



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y CENTRO DE QUÍMICA-INSTITUTO
DE CIENCIAS

Doctorado en Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

FACULTAD DE QUÍMICA

Doctorado en Química

**“Nuevos sistemas de reconocimiento molecular basados en
organocalcógenos. Agentes antiparasitarios y
antiproliferativos”**

Presenta

M.C. Mónica Martínez Montiel

Directores de tesis

Dra. Penélope Merino Montiel

Dr. Óscar López López

Puebla, México. Julio 2022



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y CENTRO DE QUÍMICA-INSTITUTO
DE CIENCIAS

Doctorado en Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

FACULTAD DE QUÍMICA

Doctorado en Química

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Mónica Martínez Montiel", written over a circular stamp.

Memoria presentada por la M.C. Mónica Martínez Montiel
para optar al grado de Doctora en Química.

Puebla, México. Julio de 2022



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y CENTRO DE QUÍMICA-INSTITUTO
DE CIENCIAS

Doctorado en Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

FACULTAD DE QUÍMICA

Doctorado en Química

Vº Bº de los Directores de la Tesis

A blue ink signature of Dra. Penélope Merino Montiel, consisting of stylized, overlapping loops and lines.

Fdo. Dra. Penélope Merino Montiel
Profesora Titular del Departamento
de Química Orgánica del Posgrado
en Ciencias Químicas, BUAP

A blue ink signature of Dr. Óscar López López, featuring a large, sweeping flourish that extends to the right.

Fdo. Dr. Óscar López López
Profesor Titular del
Departamento de Química
Orgánica de la Universidad de
Sevilla



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. Jesús Sandoval Ramírez, Dr. José María Fernández-Bolaños Guzmán, Dra. Inés Maya Castilla, Dr. Víctor Gómez Calvario y la Dra. Jacqueline Jiménez Hernández, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Nuevos sistemas de reconocimiento molecular basados en organocalcógenos. Agentes antiparasitarios y antiproliferativos”**, que presenta la alumna **M.C. Mónica Martínez Montiel** para obtener el grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los trece días del mes de junio del año dos mil veintidós.

ATENTAMENTE

Dr. Jesús Sandoval Ramírez

Dr. José María Fernández-Bolaños Guzmán

Dra. Inés Maya Castilla

Dr. Víctor Gómez Calvario

Dra. Jacqueline Jiménez Hernández



El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y en el Laboratorio de Química Fina de Carbohidratos de la Universidad de Sevilla, España bajo la dirección de la Dra. Penélope Merino Montiel y el Dr. Óscar López López con el apoyo otorgado por CONACYT a través de la beca nacional con el número (CVU/Becario) **619093** / 333901 y de la beca mixta (291250) del 2 de diciembre de 2018 al 31 de julio de 2019 y del 22 al 31 de noviembre de 2021.

Thio- and selenosemicarbazones as antiprotozoal agents against *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*

Alexandra Ibáñez-Escribano^{a*}, Cristina Fonseca-Berzal^{a*}, Mónica Martínez-Montiel^{b*}, Manuel Álvarez-Márquez^c, María Gómez-Núñez^d, Manuel Lacueva-Arnedo^a, Teresa Espinosa-Buitrago^a, Tania Martín-Pérez^{e,f}, José Antonio Escario^a, Penélope Merino-Montiel^b, Sara Montiel-Smith^b, Alicia Gómez-Barrio^a, Óscar López^c and José G. Fernández-Bolaños^c

^aUnidad de Parasitología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Madrid, Spain; ^bFacultad de Ciencias Químicas, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México; ^cDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; ^dEscuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; ^eDepartamento de Biomedicina y Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain; ^fInstitute of Specific Prophylaxis and Tropical Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

ABSTRACT

Herein, we report the preparation of a panel of Schiff bases analogues as antiprotozoal agents by modification of the stereoelectronic effects of the substituents on N-1 and N-4 and the nature of the chalcogen atom (S, Se). These compounds were evaluated towards *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. Thiosemicarbazide **31** showed the best trypanocidal profile (epimastigotes), similar to benznidazole (BZ): IC₅₀ (**31**)=28.72 μM (CL-B5 strain) and 33.65 μM (Y strain), IC₅₀ (BZ)=25.31 μM (CL-B5) and 22.73 μM (Y); it lacked toxicity over mammalian cells (CC₅₀ > 256 μM). Thiosemicarbazones **49**, **51** and **63** showed remarkable trichomonocidal effects (IC₅₀ =16.39, 14.84 and 14.89 μM) and no unspecific cytotoxicity towards Vero cells (CC₅₀ ≥ 275 μM). Selenoisosters **74** and **75** presented a slightly enhanced activity (IC₅₀=11.10 and 11.02 μM, respectively). Hydrogenosome membrane potential and structural changes were analysed to get more insight into the trichomonocidal mechanism.

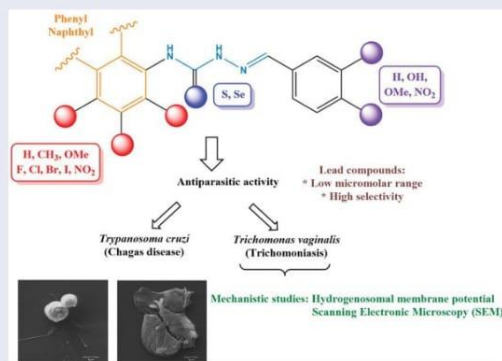
ARTICLE HISTORY



Received 19 December 2021
Revised 6 February 2022
Accepted 7 February 2022

KEYWORDS


Trypanosoma cruzi;
Trichomonas vaginalis;
antiprotozoal agents;
thio[seleno]semicarbazones;
unspecific cytotoxicity; MoA

GRAPHICAL ABSTRACT



CONTACT Penélope Merino-Montiel  penelope.merino@correo.buap.mx  Facultad de Ciencias Químicas, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Puebla PUE 72570, México; Alicia Gómez-Barrio  agbarrio@ucm.es  Unidad de Parasitología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Pza. Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040 Spain; Óscar López  osc-lopez@us.es  Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Apartado 1203, Sevilla 41071, Spain

*These authors contributed equally to the manuscript.

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2022 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se han presentado en los siguientes congresos y reuniones:

- **Mónica Martínez Montiel**, Óscar López López, Penélope Merino Montiel. Nuevos sistemas de reconocimiento molecular basados en selenocarbohidratos (cartel). XXII Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas 6 al 10 de octubre de 2017 en Puebla, Puebla.
- **Mónica Martínez Montiel**, Penélope Merino Montiel, Óscar López López, Socorro Meza Reyes, José Luis Vega Báez. Preparación de selenoglucósidos multivalentes como potenciales inhibidores de lectinas (cartel). 14a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales del 23 al 26 de mayo de 2018 en Cuernavaca, Morelos.
- **Mónica Martínez Montiel**, Óscar López López, Penélope Merino Montiel. Nuevos sistemas de reconocimiento molecular basados en selenocarbohidratos (Ponencia). XXIII Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas del 15 al 19 de octubre de 2018 en la ciudad Puebla, Puebla.
- **Martinez Montiel Monica**, Fernandez-Bolaños J.G, Meza Reyes S. Merino Montiel P, Óscar López López Ó. Preparation of new carbohydrates derivatives sulfonamides as potencial carbonic anhydrase inhibitors (cartel). XXVIII Congreso Internacional de la Sociedad Italo-Latinoamericana de ETNOMEDICINA del 16 al 20 de septiembre de 2019 La Habana, Cuba.
- **Mónica Martínez Montiel**, Penélope Merino Montiel, Óscar López López, Penélope Merino Montiel. Preparación de tioy selenosemicarbazonas como potenciales agentes antiproliferativos e inhibidores de las anhidrasas carbónicas. XXII Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas 6 al 10 de octubre de 2017 en Puebla, Puebla. (Ponencia) XXIV Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas del 11 al 15 de noviembre de 2019 en la ciudad Puebla, Puebla.
- **Mónica Martínez Montiel**, José Luis Vega Báez, Penélope Merino Montiel, Óscar López López. Síntesis de nuevas sulfonamidas como inhibidores de anhidrasas carbónicas. (cartel). LatinXChem, el día 7 de septiembre de 2020.
- **Mónica Martínez Montiel**. Síntesis de nuevas sulfonamidas derivadas de carbohidratos como potenciales inhibidores de anhidrasas carbónicas (Ponencia) 4to Congreso de Estudiantes de Doctorado en Química realizado en Sevilla España el día 3 de diciembre de 2020.
- **Mónica Martínez Montiel**. Síntesis de tiosemicarbazonas (Ponencia) Experimentos en química el día 9 de febrero de 2021.
- **Mónica Martínez Montiel**, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith, José Luis Vega Báez, Óscar López López, Claudiu T. Supuran, Blanca Colin Lozano. Síntesis de nuevas tiosemicarbazonas derivadas de sulfonamidas como inhibidores de anhidrasas carbónicas (cartel). XVI Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica modalidad virtual del 19 al 23 de abril de 2021.

- **Mónica Martínez Montiel**, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith, José Luis Vega Báez, José G. Fernández-Bolaños, Óscar López López, Claudiu T. Supuran, José M. Padrón. Preparación de selenosemicarbazonas como inhibidores de anhidrasas carbónico y como potenciales agentes antiproliferativos (cartel). Congreso Internacional de la Sociedad Química de México llevado a cabo del 30 de agosto al 3 de septiembre de 2021.
- Laura L. Romero- Hernández, **Mónica Martínez Montiel**, Penélope Merino Montiel, Óscar López López, Sara Montiel Smith, José Luis Vega Báez. Synthesis of glyco-coumarins as antiproliferative agents (cartel). LatinXChem el día 20 de septiembre de 2021.

Agradecimientos

A la Dra. Sara Montiel Smith por el apoyo brindado a lo largo de todos estos años, desde aquel Verano de Talento cuando me encontraba en primero de preparatoria y reafirme que quería estudiar Química. Así como cuando me permitió unirme al equipo de trabajo en el 2009.

Al Dr. José María Fernández-Bolaños y a la Dra. Inés Maya Castilla por permitirme trabajar dentro de su grupo de investigación y por el tiempo brindado a lo largo de mi estancia en la Universidad de Sevilla, España.

A mi comisión revisora por el tiempo y dedicación

Dra. Jaqueline Jiménez Hernández

Dr. Víctor Gómez Calvario

Dr. Jesús Sandoval Ramírez

Dra. Inés Maya Castilla

Dr. José María Fernández-Bolaños Guzmán

A la Dra. Penélope Merino Montiel por aceptarme como alumna desde la tesis de Licenciatura y ahora para el Doctorado, por guiarme y apoyarme en todos estos años en los que hemos colaborado.

Al Dr. Óscar López López por todas las enseñanzas, consejos y su confianza brindada cuando estuve en Sevilla y aun estando en Puebla se ha tomado el tiempo para esclarecer esas dudas que surgían de vez en cuando y siempre estar al pendiente de mi trabajo.

Al Dr. José Mnuel Padrón de la Universidad de La Laguna (Canarias) por realizar las pruebas antiproliferativas

Al Dr. Claudiu T. Supuran de la Universidad de Florencia (Italia) por realizar las pruebas de inhibición de las anhidrasas carbónicas.

A la Dra. Raquel Pérez Herrera de la Universidad de Zaragoza (España) por realizar los ensayos antitumorales *in vivo*.

A CONACYT por la beca de Doctorado y la beca mixta otorgada.

A la VIEP por la beca de terminación de Tesis.

Dedicatorias

A ti mamá, por ser parte fundamental de mi vida y cada uno de mis logros también son tuyos. Siempre me has guiado, pero me has dejado ser yo, siempre me das ese abrazo que necesito cuando ya no puedo más. Definitivamente tengo a la mejor mamá y no sé qué haría sin ti.

A ti papá, por ser también parte fundamental de mi vida, por siempre estar ahí con nosotras, aunque nunca entiendas de que hablamos, pero siempre estás apoyándome en todas las decisiones que tomo ya sean buenas o malas. Sé que estas muy orgulloso de mi y que siempre me presumes y tampoco sé que haría sin ti, aunque a veces no lo digamos o no nos demos ese abrazo que siempre necesitamos.

A mi Evancin porque siempre me alegra los días y te amo tanto.

A ti Nancy, has sido una guía a lo largo de mi vida y una inspiración y aunque en muchas ocasiones no estoy de acuerdo con todo lo que me dices en algunas cosas tienes razón por que "eres perfecta" jajajaja. Sabes que te quiero mucho y que a pesar de todo siempre estaremos la una para la otra.

A ti Rebe, gracias por ser parte de la familia por estar siempre con nosotros y también por guiarme y apoyarme a lo largo de estos años en los que me he formado, a veces ha sido difícil, pero sé que siempre poder contar contigo.

A ti Yair, por ser parte desde un inicio de esta aventura que se llama Doctorado, por apoyarme en todo momento desde cuando me tuve que ir a España y yo lloraba los primeros días, siempre estuviste ahí para mí a la distancia y a 7 horas de diferencia. Gracias por nunca dejarme rendir cuando yo solo quería tirar la toalla en plena pandemia y al final, por darme mi espacio siempre que tenía que trabajar y hasta animarme cuando estaba agotada y sobre todo por siempre decir que estas orgulloso de mi y de todo lo que he logrado, has sido parte fundamental de todo este proceso en el cual hemos tenido que madurar de muchas formas. Sabes que te amo y que te amare siempre.

