En condiciones normales, *tau* es una proteína importante para mantener la integridad y la estabilidad del citoesqueleto neuronal. Es una proteína asociada a los microtúbulos, polímeros que constituyen la arquitectura celular y que son esenciales en numerosos procesos de transporte y división mitótica.

---

<sup>290</sup> Citron, M. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, 25, 92-97.

<sup>291</sup> Passer, B.; Pellegrini, L.; Russo, C.; Siegel, M. R.; Lenardo, M. J.; Schettini, G.; Bachmann, M.; Tabaton, M.; D'Adamio, L. *J. Alzheimer's Dis.* **2000**, 2, 289-301.

<sup>292</sup> Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science* **2002**, 297, 353-356.

<sup>293</sup> Small, D. H.; McLean, C. A. *J. Neurochem.* **1999**, 73, 443-449.

<sup>294</sup> Hardy, J.; Allsop, D. *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, 12, 383-8.

<sup>295</sup> Lannfelt, L.; Möller, C.; Basun, H.; Osswald, G.; Sehlin, D.; Satlin, A. Logovinsky, V.; Gellerfors, P. *Alzheimers Res. Ther.* **2014**, 6, 16.

Sin embargo, en situaciones patológicas *tau* aparece anormalmente hiperfosforilada y deja de cumplir su papel en el mantenimiento de la estabilidad del citoesqueleto, transformándose en una proteína con gran capacidad de asociarse consigo misma para formar polímeros intracelulares.<sup>296</sup> Estos conglomerados proteicos se encuentran principalmente en los cuerpos neuronales y dendritas apicales, provocando serios trastornos en la actividad celular normal e impidiendo la transmisión nerviosa. Un porcentaje elevado de neuronas con ovillos neurofibrilares pierden su funcionalidad y mueren, pasando a formar parte de los agregados insolubles.

Además de la formación de los agregados proteicos previamente tratados, en la EA existen alteraciones en la neurotransmisión, en especial en el sistema colinérgico. Se ha observado una disminución de los niveles de neurotransmisores que constituyen la comunicación sináptica, en especial de acetilcolina (ACh).<sup>297</sup> Teniendo en cuenta que la ACh es hidrolizada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE), los inhibidores de esta enzima mejorarían la neurotransmisión y con ello la capacidad cognitiva de los pacientes. También se han hallado alteraciones en otros sistemas de neurotransmisores, como los regulados por glutamato,<sup>298</sup> dopamina<sup>299</sup> y serotonina.<sup>300</sup>

La ACh se produce en el citosol por acción de la enzima colinacetilasa, también conocida como colín-acetil-transferasa (CAT), siendo posteriormente almacenada en vesículas sinápticas desde las que, mediante un proceso de exocitosis dependiente de calcio, se libera al espacio sináptico. Allí ejerce su acción como neurotransmisor, uniéndose a los receptores muscarínicos y nicotínicos a ambos niveles, pre- y postsinápticos. Una vez ejercida su acción sobre los diferentes receptores colinérgicos, la ACh es hidrolizada a colina mediante la acción de la acetilcolinesterasa (AChE). Una segunda enzima también implicada en la neurotransmisión colinérgica es la butirilcolinesterasa (BuChE).<sup>301</sup> En cerebros sanos la AChE se encarga de hidrolizar del orden del 80% de la ACh, mientras que la BuChE juega un papel secundario. Sin embargo, en cerebros afectados por la EA la actividad de la AChE se ve disminuida

---

<sup>296</sup> Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E. *Trends Cell. Biol.* **1998**, *8*, 425-427.

<sup>297</sup> Bowen, D. M.; Smith, C. B.; White, P.; Davison, A. N. *Brain* **1976**, *99*, 459-496.

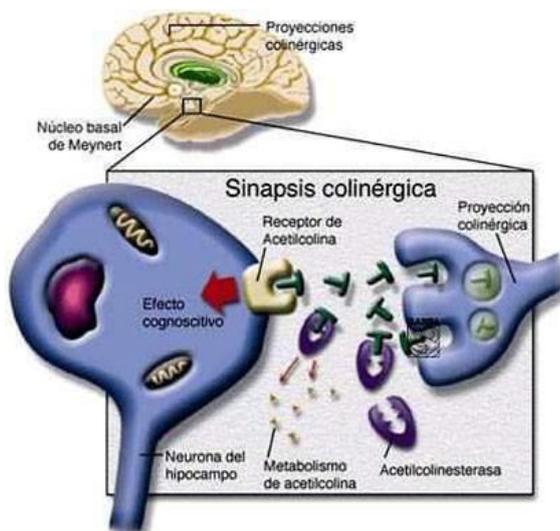
<sup>298</sup> Clarke, N. A.; Francis, P. T. *Expert Rev. Neurother.* **2005**, *5*, 671-682.

<sup>299</sup> Palmer, A. M.; Wilcock, G. K.; Erisi, M. M.; Francis, P. T.; Bowen, D. M. *Brain Res.* **1987**, *401*, 231-238.

<sup>300</sup> Palmer, A. M.; Francis, P. T.; Benton, J. S.; Sims, N. R.; Mann, D. M.; Neary, D.; Snowden, J. S.; Bowen, P. R. *J. Neurochem.* **1987**, *48*, 8-15.

<sup>301</sup> Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 131-138.

mientras se incrementa la de BuChE en un intento de las neuronas por mantener los niveles de ACh.<sup>302</sup>



**Figura 46.** Mecanismo de la sinapsis

Además de su papel en la transmisión del impulso nervioso, la AChE desempeña otras funciones no colinérgicas, incluido un papel importante en el procesamiento del  $\beta$ A. Varios estudios han indicado que la AChE aumenta la formación de fibrillas  $\beta$ A *in vitro*<sup>303</sup> y de placas amiloides en la corteza cerebral de modelos de ratones transgénicos de la EA.<sup>304</sup> Estos efectos parecen estar mediados por interacciones entre el  $\beta$ A y el sitio aniónico periférico (PAS) de la enzima, apoyado por el hecho de que el propidio, un inhibidor de AChE no-competitivo que se une puramente a PAS, disminuye significativamente la agregación del  $\beta$ A inducida por AChE.<sup>305</sup> Sin embargo, el edrofonio, un inhibidor competitivo puro que se une al centro activo (CAS), no muestra ningún efecto sobre la fibrilogénesis de  $\beta$ A inducida por AChE.<sup>306</sup> Por lo tanto, parece existir una estrecha relación entre la actividad catalítica de la AChE y la precipitación del péptido  $\beta$ A.

Otro factor que podría afectar al desarrollo de esta patología es el estrés oxidativo. Es conocido que el cerebro es especialmente vulnerable al daño oxidativo, debido al elevado consumo de oxígeno (utiliza el 20% del oxígeno basal a pesar de constituir

<sup>302</sup> Scarpini, E.; Scheltens, P.; Feldman, H. *Lancet Neurol.* **2003**, *2*, 539-47.

<sup>303</sup> Inestrosa, N. C.; Dinamarca, M. C.; Alvarez, A. *FEBS J.* **2008**, *275*, 625-632.

<sup>304</sup> Rees, T.; Hammond, P. I.; Soreq, H.; Younkin, S.; Brimijoin, S. *Neurobiol. Aging* **2003**, *24*, 777-787.

<sup>305</sup> De Ferrari, G. V.; Canales, M. A.; Shin, I.; Weiner, L. M.; Silman, I.; Inestrosa, N. C. *Biochemistry* **2001**, *40*, 10447-10457.

<sup>306</sup> Bartolini, M.; Bertucci, C.; Cavrini, V.; Andrisano, V. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 407-416.

solamente el 2-3% de la masa corporal total), al alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados fácilmente oxidables y a la presencia de iones metálicos activos en procesos redox, capaces de generar radicales libres. Además, la relativa escasez de sistemas de defensa antioxidante hace que el SNC sea particularmente propenso a patologías oxidativas.<sup>307</sup> Es un hecho contrastado que el estrés oxidativo aumenta con la edad y existen claras evidencias de la participación del desequilibrio oxidativo en diferentes patologías. Por ejemplo, un estudio de la corteza frontal postmortem de pacientes con EA demostró un aumento significativo dependiente de la enfermedad en marcadores oxidativos que se correlacionaba con bajas puntuaciones en el “Mini-Mental Status Examination”.<sup>308</sup> Además, en un modelo de ratón de EA se descubrió que el daño oxidativo es un evento que precede a la aparición de otras características patológicas de la EA.<sup>309</sup> Estos hallazgos señalan la participación temprana del estrés oxidativo mitocondrial en la patogénesis y la progresión de esta enfermedad.<sup>310</sup> Por lo tanto, los fármacos que protegen a las neuronas del estrés oxidativo mitocondrial podrían ser útiles para la prevención o el tratamiento de la EA.<sup>311</sup>

## 1.2. Estrategias terapéuticas contra el Alzheimer: derivados de tacrina

En la actualidad, las opciones terapéuticas para el tratamiento de la EA están limitadas a tres inhibidores de la AChE: donepezilo, rivastigmina y galantamina, un antagonista del receptor de *N*-metil-D-aspartato, la memantina (Figura 47).<sup>312, 313</sup> La tacrina, inhibidor de la AChE y BChE, fue el primer fármaco desarrollado con esta finalidad en 1993 pero se retiró del mercado dada su hepatotoxicidad. Estos fármacos tienen efectos beneficiosos sobre las funciones cognitivas de los pacientes durante los primeros 6-12 meses de tratamiento y en algunos casos, retrasan el declive degenerativo. Sin embargo, ninguno de ellos es capaz de bloquear o revertir la neurodegeneración.

---

<sup>307</sup> Casetta, I.; Govoni, V.; Granieri, E. *Curr. Pharm. Design* **2005**, *11*, 2033-2052.

<sup>308</sup> Ansari, M. A.; Scheff, S. W. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2010**, *69*, 155-167.

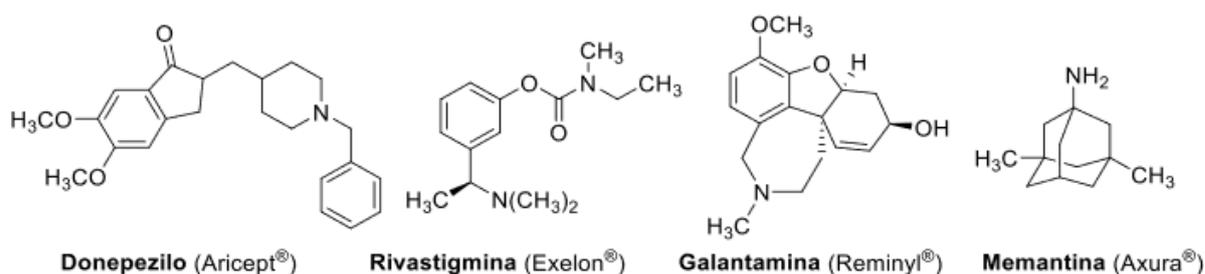
<sup>309</sup> Gu, F.; Zhu, M.; Shi, J.; Hu, Y.; Zhao, Z. *Neurosci. Lett.* **2008**, *440*, 44-48.

<sup>310</sup> Caldeira, G. L.; Ferreira, I. L.; Rego, A. C. *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *34*, 115-131.

<sup>311</sup> Huang, Q.; Aluise, C. D.; Joshi, G.; Sultana, R.; St Clair, D. K.; Markesbery, W. R.; Butterfield, D. A. *J. Neurosci. Res.* **2010**, *88*, 2618-2629.

<sup>312</sup> Bond, M.; Rogers, G.; Peters, J.; Anderson, R.; Hoyle, M.; Miners, A.; Moxham, T.; Davis, S.; Thokala, P.; Wailoo, A.; Jeffreys, M.; Hyde, C. *Health Technol. Assess.* **2012**, *16*, 1-470.

<sup>313</sup> Wilkinson, D.; Wirth, Y.; Goebel, C. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2013**, *37*, 71-85.



**Figura 47.** Fármacos actualmente comercializados para el tratamiento paliativo de la EA

A pesar del esfuerzo investigador que se viene desarrollando en las últimas décadas, desde 2003 no se ha comercializado ningún nuevo medicamento contra la EA. Sin embargo, hay numerosas moléculas en ensayos clínicos:<sup>314,315</sup> inhibidores de AChE, BACE-1 y  $\gamma$ -secretasa, agonistas y antagonistas de receptores de neurotransmisores, anticuerpos para eliminar agregados proteicos de  $\beta$ A y *tau*, antiinflamatorios, etc. Algunos ejemplos de fármacos que se encuentran en avanzadas fases clínicas para el tratamiento de la EA<sup>316</sup> son: dextrometorfano (antagonista NMDA y agonista de receptores sigma-1,<sup>317</sup> prazosin y carvedilol (antagonistas de receptores adrenérgicos,<sup>318</sup> simvastatina (inhibidor de HMG-CoA reductasa),<sup>319</sup> intepirdina (antagonista de los receptores de serotonina de tipo 5-HT<sub>6</sub>,<sup>320</sup> elenbecestat, lanabecestat y verubecestat (inhibidores de BACE-1),<sup>321</sup> y TRx0237 o azul de metileno (inhibidor de la agregación de *tau*).<sup>322</sup>

<sup>314</sup> Pogacic Kramp, V. *Neurodegener. Dis.* **2012**, 9, 210-283.

<sup>315</sup> Hung, S. Y.; Fu, W. M. *J. Biomed. Sci.* **2017**, 24, 47-54.

<sup>316</sup> Alzorum <https://www.alzforum.org/>.

<sup>317</sup> Porsteinsson, A. P.; Antonsdottir, I. M. *Expert Opin. Pharmacother.* **2017**, 18, 611-620.

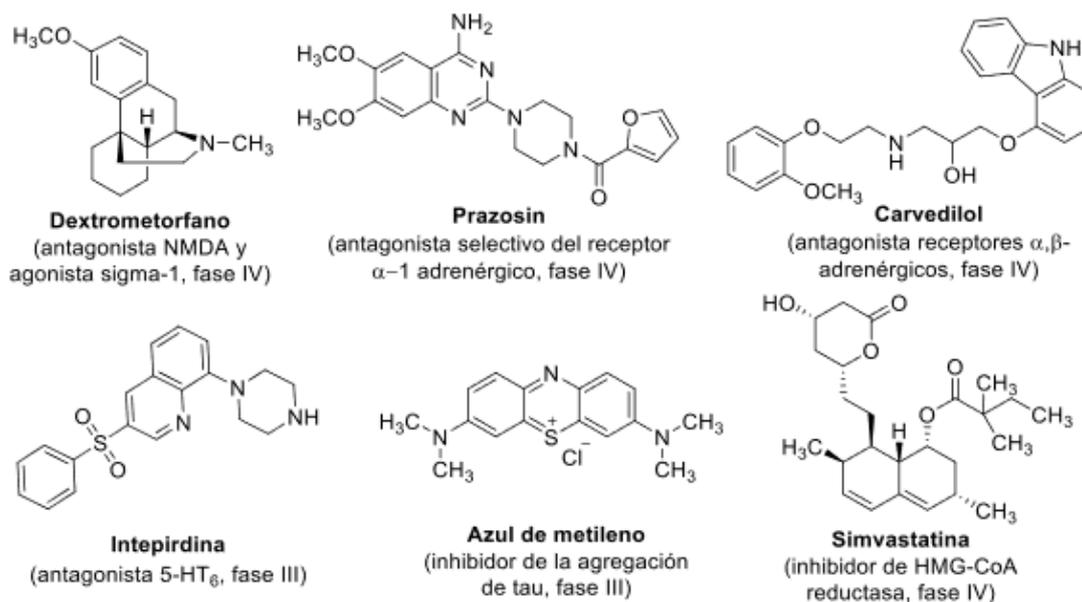
<sup>318</sup> Dunn, K. M.; Nelson, M. T. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2014**, 306, H1-14.

<sup>319</sup> Li, G.; Mayer, C. L.; Morelli, D.; Millard, S. P.; Raskind, W. H.; Petrie, E. C.; Cherrier, M.; Fagan, A. M.; Raskind, M. A.; Peskind, E. R. *Neurology* **2017**, 89, 1251-1255.

<sup>320</sup> Khoury, R.; Grysman, N.; Gold, J.; Patel, K.; Grossberg, G. T. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2018**, 27, 523-533.

<sup>321</sup> Kumar, D.; Ganeshpurkar, A.; Kumar, D.; Modi, G.; Gupta, S. K.; Singh, S. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 148, 436-452.

<sup>322</sup> Crowe, A.; James, M. J.; Lee, V. M.; Smith, A. B., 3rd; Trojanowski, J. Q.; Ballatore, C.; Brunden, K. R. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 11024-11037.