A ti tía Sara porque a pesar de ser mi jefa eres mi tía y has buscado el bien para mí a lo largo de todos estos años desde que tenía 15 y empecé a decir que quería estudiar Química. Me abriste las puertas del laboratorio para mitigar mi duda de lo que realmente era estudiar Química. Me tomaste como alumna desde el inicio de mi carrera universitaria y siempre he dicho que estoy muy agradecida y parte de todo lo que he logrado es por ti y por toda la ayuda que me has brindado.

A ti Peny, por ser mi prima y mi jefa, aún recuerdo esos veranos en los que me dabas clases de los planetas y era tu única alumna porque mi hermana y Ale se escapaban. Siempre te he visto como una hermana mayor y como un ejemplo a seguir. Gracias por todas las enseñanzas y el tiempo que has invertido en mi a lo largo de todos estos años. Te quiero mucho.

A mis niños Paco, Danis y Lore siempre serán mis niños y siempre estare con ustedes.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
1. RESUMEN.....	17
1. SUMMARY	20
2. RELACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS PREPARADOS	23
Tio- y selenosemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina	23
Tiosemicarbazonas derivadas de arilsulfonamidas	23
Selenosemicarbazonas fenólicas	23
Arilsulfonamidas derivadas de carbohidratos	24
Cumarinas derivadas de ácidos carboxílicos y carbohidratos	24
Sales de trifenilfosfonio derivadas del ácido oleanólico	25
3. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	26
4. SÍNTESIS DE TIO(SELENO)SEMICARBAZONAS CON POTENCIAL ACTIVIDAD BIOLÓGICA....	31
4.1. Introducción y antecedentes	31
4.2. Objetivo general.....	64
4.3. Objetivos particulares.....	64
4.4. Discusión de resultados	65
5. SÍNTESIS DE GLICOCONJUGADOS DERIVADOS DE SULFONAMIDAS Y CUMARINAS COMO INHIBIDORES DE ANHIDRASAS CARBÓNICAS Y AGENTES ANTIPROLIFERATIVOS	79
5.1. Introducción y antecedentes	79
5.2. Objetivo general.....	93
5.3. Objetivos particulares.....	93
5.4. Discusión de resultados.	94
6. SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS MITOCONDRIOTRÓPICOS DEL ÁCIDO OLEANÓLICO COMO POTENCIALES AGENTES ANTITUMORALES.....	107
6.1. Introducción.	107
6.2. Objetivo General	123
6.3. Objetivos particulares.....	123
7. ENSAYOS BIOLÓGICOS	131
7.1. Predicción de propiedades farmacocinéticas de las tio(seleno)semicarbazonas	131
7.2. Actividad antiparasitaria.....	152
7.3. Inhibición de anhidrasas carbónicas.....	153
7.4. Ensayos de actividad antiproliferativa <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	160
8. CONCLUSIONES	172

9. PARTE EXPERIMENTAL	175
9.1. Métodos generales	175
9.2. Materias primas	178
9.3. Nuevas investigaciones	205

ABREVIATURAS

$[\alpha]_D^T$	Rotación óptica
°C	Grados Celsius
μL	Microlitros
μM	Micromolar
5-FU	5-Fluorouracilo
AAZ	acetazolamida
ABC	Sistema de excreción de xenobióticos
AcOH	Ácido acético
AChE	Acetilcolinesterasa
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
AG	Grupo de anclaje (<i>anchoring group</i>)
AKR1	Familia 1 de aldo-ceto reductasas
Anh.	Anhidro
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATRA	ácido transretinico
BBB	Bermeación de la barrera hematoencefálica
BuChE	Butirilcolinesterasa
CARP	CA-related proteins
CAs	Anhidrasas carbónicas
CD163	Unidad recombinante de diferenciación
CDDP	Cisplatino
CTE	Cadena de transporte de electrones
d	Señal doble
DCC	Diciclohexil carbodiimida

dd	Doble doblete
ddd	Doble doblete de doblete
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DOX	Agente anticancerígeno doxorubicina
ELA	Esclerosis lateral amiotrópica
Equiv.	Equivalentes
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares.
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
G6P	Glucosa-6-fosfato
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GI	Gastrointestinal
Glu	Glutamato
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
His	Histidina
HKII	Hexoquinasa II
HRESI-MS	<i>High-resolution electrospray mass spectrometry</i>
HSV	Virus herpes simplex
I.S.	Índice de selectividad
IC ₅₀	<i>Median Inhibitory Concentration</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>K_i</i>	Constante de inhibición
m	Señal múltiple
MEK	Proteína quinasa activada por mitógenos
mTOR	Blanco de la rapamicina en los mamíferos
MTZ	Metronidazol
mw	microondas
nM	nanomolar

NTDs	Enfermedades Tropicales Desatendidas (<i>Neglected Tropical Diseases</i>)
OA	Ácido oleanólico
Pa	Probabilidad de ser activo
PDGFR	Receptor de crecimiento derivado de plaquetas
Pg-P	Glicoproteína-P
Pi	Probabilidad de ser inactivo
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PKB	Proteína quinasa B
PTPC	<i>Permeability Transition Pore Complex</i>
PyBOT	Hexafluorofoosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio
Raf	Fibrosarcoma de rápida aceleración
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RR	Ribonucleótido reductasa
s	Singulete
S6K1	Proteína ribosomal S6 quinasa B1
SARs	Relaciones estructura-actividad
SELENOF	Selenoproteína F
SELENOH	Selenoproteína H
SELENOI	Selenoproteína I
SELENOK	Selenoproteína K
SELENOM	Selenoproteína M
SELENOO	Selenoproteína O
SELENOT	Selenoproteína T
SELENOV	Selenoproteína V
SELENOW	Selenoproteína W
SNC	Sistema nervioso central
t.a.	Temperatura ambiente

td	Triple doblete
Thr	Treonina
TPP	Trifenilfosfonio
TPSA	Área de superficie polar (<i>Topological Polar Surface Area</i>)
VCDA	Canal aniónico dependiente de voltaje
VEGFR	Receptor de crecimiento endotelial vascular
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano
YAP	Gen de la proteína asociada a YES
ZBG	Grupo de unión a Zinc (<i>Zinc Binding Group</i>)

1. RESUMEN

La presente Tesis Doctoral se encuadra en las líneas de investigación de los grupos *Síntesis y Modificación de Productos Naturales* (Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México) y *Química Fina de Carbohidratos* (Universidad de Sevilla, España), orientadas a la búsqueda de compuestos, tanto naturales, como sintéticos o semisintéticos con actividad biológica.

Esta investigación ha sido financiada por los proyectos Síntesis estereocontrolada de espiroazúcares y de seleno-derivados y su evaluación como inhibidores enzimáticos y como agentes antioxidantes (CB-2015/257465, CONACYT, México), Moléculas y macromoléculas con actividad multidiana frente a enfermedades degenerativas (CTQ2016-78703-P) y Sistemas químicos para la vectorización y liberación selectiva de nuevos inhibidores enzimáticos citotóxicos (PID2020-116460RB-I00), estos dos últimos financiados por el MICIN (España). La investigación desarrollada en esta Tesis, que se encuentra dividida en tres capítulos (4-6), se enfoca en la búsqueda de productos con potencial actividad antiproliferativa, haciendo uso de algunas dianas terapéuticas relevantes.

El principal objetivo perseguido en los Capítulos 4 y 5 ha sido la preparación de nuevos inhibidores de anhidrasas carbónicas (CAs), una superfamilia de metaloenzimas ampliamente distribuida en todos los seres vivos. Dichas enzimas, que catalizan la hidratación reversible del CO₂, están implicadas en un amplio número de enfermedades y desórdenes. En particular, se ha analizado la influencia de los compuestos preparados en estos capítulos sobre algunas isoformas de las α -CAs, localizadas en mamíferos, principalmente sobre las isoformas IX y XII, sobreexpresadas en numerosas células tumorales, y responsables del medio extracelular ácido característico en los tumores.

En particular, en el Capítulo 4 se ha abordado la preparación de tio- y selenosemicarbazonas; en este contexto se ha llevado a cabo la síntesis de una amplia variedad de derivados con objeto de establecer relaciones estructura-actividad que permitan el diseño racional del derivado cabeza de serie. Así pues, se ha modificado la naturaleza del átomo de calcógeno (S, Se), la distancia entre el anillo aromático localizado en la posición N-4 y la tiosemicarbazona, la naturaleza del anillo aromático sobre el grupo metilideno (piridina, fenilo *p*-sustituido), así como la naturaleza de los sustituyentes del anillo aromático en N-4. Los ensayos *in vitro* indican que las tiosemicarbazonas y sus selenoisómeros con un fragmento de tipo 2-piridilo (compuestos **1** y **2**, respectivamente) se comportan como excelentes agentes antiproliferativos, con una actividad situada en muchos casos en el rango nM bajo, probablemente debido a su capacidad de quelatar el Fe²⁺, y posiblemente también por inducir estrés oxidativo. No obstante, y a pesar de su capacidad quelatante, no mostraron actividad relevante en la inhibición de las α -CAs evaluadas, las cuales poseen Zn²⁺ en su centro activo.

La introducción de un grupo sulfonamido en el anillo sobre la posición N-4, bien manteniendo el fragmento de tipo 2-piridilo sobre el grupo metilideno (compuestos **3**), o bien sustituyéndolo por un anillo de fenilo *p*-sustituido (derivados **4**) permitió el acceso a una amplia variedad de tiosemicarbazonas que sí mostraron un buen perfil como inhibidores de CAs.

En todos estos derivados se observó una preferencia en la inhibición hacia la isoforma XII, que puede ser de interés, ya que algunos inhibidores de dicha enzima lo son también de la glicoproteína-P (Pg-P), uno de los principales mecanismos de eliminación de xenobióticos, y, por consiguiente, responsable del desarrollo de quimiorresistencia en numerosos fármacos antitumorales. El uso del grupo sulfonamido en la posición *meta* del anillo aromático condujo a una sustancial mejora de la selectividad frente a CA XII, en comparación con CA I, isoforma localizada en el citosol, y cuya inhibición conduce a importantes efectos secundarios. Destaca especialmente el *p*-metoxifenil derivado **4h**, que, comparado con la acetazolamida (AAZ), el fármaco empleado como referencia, exhibe un incremento de 2.5 veces de su potencia inhibitoria de la CA XII ($K_i = 2.3$ vs. 5.7 nM) y de 7.4 veces en la selectividad en relación con la CA I ($K_i = 747.6$ vs. 250 nM). Las propiedades físico-químicas y farmacocinéticas de **4h**, así como la posible identificación de dianas terapéuticas también han sido predichas empleando el software SwissADME y PASS online, respectivamente.

En el Capítulo 5 se han preparado una amplia variedad de derivados en los que dos tipos de farmacóforos empleados en la inhibición de CAs (arilsulfonamidas y cumarinas) se han conectado a un residuo polar (ácido carboxílico o carbohidrato) a través de un conector de tipo tioureido, tanto lineal, como cíclico, con objeto de mejorar la selectividad en la inhibición de las CAs IX y XII. En particular, se abordó la preparación de un elevado número de tioureas bicíclicas derivadas de carbohidrato (imidazolidinina-2-tionas), empleando una metodología ampliamente usada en el grupo de investigación para acceder a pseudonucleósidos, y consistente en la reacción de un carbohidrato reductor que contiene un grupo amino en C-2 con un isotiocianato; esta reacción conduce en primera instancia a una 5-hidroxi-imidazolidina-2-tiona no aislada, la cual, mediante tratamiento en medio ácido, experimenta una ciclodeshidratación, conduciendo al derivado bicíclico buscado.

Esta reacción se ha aplicado a isotiocianatos derivados de arilsulfonamidas, así como a isotiocianatos derivados de cumarina (2*H*-cromen-2-ona, obtenidas mediante condensación de Pechmann). Se ha modificado la configuración del carbohidrato de partida (*D*-gluco, *D*-galacto, *D*-mano), la posición del grupo sulfonamido en el anillo aromático (*meta*, *para*), el tamaño del espaciador entre la cumarina y el residuo de carbohidrato, así como la naturaleza de los sustituyentes en las posiciones C-3 y C-4 de la cumarina. Esto ha permitido el acceso de las sulfonamidas **6–8**, así como de las cumarinas **19**, **21–24**. Con objeto de comparar la influencia en la actividad biológica de

los sistemas bicíclicos, también se llevó a cabo la preparación de las tioureas lineales **18** y **20**.

En los biciclos derivados de sulfonamidas **6–8** se observa de nuevo una preferencia en la inhibición de CA XII, siendo el orden de actividad en función del carbohidrato: Gal > Man > Glu en el caso de las *p*-sulfonamidas, y Man > Gal > Glu para las *m*-sulfonamidas. Destacan todos los derivados de galactosa (**7**) y manosa (**8**), que se comportaron como muy potentes inhibidores de la CA XII (K_i 2.9–5.1 nM). Es destacable, además, que la ubicación del grupo sulfonamido en la posición *meta* (**7b**), condujo a un índice de selectividad CA I/XII de 1531, muy superior al encontrado para la AAZ (44.9). El derivado de configuración *D*-*gluco* **6c** resultó ser también un potente inhibidor de la CA II (K_i = 8.9 nM), una isoforma implicada en el glaucoma.

En el Capítulo 6 se abordó la preparación de un pequeño panel de sales de trifenilfosfonio derivadas del triterpenoide natural ácido oleanólico en la posición C-28 (compuestos **27**), con objeto de obtener una serie de agentes mitocondriotrópicos con actividad antitumoral (*mitocans*). El grupo trifenilfosfonio actuaría como vector selectivo hacia las mitocondrias de las células tumorales, debido al mayor potencial negativo de estas con respecto a las células normales. La metodología sintética es sencilla, y se llevó a cabo en dos etapas: monoesterificación de un α,ω -dibromoalcano por parte del ácido carboxílico en C-28, seguido de desplazamiento nucleofílico del segundo átomo de bromo por parte de Ph_3P en un tubo Fisher-Porter.