**Figura 48.** Fármacos en avanzadas fases clínicas para el tratamiento de la EA

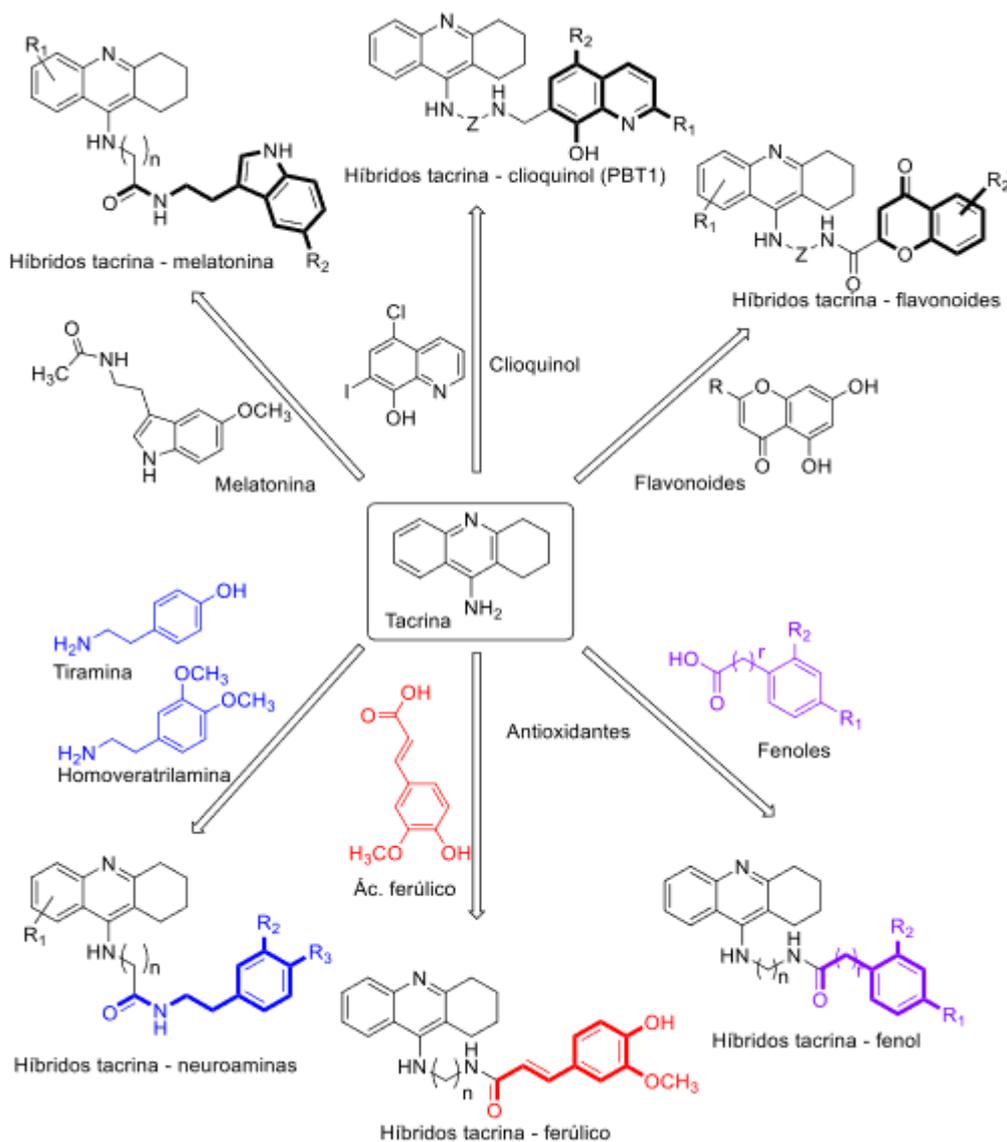
La complejidad de la patología de la EA ha fomentado además el diseño de moléculas capaces de interactuar con dos o más dianas farmacológicas complementarias, esperando que estos ligandos multi-diana (MTL, por sus siglas en inglés) puedan representar ventajas importantes en el tratamiento de la enfermedad. En los últimos años, se han desarrollado muchos MTL interesantes, como memoquin, ladostigil y huprina X, entre otros. Memoquin es un inhibidor de AChE y  $\beta$ -secretasa-1 (BACE-1) con propiedades antiagregantes y antioxidantes adicionales, que recientemente ha demostrado su eficacia *in vivo* usando diferentes modelos de ratones de amnesia inducida.<sup>323</sup> Ladostigil es un inhibidor de colinesterasas (ChEs) y un inhibidor selectivo de monoaminoxidasas cerebrales (MAO-A y -B), con poco o ningún efecto inhibitorio de la MAO periférica en experimentos *in vivo*.<sup>324</sup> Finalmente, la huprina X es un inhibidor sub-nanomolar de AChE con efectos adicionales, tales como inhibición de BACE-1, activación de  $\alpha$ -secretasas y estimulación de la señalización de la ruta de la proteína quinasa activada por mitógeno, que es capaz de mejorar el aprendizaje y la memoria en un modelo triple de ratones transgénicos de AD.<sup>325</sup>

<sup>323</sup> Capurro, V.; Busquet, P.; Lopes, J. P.; Bertorelli, R.; Tarozzo, G.; Bolognesi, M. L.; Piomelli, D.; Reggiani, A.; Cavalli, A. *PLoS One*, **2013**, *8*, e56870.

<sup>324</sup> Weinreb, O.; Amit, T.; Bar-Am, O.; Youdim, M. B *Curr. Drug Targets* **2012**, *13*, 483-494.

<sup>325</sup> Ratia, M.; Giménez-Llort, L.; *Neurodegener. Dis.* **2013**, *11*, 129-140.

A este respecto, la hepatotoxicidad provocada por la tacrina ha impulsado la búsqueda de derivados no tóxicos, que además puedan actuar sobre varios receptores simultáneamente, los llamados fármacos multidiana. Por ejemplo, se han desarrollado híbridos de tacrina con productos naturales (melatonina o flavonoides) o con fármacos en avanzados estudios clínicos (ej., clioquinol), dando lugar a los híbridos tacrina-melatonina,<sup>326,327</sup> tacrina-clioquinol<sup>328</sup> y tacrina-flavonoides (Esquema 39).<sup>329</sup>



<sup>326</sup> Rodríguez-Franco, M. I.; Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Hernández-Ledesma, B.; Bartolomé, B. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 459-462.

<sup>327</sup> Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Campillo, N. E.; Páez, J. A.; González-Muñoz, G. C.; Usán, P.; García-Palomero, E.; López, M. G.; Villarroja, M.; García, A. G.; Martínez, A.; Rodríguez-Franco, M. I. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 828-841.

<sup>328</sup> Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; González-Muñoz, G. C.; Conde, S.; López, M. G.; Villarroja, M.; García, A. G.; Rodríguez-Franco, M. I. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (13), 4927-4937.

<sup>329</sup> Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Monjas, L.; Rademann, J.; Rodríguez-Franco, M. I. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1303-1317.

Estas familias demostraron su capacidad para evitar la muerte de las neuronas sometidas a estrés oxidativo mitocondrial o a la exposición de la  $\beta$ A, restablecer los niveles de neurotransmisores y detener la pérdida neuronal. Además, estudios *in vivo* de los híbridos tacrina-melatonina y tacrina-clioquinol, indican que son capaces de reducir los déficits cognitivos, así como disminuir la carga de  $\beta$ -amiloide en el cerebro de los ratones transgénicos APP/Ps1 empleados como modelo murino de la EA.<sup>330,331</sup>

En este mismo sentido, y dado los buenos resultados obtenidos con los anteriores híbridos, otros autores reportan la obtención de nuevos híbridos, en los que a la estructura de la tacrina se le unirían fragmentos de neuroaminas (como tiramina o homoveratrilamina) o de moléculas antioxidantes (como el ácido ferúlico y otros fenoles).<sup>332</sup> En todos los casos, se trata de moléculas multifuncionales con propiedades colinérgicas y neuroprotectoras, dirigidas a un potencial tratamiento de la EA.

Otros derivados con propiedades antioxidantes que se pueden destacar son los conocidos como “KojoTacrinas”, sintetizados recientemente por Dgachi et al. incorporando a la tacrina una unidad de ácido kójico, un conocido agente antioxidante (Esquema 40).<sup>333</sup>

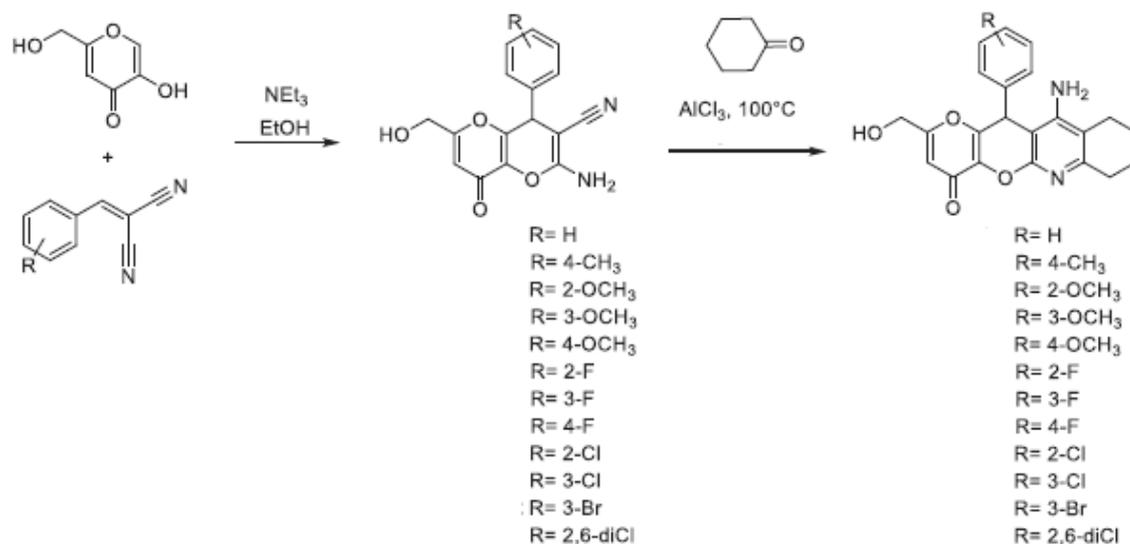
---

<sup>330</sup> Spuch, C.; Antequera, D.; Fernández-Bachiller, M. I.; Rodríguez-Franco, M. I.; Carro, E. *Neurotox. Res.* **2010**, *17* (4), 421-431.

<sup>331</sup> Antequera, D.; Bolos, M.; Spuch, C.; Pascual, C.; Ferrer, I.; Fernández-Bachiller, M. I.; Rodríguez-Franco, M. I.; Carro, E. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *46*, 682-691.

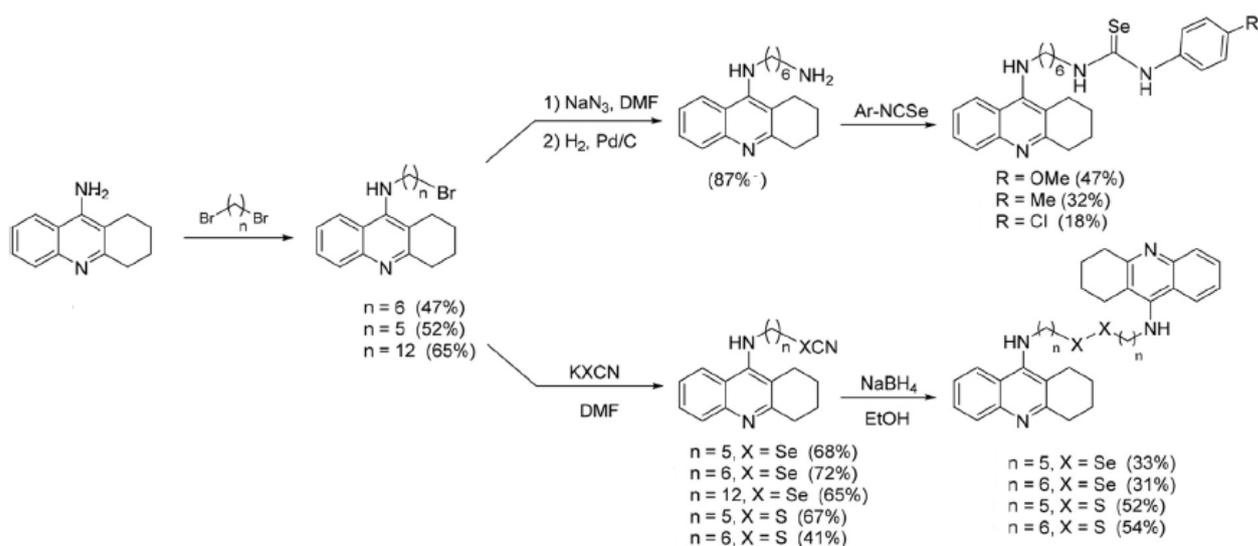
<sup>332</sup> Spilovska, K.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Dolezal, R.; Mezeiova, E.; Soukup, O.; Kuca, K. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2017**, *17*, 1006.

<sup>333</sup> Dgachi, Y.; Martin, H.; Malek, R.; Jun, D.; Janockova, J.; Sepsova, V.; Soukup, O.; Iriepa, I.; Moraleda, I.; Maalej, E.; Carreiras, M. C.; Refouvelet, B.; Chabchoub, F.; Marco-Contelles, J.; Ismaili, L. *J Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 163–170.



**Esquema 40.** Híbridos tacrina-ácido kójico preparados recientemente en bibliografía

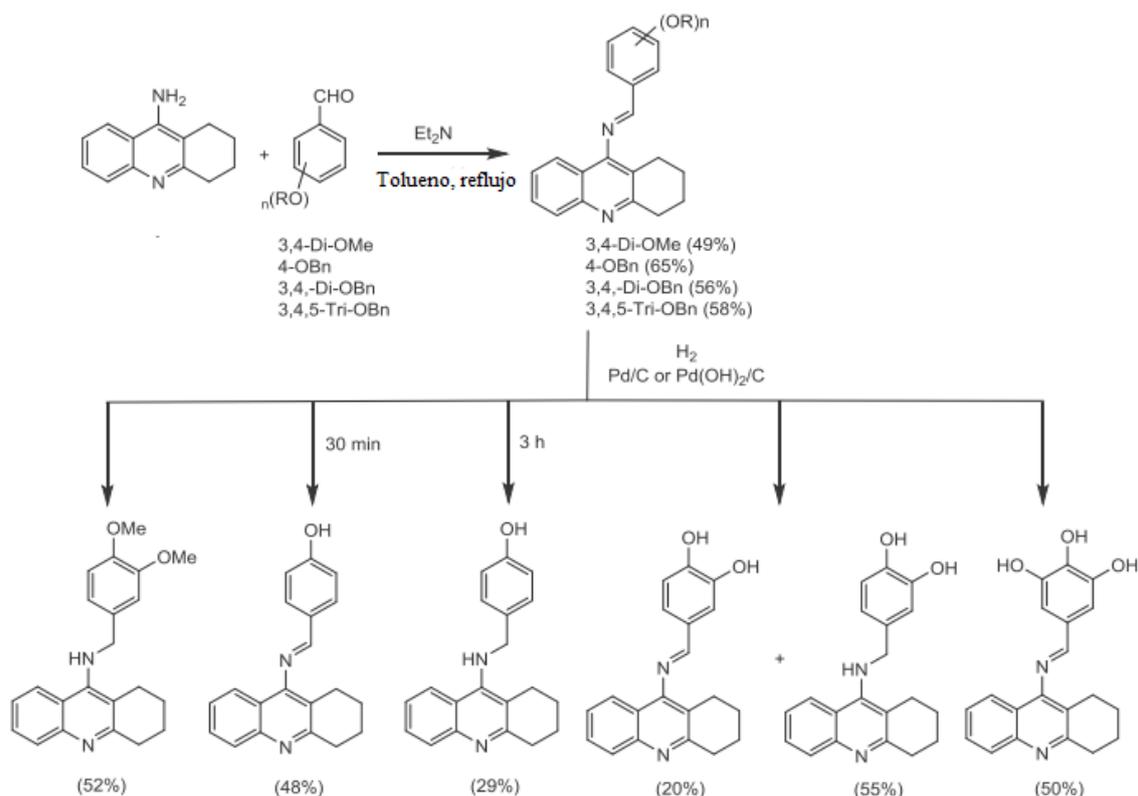
También se ha publicado la síntesis de híbridos de tacrina multidiana con otra funcionalidad adicional a la de combatir el estrés oxidativo, como la que describen Roldán-Peña *et al.* Estos autores llevaron a cabo la síntesis de homodímeros simétricos de tacrina que contenían un puente disulfuro o diseleniuro para el tratamiento de la EA y como agentes antiproliferativos (Esquema 41).<sup>334</sup>



**Esquema 41.** Homodímeros simétricos de tacrina con puentes disulfuro, diseleniuro y selenourea

<sup>334</sup> Roldán-Peña, J. M.; Alejandro-Ramos, D.; López, O.; Maya, I.; Lagunes, I.; Padrón, J. M.; Peña-Altarima, L. E.; Bartolini, M.; Monti, B.; Bolognesi, M. L.; Fernández-Bolaños, J. G. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 761-773.

Además, recientemente ese mismo grupo de investigación ha elaborado híbridos tacrina-polifenoles como potenciales agentes multidiana, también con el objetivo de combatir el estrés oxidativo (Esquema 42).<sup>335</sup>



**Esquema 42.** Híbridos Tacrina-Polifenoles sintetizados por Roldán-Peña et al.

Por ello, viendo los interesantes efectos que podía tener la síntesis de híbridos de tacrina capaces de actuar con dos o más dianas farmacológicas, desde nuestro grupo de investigación se decidió llevar a cabo la síntesis de híbridos tacrina-quitosano. No existen estudios previos relacionados y, estos híbridos podrían combinar las propiedades de inhibir las enzimas AChE y BChE de la tacrina con el resto de propiedades beneficiosas del quitosano entre las que destacan su capacidad antioxidante y antiproliferativa revisadas anteriormente. Además, el quitosano serviría de vector a la tacrina en el organismo aumentando su estabilidad y mediante los

<sup>335</sup> 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.

diferentes puentes de unión entre el biopolímero y la tacrina se podrían potenciar algunos efectos contra dianas concretas, entre las que se destacaría el puente selenourea con gran potencial antioxidante como se vio previamente en el capítulo 2, que limite el daño pro-oxidante intrínseco de la tacrina.

## **2. Objetivos específicos**

1) Síntesis y caracterización de nuevos derivados de tacrina con un espaciador adecuado para acomodarse a la estructura del quitosano.

2) Preparación y caracterización de nuevos sistemas multidiana híbridos tacrina-quitosano conteniendo distintos tipos de función puente de unión al biopolímero, con potencial aplicación frente a la enfermedad del Alzheimer.

3) Evaluación del potencial biológico de los productos preparados contra la EA: inhibición de las enzimas Acetilcolinesterasa y Butilcolinesterasa, así como el estudio de la hepatotoxicidad de los mismos.

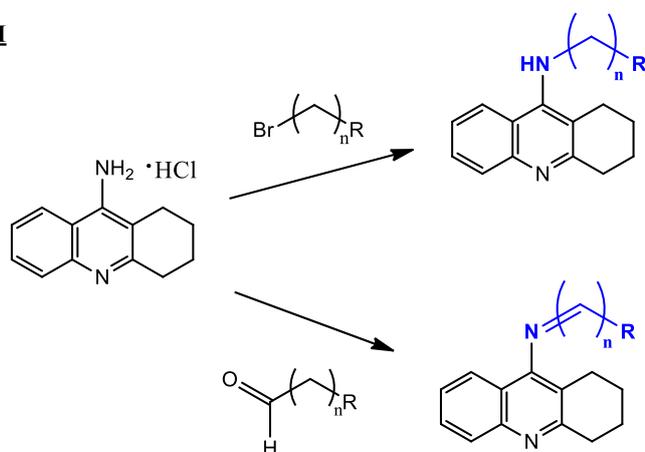
### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Síntesis de derivados de tacrina

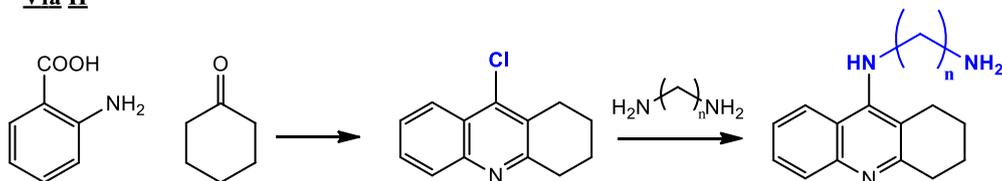
La síntesis de derivados de tacrina se planteó con la finalidad de que a su vez estos derivados sintetizados pudiesen ser anclados posteriormente al quitosano, de tal forma que por la experiencia previa de nuestro grupo de investigación con dicho biopolímero se buscaban funcionalidades de tipo: alqueno, aldehído, ácido, halogenuro terminal, isocianato, isoselenocianato o isotiocianato que pudiesen ser incorporadas *a posteriori* al quitosano a través de su grupo amino.