La evaluación de la actividad antiproliferativa *in vitro* mostró que los tres derivados con el espaciador más corto (**27a-c**) se comportaron como agentes antiproliferativos muy potentes frente a las 6 líneas tumorales ensayadas, con valores de GI_{50} comprendidos entre 13–88 nM (hasta 2000 veces más potente que el cisplatino), y excelente selectividad en comparación con una línea celular no tumoral (índice de selectividad > 7692). El análisis mediante microscopia de imagen de células vivas permitió detectar la presencia de apoptosis en el modo de acción de estos compuestos. Así mismo, se llevó a cabo un estudio *in vivo* con ratones en un modelo xenógrafo con células tumorales de ratón (mama, 4T1) con expresión de luciferasa, con objeto de efectuar el seguimiento del crecimiento del tumor mediante un método no invasivo (bioluminiscencia). La administración de tan sólo 0.55 mg/kg del compuesto **27c** tres días a la semana, durante 20 días permitió una reducción muy significativa del crecimiento del tumor (en torno a un 58%), sin observar efectos adversos en el ratón.

1. SUMMARY

This Doctoral Thesis fits into the research topics of the groups *Synthesis and Modification of Natural Products* (Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Mexico), and *Carbohydrates Fine Chemistry* (Universidad de Sevilla, Spain), focused on the search of biologically active compounds, either natural, synthetic or semisynthetic ones.

This research has been funded by the projects Stereocontrolled synthesis of spiro-sugars and selenoderivatives, and their evaluation as enzymatic inhibitors and antioxidant agents (CB-2015/257465, CONACYT, Mexico), Molecules and macromolecules with multitarget activity towards degenerative diseases (CTQ2016-78703-P) and Chemical systems for the vectorization and selective release of new cytotoxic enzymatic inhibitors (PID2020-116460RB-I00), the last two ones funded by MICIN (Spain).

The Thesis, which is divided into three chapters (4-6), is focused on the search of potential antiproliferative agents, making use of some relevant therapeutic targets.

The main target pursued in Chapters 4 and 5 has been the preparation of new carbonic anhydrases inhibitors (CAs), a superfamily of metalloenzymes widely distributed in all living beings. Such enzymes, which catalyse the reversible hydration of CO₂, are involved in an ample number of diseases and disorders. In particular, the influence of the compounds prepared in these chapters on some isoforms of α -CAs, found in mammals has been analyzed, and in particular on CAs IX and XII isoforms, overexpressed in numerous tumour cells, and responsible for the intrinsic acidic extracellular medium of numerous tumours.

In particular, in Chapter 4, the preparation of thio- and selenosemicarbazones has been addressed; in this context, the synthesis of an ample number of derivatives has been accomplished, with the aim of establishing structure-activity relationships that allow the rational design of the lead-compound. Thus, the nature of the chalcogen atom (S, Se) has been modified, together with the distance between the aromatic ring on N-4 and the thiosemicarbazone moiety, the nature of the aromatic system on the methylidene group (pyridine, *p*-substituted phenyl), and the nature of the substituents of the aromatic ring on N-4. *In vitro* biological assays indicate that thiosemicarbazones and their seleno-isosters bearing a 2-pyridyl residue (compounds **1** and **2**, respectively) behave as excellent antiproliferative agents, with activities in many cases within the low nM range, probably because of their capacity of complexing Fe²⁺ and induce oxidative stress. However, and despite their chelating properties, they did not show relevant inhibition of the tested α -CAs, which bear Zn²⁺ in their active site.

Introduction of a sulfonamido motif on the N-4 aromatic ring, either keeping the 2-pyridyl fragment on the methyldiene group (compounds **3**), or replacing it with a *p*-substituted phenyl system (derivatives **4**) allowed the access to an ample variety of thiosemicarbazones with a good inhibitory profile of CAs.

In all these derivatives, a preference for the inhibition of the CA XII isoform was observed, what can be of interest, as some inhibitors of this enzymes are also inhibitors of P-glycoprotein (Pg-P), one of the main mechanisms for eliminating xenobiotics, and thus, responsible for the development of chemoresistance of numerous antitumor drugs.

The use of the sulfonamido group on the *meta* position of the aromatic ring yielded a remarkable improvement of the selectivity towards CA XII, in comparison with CA I, a cytosolic isoform whose inhibition affords important side effects. *p*-Methoxyphenyl derivative **4h** is particularly relevant, as it exhibits a roughly 2.5-fold increase in the inhibitory potency of CA XII ($K_i = 2.3$ vs. 5.7 nM) and a 7.4-fold improvement of the selectivity in connection with CA I ($K_i = 747.6$ vs. 250 nM), when compared with acetazolamide (AAZ), the reference drug.

Physico-chemical and pharmaokinetic properties of **4h**, as well as the identification of potential therapeutic targets were also predicted, using the software SwissADME and PASS online, respectively.

In Chapter 5, an ample variety of derivatives have been prepared using two different pharmacophores for the CA inhibition (arylsulfonamide or coumarins), connected through a thioureido linker, either linear or cyclic, to a polar residue, with the aim of achieving more selective CA inhibitors. In particular, the preparation of a high number of bicyclic thioureas, derived from carbohydrates (imidazolidine-2-thiones) has been addressed, using a methodology widely used in the research group for accessing pseudonucleosides; this methodology involves the reaction of a reducing sugar with an amino group on C-2 with an isothiocyanate. This reaction furnishes firstly a non-isolated 5-hydroxy-imidazolidine-2-thione, which undergoes a cyclodehydration reaction upon acid treatment, affording the target bicyclic derivative.

This reaction has been used with both, isothiocyanates derived from arylsulfonamides, and also from coumarin (2*H*-chromen-2-one, obtained by the Pechmann condensation). Thus, configuration of the initial carbohydrate (*D*-*gluco*, *D*-*galacto*, *D*-*manno*), position of the sulfonamido group on the aromatic ring (*meta*, *para*), length of the spacer between the coumarin and carbohydrate residues, and also the nature of the substituents located on C-3 and C-4 positions of the coumarin have been modified. This allowed access to sulfonamides **6–8**, as well as coumarins **19**, **21–24**. With the aim of comparing the influence of the bicyclic systems on the biological properties, linear thioureas **18** and **20** were also prepared.

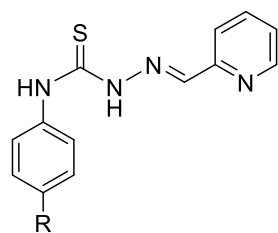
In sulfonamide-derived bicyclic derivatives **6–8**, a preference for the inhibition of CA XII was again observed, the potency order being: Gal > Man > Glu for *p*-sulfonamides, and Man > Gal > Glu for *m*-sulfonamides. Particularly remarkable are, therefore, galactose (**7**) and mannose (**8**) derivatives, which behaved as very potent inhibitors of CA XII (K_i 2.9–5.1 nM). It is also worth mentioning that placement of the sulfonamido group on the *meta* position (**7b**) afforded a selectivity index CA I/XII of 1531, much higher than the one found for AAZ (44.9). *D-Gluco*-configured derivative **6c** was also a potent inhibitor of CA II (K_i = 8.9 nM), an isoform involved in glaucoma.

In Chapter 6, the preparation of a small panel of phosphonium salts derived from the natural triterpenoid oleanolic acid on C-28 position (compounds **27**) was addressed, with the aim of achieving mitochondriotropic agents with antitumoral properties (*mitocans*). The triphenylphosphonium group would act as a selective vector towards tumoral mitochondria, due to their higher negative membrane potential in comparison with normal cells. Methodology was simple, and consisted just of two synthetic steps: monoesterification of α,ω -dibromoalkanes by the carboxylic acid on C-28, followed by nucleophilic displacement of the second bromine atom by Ph_3P in a Fisher-Porter tube.

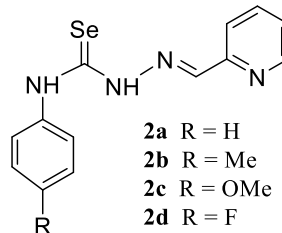
In vitro evaluation of antiproliferative activity showed that the three derivatives with the shortest linkers (**27a-c**) behaved as very potent antiproliferative agents towards the 6 tumour cell lines tested, with GI_{50} values ranging 13-88 nM (up to 2000-fold stronger than cisplatin), and excellent selectivities compared to a non-tumour cell line (selectivities indexes up to > 7692). Confocal microscopy allowed to detect apoptosis in their mode of action. Moreover, an *in vivo* assay was accomplished in a xenograft model, using a mouse cell line (breast, 4T1) expressing luciferase, with the aim of following the evolution of the tumour with a non-invasive method (bioluminescence). Administration of just 0.55 mg/kg of compound **27c** three days a week for 20 days allowed a significant reduction of the tumour growth (roughly 58%), without observing adverse effects in the mouse.

2. RELACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS PREPARADOS

Tio- y selenosemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina

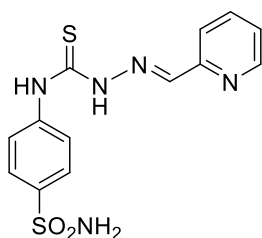


1f R = Br
1g R = I

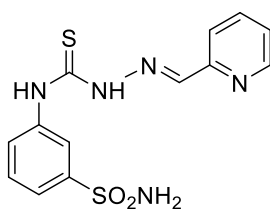


2a R = H
2b R = Me
2c R = OMe
2d R = F
2e R = Cl
2f R = Br
2g R = I

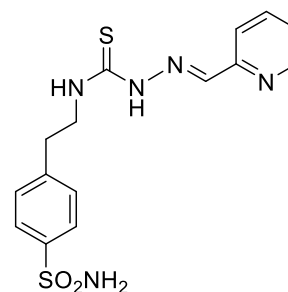
Tiosemicarbazonas derivadas de arilsulfonamidas