La obtención de los derivados de tacrina se ha abordado por dos vías diferentes. La primera vía estriba en la funcionalización a través del grupo amino de la tacrina comercial mediante reacciones de sustitución nucleófila con halogenuros primarios o formación de bases de Schiff por condensación de un aldehído con esta amina aromática. La segunda vía se basa en obtener el esqueleto heterocíclico de tetrahydroacridina como 9-cloro-1,2,3,4-tetrahydroacridina la cual podría usarse como base para obtener los posteriores derivados de tacrina:

##### Vía I



##### Vía II



**Esquema 43.** Planteamiento sintético para la obtención de nuevos derivados de tacrina

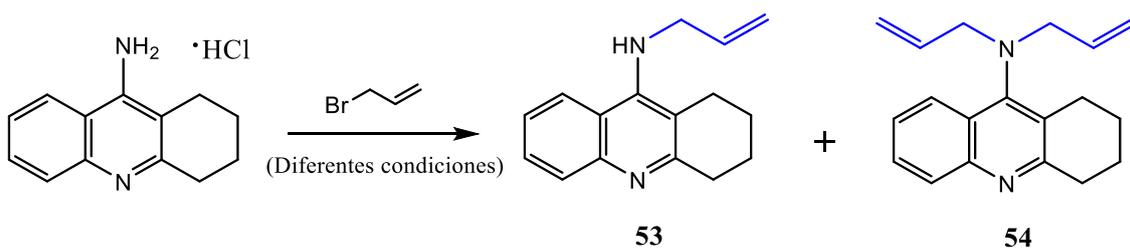
### 3.1.1. Vía I: Síntesis de derivados de tacrina por funcionalización del grupo amino

Cronológicamente, la primera y única vía planteada para la derivatización de la tacrina fue la de funcionalizar el grupo amino. Por ello, se probaron distintos reactivos basados en halogenuros de alquilo primarios que pudiesen ser desplazados por la función amina y otros basados en funciones aldehído para obtener la imina correspondiente.

En primer lugar, se hizo reaccionar clorhidrato de tacrina con bromuro de alilo en presencia de DIPEA. La DIPEA tenía como objetivo liberar la tacrina de su forma de clorhidrato y para el posterior desplazamiento del bromo, por parte del grupo amino, en el bromuro de alilo. Sin embargo, a pesar de someter la reacción a condiciones de reflujo y dejarla reaccionando más de 24 horas, no se observó la presencia de ningún nuevo producto (Tabla 16).

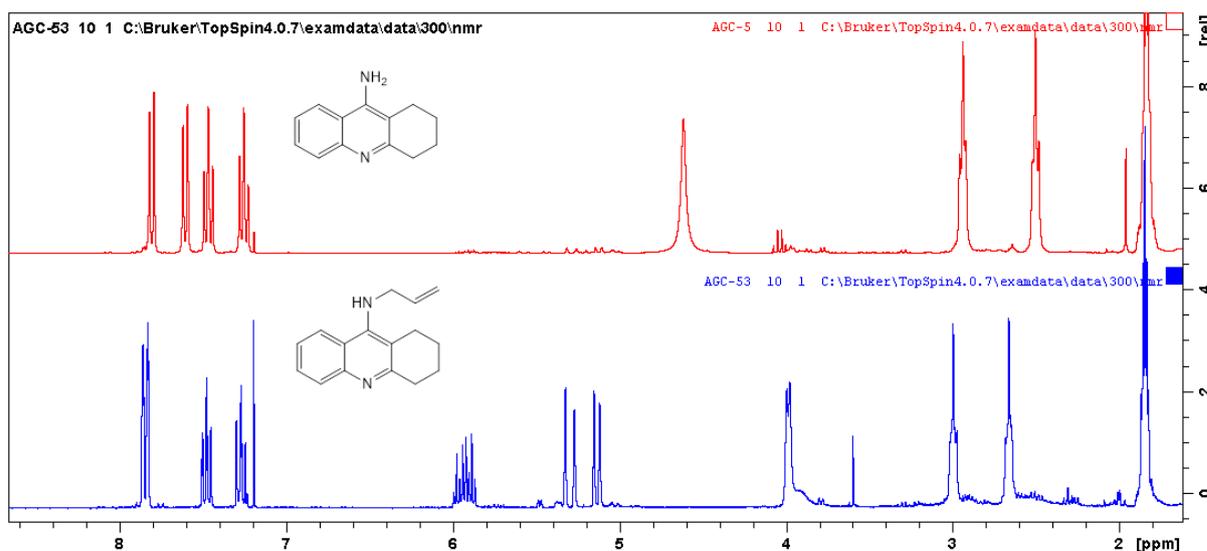
Teniendo en cuenta este resultado negativo, se ensayaron distintas condiciones para la reacción: se emplearon otras bases (NaOH, KOH, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e incluso NaH), disolventes polares apróticos que favoreciesen la sustitución como el acetonitrilo o la DMF y condiciones más enérgicas de reacción mediante aumento de la temperatura. Sin embargo, sólo llegaron a observarse trazas del producto deseado en el mejor de los casos (Tabla 16). Las únicas condiciones que permitieron obtener el producto **53** con un rendimiento moderado fueron aquellas en las que se empleó una base muy fuerte como el NaH y temperaturas muy altas alrededor de 120 °C con DMF como disolvente. No obstante, la fuerza de la base condujo a la posterior deprotonación de la amina secundaria formada y por tanto a una segunda alquilación que se tradujo en un peor rendimiento del producto deseado.

**Tabla 16.** Condiciones ensayadas para la reacción de tacrina con el bromuro de alilo



Base	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)
DIPEA	DCM	Reflujo	72	No reacciona
DIPEA	DMF	120	72	No reacciona
NaOH	DMF	120	72	Trazas en HRMS de <b>53</b>
NaOH	Acetonitrilo	Reflujo	24	No reacciona
KOH	Acetonitrilo	Reflujo	24	No reacciona
Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMSO	120	24	No reacciona
NaH	DMF	120	24	<b>53</b> (37%) y <b>54</b> (15 %)

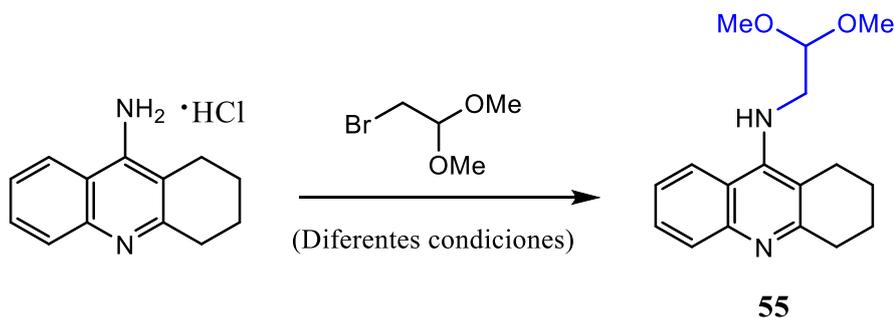
La aparición de un nuevo multiplete y dos dobles dobles a 5.93, 5.28 y 5.13 ppm respectivamente, asignados a los protones olefínicos de la cadena lateral de la tacrina, así como el doblete a un desplazamiento de 3.99 ppm perteneciente a los protones del metileno unido al grupo amino, permiten confirmar de manera satisfactoria el alqueno incorporado al esqueleto de la tacrina (**Figura 49**). Además, la doble integración para estas señales anteriormente nombradas, permite distinguir el dialqueno (**54**) del monoalqueno formado (**53**).



**Figura 49.** Comparativa <sup>1</sup>H RMN (300 MHz) de tacrina comercial y derivado **53** en CDCl<sub>3</sub>

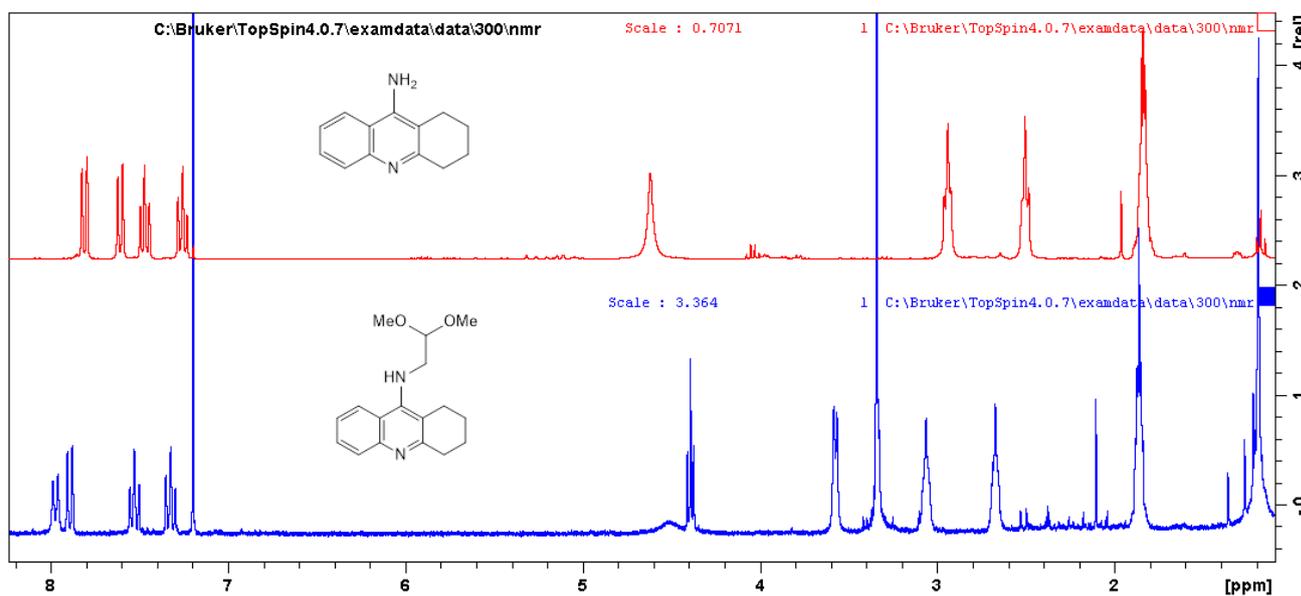
Otro de los ensayos que se llevó a cabo con relativa dificultad dada la tendencia a no reaccionar de la tacrina fue la reacción de la tacrina clorhidrato con el reactivo 2-bromo-1,1-dimetoxietano. Nuevamente se probaron diversas condiciones, reaccionando únicamente de forma satisfactoria cuando se empleaba hidruro de sodio como base, resultando el compuesto deseado **55** con un 40 % de rendimiento.

**Tabla 17.** Condiciones ensayadas para la reacción de tacrina con el 2-bromo-1,1-dimetoxietano



Base	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)
DIPEA	DMF	120	72	No reacciona
NaOH	Acetonitrilo	Reflujo	24	No reacciona
NaH	DMF	120	24	<b>55</b> (40 %)

En este caso la aparición en  $^1\text{H}$  RMN (Figura 50) de un metilideno y un metileno en forma de un triplete y un doblete a 4.39 y 3.58 ppm, respectivamente, así como un singlete a 3.34 ppm perteneciente a los 6 H de los dos grupos metoxilo presentes en el derivado, permiten la identificación del compuesto **55**.



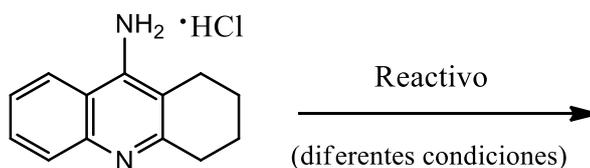
**Figura 50.** Comparativa  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz) de tacrina comercial en  $\text{DMSO-d}_6$  y derivado **55** en  $\text{CDCl}_3$

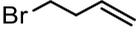
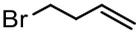
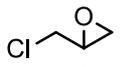
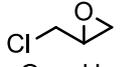
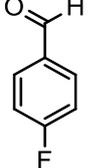
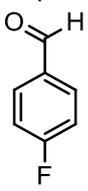
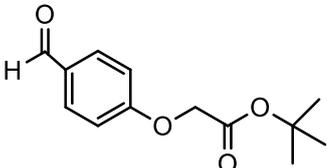
Otra reacción de desplazamiento que permitió obtener el derivado de tacrina adecuado (**61**) para la posterior reacción quitosano fue el ensayo de tacrina clorhidrato

con el dihaluro 1,5-dibromopentano empleando hidróxido de sodio como base, descrito por Roldán-Peña et al., con un rendimiento también relativamente bajo.<sup>334</sup>

En líneas generales, el empleo de esta metodología extrapolada a otros halogenuros primarios como la epíclorhidrina, o a aldehídos como el 4-fluorbenzaldehído en diferentes condiciones condujo a resultados negativos como puede observarse en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Otros ensayos de desplazamiento y obtención de iminas ensayados sobre tacrina



Reactivo	Base	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento
	<b>DIPEA</b>	Acetonitrilo	Reflujo	72	No reacciona
	<b>NaH</b>	DMF	120	24	No reacciona
	<b>DIPEA</b>	DMF	120	24	No reacciona
	<b>NaOH</b>	DMF	120	72	No reacciona
	<b>NaOH</b>	EtOH	Reflujo	24	No reacciona
	<b>NaH</b>	DMF	120	24	No reacciona
	<b>NaOH</b>	Acetonitrilo	Reflujo	24	No reacciona

En vista de los resultados obtenidos podría concluirse que esta metodología no es satisfactoria, ya que en la mayoría de los casos no produce reacción y en aquellos casos

en los que la produce lo hace con bajos rendimientos. Este hecho se podría atribuir a la baja nucleofilia y, por tanto, poca reactividad del grupo amino de la tacrina. Los factores que proponemos para intentar dar explicación a esta baja nucleofilia son los siguientes:

a) *Deslocalización de electrones del grupo amino.* Los electrones del grupo amino primario de la tacrina se encuentran muy deslocalizados por la presencia de dos anillos aromáticos en la molécula, observándose hasta seis formas resonantes (Figura 51). Por tanto, la alta deslocalización de estos electrones probablemente derive en una baja nucleofilia.

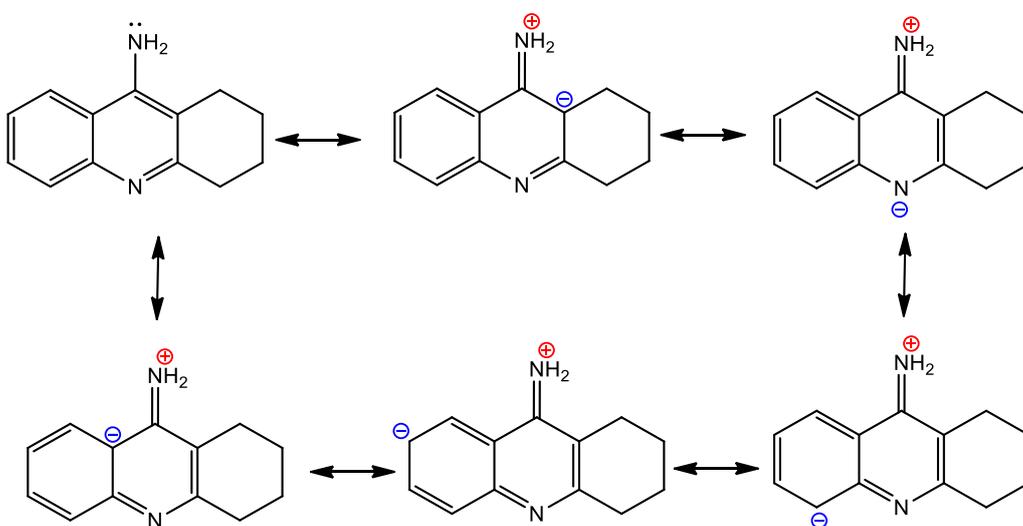


Figura 51. Formas resonantes de la tacrina

b) *Presencia de anillo de piridina.* En las aminas alifáticas el par electrónico está muy localizado en el nitrógeno, un átomo de electronegatividad no muy elevada, por ello suelen ser las bases más fuertes ( $pK_b$  3-5). Por otra parte, las anilinas, como es el caso de la tacrina, tienen una basicidad menor que las aminas alifáticas porque el par electrónico no está tan disponible, sino que está deslocalizado hacia los anillos aromáticos ( $pK_b$  anilina: 9.37). Sin embargo, el par electrónico en el nitrógeno de la piridina está proyectado hacia fuera, quedando disponible y haciendo que sea por tanto, un compuesto más básico ( $pK_b$  piridina: 8.82). Por tanto, el nitrógeno de la piridina compite con el de la amina de la tacrina a la hora de reaccionar, lo que deriva igualmente en una menor reactividad.

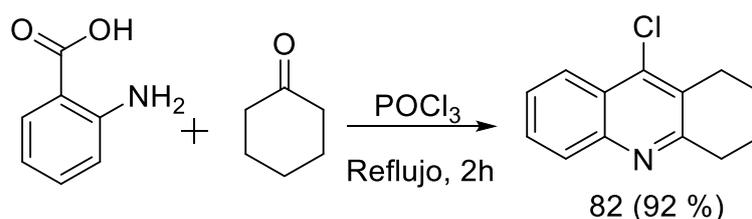
### 3.1.2. Vía II: Síntesis de derivados de tacrina a través de la 9-cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina

A la vista de los resultados negativos obtenidos mediante la anterior metodología y la poca reactividad que ofrecía el grupo amino de la tacrina, se planteó una segunda posibilidad que consistía en llevar a cabo el ataque de una amina ya funcionalizada fuese introducida en la posición 4 del anillo de piridina contenido en la estructura de la tacrina y de esta forma conseguir la derivatización del compuesto.

Es bien conocido que la piridina experimenta eficientemente las reacciones de sustitución nucleófila aromática ( $S_NAr$ ), como consecuencia de la baja densidad electrónica de los átomos de carbono del anillo.<sup>336</sup>

Por tanto, la idea consistía en sintetizar desde cero el esqueleto de la tacrina sustituyendo el grupo amino de la tacrina por un átomo de cloro, el cual se haría reaccionar posteriormente con una diamina para conseguir el esqueleto de la tacrina de forma eficiente con otro sustituyente de tipo amina en el extremo de la cadena lateral, que al ser una amina primaria alifática permitiría obtener los diversos derivados sin tanta dificultad y con mayores rendimientos.

El primer paso que se llevó a cabo fue la síntesis del esqueleto heterocíclico de la tacrina. Para ello, se partió del ácido antranílico y ciclohexanona como materias primas, las cuales se hicieron reaccionar con oxiclورو de fosforo en presencia de acetato de etilo a reflujo lo que condujo a la 9-cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina (**82**).<sup>337</sup>



Esquema 44. Condiciones de síntesis de compuesto **82**

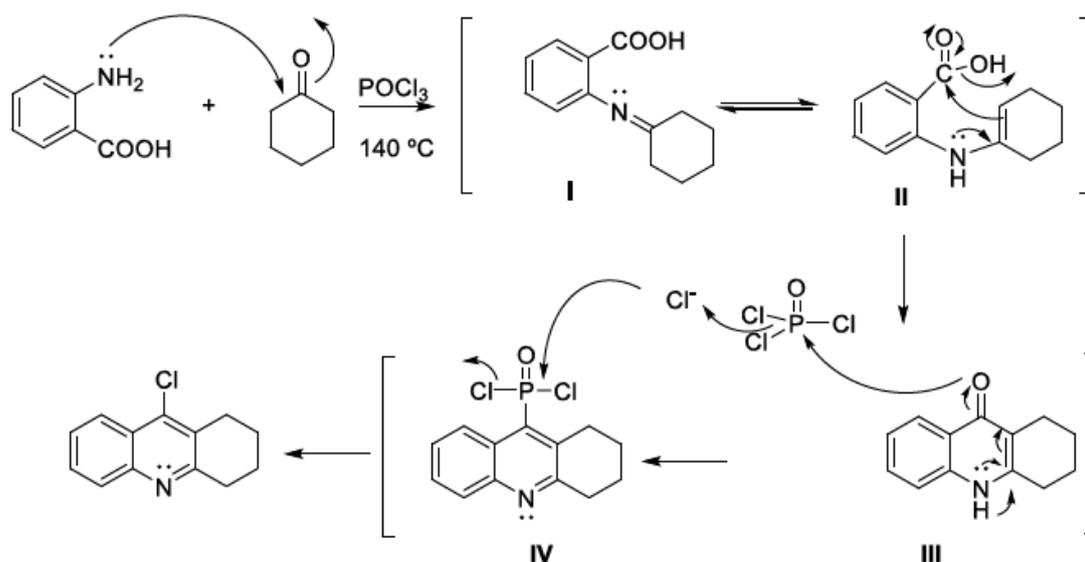
La síntesis de este compuesto se lleva a cabo mediante una variación de la reacción de Friedlander de quinolinas, que transcurriría de forma que:<sup>338</sup>

<sup>336</sup> Davies, D. T. (1992). Aromatic heterocyclic chemistry (pp. 125-141). Oxford University Press.

<sup>337</sup> Bornstein, J. J.; Eckroat, T. J.; Houghton, J. L.; Jones, C. K.; Green, K. D.; Garneau-Tsodikova, S. *MedChemComm*, **2011**, 2, 406-412.

<sup>338</sup> Hiremathad A.; Keri, R. S.; Esteves, A. R.; Cardoso, S. M.; Chaves, S.; Santos, M.A. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 148, 255-67.

En primer lugar, el ácido antranílico reacciona con la ciclohexanona para obtener una base de Schiff (I), la cual es tautomerizada a la enamina (II) que, mediante sustitución nucleófila acílica intramolecular, conduce a la acridona (III), la cual, en presencia de oxiclorigo de fosforo en condiciones térmicas de reacción, permite obtener el compuesto deseado, con rendimientos excelentes y sin la necesidad de una posterior purificación (Esquema 45).

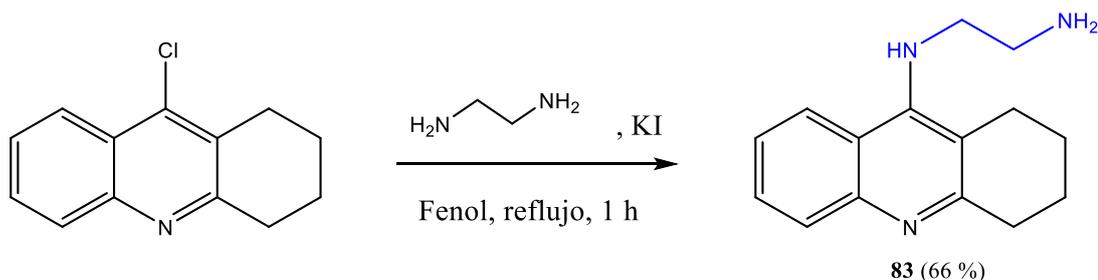


Esquema 45. Propuesta mecanística para la obtención de **82**<sup>339</sup>

Seguidamente, el compuesto obtenido (**82**) se sometió a una reacción de sustitución nucleofílica aromática, haciéndolo reaccionar con 1,2-diaminoetano en presencia de yoduro potásico y fenol a  $150\text{ }^\circ\text{C}$ , tal y como describen Keri et al.,<sup>340</sup> obteniendo el compuesto **83** con un rendimiento de un 68 % (Esquema 46). El compuesto puede ser identificado en  $^1\text{H}$  RMN por la aparición de dos tripletes a 3.45 y 2.87 ppm pertenecientes a los dos metilenos de la cadena lateral incorporada.

<sup>339</sup> Carmona, N.; Derivados de tacrina para su empleo en la síntesis de compuestos con capacidad multidiana frente a la enfermedad de Alzheimer. TFG, Universidad Complutense de Madrid, Junio 2019.

<sup>340</sup> Keri, R. S.; Quintanova, C.; Marques, S. M.; Raquel Esteves, A.; Cardoso, S. M.; Amélia Santos, M.; *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4559-4569.

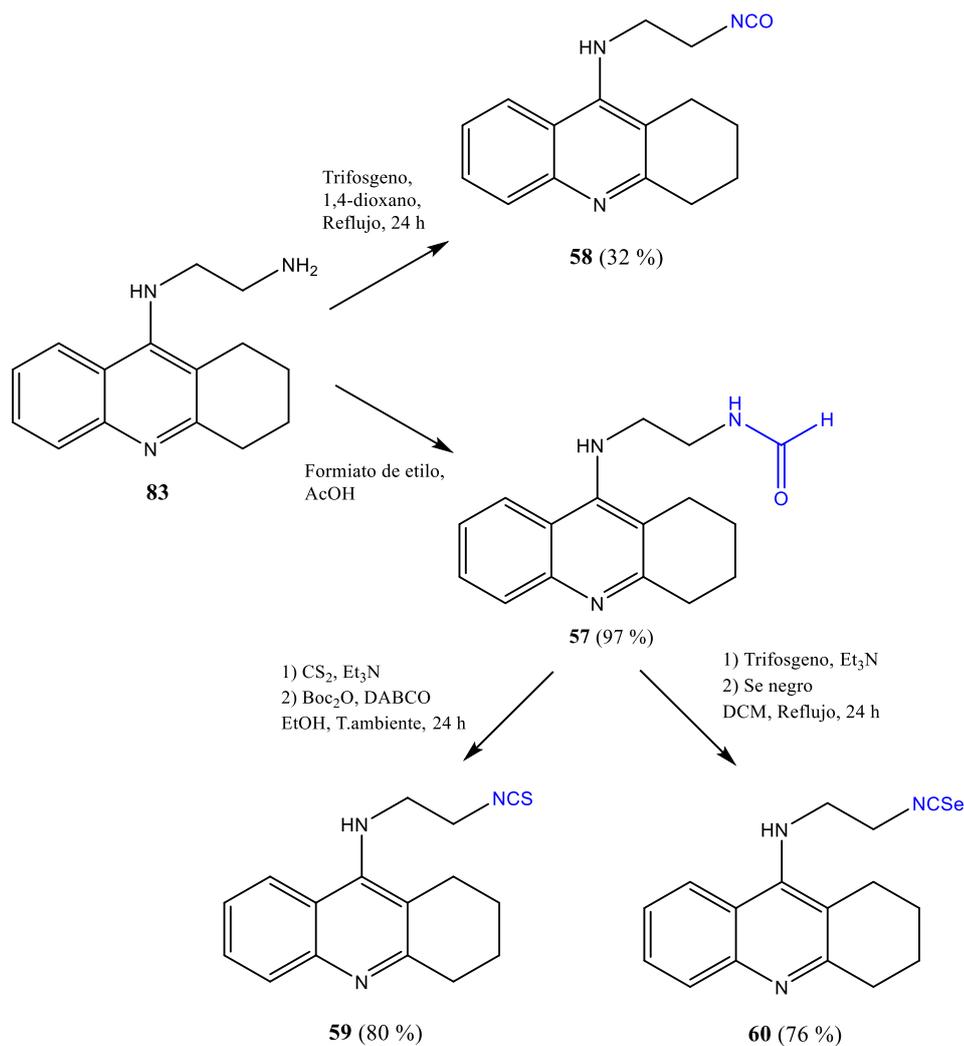


**Esquema 46.** Condiciones de síntesis de diamina **83**

Usando como base esta diamina derivada de tacrina, se planeó obtener el resto de derivados con las funcionalidades adecuadas para su posterior unión al quitosano: isocianato, isotiocianato e isoselenocianato derivados de tacrina. El planteamiento sintético planteado para obtener estos derivados está resumido en el Esquema 47.

El isocianato derivado de tacrina de estructura **58** se obtuvo por reacción del compuesto **83** con trifosgeno en dioxano a reflujo, con un rendimiento moderado (32%). Mientras que el  $^1\text{H}$  RMN de este compuesto no aporta información relevante, ya que muestra pocas diferencias con respecto a la diamina **83**, la aparición de una nueva señal a 123.2 ppm en  $^{13}\text{C}$  RMN permite identificar el grupo isocianato de la molécula, lo que junto al análisis mediante espectrometría de masas (ESI-HRMS) permite confirmar la presencia del compuesto.

La obtención del isotiocianato **59** y del isoselenocianato **60** se requirió de un paso previo que consistía en la síntesis de la formamida correspondiente **57**, obtenida mediante reacción de la diamina **83** con formiato de etilo en presencia de ácido acético como catalizador. El compuesto se obtuvo con un rendimiento excelente y pudo caracterizarse satisfactoriamente mediante la presencia en su  $^1\text{H}$  RMN de un singulete a 8.26 ppm correspondiente al protón del grupo formilo (Figura 52).



Esquema 47. Síntesis de los derivados de tacrina de estructuras **57**, **58**, **59** y **60**

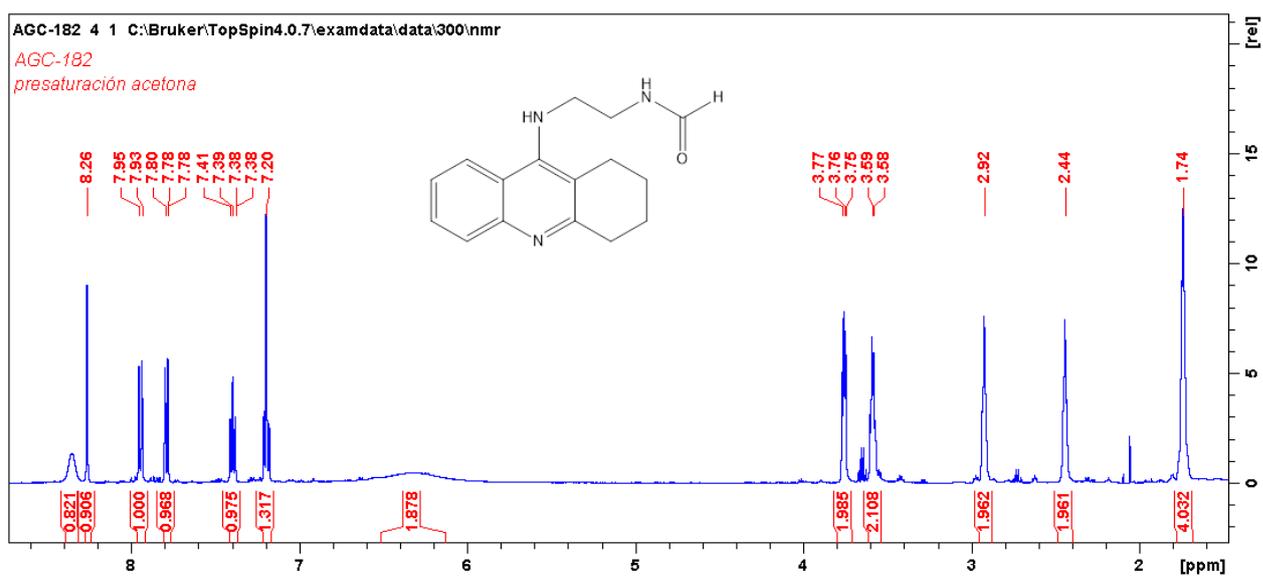


Figura 52. Espectro de <sup>1</sup>H RMN (300 MHz) de la formamida **57** en acetona-*d*<sub>6</sub>

Posteriormente, la formamida **57** se hizo reaccionar con disulfuro de carbono en presencia de Et<sub>3</sub>N, formándose como intermedio un ditiocarbamato derivado de tacrina, el cual evoluciona al isotiocianato correspondiente por reacción con dicarbonato de ditercbutilo (Boc<sub>2</sub>O) y cantidades catalíticas de DABCO. Este isotiocianato se obtuvo con buen rendimiento (80%) y su estructura es confirmada por la desaparición del singlete correspondiente al grupo formilo de la formamida en su espectro de <sup>1</sup>H RMN y por la aparición de una señal a 130.0 ppm en su <sup>13</sup>C RMN, correspondiente al carbono del grupo isotiocianato.

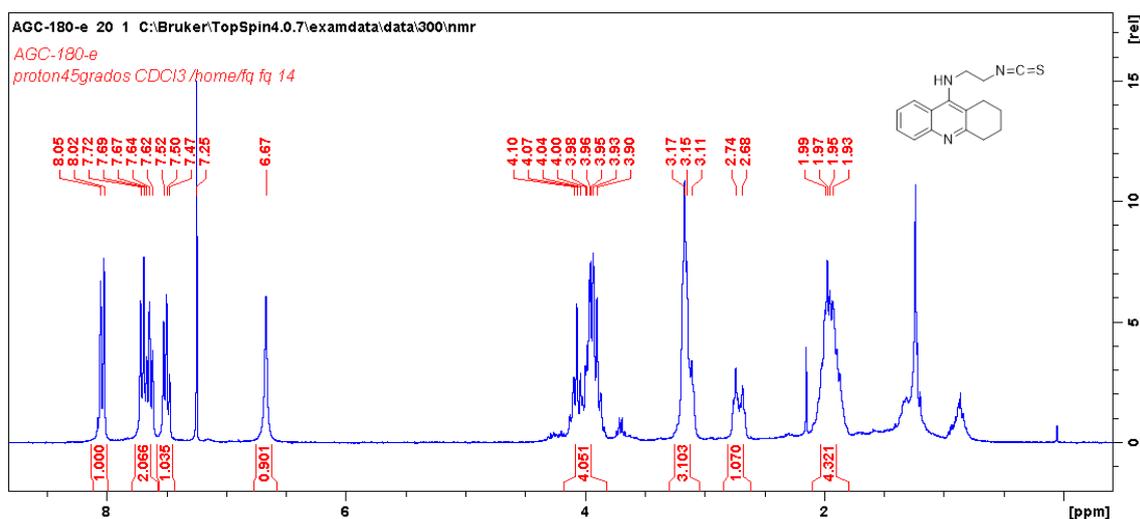


Figura 53. Espectro de <sup>1</sup>H RMN (300 MHz) del isotiocianato **59** en CDCl<sub>3</sub>

Finalmente, para la preparación del isoselenocianato derivado de estructura **60** procedió de la misma forma en que se llevaron a cabo los isoselenocianatos en el capítulo 2 de esta tesis, mediante la metodología de Fernández-Bolaños y colaboradores.<sup>243</sup> De esta manera, la formamida preparada fue transformada en isoselenocianato mediante un procedimiento *one pot* en dos etapas; en la primera se genera un isonitrilo intermedio por deshidratación de la formamida promovida por el empleo de trifosgeno y, seguidamente, dicho isonitrilo se transforma en isoselenocianato mediante reacción con selenio negro elemental. De este modo se sintetizó el isoselenocianato **60** con buen rendimiento (76%). El compuesto fue identificado de manera satisfactoria tal y como ocurría en el isotiocianato **59**, por la desaparición del singlete correspondiente al grupo formilo de la formamida precursora en <sup>1</sup>H RMN y por la aparición de una señal a 129.7 ppm correspondiente al carbono del grupo isoselenocianato en su espectro de <sup>13</sup>C RMN.

### 3.2. Síntesis de híbridos tacrina-quitosano

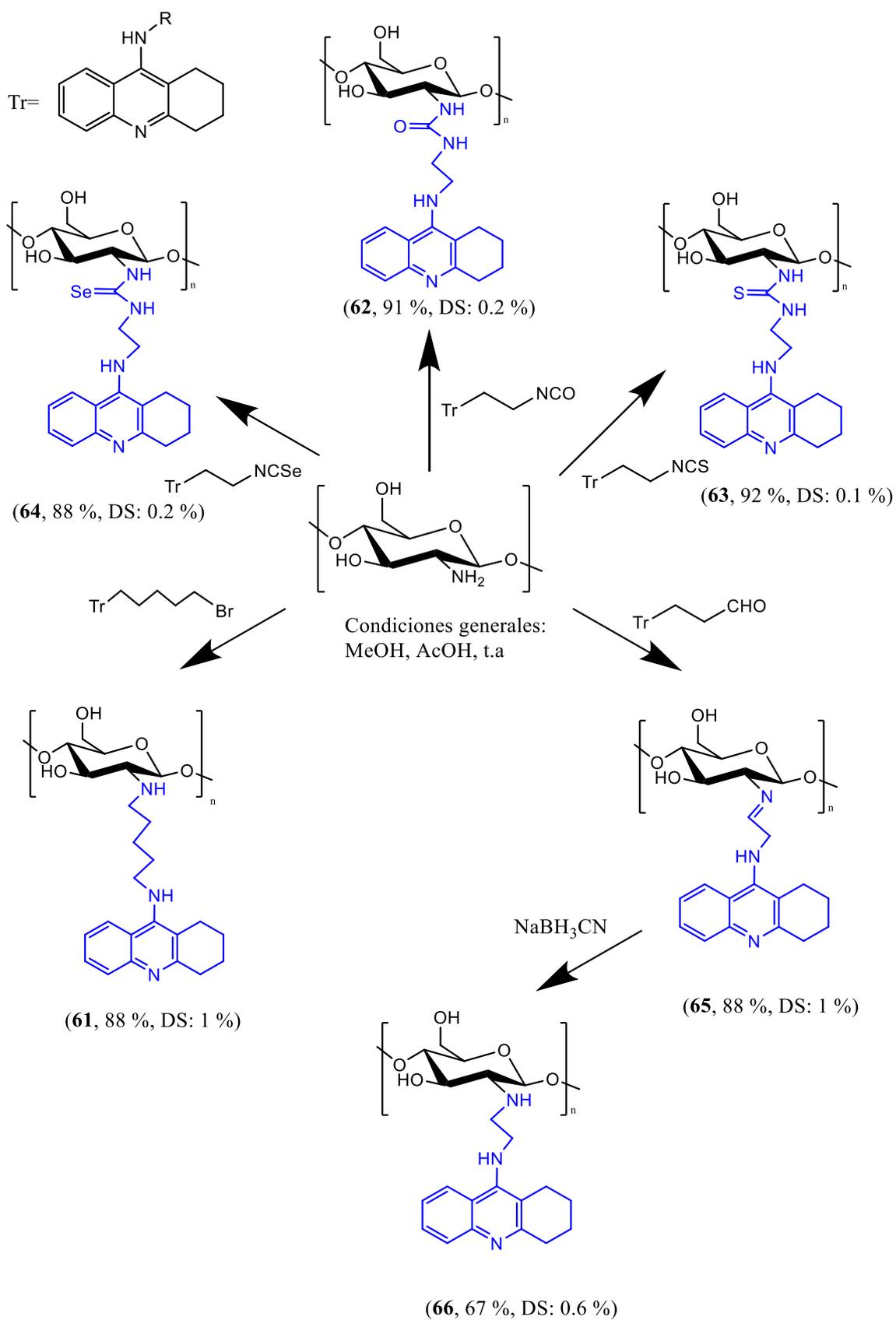
La síntesis de los híbridos tacrina-quitosano se llevó a cabo por reacción de cada uno de los derivados de tacrina (**58-60**) sintetizados previamente con quitosano nativo. El objetivo era el anclaje de estas unidades activas al biopolímero para la presentación multivalente de las mismas y la reducción de la hepatotoxicidad original de los compuestos de tacrina.