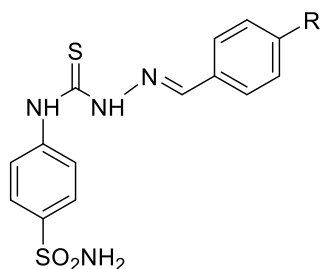
3a



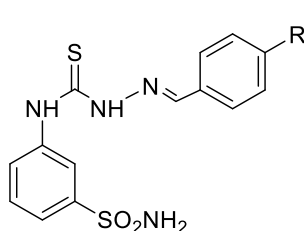
3b



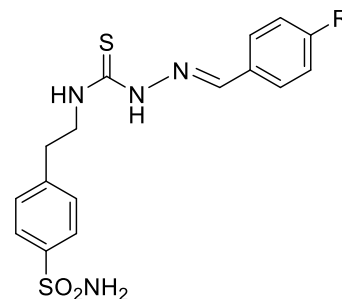
3c



4a R = H
4b R = OMe
4c R = F
4d R = Cl
4e R = Br
4f R = NO₂

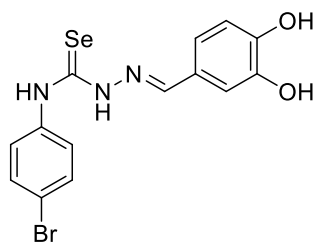


4g R = H
4h R = OMe
4i R = F
4j R = Cl
4k R = Br

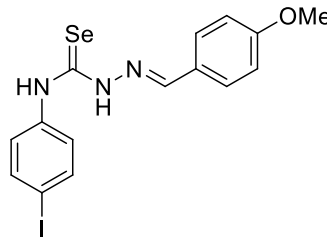


4l R = H
4m R = OMe
4n R = F
4o R = Cl
4p R = Br

Selenosemicarbazonas fenólicas

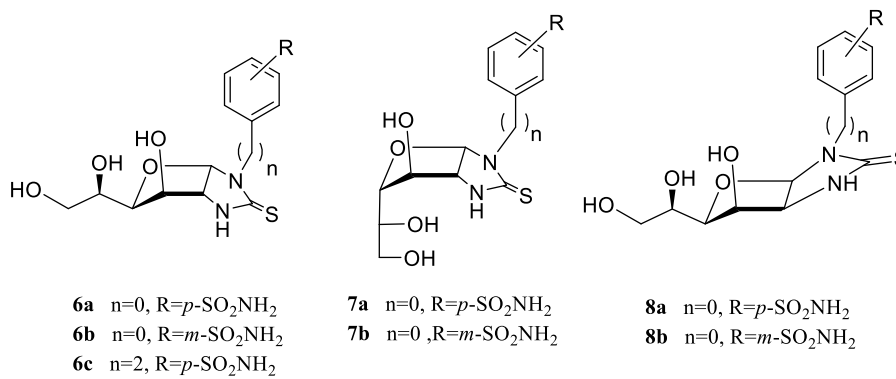


5a

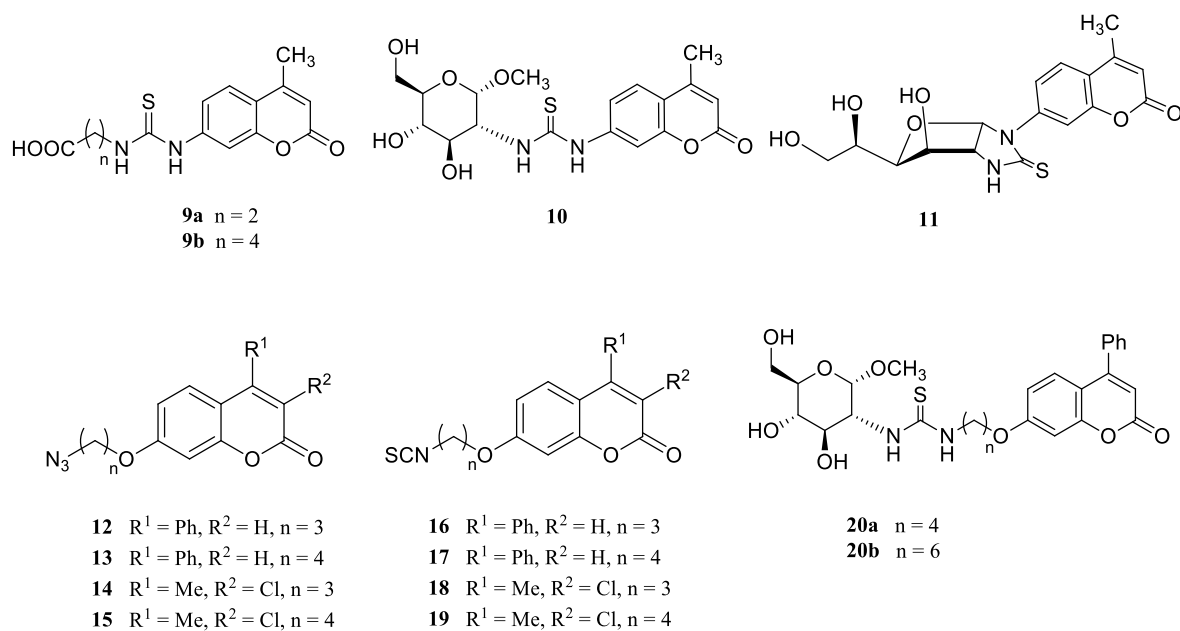


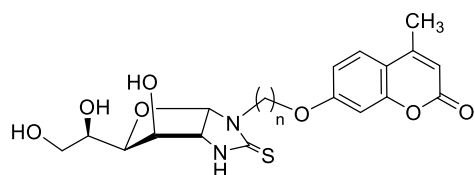
5b

Arilsulfonamidas derivadas de carbohidratos

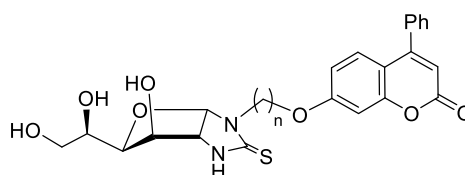


Cumarinas derivadas de ácidos carboxílicos y carbohidratos

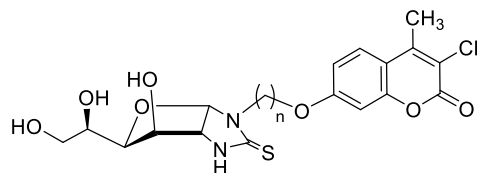




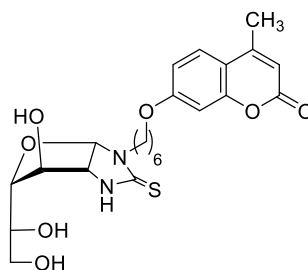
21a n = 3
21b n = 4
21c n = 6



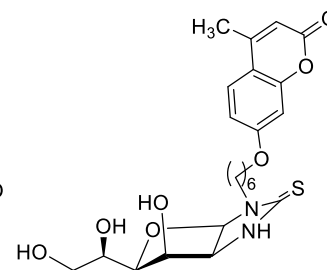
22a n = 3
22b n = 4
22c n = 6



23a n = 3
23b n = 4
23c n = 6

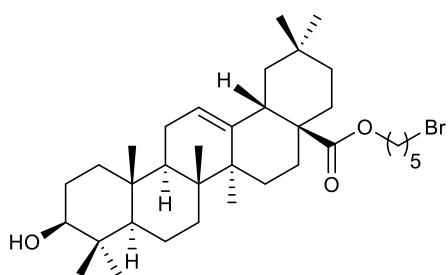


24

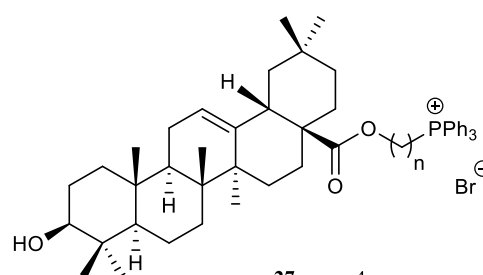


25

Sales de trifenilfosfonio derivadas del ácido oleanólico



26



27a n = 4
27b n = 5
27c n = 6
27d n = 12

3. INTRODUCCIÓN GENERAL

El cáncer es una alteración caracterizada por el crecimiento tisular patológico, el cual tiene su origen en la proliferación persistente y prolongada de células anormales que desemboca en una invasión y destrucción de los tejidos del cuerpo; es tal su complejidad que actualmente no se le considera como una única enfermedad, sino como un conglomerado de más de 100 enfermedades. Su diagnóstico precoz, así como la búsqueda de terapias efectivas supone un gran desafío en la actualidad.¹

A nivel mundial se produjeron aproximadamente 19.3 millones de nuevos casos de cáncer y casi 10 millones de defunciones en el año 2020. El número de casos detectados en cáncer de mama ha superado a los de pulmón (**Tabla 3.1**), aunque este sigue ocupando la primera posición en el porcentaje total de muertes.² A modo de comparativa, en el año 2018 se detectaron 2,093,876 casos de cáncer de pulmón (11.6%), frente a los 2,088,849 (11.6%) de cáncer de mama.³

Tabla 3.1. Tabla de casos nuevos y muertes por cáncer en el año 2020.

Tipo de Cáncer	No. de casos (%)	No. de muertes (%)	Tipo de Cáncer	No. de casos (%)	No. de muertes (%)
Mama	2,261,419 (11.7)	684,996 (6.9)	Cuello uterino	604,127 (3.1)	341,831 (3.4)
Pulmón	2,206,771 (11.4)	1,796,144 (18)	Esófago	604,100 (3.2)	544,076 (5.5)
Próstata	1,141,259 (7.3)	375,304 (3.8)	Tiroides	586,202 (3.0)	43,646 (0.4)
Piel (no melanoma)	1,198,073 (6.2)	63,731 (0.6)	Vejiga	573,278 (3.0)	212,536 (2.1)
Colon	1,148,515 (6.0)	576,858 (5.8)	Linfoma no-Hodgkin	544,352 (2.8)	259,793 (2.6)
Estómago	1,089,103 (5.6)	768,793 (7.7)	Páncreas	495,773 (2.6)	466,003 (4.7)

- Hassanpour, S.H.; Dehghani, M. Review of cancer from perspective of molecular. *J. Cancer Res. Pract.* **2017**, *4*, 127–129.
- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020. GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer J. Clin.* **2020**, *71*, 209–249.
- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394-424.

Hígado	905, 677 (4.7)	830, 180 (8.3)	Leucemia	474, 519 (2.5)	311, 594 (3.1)
Recto	732, 210 (3.8)	339, 022 (3.4)	Riñón	431, 288 (2.2)	179, 368 (1.8)

En México, el cáncer constituye la tercera causa de muerte con el 12% de las defunciones, sólo por detrás de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. En el año 2020 se contabilizaron 195,499 casos y 90,222 muertes. Entre los tipos de cáncer más comunes en hombres destacan el de próstata, colorrectal, estómago, pulmón, o el linfoma no-Hodgkin (**Figura 3.1**), mientras que en las mujeres se encuentran el de mama, cuello uterino, tiroides, colorrectal y de endometrio (**Figura 3.2**).⁴

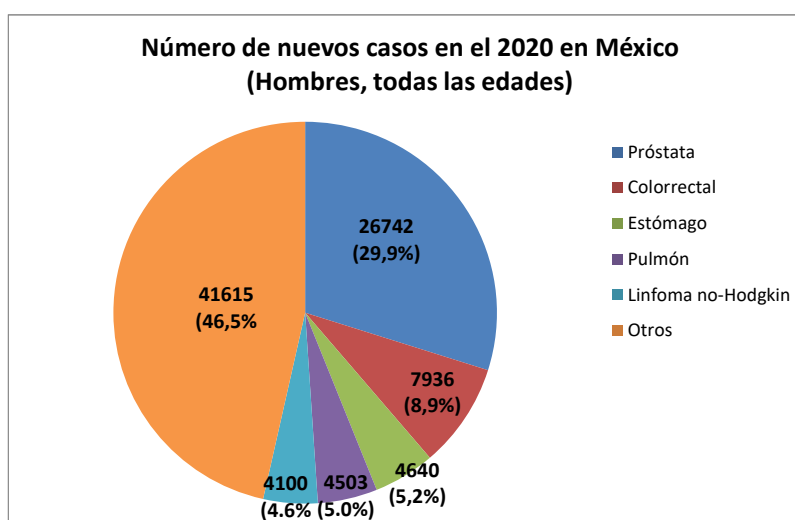


Figura 3.1. Datos de casos nuevos de cáncer en 2020 en hombres en México. Adaptado de referencia 4.

4. Globocan (2020) Population fact sheets "Mexico"

[<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>].

Ultimo acceso:

22/05/22.

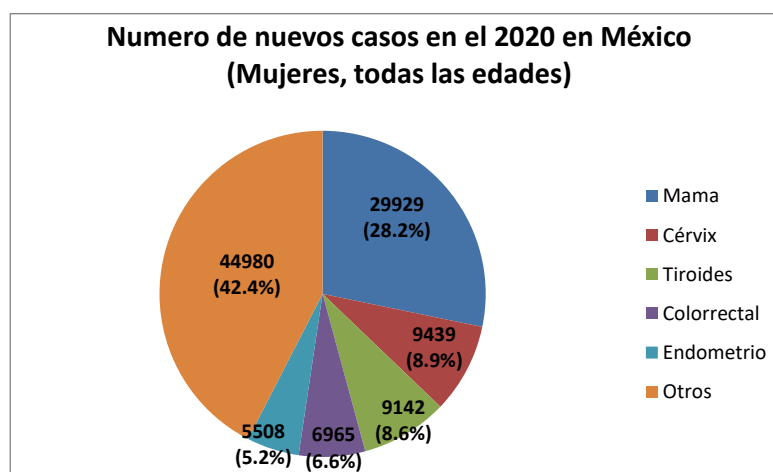


Figura 3.2. Datos de casos nuevos de cáncer en 2020 en mujeres en México. Adaptado de referencia 4.

Se prevé que para el año 2030 aumenten a 23.6 millones de nuevos casos a nivel mundial.⁵ Debido a esto, la lucha contra el cáncer es uno de los objetivos fundamentales para el área de la industria farmacéutica,⁶ así como una línea de investigación primordial en el área de la Química Medicinal.

Los diversos tratamientos para el cáncer disponibles en la actualidad, como la radioterapia, quimioterapia o el quirúrgico han demostrado que tienen posibilidades limitadas. En el caso de la quimioterapia, los agentes quimioterapéuticos normalmente poseen una baja especificidad de la acción antitumoral y una alta toxicidad hacia órganos y tejidos sanos, lo cual origina severos efectos secundarios.⁷ Además, un problema añadido es el desarrollo de quimiorresistencia, normalmente provocado por la existencia de mecanismos de eliminación de xenobióticos en las células tumorales (ej., glicoproteína-P, Pg-p), expulsando al agente quimioterapéutico, y disminuyendo de esta manera su eficacia de manera significativa.⁸

Debido a la eficacia reducida y a la considerable toxicidad de numerosos agentes quimioterapéuticos actuales existe una clara y urgente necesidad de desarrollar fármacos novedosos eficaces y no tóxicos para el tratamiento del cáncer.⁹

-
5. Cragg, G.; Pezzuto, J.M. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Med. Princ. Pract.* **2015**, *2*, 41–59.
 6. Franconetti, A.; López, Ó., Fernández-Bolaños, J.G. Carbohydrates: potential sweet tools against cancer. *Curr. Med. Chem.* **2020**, *27*, 1206–1242.
 7. Solyanik, G.I. Multifactorial nature of tumor drug resistance. *Exp. Oncol.* **2010**, *32*, 181–185,
 8. Valente, A.; Podolski-Renić, A.; Poetsch, I.; Filipović, N.; López, Ó.; Turel, I.; Heffeter, P. Metal- and metalloid-based compounds to target and reverse cancer multidrug resistance. *Drug Resist. Updat.* **2021**, *58*, 100778.
 9. Lee, M.M.L.; Chan, B.D.; Wong, W.Y.; Leung, T.W.; Qu, L.Z.; Zhu, J.H.L.; Lee, C.S.; Chen, S.; Tai, W.L.Z. Synthesis and evaluation of novel anticancer compounds derived from the natural product brevelin A. *ACS Omega*, **2020**, *5*, 14586–14596.