Al igual que en los capítulos 1 y 2, el quitosano empleado es de bajo peso molecular ( $M_w = 87875$  g/mol) con un grado de desacetilación del 84 %.

En todos los casos, se empleó ácido acético para solubilizar el polímero mediante la protonación de los grupos amino. El valor del pH utilizado en la síntesis fue de 5 para el caso particular de la selenourea y de un rango entre 6.0 y 6.3 para el resto de los compuestos, ya que era el pH óptimo en el que el grupo amino del quitosano presenta la máxima nucleofilia sin llegar a precipitar. Además, la reacción para obtener la selenourea se llevó a cabo en la oscuridad y bajo atmósfera inerte con la finalidad de evitar la degradación del compuesto organoselénico.

Para el caso particular de la imina derivada de tacrina y quitosano, se realizó un paso previo que consistió en la transformación del derivado de tacrina funcionalizado como dimetilacetal de estructura **55** en el aldehído correspondiente **56**.

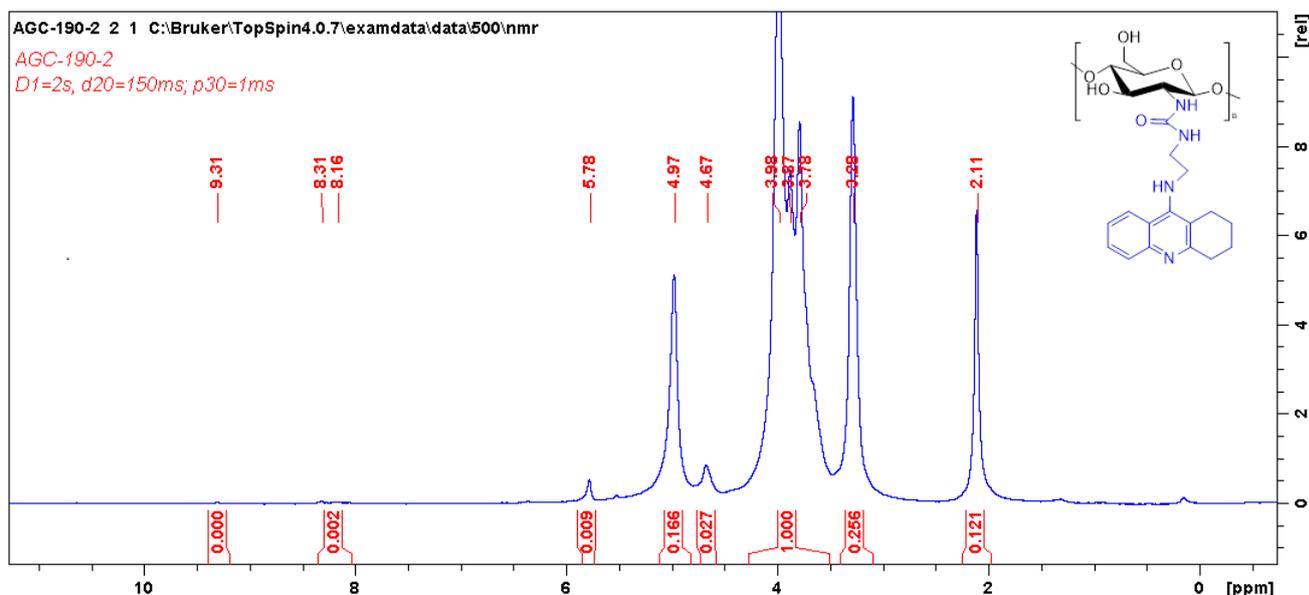
Los compuestos se obtuvieron con rendimientos excelentes que oscilan del 88 al 91% y con porcentajes de incorporación en un rango de 0.1-1 % (Esquema 48). Como se explicó en anteriores capítulos la metodología está diseñada para obtener un leve patrón de sustitución en el esqueleto del biopolímero con el objetivo de preservar las propiedades fisicoquímicas del mismo.



**Esquema 48.** Síntesis de los nuevos híbridos tacrina-quitosano

La caracterización de los sistemas tacrina-quitosano se llevó a cabo mediante análisis de  $^1\text{H}$  NMR en disolución con filtro de difusión y  $^{13}\text{C}$  CPMAS RMN en estado sólido.

Como se explicó en los anteriores capítulos, los experimentos de  $^1\text{H}$  RMN con filtro de difusión suponen una herramienta rutinaria para corroborar cualquier incorporación de forma covalente al quitosano. Las señales entre 3.0 y 5.0 ppm se asignan a los protones del esqueleto del quitosano. Concretamente, la señal que aparece a 3.2 ppm representa el protón H-2, el multiplete que aparece en la zona de 3.6-4.0 ppm se asigna a los H-3, H-4, H-5, H-6 y H-6' y el pico que aparece a aproximadamente 5.0 ppm se asigna al H-1. Tras producirse la reacción entre el quitosano y el correspondiente derivado de tacrina aparecen nuevos picos en el espectro, indicando el anclaje de estos últimos al biopolímero. Los protones alifáticos pertenecientes ciclohexano del esqueleto de la tacrina y a la cadena lateral introducida en la misma aparecerían solapados por los protones del anillo de piranosa del quitosano, por lo cual no suponen una información relevante para identificar la presencia de la unidad activa. Sin embargo, la aparición de nuevas señales en la zona aromática permite distinguir la presencia de los cuatro protones pertenecientes al esqueleto de la tacrina.



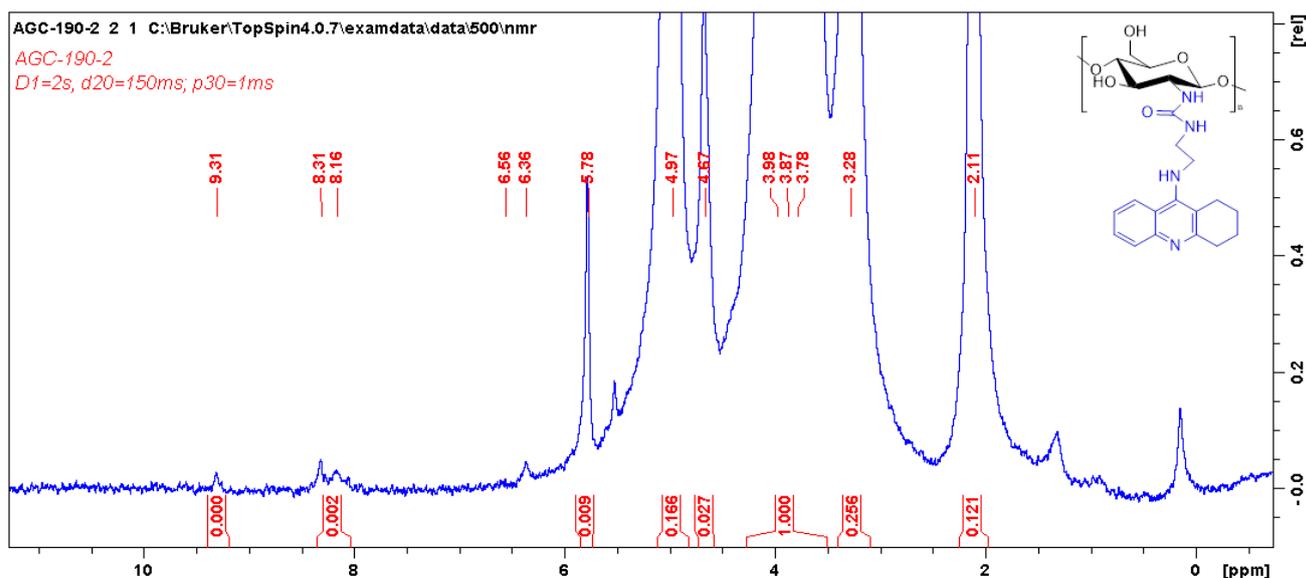
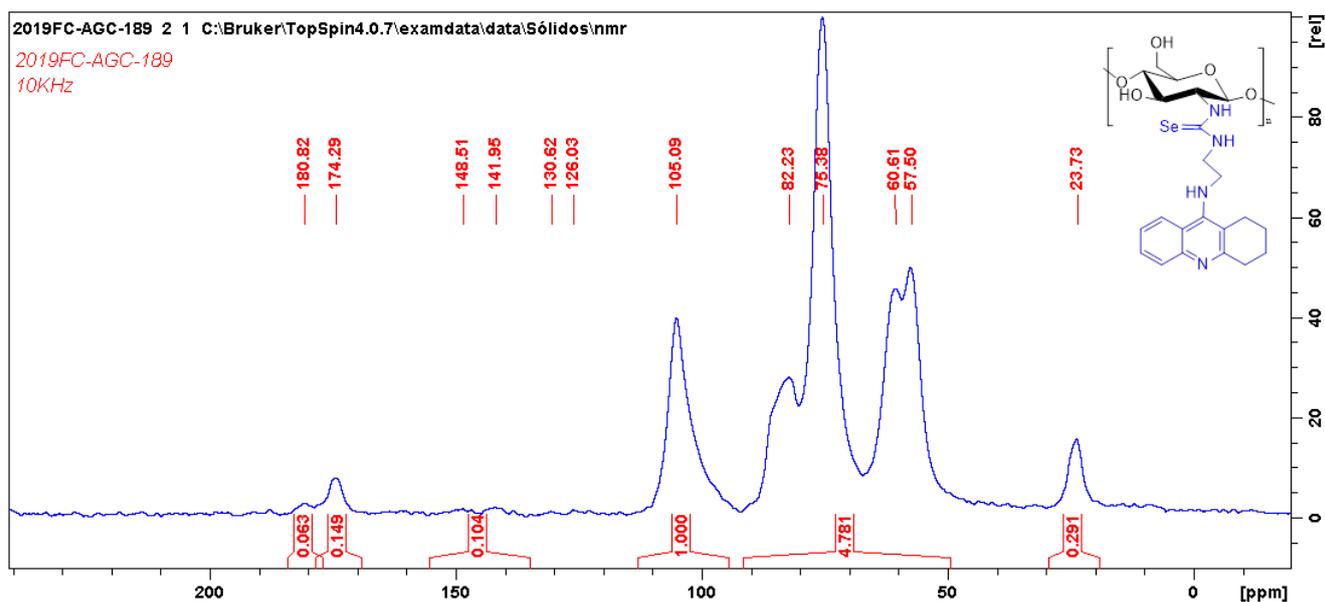


Figura 54.  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, AcOD:D<sub>2</sub>O) con filtro de difusión de urea derivada de tacrina-quitosano **62**

Al igual que ocurre en los espectros de  $^1\text{H}$  RMN, en el  $^{13}\text{C}$  CPMAS RMN los carbonos alifáticos del anillo de ciclohexano y de la cadena lateral incorporada a la tacrina se solapan con los carbonos del anillo de piranosa del quitosano. Sin embargo, como ocurre en el caso anterior, la aparición de carbonos en la zona aromática (140-105 ppm) permite identificar el derivado de quitosano satisfactoriamente. Adicionalmente, para el caso de la tiourea **63** y de la selenourea **64**, se observa la aparición en cada caso de una señal a 180 ppm junto al carbonilo del grupo *N*-acetilo de la unidad acetilada del quitosano, perteneciente a los dobles enlaces C=S y C=Se de los grupos tiourea y selenourea.



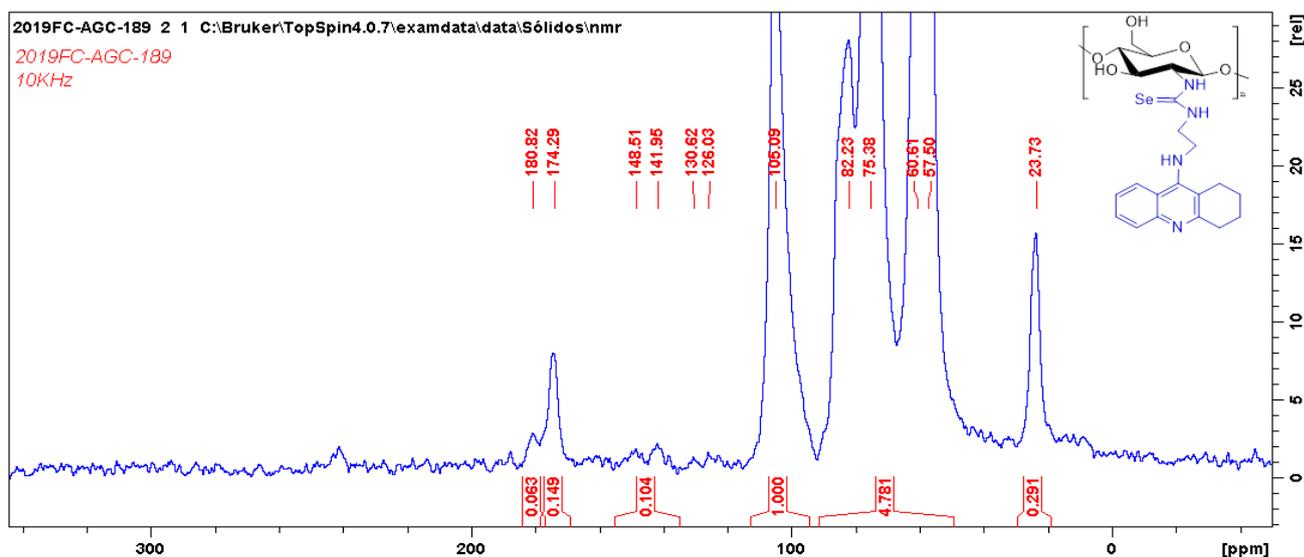


Figura 55.  $^{13}\text{C}$  CPMAS RMN de la selenourea derivada de tacrina-quitosano **64**

### 3.3. Actividades biológicas

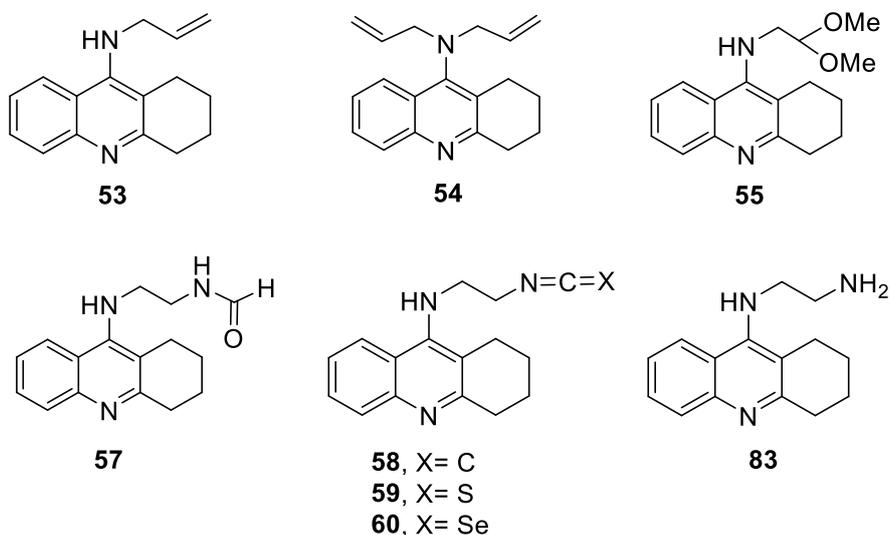
#### 3.3.1. Actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE

La evaluación de la inhibición de la acetilcolinesterasa y de la butirilcolinesterasa se llevó a cabo siguiendo el método original de Ellman et al., usando tacrina y donepezilo como controles positivos.<sup>341</sup> Se ha demostrado que ambas enzimas catalizan la descomposición del neurotransmisor acetilcolina, aunque la actividad de la primera suele ser predominante en los cerebros sanos, mientras que la actividad de BuChE aumenta significativamente con la progresión de la enfermedad del Alzheimer.<sup>342</sup> Se emplearon como enzimas modelo la acetilcolinesterasa procedente de la anguila eléctrica *Electrophorus Electricus* y la butirilcolinesterasa de suero equino y, como sustratos, el yoduro de acetyl- y butiriltiocolina. Los valores de  $\text{EC}_{50}$  para AChE y BuChE se encuentran recogidos en la Tabla 19. La mayoría de los compuestos evaluados consiguieron valores de  $\text{EC}_{50}$  en un rango de sub-micromolar a nanomolar con mejor potencial inhibitorio de la BuChE sobre la AChE.

<sup>341</sup> Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres Jr, V.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88-95.

<sup>342</sup> Perry, E. L.; Perry, R. H.; Blessed, G.; Tomlinson, B. E. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1978**, 4, 273-277.

**Tabla 19.** Estudio de inhibición *in vitro* de AChE y BuChE de derivados de tacrina sintetizados



Compuestos	AChE <sup>a</sup> Ec <sub>50</sub> (μM)	BuChE <sup>b</sup> Ec <sub>50</sub> (μM)
53	0.65 ± 0.01	0.097 ± 0.014
54	8.0 ± 1.9	0.64 ± 0.07
55	2.4 ± 0.6	0.45 ± 0.02
57	1.3 ± 0.1	0.14 ± 0
58	2.6 ± 0.3	0.37 ± 0.03
59	9.5 ± 0.3	1.2 ± 0
60	10 ± 2	0.88 ± 0.01
83	0.43 ± 0.04	0.063 ± 0.005
Donepezilo <sup>c</sup>	0.038 ± 0.001	3.14 ± 0.2
Tacrina <sup>c</sup>	0.13 ± 0.21	0.054 ± 0.85

<sup>a</sup> Concentración inhibitoria efectiva media (medida ± SD) de AChE procedente de *Electrophorus Electricus*.