En la búsqueda de nuevos anticancerígenos se necesita llegar a la comprensión de la compleja maquinaria bioquímica que rodea a esta enfermedad neoplásica.⁶ Es por ello que Hanahan actualizó los llamados “sellos distintivos del cáncer” como un conjunto de capacidades que son cruciales para la formación de tumores malignos. Las anteriores seis capacidades se han ampliado a ocho, que son: habilidades adquiridas para mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, vasculogénesis, metástasis, capacidad de reprogramar el metabolismo celular y prevenir la destrucción inmune.¹⁰

En este contexto, se pueden seleccionar algunas dianas terapéuticas con el fin de desarrollar agentes anticancerígenos más selectivos, entre las cuales destacan las sialiltransferasas,¹¹ quinasas,¹² topoisomerasas,¹³ telomerasas,¹⁴ polimerasas,¹⁵ apoptosis,¹⁶ angiogénesis,¹⁷ ADN,¹⁸ microtúbulos,¹⁹ sistema inmune,²⁰ transportadores de nutrientes,²¹ ROS,²² α -glucosidasas²³ (como α -manosidasas²⁴ y α -L-fucosidasas²⁵) y las

-
10. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer. Discov.* **2022**, *12*, 31–46.
 11. Pietrobono, S.; Stecca, B. Aberrant sialylation in cancer: biomarker and potential target for therapeutic intervention? *Cancers* **2021**, *13*, 2014.
 12. Jin, N.; Bi, A.; Lan, X.; Xu, J.; Wang, X.; Liu, Y.; Wang, T.; Tang, S.; Zeng, H.; Chen, Z.; Tan, M.; Ai, J.; Xie, H.; Zhang, T.; Liu, D.; Huang, R.; Song, Y.; Leung, E.L.H.; Yao, X.; Ding, J.; Geng, M.; Lin, S.H.; Min, H. Identification of metabolic vulnerabilities of receptor tyrosine kinases-driven cancer. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2701.
 13. Gmeiner, W.H.; Van Waardenburg, R.C.A.M. Targeting DNA topoisomerases: past & future. *Cancer Drug Resist.* **2021**, *4*, 758–761.
 14. Guterres, A.N.; Villanueva, J. Targeting telomerase for cancer therapy. *Oncogene* **2020**, *39*, 5811–5824.
 15. Saha, P.; Mandal, T.; Talukdar, A.D.; Kumar, D.; Trioathi, P.P.; Wang, Q.E.; Srivastava, A.K. DNA polymerase eta: a potential pharmacological target for cancer therapy. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *236*, 4106–4120.
 16. Carneiro, B.A.; El-Deiry, W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 395–417.
 17. Teleanu, R.I.; Chircov, C.; Grumezescu, A.M.; Teleanu, D.M. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic strategies for cancer treatment. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 84.
 18. Costa de Almeida, L.; Calil, F.A.; Machado-Neto, J.A.; Costa-Lotuf, L.V. DNA damaging agents and DNA repair: from carcinogenesis to cancer therapy. *Cancer Genet.* **2021**, *252*, 6–24.
 19. Serpico, A.F.; Visconti, R.; Grieco, D. Exploiting immune-dependent effects of microtubule-targeting agents to improve efficacy and tolerability of cancer treatment. *Cell. Death Discov.* **2020**, *11*, 361–367.
 20. Brown, N.F.; Carter, T.J.; Ottaviani, D.; Mulholland, P. Harnessing the immune system in glioblastoma. *Br. J. Cancer.* **2018**, *119*, 1171–1181.
 21. Thakur, C.; Chen, F. Connections between metabolism and epigenetics in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2019**, *57*, 52–58.
 22. Perillo, B.; Donato, M.D.; Pezone, A.; Zazzo, E.D.; Giovannelli, P.; Galasso, G.; Castoria, G.; Migliaccio, A. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 192–203.
 23. Gerber-Lemaire, S.; Juillerat-Jeanneret, L. Glycosylation pathways as drug targets for cancer: glycosidase inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1043–1052.
 24. Hamester, F.; Legler, K.; Wichert, B.; Kelle, N.; Eylmann, K.; Rossberg, M.; Ding, Y.; Kurti, S.; Schmalfeldt, B.; Milde-Langosh, K.; Oliveira-Ferrer, L. Prognostic relevance of the Golgi mannosidase MAN1A1 in ovarian cancer: impact of N-glycosylation on tumour cell aggregation. *Br. J. Cancer.* **2019**, *121*, 944–953.
 25. Bonin, S.; Parascandolo, A.; Aversa, C.; Barvazza, R.; Tsuchida, N.; Castellone, M.D.; Stanta, G.; Vecchio, G. Reduced expression of α -L-Fucosidase-1 (FUCA-1) predicts recurrence and shorter cancer specific survival in luminal BLN+ breast cancer patients. *Oncotarget* **2018**, *9*, 15228–15238.

anhidrasas carbónicas;²⁶ estas últimas son una de las dianas terapéuticas que se han seleccionado en la presente Tesis Doctoral.

Así pues, en la presente Tesis Doctoral se planteó la preparación de una serie de derivados sintéticos y semisintéticos con potencial aplicabilidad en el contexto de las terapias contra el cáncer. Uno de los principales objetivos perseguidos ha sido el acceso a compuestos que puedan mejorar la eficacia frente a células tumorales, en cuanto a potencia y selectividad, y por tanto, reducir los efectos secundarios sobre células y tejidos sanos. Los objetivos particulares se indicarán en cada uno de los siguientes capítulos.

26. Pastorekova, S.; Gillis, R.J. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* **2019**, *38*, 65–77.

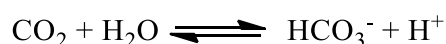
4. SÍNTESIS DE TIO(SELENO)SEMICARBAZONAS CON POTENCIAL ACTIVIDAD BIOLÓGICA

4.1. Introducción y antecedentes

En este capítulo de la Tesis Doctoral se describirá el acceso a una librería de tiosemicarbazonas, uno de los análogos de bases de Schiff más estudiados debido a sus numerosas propiedades biológicas, así como a sus selenoisómeros. En particular, los compuestos sintetizados se evaluarán como potenciales inhibidores de las isoformas de anhidrasas carbónicas relacionadas con procesos tumorales, y algunos de ellos, como agentes antiparasitarios.

Anhidrasas carbónicas

Las anhidrasas carbónicas (CAs, EC 4.2.1.1) constituyen una superfamilia de metaloenzimas expresadas tanto en organismos procariotas como eucariotas²⁷ que catalizan una reacción crucial desde el punto de vista fisiológico: la hidratación reversible del CO₂, para dar lugar a HCO₃⁻ y H⁺ (**Esquema 4.1**):



Esquema 4.1. Reacción catalizada por las CAs.

Esta reacción se puede producir en ausencia de enzima, pero muy lentamente (se requieren en torno a 100 s para llegar al equilibrio, lo cual resulta demasiado lento como para satisfacer los requerimientos metabólicos),²⁸ mientras que, en presencia de CAs, el equilibrio se alcanza en menos de 1s.

Este equilibrio, a pesar de ser tremendamente sencillo, resulta esencial en numerosos procesos biológicos, tales como la respiración (al disolver CO₂ en sangre en forma de HCO₃⁻),²⁹ homeostasis ácido-base (mantenimiento del pH),³⁰ o gluconeogénesis,³¹ entre otros.

Hasta la fecha se han descubierto 8 familias genéticas de CAs: α-CAs (presentes en vertebrados, bacterias, algas y citoplasma de plantas verdes), β-CAs (predominantemente en bacterias, algas y cloroplastos de mono- y dicotiledóneas), γ-CAs (principalmente en arqueas y bacterias), δ, ζ-CAs (presentes en algunas diatomeas

27. Supuran, C.T. Emerging role of carbonic anhydrase inhibitors. *Clin. Sci.* **2021**, *135*, 1233–1249.

28. Angeli A.; Carta, F.; Supuran, C.T. Carbonic anhydrases: versatile and useful biocatalysts in chemistry and biochemistry. *Catalyst* **2020**, *10*, 1008b.

29. Geers, C.; Gros, G. Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 681–715.

30. Lee, D.; Hong, J.H. The fundamental role of bicarbonate transporters and associated carbonic anhydrase enzymes in maintaining ion and pH homeostasis in non-secretory organs. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 339–357.

31. Ismail, I.S. The role of carbonic anhydrase in hepatic glucose production. *Curr. Diabetes Rev.* **2018**, *14*, 108–112.

marinas), η -CAs (protozoos), θ -CAs (diatomeas marinas), ι -CAs (fitoplancton marino y bacterias),³² la última de ellas descubierta muy recientemente.^{33,34}

Las α -CA en mamíferos se clasifican a su vez en 16 isoformas, atendiendo a su distribución en tejidos y propiedades cinéticas: citosólicas (CAs I, II, III, VII, XIII), mitocondriales (CAs VA, VB), asociadas a membrana (CAs IV, IX, XII, XIV, XV), secretadas en la saliva y calostro (CA VI) y proteínas asociadas a CAs (CARP, *CA-related proteins*; CAs VIII, X, XI). De todas ellas, las isoformas VIII, X, XI carecen de actividad conocida debido a la sustitución de uno o más residuos de histidina, importantes para su función. Debido a esto, se les conoce como proteínas relacionadas con las CAs (CARPs) (**Tabla 4.1**).^{35,36}

Tabla 4.1 Clasificación de las isoformas α -CAs en función de su localización.

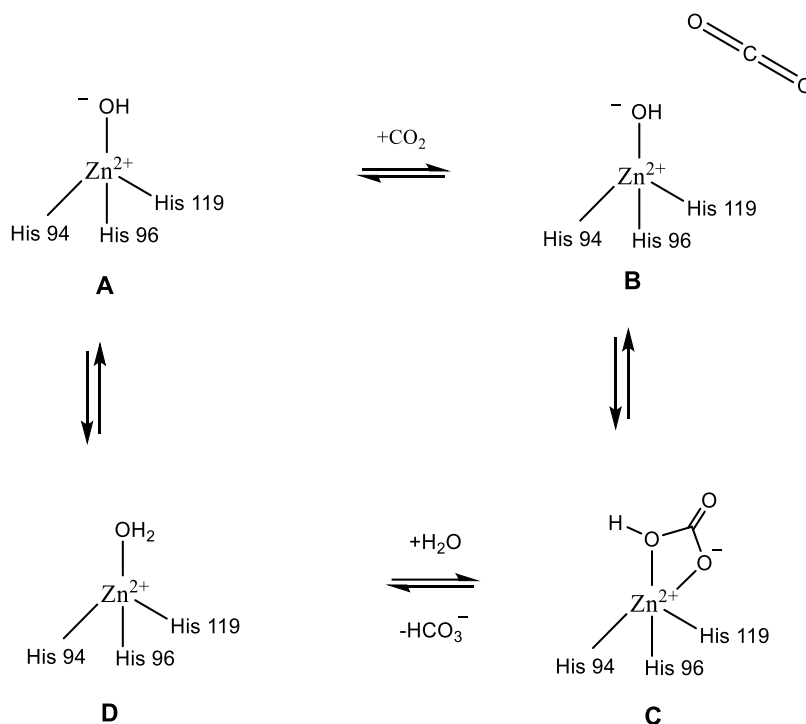
Citosólicas	I, II, III, VII, XIII
Mitocondriales	VA, VB
Secretadas	VI
Asociadas a membrana	IV, IX, XII, XIV, XV
CARPs	VII, X, XI

Aunque se han descrito CAs que poseen Cd(II), Co(II), Fe(II), Mn(II) como grupos prostéticos, el sitio activo de la mayoría de las CA contiene un ion zinc (Zn^{2+}), que es esencial para la catálisis.³⁷ Los datos cristalográficos muestran que el ion metálico está situado en la parte inferior de una hendidura y está coordinado con tres residuos de histidina (His 94, His 96, His 119) y una molécula de agua/ion hidroxilo. El agua ligada al zinc también tiene interacciones mediante enlaces de hidrogeno con el hidroxilo de Thr 199 que a su vez forma un enlace de hidrógeno con el Glu 106; estas interacciones mejoran el carácter nucleófilo de la molécula de agua unida al zinc y contribuyen además a orientar el sustrato (CO_2) en una ubicación favorable para el ataque nucleofílico.

La forma activa de la enzima es con un ion hidróxido coordinado al Zn(II) (**Esquema 4.2**, A). Este nucleófilo fuerte reacciona con CO_2 (B) para formar una molécula

-
32. Angeli, A.; Carta, F.; Supuran, C.T. Carbonic anhydrases: versatile and useful biocatalysts in chemistry and biochemistry. *Catalysts* **2020**, *10*, 1008–1019.
33. Jensen, E.L.; Clement, R.; Kosta, A.; Maberly, S.C.; Gontero, B. A new widespread subclass of carbonic anhydrase in marine phytoplankton. *ISME J.* **2019**, *13*, 2094–2106.
34. Nocentini, A.; Supuran, C.T.; Capasso, C. An overview on the recently discovered iota-carbonic anhydrases. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 1988–1995.
35. Supuran, C.T. Carbonic anhydrases—an overview. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 603–614.
36. Aspatwar, A.; Tolvanen, M.E.E.; Parkkila, S. An update on carbonic anhydrase-related proteins VIII, X and XI. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28*, 1129–1142.
37. Supuran, C.T. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem J.* **2016**, *473*, 2023–2032.

de HCO_3^- que queda unida al zinc (C); posteriormente, el ion bicarbonato es desplazado por una molécula de agua, que conduce a la forma ácida de la enzima, con agua coordinada al Zn(II) (D) que es catalíticamente inactiva. Para regenerar la enzima, el H^+ se transfiere desde el sitio activo al medio, permitiendo que el zinc se una nuevamente al ligando hidróxido (A).³⁸ Este proceso es asistido por la His 64 la cual es importante ya que muestra una flexibilidad capaz de cambiar de una conformación “in” a “out”.



Esquema 4.2. Mecanismo de catálisis de las anhidrasas carbónicas (reproducido de referencia 38).

La His 64 acepta un protón de la molécula de agua coordinada con el metal en la conformación “in” y lo libera en la conformación “out”, lo que ayuda al transporte de protones, el paso determinante de la velocidad en el ciclo catalítico.³⁹ En la **Figura 4.1** se muestra, a modo de ejemplo, el sitio activo de la CA II, con el ion Zn^{2+} , así como los principales aminoácidos implicados en la catálisis.

38. Kumar, S.; Rulhania, S.; Jaswal, S.; Monga, V. Recent advances in the medicinal chemistry carbonic anhydrase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112923.

39. Petreno, A.; Osman, S.M.; Alasmay, F.A.; Almutairi, T.M.; Nocentini, A.; Supuran C.T. Binding site comparison for coumarin inhibitors and amine/amino acid activators of human carbonic anhydrase. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *226*, 113875.

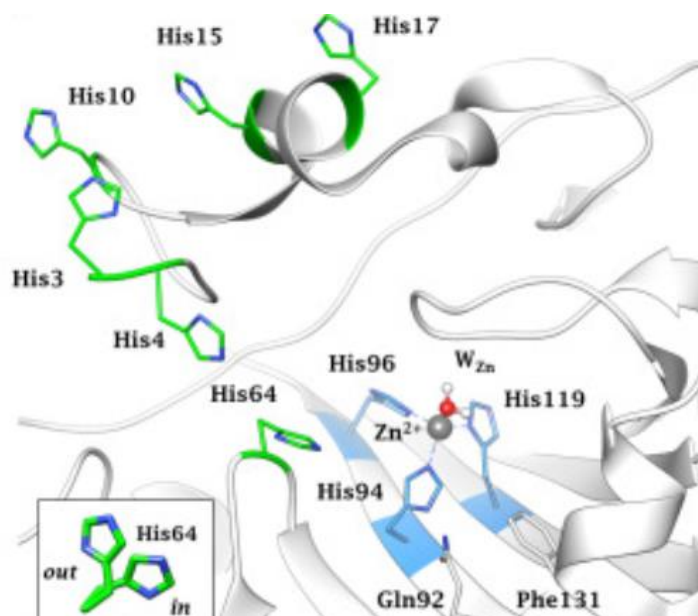
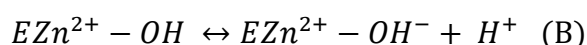
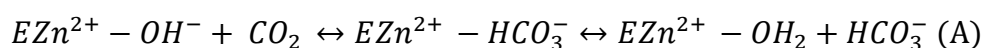


Figura 4.1. Sitio activo de CA II con el ion Zn^{2+} (tomado de referencia 39).

El proceso se representa simplifícadamente en el **Esquema 4.3** (A) y (B)



Esquema 4.3. Catálisis ejercida por las CAs.

El paso limitante es la segunda reacción, es decir, la transferencia de un protón para regenerar el hidróxido unido al zinc de la enzima. En las enzimas catalíticamente activas como CA II, IV, V, VII, IX, el proceso es asistido por un residuo de histidina situado en la entrada del sitio activo (His 64), así como por un grupo de histidinas que sobresale del borde del sitio activo a la superficie de la enzima asegurando así la transferencia del protón.³⁸

Las anhidrasas carbónicas no solo controlan procesos bioquímicos esenciales, sino que están también involucradas en ciertas patologías, como la epilepsia,⁴⁰ isquemia,⁴¹ dolor neuropático,⁴² glaucoma,⁴³ obesidad,⁴⁴ cáncer,⁴⁵ o enfermedad de Alzheimer.⁴⁶ Es

40. Aggarwal, M.; Kondeti, B.; McKenna, R. Anticonvulsant/antiepileptic carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23*, 717–724.

41. Di Cesare Mannelli, L.; Micheli, L.; Carta, F.; Cozzi, A.; Ghelardini, C.; Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibition for the management of cerebral ischemia: *in vivo* evaluation of sulfonamide and coumarin inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 894–899.

42. Nocentini, A.; Alterio, V.; Bua, S.; Micheli, L.; Esposito, D.; Buonanno, M.; Bartolucci, G.; Osman, S.M.; AlOthman, Z.A.; Cirilli, R.; Pierini, M.; Monti, S.M.; Di Cesare Mannelli, L.; Gratteri, P.; Ghelardini, C.; De Simone, G.; Supuran, C.T. Phenyl(thio)phosphon(amid)ate benzenesulfonamides as potent and selective inhibitors of human carbonic anhydrases II and VII counteract allodynia in a mouse model of oxaliplatin-induced neuropathy. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 5185–5200.

43. Fabrizi, F.; Mincione, F.; Somma, T.; Scozzafava, G.; Galassi, F.; Masini, E.; Impagnatiello, F.; Supuran, C.T. A new approach to antiglaucoma drugs: carbonic anhydrase inhibitors with or without NO

por ello que el desarrollo de inhibidores⁴⁷ y activantes⁴⁸ de CAs está cobrando un especial interés en el ámbito de la Química Medicinal. En particular, la inhibición de estas enzimas puede permitir el acceso a agentes diuréticos,⁴⁹ antiglaucoma,⁵⁰ anticonvulsivos⁵¹, anticancerígenos,⁵² agentes antifúngicos⁵³ y antibacterianos.⁵⁴ En la **Tabla 4.2** se muestran diversas CAs como dianas para numerosas enfermedades.

Tabla 4.2. Enzimas CAs como dianas en diversas enfermedades.

Enzima	Enfermedades en la que está involucrada
I	Edema cerebral
II	Glaucoma, edema, epilepsia, mal de altura
III	Estrés oxidativo
IV	Glaucoma, retinitis pigmentosa, derrame cerebral

-
- donating moieties. Mechanism of action and preliminary pharmacology. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2012**, *27*, 138–147.
44. Costa, G; Carta, F.; Ambrosio, F.A.; Artese, A.; Ortuso, F.; Moraca, F.; Rocca, R.; Romeo, I.; Lupia, A.; Maruca, A.; Bagetta, D.; Catalano, R.; Vullo, D.; Alcaro, S.; Supuran, C.T. A computer-assisted discovery of novel potential anti-obesity compounds as selective carbonic anhydrase VA inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *181*, 111565.
45. Neri, D.; Supuran, C.T. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 767–777.
46. Provensi, G.; Carta, F.; Nocentini, A.; Supuran, C.T.; Casamenti, F.; Passani, M.B.; Fossati, S. A new kid on the block? Carbonic anhydrases as possible new targets in Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4724.
47. Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors and their potential in a range of therapeutic areas. *Expert. Opin. Ther. Pat.* **2018**, *28*, 709–712.
48. Supuran, C.T. Carbonic anhydrase activators. *Future Med. Chem.* **2018**, *10*, 561–573.
49. Husain, A.; Madhesiam D.; Rashid, M.; Ahmad, A.; Khan, S.A.J. Synthesis and *in vivo* diuretic activity of some new benzothiazole sulfonamides containing quinoxaline ring system. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 1682–1689.
50. Lolak, N.; Akocak, S.; Bua, S.; Koca, S.; Supuran, C.T. Design and synthesis of novel 1,3-diaryltriazene-substituted sulfonamides as potent and selective carbonic anhydrase II inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2018**, *77*, 542–547.
51. Mishra, C.B.; Kumari, S.; Angeli, A.; Bua, S.; Mongre, R.K.; Tiwari, M.; Supuran C.T. Discovery of potent carbonic anhydrase inhibitors as effective anticonvulsant agents: drug design, synthesis, and *in vitro* and *in vivo* investigations. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 3100–3114.
52. Sayed, A.M.; Taher, F.A.; Abdel-Samas, M.R.K.; El-Gaby, M.S.A, El-Adl, K.; Saleh, N.M. Design, synthesis, molecular docking, *in silico* ADMET profile and anticancer evaluations of sulfonamide endowed with hydrazone-coupled derivatives as VEGFR-2 inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2021**, *108*, 104669.
53. Asghar, H.; Asghar, H.; Asghar, T. A review on anti-urease potential of coumarins. *Curr. Drug Targets*, **2021**, *22*, 1926–1943.
54. Mostajeran, N., Arshad, F.A.; Aliyan, H.; Massah, A.R. Solvent-free synthesis and antibacterial evaluation of novel coumarin sulfonamides. *Pharm. Chem. J.* **2018**, *52*, 1–7.

VA/VB	Obesidad
VI	Cariogénesis
VII	Epilepsia
VIII	Neurodegeneración, cáncer
IX	Cáncer
XII	Cáncer
XIII	Esterilidad
XIV	Epilepsia, retinopatía

De entre todas las isoformas de las α -CAs, en la presente Tesis Doctoral se hará especial énfasis en las CAs IX y XII, consideradas como dianas terapéuticas contra el cáncer, ya que se encuentran sobreexpresadas en numerosos tipos de tumores. Ambas enzimas están asociadas a la membrana celular y se han caracterizado como marcadores tumorales en cáncer humano.⁵⁵ Estas dos isoformas están involucradas en la acidificación de la microenvoltura extracelular y también en la protección de las células cancerígenas de la acidosis.⁵⁶

Se sabe que las células cancerosas que se encuentran en etapa de proliferación producen a menudo grandes cantidades de lactato, dióxido de carbono y protones durante el metabolismo oncogénico, por lo que las células tumorales necesitan regular el pH y transportar iones para adaptarse a la acidosis.⁵⁷ La acidosis extracelular representa una gran amenaza para las células, ya que al modificar el pH intracelular pueden interrumpirse varias funciones biológicas esenciales,⁵⁸ esto hace que la función de las CAs IX Y XII, sobreexpresadas en células tumorales y encargadas de regular el pH extracelular, sea esencial para la supervivencia de las células tumorales.

De esta forma, se ha demostrado que las CAs IX y XII juegan un papel esencial en la tumorigénesis, procesos de señalización, progresión del tumor, acidificación y metástasis;⁵⁹ la CA IX se expresa de manera mucho más limitada en células sanas, lo cual

55. Gillies, R.J. Cancer heterogeneity and metastasis: life at the edge. *Clin. Exp. Metastasis* **2022**, *39*, 15–19.

56. Shen-Han, L.; Griffiths, J.R. How and why are cancers acidic? Carbonic anhydrase IX and the homeostatic control of tumour extracellular pH. *Cancers* **2020**, *12*, 1616.

57. Ibrahim-Hashim, A.; Estrella, V. Acidosis and cancer: from mechanism to neutralization. *Cancer Metastasis Rev.* **2019**, *38*, 149–155.

58. Rouschner, M.; Lange, L.; Husing, T.; Reime, S.; Nolze, A.; Maschek M.; Thews, O.; Riemann, A. Impact of the acidic environment on gene expression and functional parameters of tumors *in vitro* and *in vivo*. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2021**, *40*, 10.

59. Mboge, M.Y.; Mahon, B.P.; McKenna, R.; Frost, S. Carbonic anhydrases: Role in pH control and cancer. *Metabolites.* **2018**, *8*, 19.

la convierte en un diana de interés para el desarrollo de fármacos antitumorales selectivos; además, se le considera como un marcador de tumores agresivos y resistentes.⁶⁰ La sobreexpresión de la CA IX surge como respuesta de la célula tumoral al fenómeno de hipoxia (bajos niveles de oxígeno).⁶¹ Por otro lado, la inhibición de la CA XII se ha asociado con la inactivación de la glicoproteína-P (P-gp), uno de los mecanismos más usuales empleados para la eliminación de xenobióticos, y por tanto, correlacionado con el desarrollo de resistencia hacia los agentes quimioterapéuticos en el cáncer.⁶²

Inhibidores de las anhidrasas carbónicas

Los inhibidores de CAs se han dividido según su mecanismo de inhibición en cuatro grupos.⁶³

- **Agentes quelatantes del Zn(II).** En este grupo se encuentran iones inorgánicos,⁶⁴ las sulfonamidas y sus isómeros⁶⁵ (sulfamatos,⁶⁶ sulfamidas⁶⁷), ditiocarbamatos,⁶⁸ hidroxamatos,⁶⁹ ácidos carboxílicos,⁷⁰ o benzoxaborol.⁷¹

- **Compuestos que poseen un grupo de anclaje (AG, *anchoring group*) al Zn(II) complejoado con agua/ion hidróxido.** El AG puede ser: OH, amina primaria, COOH,

60. Betof, A.S.; Rabbani, Z.N.; Hardee, M.E.; Kim, S.J.; Broadwater, G.; Bentley, R.C.; Snyder, S.A.; Vujaskovic, Z.; Oosterwijk, E.; Harris, L.N.; Horton, J.K.; Dewhirst, M.W.; Blackwell, K.L. Carbonic anhydrase IX is a predictive marker of doxorubicin resistance in early-stage breast cancer independent of HER2 and TOP2A amplification. *Br. J. Cancer*. **2012**, *106*, 916–922.

61. Pastorek, J.; Pastorekova, S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: from biology to clinical use. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *31*, 52–65.

62. Salaroglio, I.C.; Mujundar, P.; Annovazzi, L.; Kopecha, J.; Mellai, M.; Schiffer, D.; Poulsen, S.A.; Riganti, C. Carbonic anhydrase XII inhibitors overcome P-glycoprotein-mediated resistance to temozolomide in glioblastoma. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 2598–2609.

63. Supuran, C.T. Exploring the multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrase for novel drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2020**, *15*, 1–16.

64. De Simone, G.; Supuran, C.T. (In)organic anions as carbonic anhydrase inhibitors. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *111*, 117–129.

65. Mboge, M.Y.; Chen, Z.; Wolff, A.; Mathias, J.V.; Tu, C.; Brown, K.D.; Bozdog, M.; Carta, F.; Supuran, C.T.; McKenna, R.; Frost, S.C. Selective inhibition of carbonic anhydrase IX over carbonic anhydrase XII in breast cancer cells using benzene sulfonamides: Disconnect between activity and growth inhibition. *PLoS One* **2018**, *13*, e0207417.