<sup>b</sup> Concentración inhibitoria efectiva media (medida ± SD) de BuChE procedente de suero equino.

<sup>c</sup> Valores de EC<sub>50</sub> para Donepezilo y Tacrina para las mismas enzimas obtenidos del estudio de Maqbool et al.<sup>343</sup>

Los valores de inhibición obtenidos para la enzima AChE muestran que los derivados sintetizados inhiben en menor medida a esta enzima que los fármacos donepezilo y tacrina. No obstante, algunos derivados como **53**, **57** y **83** se aproximan al potencial inhibitorio de la tacrina. Los peores resultados los exhiben el dialqueno **54**, diacetal **55** y la gama de iso, isotio e isoselenocianatos **58-60**.

<sup>343</sup> Maqbool, M.; Manral, A.; Jameel, E.; Kumar, J.; Saini, V.; Shandilya, A.; Tiwari, M.; Hoda, N.; B, J. *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, *24*, 777-2788.

Con respecto a los valores de inhibición de BuChE, todos los derivados obtenidos mostraron un poder inhibitorio de esta enzima significativamente mayor que el fármaco donepezilo. Sin embargo, ninguno de los mismos consiguió alcanzar el poder inhibitorio de la tacrina original. Pese a ello, destacan los derivados **53** y **83** por poseer valores de  $EC_{50}$  del mismo orden que el fármaco original y **57** por ser el tercero más próximo a este valor .

A la vista de los resultados, se puede apreciar que el orden de los compuestos en el potencial inhibitorio de ambas enzimas sigue prácticamente el mismo patrón para todos los derivados sintetizados. Podemos destacar el hecho de que aquellos compuestos con una cadena más larga y la presencia de grupos más voluminosos, en concreto con átomos de la familia de los calcógenos (**55-60**), tienen un peor comportamiento que aquellos que tienen unido al grupo amino de la tacrina una cadena de máximo tres miembros, como es el caso de **53** y **83**, que presentan un grupo alqueno y un grupo amino respectivamente. Por ello, se podría pensar que la presencia de estos grupos en la cadena, bien por su voluminosidad o bien por su naturaleza electrónica, no permiten la unión de la molécula al centro activo de la enzima. Finalmente, en referencia al dialqueno **54**, el mal resultado en su actividad, a pesar de no cumplir las condiciones anteriores, puede achacarse a la ausencia del protón en el grupo amino de la posición 9 debido a que este grupo amino protonado puede imitar el catión iminio del sustrato enzimático natural y, por tanto, unirse eficientemente al sitio catalítico. Sin embargo, esta situación no puede darse en el dialqueno **54** debido a la ausencia de ese protón. Otros autores, como Roldán-Peña et al. respaldan la hipótesis anterior al obtener un peor resultado en el estudio de esta misma actividad en sus compuestos derivados de tacrina por el hecho de presentar éstos un grupo amido en lugar de un grupo amino en la posición 9 de la tacrina.<sup>344</sup>

### **3.3.2. Estudios de hepatotoxicidad**

La evaluación de la hepatotoxicidad se llevó a cabo mediante el ensayo *Alamar Blue* desarrollado por Zhang et al.,<sup>344</sup> que es un ensayo de viabilidad celular que permite, también, cuantificar el número de células vivas de un cultivo. El principal componente del *Alamar Blue* es la resazurina, un compuesto azul, que al entrar en el

---

<sup>344</sup> Zhang, H. X.; Du G. H.; Zhang, J. T. *Acta Pharmacol. Sin.* **2004**, 25, 385-389.

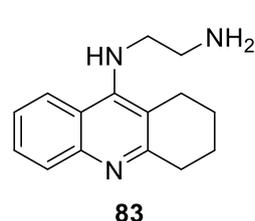
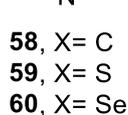
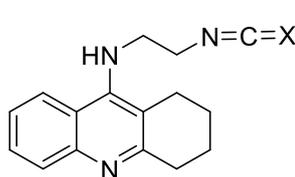
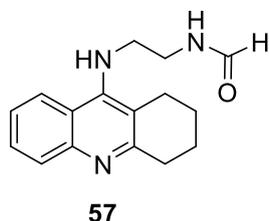
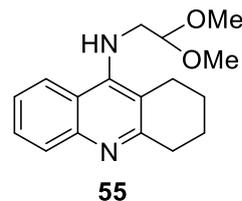
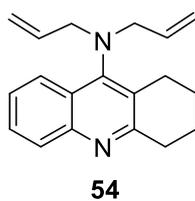
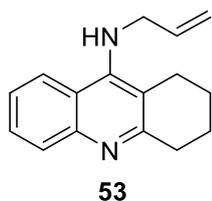
interior de las mitocondrias de las células vivas es reducida a resofurina, cambiando a color rosado y altamente fluorescente. El mecanismo de este indicador redox está explicado con más detalle en el *apartado 3.4.2.* del *Capítulo 1* de esta tesis.

Las línea celular ensayada para los compuestos de este capítulo fue HepG2, que es una línea celular tumoral humana aislada de un tumor hepático. Se trata de una línea celular de interés ya que proceden del órgano con mayor capacidad de metabolización como es el hígado.

El protocolo está descrito de forma detallada en la parte experimental, pero como resumen se puede indicar que se realizó la siembra de las células HepG2 y se expuso a la presencia de los compuestos objeto de estudio. Transcurrido el tiempo de exposición de las células a los diferentes compuestos, se adiciona a los pocillos una solución madre de *Alamar Blue* al 10% durante al menos 2 horas. Las placas serán incubadas a 37°C durante ese periodo. Finalmente, se procede a la medición de la fluorescencia en el espectrofotómetro a  $\lambda = 560/590$  nm excitación/emisión comparando la respuesta del control negativo con los grupos de exposición. Los experimentos se llevaron a cabo dos veces y por sextuplicado cada concentración en el ensayo de citotoxicidad basal. Las concentraciones efectivas medias (EC50) de los biomarcadores ensayados fueron calculadas mediante regresión lineal. Además, también se contó con el grupo de exposición denominado control negativo, que corresponden a células expuestas a medio de cultivo. Por otro lado, el control positivo lo constituía las células expuestas a la tacrina.

Se ensayaron tanto los derivados de tacrina (**53-55**, **57-60** y **83**), como los híbridos tacrina-quitosano (**61-66**) sintetizados. Sin embargo, con los híbridos tacrina-quitosano no se obtuvieron resultados concluyentes debido a la problemática que presentaba el tener que disolverlos en pequeñas cantidades de ácido, en concreto ácido acético, ya que este medio acidificado resultaba en la destrucción del cultivo celular. Los resultados obtenidos en el ensayo para los derivados de tacrina (**53-55**, **57-60** y **83**) se encuentran recogidos en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Estudio de la hepatotoxicidad respecto a la línea celular HepG2 de los derivados de tacrina sintetizados



Compuesto	Concentración efectiva media (EC50) (μM) <sup>a</sup>	
	24h	48h
<b>53</b>	325,81 ± 81,86	168 ± 13,31
<b>54</b>	>1000	652, 59 ± 339,98
<b>55</b>	938,08 ± 87,57	483,40 ± 0,5
<b>57</b>	891, 17 ± 153,16	650, 48 ± 188,35
<b>58</b>	527,48 ± 56,36	324,29 ± 165,52
<b>59</b>	>1000	>1000
<b>60</b>	248,62 ± 56,13	57,1 ± 20,71
<b>83</b>	106,53 ± 44,76	183 ± 76,63
<b>Tacrina</b>	143,76 ± 21,13	168,45 ± 0,25

<sup>a</sup> Concentración efectiva media: concentración a la cual se produce el descenso del 50% de la población celular.

Los resultados muestran que la tacrina tiene un comportamiento similar sobre las células HepG2 en ambos tiempos de exposición, causando el descenso de la viabilidad a concentraciones menores a 200 μM.

Tras 24 horas de exposición podemos observar que, por regla general, la mayoría de los derivados de tacrina sintetizados (**53-55** y **57-60**) presentan una menor hepatotoxicidad que la tacrina original. Los compuestos que inducen un mayor descenso en la viabilidad celular son el compuesto **83** y **60**, siendo el más potente de los dos el número **83** con una hepatotoxicidad superior incluso a la del fármaco original. En el caso de los compuestos menos sensibles tras la exposición a HepG2 podemos destacar el **54** y el **59**, con los cuales no se ha observado daño citotóxico a las concentraciones ensayadas (0-1000μM).

Tras 48 horas de exposición el compuesto que induce la respuesta más sensible en las células hepáticas es el compuesto **60**, siendo éste casi tres veces más hepatotóxico que la tacrina (Figura 56). Los compuestos **53** y **83** presentan una citotoxicidad muy parecida la tacrina. El resto de compuestos ensayados (**54**, **55**, **57-59**) presentan un perfil menos dañino para las células HepG2.

De forma general, bajo las condiciones ensayadas podemos concluir que de todos los compuestos ensayados, el compuesto **59** es el que en principio presenta un perfil más seguro, mostrado tras ambos tiempos de exposición una viabilidad del 100% en todas las concentraciones ensayadas.

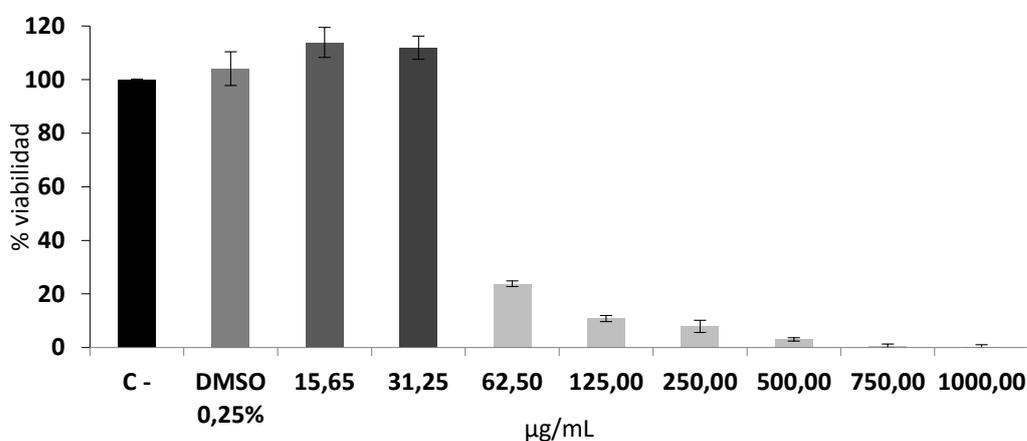


Figura 56. Viabilidad celular del compuesto **60** a diferentes concentraciones tras 48 horas

A la vista de los resultados, podríamos proponer que la presencia de selenio en la forma de isoselenocianato en la cadena lateral de la tacrina **60** dispara el daño citotóxico puesto que sus homólogos calcógenos isocianato **58** e isotiocianato **59** muestran una citotoxicidad significativamente menor. Esto podría deberse a que las células con las que se ha trabajado son células tumorales y en el *Capítulo 2* se ha mostrado la gran cantidad de beneficios que tiene la presencia de selenio contra entornos tumorales, entre otras la disminución de las especies ROS, lo que induzca en última instancia a la muerte de este tipo de células. También podemos destacar que hay cierta linealidad con respecto la presencia de grupos más reactivos en la cadena lateral y el aumento de la hepatotoxicidad, como ocurre con el amino **83** y el alqueno

**53**, de forma que la presencia de grupos menos reactivos como el diacetal **55** y la formamida **57** dan lugar a un menor daño celular.

## 4. Conclusiones

Se ha llevado a cabo la preparación de nuevos derivados de tacrina mediante dos metodologías distintas: funcionalización del grupo amino de la tacrina comercial mediante reacciones de sustitución y sustitución nucleófila aromática con formación del esqueleto de la 9-cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina. La primera metodología no ha permitido la obtención de todos los compuestos deseados y, además, estos compuestos se han obtenido con rendimientos bajos-moderados. En cambio, la segunda metodología ha permitido la obtención de todos los compuestos que se esperaban con rendimientos altos-moderados.

Se han preparado además sistemas híbridos tacrina-quitosano, mediante combinación de cada uno de los derivados de tacrina previamente preparados con el biopolímero, obteniéndose de esta forma distintos puentes de unión “,urea, tiourea, selenourea, amino e imino, que confieren a estos sistemas interesantes propiedades y podrían permitir su uso como fármacos multidiana. Un ejemplo concreto es el caso de la selenourea derivada de tacrina-quitosano con importante potencial frente al estrés oxidativo.

Respecto al potencial inhibitorio frente a las enzimas AChE y BuChE, los derivados de tacrina sintetizados (**53-55** y **57-60**) han mostrado un peor resultado que la tacrina original. No obstante, algunos de ellos (**53**, **57** y **83**) han obtenidos valores más próximos a los de este compuesto. Además, pese a que los resultados inhibitorios de ambas enzimas no han sido tan satisfactorios, la mayoría de los compuestos sintetizados (**54**, **55**, **57**, **58** y **59**) han presentado una menor hepatotoxicidad que la tacrina frente a la cepa celular HepG2, tras 48 horas de exposición de la cepa al compuesto. Por tanto, teniendo en cuenta la relación potencial inhibitorio de AChE y BuChE y la hepatotoxicidad, se puede concluir que el compuesto **57** podría ser un candidato interesante para realizar más estudios en profundidad a este respecto.

Con respecto a los derivados tacrina-quitosano, no ha sido posible la evaluación de las actividades enzimáticas ni de la hepatotoxicidad debido a que la necesidad de disolver estos compuestos en medio ligeramente ácido provocaba el deterioro de las enzimas y el cultivo celular con los que se trabajó.

## 5. Parte Experimental

### 5.1. General methods

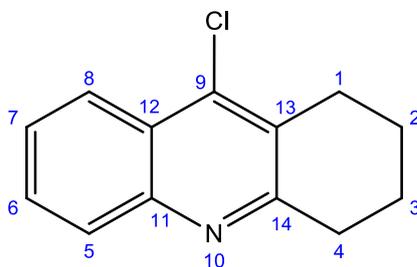
The general methods used are equivalent to those used in Chapter 1.

### 5.2. Raw materials

The commercial raw materials such as 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride hydrate, anthranilic acid, cyclohexanone, 1,2-diaminoethane, 1,5-dibromopentane, allyl bromide, 2-bromo-1,1-dimethoxyethane, ethyl formate, black selenium powder, Triphosgene (bis(trichloromethyl) carbonate, DABCO, BTC and Boc<sub>2</sub>O are commercially available from Sigma-Aldrich®. The chitosan used as raw material has been supplied by Sigma-Aldrich® as well. It has a degree of deacetylation (DD) of 84 %, parameter which has been determined by <sup>1</sup>H-NMR. The molecular weight is 87875 g/mol and it has been calculated by the group as well by HPLC/SEC. The Mn of chitosan used is 48675 g/mol and its PDI 1.81.

In regard to synthetical raw materials:

#### 9-Chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine (82)<sup>345</sup>

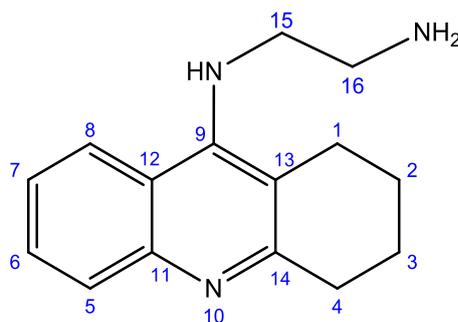


To a mixture of anthranilic acid (5.00 g, 36.5 mmol, 1 eq) and cyclohexanone (4.0 ml, 38.6 mmol, 1.1 eq) at 0 °C was carefully added POCl<sub>3</sub> (20 ml, 214.5 mmol, 5.9 eq). After being refluxed for 2 h, the reaction was cooled down to rt and concentrated under reduced pressure. The crude product was diluted with EtOAc (100 ml) and neutralized with a 10 % aq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution. The organic layer was washed with brine (2x100 ml), dried (MgSO<sub>4</sub>), filtered, and concentrated under reduced pressure. Further purification by flash chromatography (5:1 Cyclohexane: EtOAc) gave X (7.30 g, 92%) as a light yellow powder.

<sup>345</sup> Scheiner, M.; Dolles, Dominik.;Gunesch, S.; Hoffmann, Matthias.; Nabissi, Massimo.; Marinelli, O.; Naldi, M.; Bartolini, M.; Decker, M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *62*, 9078-9102

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):  $\delta$  8.19 (dd, 1H,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 1.6$  Hz, H-5), 8.06 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, H-8), 7.70 (ddd, 1H,  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 7.2$  Hz,  $J_3 = 1.6$  Hz, H-6), 7.57 (ddd, 1H,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 7.2$  Hz,  $J_3 = 1.2$  Hz, H-7), 3.18 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz, H-4), 3.04 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz, H-1), 1.97 (m, 4H, H-2 and H-3)

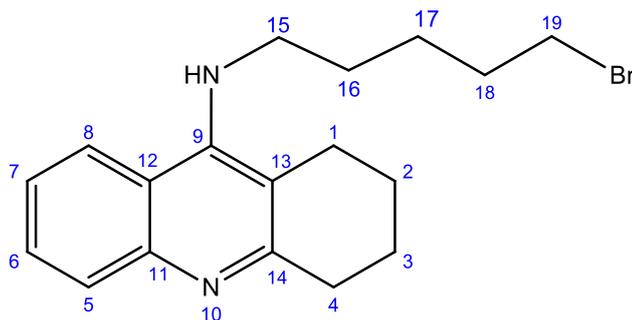
***N*-(1,2,3,4-Tetrahydroacridin-9-yl)ethane-1,2-diamine (83)**<sup>341</sup>



A mixture of **(82)** (241 mg, 1 mmol), 1,2-diaminoethane (120 mg, 2 mmol), phenol (1.5 g, 16 mmol), and KI (50 mg, 0.3 mmol) were carefully heated at 180 °C for 4 h and then cooled at room temperature. The mixture was diluted with EtOAc and made basic with 10% NaOH solution. The organic layer was washed with water and brine. The combined organic phases were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure to give the crude product. Purification was performed by column chromatography, eluent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$  (7:1:1) to afford compound **(83)** as a brown oil (200 mg, 68 %).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):  $\delta$  7.94 (dd, 1H,  $J_1 = 8.6$  Hz,  $J_2 = 0.8$  Hz, H-5), 7.87 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, H-8), 7.46 (ddd, 1H,  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 7.2$  Hz,  $J_3 = 1.6$  Hz, H-6), 7.25 (ddd, 1H,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 7.2$  Hz,  $J_3 = 1.2$  Hz, H-7), 3.45 (t, 2H,  $J = 5.5$  Hz, H-4), 2.99 (m, 2H, H-15), 2.87 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz, H-1), 2.66 (m, 2H, H-16), 1.81 (m, 4H, H-2 and H-3)

### *N*-(5-Bromopent-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (**84**)<sup>334</sup>

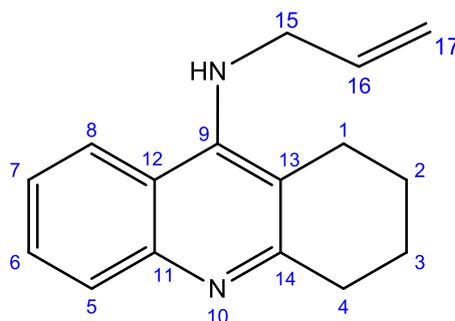


A solution of tacrine hydrochloride (240 mg, 1 mmol) in Acetonitrile (10 mL), NaOH (80 mg, 2 mmol) was added at a temperature of 0 °C and the mixture was kept under stirring for 1 hour. Then, 1,5-dibromopentane (204  $\mu$ L, 1.5 mmol) was added to the reaction and refluxed for 24 hours. When the reaction is completed, the residue is concentrated and the product purified by column chromatography (8:2:2 – Cyclohexane:AcOEt:Et<sub>3</sub>N) to give the *N*-(5-Bromopent-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (**84**) as a brown oil (100 mg, 37%).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):  $\delta$  7.90 (dd, 1H,  $J_1 = 8.6$  Hz,  $J_2 = 0.8$  Hz, H-5), 7.60 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, H-8), 7.46 (ddd, 1H,  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 7.2$  Hz,  $J_3 = 1.6$  Hz, H-6), 7.25 (ddd, 1H,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 7.2$  Hz,  $J_3 = 1.2$  Hz, H-7), 3.45 (t, 2H,  $J = 5.5$  Hz, H-4), 3.25 (m, 4H, H-15 and H-19), 2.87 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz, H-1), 2.01 (m, 6H, H-16, H-17 and H-18), 1.81 (m, 4H, H-2 and H-3)

### 5.3. Synthesis and characterization of tacrine derivatives

#### *N*-Allyl-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (**53**)



A solution of tacrine hydrochloride (500 mg, 2.1 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL), sodium hydride (255 mg, 6.4 mmol) was added at a

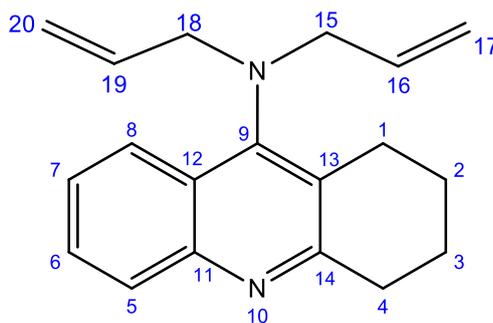
temperature of 0 °C and kept under stirring for 1 hour. Then, allyl bromide (920  $\mu$ L, 10.6 mmol) was added to the reaction and the mixture was refluxed for 24 hours. When the reaction was completed cold H<sub>2</sub>O (20 mL) was added. Subsequently, the residue was concentrated and the product purified by column chromatography (8:2:2 – Cyclohexane:AcOEt:Et<sub>3</sub>N) to give the *N*-Allyl-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (**53**) as a yellow oil (180 mg, 37%).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):  $\delta$  7.83 (dt, 2H, J<sub>1</sub>= 8.6 Hz, J<sub>2</sub>= 1.5 Hz, H-5 and H-8), 7.47 (d, 1H, J= 8.8 Hz, H-6), 7.27 (t, 1H, J= 7.4 Hz, H-7), 5.93 (m, 1H, H-16), 5.29 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=17.1 Hz, J<sub>2</sub>= 1.51 Hz, H-17A), 5.13 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=10.1 Hz, J<sub>2</sub>= 1.51 Hz, H-17B), 3.99 (d, 2H, J= 5.8 Hz, H-15), 3.00 (t, 2H, J= 5.6 Hz, H-1), 2.66 (t, 2H, J= 5.5 Hz, H-4), 1.84 (m, 4H, H-2 and H-3)

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  158.6 (C-14), 150.3 (C-11), 147.5 (C-9), 135.8 (C-5), 128.8 (C-6), 128.3(C7), 123.8 (C-8), 122.6 (C-12), 120.3 (C-13), 116.8 (C-16), 116.7 (C-17), 51.7 (C-15), 34.0 (C-4), 24.7 (C-1), 23.0 (C-3), 22.8 (C-2)

ESIHRMS: m/z 239.1545, calcd for C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub> + H: 239.1543

#### ***N,N*-Diallyl-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (54)**



A solution of tacrine hydrochloride (500 mg, 2.1 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (10 ml), sodium hydride (255 mg, 6.4 mmol) was added at a temperature of 0 °C and the mixture was kept under stirring for 1 hour. Then, allyl bromide (920  $\mu$ L, 10.6 mmol) was added to the reaction and the mixture is refluxed for 24 hours. When the reaction was completed cold H<sub>2</sub>O (20 mL) is added. Subsequently, the residue is concentrated and the product purified by column

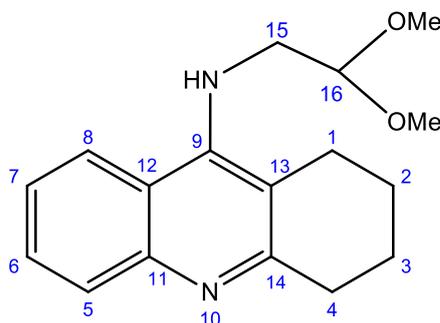
chromatography (4:1:1 – Cyclohexane:AcOEt:Et<sub>3</sub>N) to give the *N,N*-Diallyl-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (**54**) as a yellow oil (90 mg, 15%).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): δ 7.89 (dt, 2H, J<sub>1</sub>= 8.6 Hz, J<sub>2</sub>= 1.5 Hz, H-5 and H-8), 7.48 (d, 1H, J= 8.8 Hz, H-6), 7.34 (t, 1H, J= 7.4 Hz, H-7), 5.74 (m, 2H, H-16 and H-19), 5.1-5.0 (m, 4H, H-17A, H-17B, H20A and H-20B), 3.79 (d, 4H, J= 6.6 Hz, H-15 and H-18), 3.05 (t, 2H, J= 6.6 Hz, H-1), 2.81 (t, 2H, J= 6.6 Hz, H-4), 1.81 (m, 4H, H-2 and H-3)

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 160.2 (C-14), 152.9 (C-11), 147.9 (C-9), 135.4 (C-5), 128.8 (C-6), 128.3 (C-7), 128.1 (C-8), 126.4 (C-12), 124.8 (C-13), 124.3 (C-16 and C-19), 117.2 (C-17 and C-20), 55.5 (C-15 and C-18), 33.9 (C-4), 31.9 (C-1), 22.9 (C-3), 22.6 (C-2)

ESIHRMS: m/z 279.1858, calcd for C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub> + H: 279.1856

#### *N*-(2,2-Dimethoxyethyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (**55**)



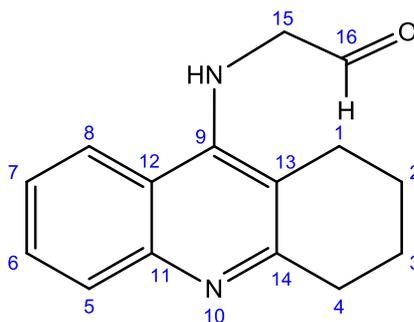
To a solution of 1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (800 mg, 0.426 mmol) in acetonitrile (10 ml) is added sodium hydride (484 mg, 0.12 mmol), leaving it under stirring for 20 minutes. Then, 2-bromo-1,1-dimethoxyethane (1.43 ml, 0.12 mmol) is added. The mixture is refluxed for 48 hours. When the reaction is completed, it is evaporated under *vacuum* and the residue was purified by silica gel chromatography (4:1:1 – Cyclohexane:AcOEt:Et<sub>3</sub>N) to afford the wished compound as a yellow oil (613 mg, 53 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): δ 7.97 (d, 1H, J<sub>1</sub>= 8.3 Hz, H-5), 7.88 (d, 1H, J= 8.3 Hz, H-8), 7.52 (t, 1H, J= 8.3 Hz, H-6), 7.32 (t, 1H, J=8.6 Hz, H-7), 4.39 (t, 2H, J= 5.2 Hz, H-16), 3.58 (d, 2H, J= 5.9 Hz, H-15), 3.39 (s, 6H, OMe), 3.05 (t, 2H, J= 5.5 Hz, H-4), 2.66 (t, 2H, J= 5.3 Hz, H-1), 1.85 (m, 4H, H-2 and H-3).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  159.0 (C14), 150.3 (C11), 147.5 (C9), 134.2 (C5), 128.9(C6), 123.8 (C7), 122.6 (C8), 120.3 (C12), 116.7 (C13), 116.4 (C16), 54.1 (C-OMe), , 49.9 (C15), 29.7 (C4), 24.4 (C1), 22.8 (C3), 22.4 (C2);

ESIHRMS:  $m/z$  287.1754, calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_2\text{N}_2 + \text{H}$ : 287.1754.

#### ***N*-(formylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (56)**

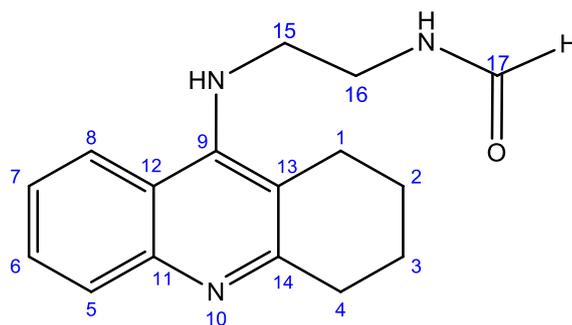


A solution of compound **55** (208 mg, 0.729 mmol) in a mixture of TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  (9:1) is stirred at room temperature for 1 hour until the disappearance of the starting material monitored by TLC (5:5:2 - DCM:MeOH:Et<sub>3</sub>N). Then, 2-bromo-1,1-dimethoxyethane (1.43 ml, 0.12 mmol) was added. When the reaction was completed, cold  $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL) was added and the organic extracts were washed with a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  (40 mL), followed by a saturated solution of  $\text{NaCl}$  (40 mL). Then,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  was added to the organic phase and it was concentrated under *vacuum* to afford a mixture of the wished compound *N*-(formylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (**56**) and the starting compound (**55**).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):  $\delta$  9.50 (s, 1H, CHO), 7.90 (d, 1H,  $J_1 = 8.3$  Hz, H-5), 7.80 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, H-8), 7.52 (t, 1H,  $J = 8.3$  Hz, H-6), 7.20 (t, 1H,  $J = 8.6$  Hz, H-7), 3.20 (d, 2H,  $J = 5.9$  Hz, H-15), 3.05 (t, 2H,  $J = 5.5$  Hz, H-4), 2.66 (t, 2H,  $J = 5.3$  Hz, H-1), 1.85 (m, 4H, H-2 and H-3).

ESIHRMS:  $m/z$  241.1336, calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ON}_2 + \text{H}$ : 241.1335.

***N*-[2-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)aminoethyl)]formamide (**57**)**



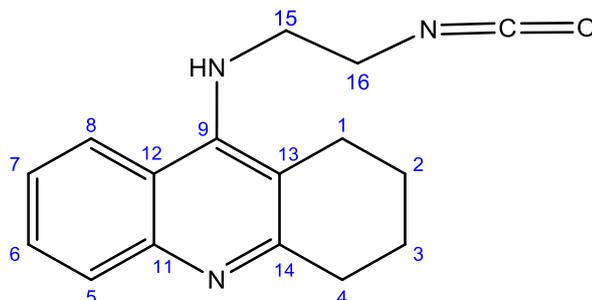
A solution of the *N*-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)ethane-1,2-diamine (**83**) (100 mg, 0.41 mmol) in ethyl formate (10 mL) and AcOH (23  $\mu$ l, 0.41 mmol) was refluxed until disappearance of the starting material monitored by TLC (7:1:1 - DCM:MeOH:Et<sub>3</sub>N) . Concentration to dryness, followed by column chromatography (7:1:1 - DCM:MeOH:Et<sub>3</sub>N) afforded *N*-[2-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)aminoethyl)]formamide (**57**) as a brown oil (110 mg, 97 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):  $\delta$  8.36 (br s, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, CHO) 7.94 (d, 1H, J<sub>1</sub>= 7.3 Hz, H-5), 7.78 (d, 1H, J= 8.8 Hz, H-8), 7.39 (t, 1H, J= 7.4 Hz, H-6), 7.20 (t, 1H, J=7.6 Hz, H-7), 3.75 (t, 2H, J= 5.7 Hz, H-15), 3.58 (q, 2H, J= 5.9 Hz, H-16), 2.92 (t, 2H, J= 5.5 Hz, H-4), 2.44 (t, 2H, J= 5.3 Hz, H-1), 1.73 (m, 4H, H-2 and H-3)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 178.2 (C14), 163.3 (CO), 153.5 (C-11), 141.3 (C-9), 130.4 (C-5), 124.3 (C-6), 123.6 (C-7), 122.8 (C-8), 117.1 (C-12), 112.8 (C-13), 49.5 (C-15), 38.6 (C-16), 29.9 (C-4), 24.4 (C-1), 22.2 (C-3), 21.3 (C-2).

ESIHRMS: *m/z* 270.1606, calcd for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>ON<sub>3</sub> + H: 270.1601

***N*-(2-Isocyanatoethyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (**58**)**



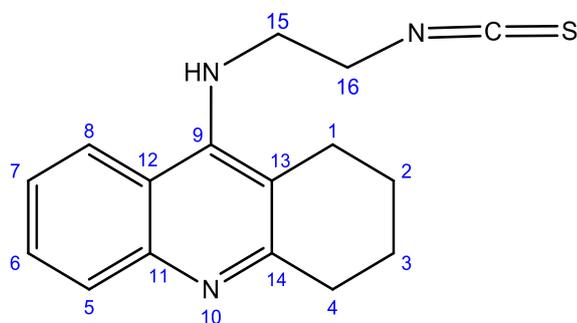
Appropriate aromatic diamine derived of tacrine (**83**) (300 mg, 1.2 mmol) was added slowly to a stirred solution of Triphosgene (bis(trichloromethyl) carbonate (BTC) (184 mg, 0.6 mmol) in 1,4-dioxane (8 mL) at room temperature. After refluxing for 8-12 h, excess 1,4-dioxane was evaporated. The residue was purified by column chromatography (7: 0.1: 0.1 – DCM: MeOH: Et<sub>3</sub>N) to afford target compound **58** as a brown oil (110 mg, 32 %)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): δ 7.98 (d, 1H, J<sub>1</sub>= 8.8 Hz, H-5), 7.65 (d, 1H, J= 8.4 Hz, H-8), 7.59 (t, 1H, J=7.4 Hz, H-6), 7.45 (t, 1H, J=7.9 Hz, H-7), 4.20 (m, 2H, H-15), 3.77 (m, 2H, H-16), 3.07 (t, 2H, J= 5.5 Hz, H-4), 2.64 (m, 2H, H-1), 1.89 (m, 2H, H-2), 1.79 (m, 2H, H-3)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 159.4 (C-14), 151.6 (C-11), 151.5 (C-9), 146.4(C-5), 129.1 (C-6), 128.0 (C-7), 125.7 (C-8), 125.6 (C-12), 123.2 (CO), 121.1 (C-13), 41.4 (C-15), 32.9 (C-16), 28.6 (C-4), 23.8 (C-1), 21.6 (C-3), 21.4 (C-2).

ESIHRMS: m/z 268.1449, calcd for C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O + H: 268.1444

#### *N*-(2-Isothiocyanatoethyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (**59**)



To the diamine derived of tacrine (**83**) (270 mg, 1.1 mmol) absolute ethanol (5 mL) was added. Then, carbon disulfide (CS<sub>2</sub>) (664 μl, 11 mmol) and Et<sub>3</sub>N (153 μl, 1.1 mmol) were added while stirring, resulting in the precipitation of the corresponding dithiocarbamate derived of tacrine. The reaction mixture was stirred for 5–30 min at room temperature and then cooled on an ice bath. Afterwards, Boc<sub>2</sub>O (240 mg, 1.1 mmol), dissolved in absolute ethanol (1 mL), was added followed by the immediate addition of a catalytic amount of DABCO (3.7 mg, 0.033 mmol, 1–3 mol %) in absolute ethanol (1 mL). The reaction mixture was kept in the ice bath for 5 min, and was then allowed to reach room temperature. After evolution of gas from the reaction

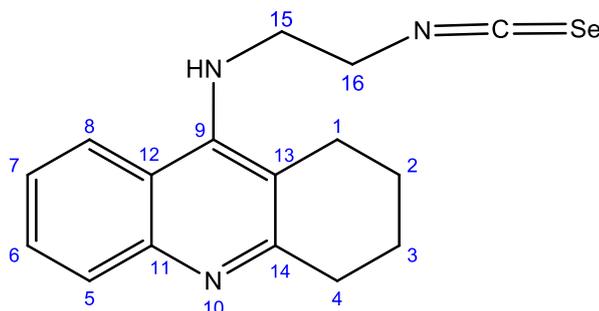
mixture had ceased (approximately 10 min), the reaction mixture was stirred for a further 5 min at room temperature and evaporated thoroughly in vacuo. The residue was purified by column chromatography (7: 0.1: 0.1 – DCM: MeOH: Et<sub>3</sub>N) to afford isothiocyanate derived of tacrine **59** as a brown oil (250 mg, 80 %)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): δ 7.98 (d, 1H, J<sub>1</sub>= 8.8 Hz, H-5), 7.65 (d, 1H, J= 8.4 Hz, H-8), 7.59 (t, 1H, J=7.4 Hz, H-6), 7.45 (t, 1H, J=7.9 Hz, H-7), 6.60 (br s, 1H, NH), 4.02 (t, 2H, J= 7.2 Hz, H-15), 3.87 (m, 2H, H-16), 3.10 (t, 2H, J= 5.5 Hz, H-4), 2.44 (t, 2H, J= 5.3 Hz, H-1), 1.91 (m, 4H, H-2 and H-3)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 183.6 (C-14), 160.5 (C-11), 147.5 (C-9), 140.8 (C-5), 130.0 (CS), 129.1 (C-6), 129.0 (C-7), 126.7 (C-8), 124.1 (C-12), 121.9 (C-13), 50.9 (C-15), 42.8 (C-16), 33.8 (C-4), 25.1 (C-1), 21.3 (C-3), 22.2 (C-2).