66. Nocentini, A.; Moi, D.; Balboni, G.; Salvadori, S.; Onnis, V.; Supuran, C.T. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazoline-based aromatic sulfamates with potent carbonic anhydrase isoforms II, IV, and IX inhibitory efficacy. *Bioorg. Chem.* **2018**, *77*, 633–639.

67. Topal, F.; Aksu, K.; Gulcin, I.; Tumer, F.; Goksu, S. Inhibition profiles of some symmetric sulfamides derived from phenethylamines on human carbonic anhydrase I and II isoenzymes. *Chem. Biodivers.* **2021**, *18*, e2100422.

68. Giovannuzzi, S.; Abutaleb, N.S.; Hewitt, C.S.; Carta, F.; Nocentini, A.; Seleem, M.N.; Flaherty, D.P.; Supuran, C.T. Dithiocarbamates effectively inhibit the α -carbonic anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2022**, *37*, 1–8.

69. Di Fiore, A.; Maresca, A.; Supuran, C.T.; De Simone, G. Hydroxamate represents a versatile zinc binding group for the development of new carbonic anhydrase inhibitors. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8838–8840.

70. Langella, E.; D'Ambrosio, K.; D'Ascenzio, M.; Carradori, S.; Monti, S.M.; Supuran, C.T.; De Simone, G. A combined crystallographic and theoretical study explains the capability of carboxylic acids to adopt multiple binding modes in the active site of carbonic anhydrases. *Chemistry* **2016**, *22*, 97–100.

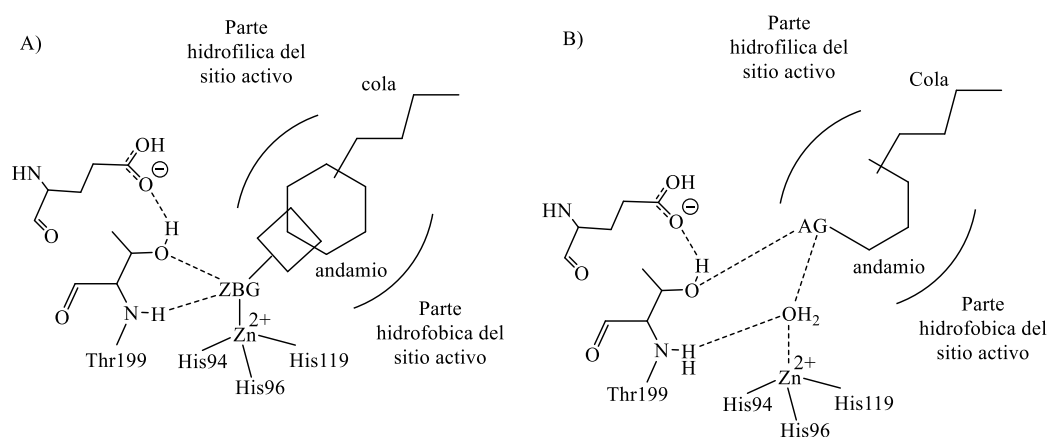
71. Langell, E.; Alterio, V.; D'Ambrosio, K.; Cadoni, R.; Winum, J.Y.; Supuran, C.T.; Monti, S.M.; De Simone, G.; Di Fiore, A. Exploring benzoxaborole derivatives as carbonic anhydrase inhibitors: a structural and computational analysis reveals their conformational variability as a tool to increase enzyme selectivity. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 1498–1505.

COOMe, SO₃H. Puede estar localizado sobre un fragmento alifático (incluyendo carbohidratos), aromático, heterocíclico. Ej. fenol,⁷² sulfocumarinas,⁷³ poliaminas,⁷⁴ tioxocumarinas.⁷⁵

• **Compuestos que obstruyen la entrada del sitio activo.** Ej. Cumarinas y sus isómeros.⁷⁶

• **Compuestos que se unen fuera del sitio activo.** Ej. ácido 2-(bencilsulfonyl)benzoico.⁷⁷

En la **Figura 4.2 (A–D)** se muestra esquemáticamente el modo de acción de cada uno de los anteriores tipos de inhibidores de CAs.



72. Karioti, A.; Carta, F.; Supuran, C.T. Phenols and polyphenols as carbonic anhydrase inhibitors. *Molecules* **2016**, *21*, 1649.
73. Krasavin M.; Zalubovskis, R.; Grandane, A.; Domraceva, I.; Zhmurov, P.; Supuean, C.T. Sulfocumarins as dual inhibitors of human carbonic anhydrase isoforms IX/XII and of human thioredoxin reductase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*, 506–510.
74. Carta, F.; Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Kaila, K.; Supuran, C.T. Polyamines inhibit carbonic anhydrases by anchoring to the zinc-coordinated water molecule. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5511–5522.
75. Ferraroni, M.; Carta, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. Thioxocumarins show an alterantive carbonic anhydrase inhibition mechanism compared to coumarins. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 462–473.
76. Meleddu, R.; Deplano, S., Maccioni, E.; Ortuso, F.; Cottiglia, F.; Secci, D.; Onali, A.; Sanna, E.; Angeli, A.; Angius, R.; Supuran, C.T.; Distinto, S. Selective inhibition of carbonic anhydrase IX and XII by coumarin and psoralen derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 685–692.
77. Rotondi, G.; Guglielmi, P.; Carradori, S.; Secci, D.; De Monte, C.; De Filippis, B.; Maccallini, C.; Amoroso, R.; Cirilli, R.; Akdemir, A.; Angeli, A.; Supuran, C.T. Design, synthesis and biological activity of selective inhibitors based on 2-(benzylsulfonyl)benzoic acid scaffold. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 1400–1413.

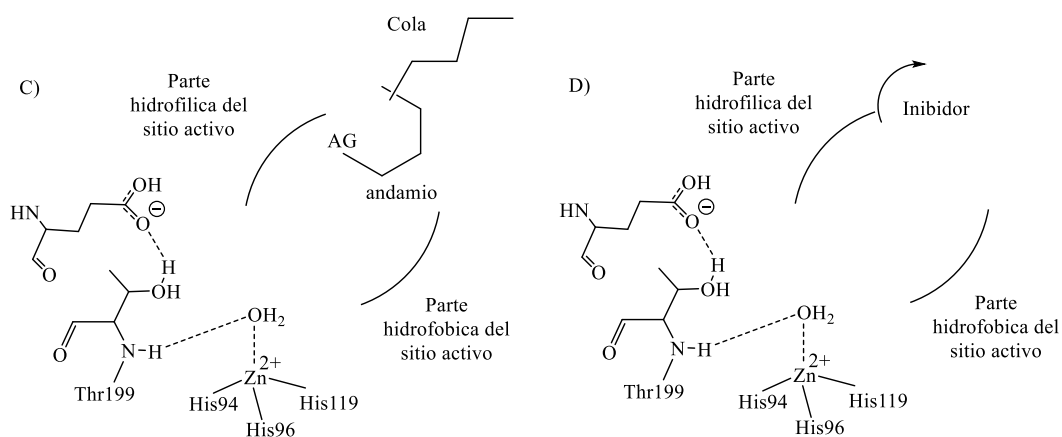


Figura 4.2. Mecanismos de inhibición de CA representados en las CA humanas: (A) Agentes quelatantes al zinc; (B) Grupo de anclaje; (C) obstrucción del sitio activo; (D) fuera del sitio activo. (Adaptado de Nocentini, A.; Supuran C.T. *En Carbonic anhydrases: an overview*, Elsevier Inc. Elsevier Inc. Amsterdam, Países Bajos, 2019, 1-16).

Sulfonamidas como inhibidores de las anhidrasas carbónicas.

Una de las principales familias de inhibidores de las CAs está constituida por derivados que contienen el grupo sulfonamido ($R-SO_2NH_2$) y sus bioisómeros sulfamidas y sulfamatos.⁷⁸ Para la construcción de este tipo de inhibidores se necesitan tres elementos estructurales cruciales:⁷⁹

- **Grupo de unión a Zinc (ZBG, Zinc Binding Group):** Este grupo puede interactuar con el catión $Zn(II)$ y con los residuos Thr 199 y Glu 106, aminoácidos que se encuentran en el sitio activo de las CAs.

- **Resto hidrofóbico:** se trata de un fragmento de tipo anillo aromático o heteroaromático, unido directamente a la cola.

- **Cola:** Los grupos, tanto polares como lipófilos pueden usarse como cola, los cuales interaccionarían con la región hidrofóbica o hidrófila, respectivamente, próxima al sitio catalítico de la enzima.

Actualmente ninguno de los inhibidores que se utilizan clínicamente para las CAs muestra selectividad. Por lo cual, sería altamente beneficioso la obtención de nuevos fármacos para evitar efectos secundarios debido a su falta de selectividad.⁸⁰ En los últimos años se ha dado un enfoque importante a dos elementos estructurales para la síntesis de inhibidores de CA, el anillo (*ring approach*) y la cola (*tail approach*). En la **Figura 4.3** se muestra la estructura general de un inhibidor de CAs⁷⁹ provisto de un ZBG.

78. Carta, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. Sulfonamides: a patent review (2008-2012). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 747–758.

79. Cuffaro, D.; Nuti, E.; Rosello, A. An overview of carbohydrate-based carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*, 1906–1922.

80. Supuran, C.T. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 345–360.

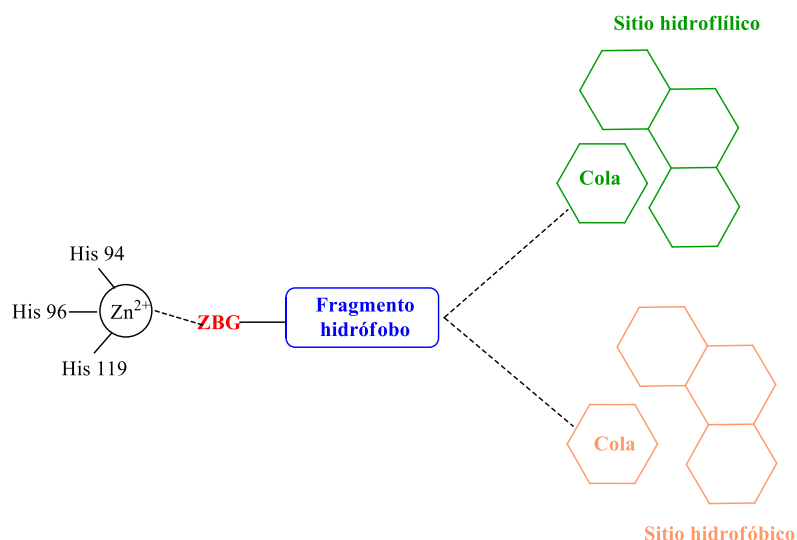


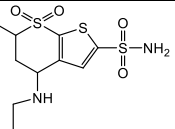
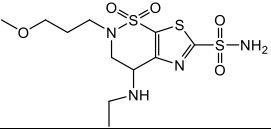
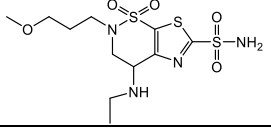
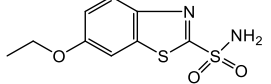
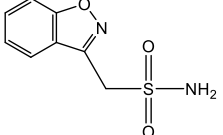
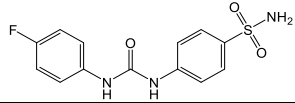
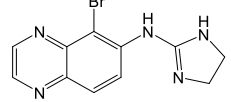
Figura 4.3. Representación esquemática de la estructura general de un inhibidor de CA con un fragmento quelatante de Zn(II). Adaptado de referencia 79.

La mayoría de los inhibidores de CAs que se usan clínicamente en la actualidad, o que se encuentran en evaluación son de tipo sulfonamida, como la acetazolamida (AAZ), metazolamida, dorzolamida, brinzolamida, indisulam, etoxzolamida, zonizamida, SLC-0111, brimonidina (**Tabla 4.3**).

Tabla 4.3. Inhibidores de anhidras carbónicas de uso clínico.

Nombre	Estructura	Actividad
Acetazolamida (AAZ)		<ul style="list-style-type: none"> • Glaucoma⁸¹ • Epilepsia^{82,83} • Mal de altura⁸⁴ • Insuficiencia cardíaca⁸⁵
Metazolamida		<ul style="list-style-type: none"> • Glaucoma⁸⁶ • Mal de altura⁸⁷

81. Kaur, I.P.; Smitha R.; Aggarwal, D.; Kapil, M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int. J. Pharm.* **2002**, *248*, 1–14.
82. Lim, L.L.; Foldvary, N.; Mascha, E.; Lee, J. Acetazolamide in women with catamenial epilepsy. *Epilepsia* **2001**, *42*, 746–749.
83. Hamidi, S.; Avoli, M. Carbonic anhydrase inhibition by acetazolamide reduces *in vitro* epileptiform synchronization. *Neuropharmacology* **2015**, *95*, 377–387.
84. Gao, D.; Wang, Y.; Zhang, R.; Zhang, Y. Efficacy of acetazolamide for the prophylaxis of acute mountain sickness: a systematic review, meta-analysis and trial sequential analysis of randomized clinical trials. *Am. J. Med. Sci.* **2021**, *361*, 635–645.
85. Wongboon, J.; Thongprayoon, C.; Bathini, T.; Ungprasert, P.; Aeddula, N.R.; Mao, M.A.; Chungpasitporn, W. Acetazolamide therapy in patients with heart failure: a meta-analysis. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 339–361.
86. Lonche, V.Y.; Sharma, S. Formulation, characterization, optimization and *in-vivo* evaluation of methazolamide liposomal *in-situ* gel for treating glaucoma. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* **2022**, *67*, 102951.
87. Lu, H.; Zhang, H.; Jiang, Y. Methazolamide in high-altitude illnesses. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *148*, 105326.