ESIHRMS: m/z 284.1215, calcd for C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>S + H: 284.1216

#### ***N*-(2-Isoselenocyanatoethyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (60)**



To a refluxing mixture of formamide derived of tacrine (**56**) (170 mg, 0.63 mmol), Et<sub>3</sub>N (377 μL, 2.71 mmol), and 4 Å molecular sieves in dry dichloromethane (5 mL) was dropwise added a solution of triphosgene (93 mg, 0.31 mmol) in dry dichloromethane (2 mL), under argon atmosphere, over a period of 1 h. After the addition, the resulting mixture was refluxed for 2.5 h and then black selenium powder (99 mg, 1.3 mmol) was added and refluxed for 18 h. After cooling, the resulting mixture was filtered off and the filtrate was then evaporated under *vacuum*. The residue was purified by column chromatography (7: 0.1: 0.1 – DCM: MeOH: Et<sub>3</sub>N) to afford isoselenocyanate derived of tacrine **60** as a yellow oil (144 mg, 76 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): δ 8.04 (d, 1H, J<sub>1</sub>= 8.5 Hz, H-5), 7.65 (d, 1H, J= 8.3 Hz, H-8), 7.59 (t, 1H, J=7.4 Hz, H-6), 7.45 (t, 1H, J=7.8 Hz, H-7), 6.83 (br s, 1H,

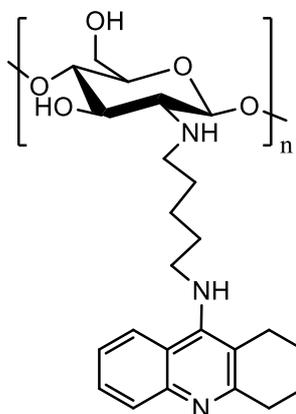
NH), 4.00 (t, 2H, J= 7.2 Hz, H-15), 3.88 (m, 2H, H-16), 3.10 (t, 2H, J= 5.5 Hz, H-4), 2.60 (t, 2H, J= 5.3 Hz, H-1), 1.92 (m, 4H, H-2 and H-3)

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 181.1 (C-14), 160.5 (C-11), 147.5 (C-9), 141.1(C-5), 129.7 (CSe), 129.1 (C-6), 129.1 (C-7), 126.8 (C-8), 123.9 (C-12), 121.9 (C-13), 51.6 (C-15), 44.2 (C-16), 33.8 (C-4), 26.6 (C-1), 22.6 (C-3), 22.2 (C-2).

ESIHRMS:  $m/z$  332.0659, calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{Se} + \text{H}$ : 332.0660

### 5.3. Synthesis and characterization of tacrine-chitosan hybrids

#### *N*-[5-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)aminopentyl]chitosan (**61**)



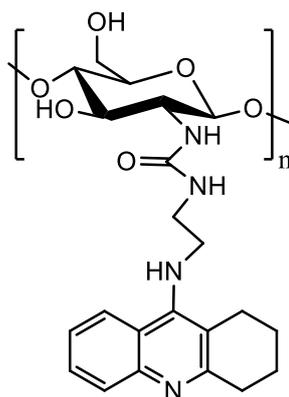
To a solution of **CS** (100 mg) in aqueous acetic solution (25 mL, pH 4.0-4.6), a solution of the tacrine derivative **84** (103 mg, 0.30 mmol) in MeOH (50 mL) was added. The resulting solution was heated to 65° C until it was noted by TLC (using MeOH as eluent) absorption at UV (254 nm) at the origin, corresponding to the incorporation of the aromatic unit into the polymer. After completion, the reaction mixture was left to reach the rt and then was treated with 4 M NaOH (pH 11.8-12.5). The resulting solid was filtered off and successively washed with  $\text{H}_2\text{O}$  (2x2 ml), EtOH (2x2 ml), DCM (2x3 ml) and acetone (2x2 ml) to afford the corresponding chitosan-tacrine derivative **61** (80 mg, 88%) as a yellow pale solid.

$^1\text{H}$  NMR with diffusion filter (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$  1:1):  $\delta$  8.29-7.69 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 4.94 (m, 1H, H-1), 4.22-3.52 (m, 9H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b and 2  $\text{CH}_2\text{-NH}$  linker), 3.30 (s, 1H, H-2), 2.12 (s, 7H,  $\text{NCOCH}_3$ ) and  $\text{CH}_2$  of Tacrine), 1.83-1.33 (m, 6H, 3  $\text{CH}_2$  linker).

$^{13}\text{C}$  CPMAS NMR (150.9 MHz):  $\delta$  174.2 (NCOCH<sub>3</sub>), 149.0-141.3 (C<sub>Ar</sub>), 105.2 (C1), 91.1-68.0 (C3-C6), 61.2 (C2 and CH<sub>2</sub>-NH of linker), 23.4 (CH<sub>3</sub> of -NCOCH<sub>3</sub>, 4 CH<sub>2</sub> of Tacrine and 3 CH<sub>2</sub> of linker).

(DS by  $^1\text{H}$  NMR: 1 %)

***N*-[2-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)aminoethylcarbamoyl]chitosan (62)**



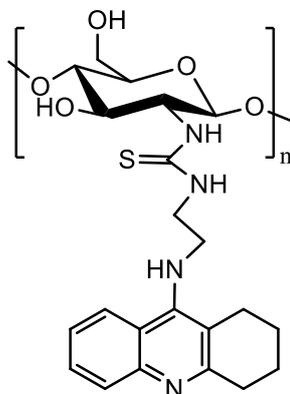
To a solution of **CS** (100 mg) in aqueous acetic solution (25 mL, pH 4.0-4.6), a solution of tacrine derivative **58** (80 mg, 0.30 mmol) in MeOH (50 mL) was added. The resulting solution was heated to 65° C until it was noted by TLC (using MeOH as eluent) absorption at UV (254 nm) at the origin, corresponding to the incorporation of the aromatic unit into the polymer. After completion, the reaction mixture was left to reach the room temperature and then was treated with 4 M NaOH (pH 11.8-12.5). The resulting solid was filtered off and successively washed with H<sub>2</sub>O (2x2 ml), EtOH (2x2 ml), DCM (2x3 ml) and acetone (2x2 ml) to afford the corresponding chitosan-tacrine derivative with urea function **62** (82 mg, 91 %) as a yellow pale solid.

$^1\text{H}$  NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1):  $\delta$  8.31-8.16 (m, 4H, H<sub>Ar</sub>), 4.97 (m, 1H, H-1), 4.26-3.53 (m, 9H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b and 2 CH<sub>2</sub>-NH linker), 3.30 (s, 1H, H-2), 2.12 (s, 7H, NCOCH<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub> of Tacrine).

$^{13}\text{C}$  CPMAS NMR (150.9 MHz):  $\delta$  174.4 (NCOCH<sub>3</sub>), 150.0-137.3 (C<sub>Ar</sub>), 105.2 (C1), 91.1-68.0 (C3-C6), 61.2 (C2 and CH<sub>2</sub>-NH of linker), 23.4 (NCOCH<sub>3</sub> and 4 CH<sub>2</sub> of Tacrine).

(DS by  $^1\text{H}$  NMR: 0,2 %)

***N*-[2-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)aminoethylthiocarbamoyl]chitosan (**63**)**



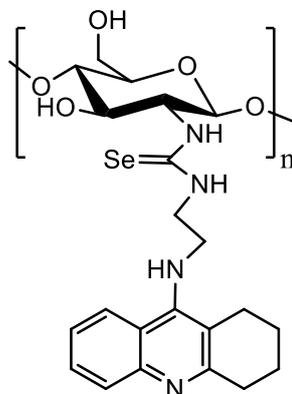
To a solution of **CS** (100 mg) in aqueous acetic solution (25 mL, pH 4.0-4.6), a solution of tacrine derivative **59** (85 mg, 0.30 mmol) in MeOH (50 mL) was added. The resulting solution was heated to 65° C until it was noted by TLC (using MeOH as eluent) absorption at UV (254 nm) at the origin, corresponding to the incorporation of the aromatic unit in the polymer. After completion, the reaction mixture was left to reach the room temperature and then was treated with 4 M NaOH (pH 11.8-12.5). The resulting solid was filtered off and successively washed with H<sub>2</sub>O (2x2 ml), EtOH (2x2 ml), DCM (2x3 ml) and acetone (2x2 ml) to afford the corresponding chitosan-tacrine derivative with thiourea function **63** (83 mg, 92 %) as a yellow pale solid.

<sup>1</sup>H NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1): δ 8.30 (br s, 4H, H<sub>Ar</sub>), 4.95 (m, 1H, H-1), 4.25-3.50 (m, 9H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b and 2 CH<sub>2</sub>-NH linker), 3.30 (s, 1H, H-2), 2.12 (s, 7H, NCOCH<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub> of Tacrine).

<sup>13</sup>C CPMAS NMR (150.9 MHz): δ 180.8 (C=S), 174.4 (NCOCH<sub>3</sub>), 148.0-133.1 (C<sub>Ar</sub>), 105.2 (C1), 91.1-68.0 (C3-C6), 57.8 (C2 and CH<sub>2</sub>-NH of linker), 23.4 (CH<sub>3</sub> of -NCOCH<sub>3</sub> and 4 CH<sub>2</sub> of Tacrine).

(DS by <sup>1</sup>H NMR: 0,1 %)

***N*-[2-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)aminoethylselenocarbamoyl]chitosan (**64**)**



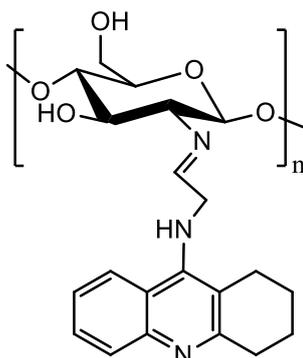
To a solution of **CS** (100 mg) in aqueous acetic solution (25 mL, pH 4.0-4.6), a solution of tacrine derivative **60** (99 mg, 0.30 mmol) in MeOH (50 ml) was added. The resulting solution was heated to 65° C until it was noted by TLC (using MeOH as eluent) absorption at UV (254 nm) at the origin, corresponding to the incorporation of the aromatic unit in the polymer. After completion, the reaction mixture was left to reach the room temperature. The resulting solid was filtered off and successively washed with H<sub>2</sub>O (2x2 ml), EtOH (2x2 ml), DCM (2x3 ml) and acetone (2x2 ml) to afford the corresponding chitosan-tacrine derivative with selenourea function **64** (79 mg, 88 %) as a yellow pale solid.

<sup>1</sup>H NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1): δ 8.30 (br s, 4H, Har), 4.94 (m, 1H, H-1), 4.37-3.49 (m, 9H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b and 2 CH<sub>2</sub>-NH linker), 3.25 (s, 1H, H-2), 2.10 (s, 7H, NCOCH<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub> of Tacrine).

<sup>13</sup>C CPMAS NMR (150.9 MHz): δ 180.8 (C=Se), 174.2 (NCOCH<sub>3</sub>), 148.0-141.1 (CAr), 105.2 (C1), 87.1-68.0 (C3-C6), 58.8 (C2 and CH<sub>2</sub>-NH of linker), 23.4 (NCOCH<sub>3</sub> and 4 CH<sub>2</sub> of Tacrine).

(DS by <sup>1</sup>H NMR: 0,21 %)

***N*-[2-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)aminoethyliden]chitosan (65)**

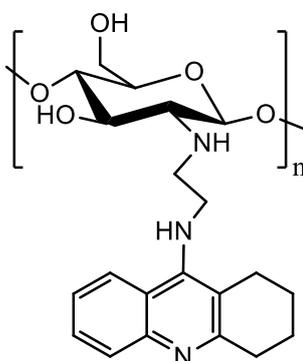


To a solution of CS (168 mg) in a solution of AcOH 0.12 M in MeOH, a solution of tacrine derivative **56** (169 mg, 0.7 mmol) was added. The resulting solution was stirred at room temperature during 24 h, until it was noted by TLC (using MeOH as eluent) absorption at UV (25 nm) at the origin, corresponding to the incorporation of the aromatic unit in the polymer. After completion, the resulting solid was filtered off and successively washed with MeOH (3x10 mL) and DCM (3x10 mL) to afford the *N*-[2-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)aminoethyliden]chitosan (**65**) (82 mg, 91 %) as a yellow palid solid.

$^{13}\text{C}$  CPMAS NMR (150.9 MHz):  $\delta$  172.5 (NCOCH<sub>3</sub>), 150.3-125.2 (CAr), 105.1 (C1), 87.1-68.0 (C3-C6), 57.8 (C2), 23.3 (NCOCH<sub>3</sub>).

(DS by  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR: 0,63 %)

***N*-[2-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)aminoetilen]chitosan (66)**



To a solution of CS (168 mg) in a solution of AcOH 0.12 M in MeOH, a solution of tacrine derivative **56** (169 mg, 0.7 mmol) was added. The resulting solution was stirred at room temperature during 24 h, until it was noted by TLC (using MeOH as eluent) absorption at UV (25 nm) at the origin, corresponding to the incorporation of the aromatic unit in the polymer. After completion, NaBH<sub>3</sub>CN (43 mg, 0.7 mmol), as a reduction agent, was added to the resulting solution and it was stirred at room temperature during 48 h. When second part of reaction was completed, HCl 2 M was slowly added until the disappearance of bubbles in order to remove the excess of NaBH<sub>3</sub>CN. Then, the suspension was filtered off and washed with NaOH (aq) 0.5 M (10 mL), H<sub>2</sub>O (10 mL), MeOH (10 mL), DCM (10 mL) to afford the *N*-[2-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)aminoethyle]chitosan (**66**) (70 mg, 77 %).

IR ( $\nu_{\max}$ ): 3358, 3283, 2870, 1655, 1577, 1375, 1060, 1027 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR with diffusion filter (500 MHz, CD<sub>3</sub>COOD/ D<sub>2</sub>O 1:1):  $\delta$  8.30 (br s, 4H, Har), 4.94 (m, 1H, H-1), 4.00-3.375 (m, 9H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b and 2 CH<sub>2</sub>-NH linker), 3.23 (s, 1H, H-2), 2.08-1.40 (s, 7H, NCOCH<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub> of Tacrine).

<sup>13</sup>C CPMAS NMR (150.9 MHz):  $\delta$  174.4 (NCOCH<sub>3</sub>), 150.0-121.2 (CAr), 105.4 (C1), 83.3-61.2 (C3-C6), 57.9 (C2), 23.6 (NCOCH<sub>3</sub>).

## 5.4. Biological activity

### 5.4.1. Inhibitory activity of the enzymes AChE and BuChE

The evaluation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitions were carried out following minor modifications of the original Ellman's assay.<sup>341</sup> Acetylcholinesterase from *Electrophorus Electricus* and butyrylcholinesterase from equine serum were used as model enzymes, while acetyl- and butyrylthiocholine iodides were used as substrates.

Stock solutions of the inhibitor were prepared in DMSO and the maximum DMSO content in the assay was maintained at 1.25% (V/V). Both enzymes, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, were solved in water at a concentration in which the reaction rate value, when the [S] = K<sub>m</sub>, is between 0.12-0.15 Abs/s. Activity was monitored in 1.2 mL Polystyrene cuvettes containing 0.1 mM phosphate buffer (pH 8.0), 0.88 mM DTNB, substrate ([S] = 0.11 mM), inhibitor (or solvent)

plus water up to a constant volume of 1.14 mL. Reaction was started by adding 60 mL of properly diluted enzyme solution at 25 °C. The formation of the chromophore was monitored at 405 nm for 125 s on a Hitachi U-2900 UV-Vis spectrophotometer. Initial rates were calculated from the slopes of the plots obtaining when representing Abs vs. t and these values were used to calculate the percentage of inhibition (%I), according to the expression:

$$\%I = \frac{v_0 - v}{v_0} \times 100$$

, where  $v_0$  represents the rate for the solution of the enzyme, and  $v$  the rate in the presence of the inhibitor.

IC<sub>50</sub> values were calculated by plotting % I vs. Log [I] and fitting the curve to a second order polynomial function. Finally, all them were expressed as the average of two measurements ± standar deviation.

#### **5.4.2. Hepatotoxicity assays**

All the necessary products for cell culture such as the culture medium Eagle Minimum Essential Medium (EMEM), the essential nutrients, fetal bovine serum, L-glutamine and the peniciline / streptomycin mixture, were provided by BioWhittaker (Lonza, Verviers, Belgium). The plastic material (plates, flasks, pipettes) comes from Nunc (Thermo Fisher Scientific, Denmark). The reagents necessary for the different tests were purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain) and VWR International Eurolab (Madrid, Spain).

HepG2 cell line, obtained from the global bank of bioresources ATCC, was selected for this assay. It is a human tumor cell line isolated from a liver tumor.

The cell cultures were maintained according to the guidelines offered by the providers. In summary, the line was kept and cultured in MEM medium and, at the same time, it was supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB), 1% L-glutamine, and antibiotics: penicillin / streptomycin mixture at 1%, (as protectors against contamination), based on the specific requirements for them. To ensure their growth, they were kept in an incubator at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> until use.

Seeding of the cells is carried out in 96-well plates at the density of  $1.10^5$  cells / mL. Cells were allowed to incubate for 24 hours in order to they reach optimal growth before exposure. After these 24 hours, the cells were exposed to tacrine and its derived compounds (**53-55**, **57-60** and **80**) in a concentration range of 15.65-1000  $\mu\text{M}$ , for between 24 and 48 hours. All tested compounds were solved in DMSO. In each trial, there was a 0.25% DMSO solvent control (maximum concentration that presents the highest concentration tested (1000  $\mu\text{M}$ ) once it is exposed in the well) to ensure that the decrease in viability was not due to a cytotoxic damage produced by the solvent but by the compound itself. In addition, there was also the exposure group called negative control, which correspond to cells exposed to culture medium.

Hepatotoxicity evaluation was carried out using the Alamar Blue assay developed by Zhang et al.,<sup>344</sup> which is a cell viability assay that also allows quantifying the number of live cells in a culture. The main component of *Alamar Blue* is resazurin, a blue compound, which when entering inside the mitochondria of living cells is reduced to resofurin, turning pink and highly fluorescent.

After the time of exposure of the cells to the different compounds, a 10% *Alamar Blue* stock solution is added to the wells for at least 2 hours. The plates will be incubated at 37 °C during this period. Finally, the fluorescence is measured in the spectrophotometer at  $\lambda = 560/590$  nm excitation / emission, comparing the response of the negative control with the exposure groups. The experiments were carried out twice and six-fold each concentration in the basal cytotoxicity assay. The mean effective concentrations ( $\text{EC}_{50}$ ) of the biomarkers tested were calculated using linear regression.