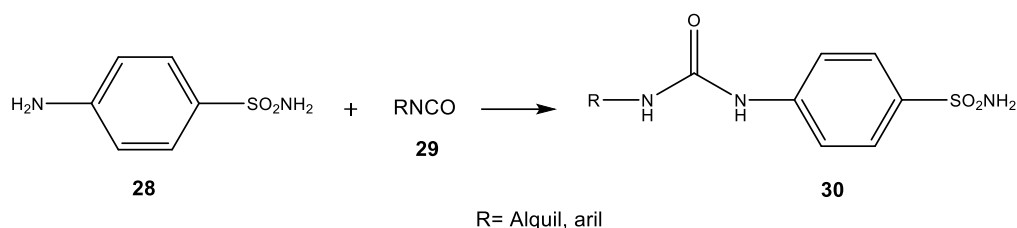
Dorzolamida		<ul style="list-style-type: none"> • Glaucoma⁸⁸
Brinzolamida		<ul style="list-style-type: none"> • Glaucoma⁸⁹
Indisulam		<ul style="list-style-type: none"> • Anticancerígeno^{90,91}
Etozolamida		<ul style="list-style-type: none"> • Glaucoma⁹² • Isquemia⁹³
Zonisamida		<ul style="list-style-type: none"> • Epilepsia⁹⁴ • Parkinson⁹⁵
SLC-0111		<ul style="list-style-type: none"> • Anticancerígeno^{96,97} (Fase II)
Brimonidina		<ul style="list-style-type: none"> • Glaucoma⁹⁸

88. Konstas, A.G.; Schmetterer, L.; Katsanos, A.; Hutnk, C.M.L.; Hollo, G.; Quaranta, L.; Teus, M.A.; Uusitalo, H.; Pfeiffer, N.; Katz, L.Y. Dorzolamide/timolol fixed combination: learning from the past and looking toward the future. *Adv. Ther.* **2021**, *38*, 24–51.
89. Lusthaus, J.A.; Goldberg, I. Brimodine and brinzolamide for treating glaucoma and ocular hypertension, safety evaluation. *Expert. Opin. Drug. Saf.* **2017**, *16*, 1071–1078.
90. Han, Y.; Goralski, M.; Gaskill, N.; Capota, E.; Kim, J.; Ting, T.C. Anticancer sulfonamides target splicing by inducing RBM39 degradation via recruitment to DCAF15. *Science* **2017**, *356*, eaal3755.
91. Lu, J.; Li, Jiang, H.; Li, D.; Chen, T.; Wang, Y.; Pu, Z.; Xu, G. Proximity labeling quantitative proteomics and biochemical studies revealed the molecular mechanism for the inhibitory effect of indisulam on the proliferation of gastric cancer cells. *J. Proteome Res.* **2021**, *20*, 4462–4474.
92. Di Fiore, A.; Pedone, C.; Antel, J.; Waldeck, H.; Witte, A.; Wurl, M.; Scozzafa, A.; Supuran C.T. De Simone G. Carbonic anhydrase inhibitors: the X-ray crystal structure of ethoxzolamide complexed to human isoform I reveals the importance of Thr 200 and Gln 92 for obtaining tight-binding inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2669–2674.
93. Pardo, A.C.; González-Arbaláez, L.F.; Fantinello, J.C.; Álvarez, B.V.; Mosca, S.M.; Swenson, E.R. Myocardial and mitochondrial effects of the anhydrase carbonic inhibitor ethoxzolamide in ischemia-reperfusion. *Physiol. Rep.* **2022**, *9*, e15093.
94. Romgi, A.; Femia, E.A.; Fattore, C.; Vitrani, G.; Di Gennaro, G. Franco, V. Zonidamide in the management of epilepsy in the elderly. *Clin. Interv. Aging.* **2015**, *10*, 931–937.
95. Goel, A.; Sugumaran, R.; Narayan, S. Zonosamide in Parkinson's disease: a current update. *Neurol. Sci.* **2021**, *42*, 4123–4129.
96. McDonald, P.C.; Chia, S.; Bedard, P.; Chu, Q.; Lyle, M.; Tang, L.; Singh, M.; Zhang, Z.; Supuran, C.T.; Renouf, D.J.; Dedhar, S. A phase 1 study of SLC-0111, a novel inhibitor of carbonic anhydrase IX in patients with advanced solid tumors. *Am. J. Clin. Oncol.* **2020**, *43*, 484–490.
97. Andreucci, E.; Ruzzolini, J.; Peppicelli, S.; Bianchini, F.; Laurenzana, A.; Carta, F.; Supuran, C.T.; Calorini, L. The carbonic anhydrase IX SLC-0111 sensitises cancer cell to conventional chemotherapy. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 117–123.
98. Cantor, L.B. Brimonidine in the treatment of glaucoma and ocular hypertension. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2006**, *2*, 337–346.

Bencenosulfonamidas como inhibidores de anhidrasas carbónicas

Las bencenosulfonamidas son la clase más común y mejor caracterizada de inhibidores de CAs. Dependiendo de la naturaleza y posición de los sustituyentes en el anillo de fenilo pueden establecerse diferentes tipos de interacciones entre la enzima y la región hidrofóbica y/o hidrofílica del sitio activo.⁹⁹ Se han descrito hasta la fecha una enorme cantidad de espaciadores entre el fragmento de tipo arilsulfonamido y la región conocida como cola en el inhibidor.

A modo de ejemplo, Pachhiano *et al.*¹⁰⁰ llevaron a cabo la síntesis de bencenosulfonamidas sustituidas con un grupo ureido **30** mediante acoplamiento de la *p*-aminobencenosulfonamida comercial con diversos isocianatos (**Esquema 4.4**).



Esquema 4.4. Síntesis de diferentes bencenosulfonamidas **30** con un puente de tipo ureido.

Todos los derivados que se describieron mostraron una fuerte afinidad por la CA IX con una inhibición en el rango de 0.5 a 575 nM, y una excelente selectividad frente a las CAs citosólicas (CA I, II). Entre ellos, el derivado con R = *m*-NO₂-C₆H₄, redujo significativamente la formación de metástasis en la línea celular 4T1 de cáncer de mama, altamente agresiva. Se demostró también que el compuesto SLC-0111 (R = *p*-F-C₆H₄), en combinación con el Paclitaxel, inhibe significativamente el crecimiento tumoral 4T1 (cáncer de mama). El compuesto SLC-0111, el derivado más conocido del grupo del Profesor Supuran, se encuentra actualmente en fase clínica Ib para el tratamiento de tumores asociados a microambientes hipóxicos,¹⁰¹ en dicho estudio, los datos farmacocinéticos establecieron como dosis segura para una futura fase 2 1000 mg de compuesto/día.¹⁰⁰

Se ha observado también que algunas sulfonamidas con restos de tioureas son buenos inhibidores de anhidrasas carbónicas; en este contexto, Fattah, *et al.*¹⁰²

99. Nocentni, A.; Supuran C.T. Advances in the structural annotation of human carbonic anhydrases and impact on future drug discovery. *Exp. Opin. Drug Discov.* **2019**, *14*, 1175–1197.

100. Pacchiano, F.; Carta, F.; McDonald P.C.; Lou, Y.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Dedhar, S.; Supuran, C.T. Ureido-substituted benzenesulfonamides potently inhibit carbonic anhydrase IX and show antimetastatic activity in a model of breast cancer metastasis. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1896–1902.

101. Ciccone, V.; Filippelli, A.; Angeli, A.; Supuran, C.T. Morbidelli, L. Pharmacological inhibition of CA IX impairs tumor cell proliferation migration and invasiveness. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2983.

102. Fattah, T.A.; Bua, S.; Saeed, A.; Shabir, G.; Supuran, C.T. 3-Aminobenzenesulfonamides incorporating acylthiourea moieties selectively inhibit the tumor-associated carbonic anhydrase isoform IX over the off-target isoforms I, II and IV. *Bioorg. Chem.* **2019**, *82*, 123–128.

describieron la síntesis de una serie de 1-aroil/acil-3-(3-aminosulfonilfenil)tioureas **31** (Figura 4.4), que fueron evaluadas frente a 4 isoformas de CA (CA I, II, IV, y IX). Se observó preferencia hacia la isoforma CA IX, con K_i en el rango de 21.5–274.2 nM. Los compuestos con una cadena de alquilo de longitud media (C_3H_5 , C_3H_7 , C_5H_{11} , CH_3) mostraron las mejores potencias de inhibición ($K_i = 44.0$, 30.9 , 21.5 , 40.2 nM, respectivamente). El compuesto que contiene un fenilo no sustituido es un inhibidor eficaz con un valor de K_i de 36.3 nM; no obstante, la incorporación de un átomo de cloro en el anillo produjo una reducción en la inhibición de CA IX ($K_i = 83.9$ nM).

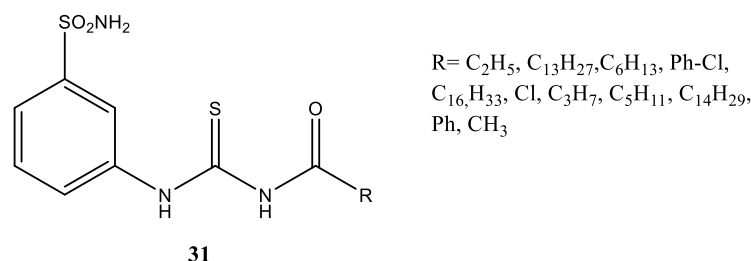


Figura 4.4. Estructuras de tioureas derivadas de sulfonamidas.

Cornelio *et al.*¹⁰³ sintetizaron una serie de 4-arilbencenosulfonamidas **32** mediante un acoplamiento de Suzuki-Miyaura entre *p*-yodobencenosulfonamida y diversos ácidos o ésteres arilborónicos utilizando un nanocatalizador de Pd heterogéneo. De esta forma, la cola de estos nuevos inhibidores estaba constituida por el fragmento aportado por el ácido/éster arilborónico, decorado con diversos sustituyentes en distintas posiciones del anillo en un sistema tipo bifenilo. Estos compuestos fueron evaluados como inhibidores de las CAs I, II, IX y XII; destaca especialmente el compuesto **32** (Figura 4.5), un inhibidor subnanomolar de la CA XII ($K_i = 0.58$ nM), y nanomolar de la CA II ($K_i = 2.1$ nM), y con excelente selectividad ($K_i = 1178$ nM para CA I). También se describieron¹⁰⁴ las estructuras cristalinas de **32** y otros derivados complejados con CA II y un mimético de CA XII, así como simulaciones *in silico*.

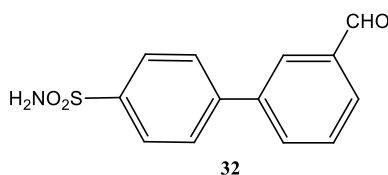


Figura 4.5. Estructura de la molécula 4-(3-formilfenil)bencenosulfonamida **32**.

103. Cornelio, B.; Laronze-Cochard, M.; Ceruso, M.; Ferraroni, M.; Rance, G.A.; Carta, F.; Khlobystov, A.N.; Fontana, A.; Supuran, C.T.; Sapi, J. 4-Arylbencenosulfonamides as human carbonic anhydrase inhibitors (hCAIs): synthesis by Pd nanocatalyst-mediated Suzuki-Miyaura reaction, enzyme inhibition and X-ray crystallographic studies. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 721–732.

104. Bhatt, A.; Mahon, B.P.; William, V.; Cruzeiro, D.; Cornelio, B.; Laronze-Cochard, M.; Ceruso, M.; Sapi, J.; Rance, G.A.; Khlobystov, A.; Fontana, A.; Roiteber, A.; Supuran, C.T.; McKenna, R. Structure activity relationships of benzenesulfonamide-based inhibitors towards carbonic anhydrase isoform specificity. *ChemBioChem.* **2016**, *18*, 213–222.

Se ha descrito que la introducción de átomos de halógeno como sustituyentes en diversas posiciones del anillo de benceno de la benzenosulfonamida provoca un aumento en la acidez de los protones del grupo sulfonamido, que a su vez se piensa está correlacionado con el aumento en las propiedades inhibitorias de CAs tal y como se ha descrito para las isoformas I, II, VII, IX XII.^{105,106} En este contexto, Zaksauskas *et al.*¹⁰⁶ diseñaron una extensa familia de 80 inhibidores (ej. compuestos **33a-e**, **Figura 4.6**) con átomos de halógeno (Cl, Br) en la posición *orto* con respecto al grupo sulfonamido, y dos colas. Una de estas colas estaba constituida por grupos de tipo carbonilo, carboxilo, hidroxilo, éteres, o uniones hidrofílicas de tipo amida. La segunda de estas colas contenía sustituyentes de tipo alquilo/arilo, conectados al anillo aromático mediante un conector de tipo sulfanilo o sulfonilo. Ambas colas juegan un papel crucial en la selectividad. Así pues, las fenilsulfonas **33a-d** tuvieron una mayor afinidad por la CA VII (K_i en el rango de 0.22 nM-0.33 nM), mientras que la ciclohexilsulfona **33e** exhibió una mayor afinidad por la CA IX ($K_i= 0.25$ nM).

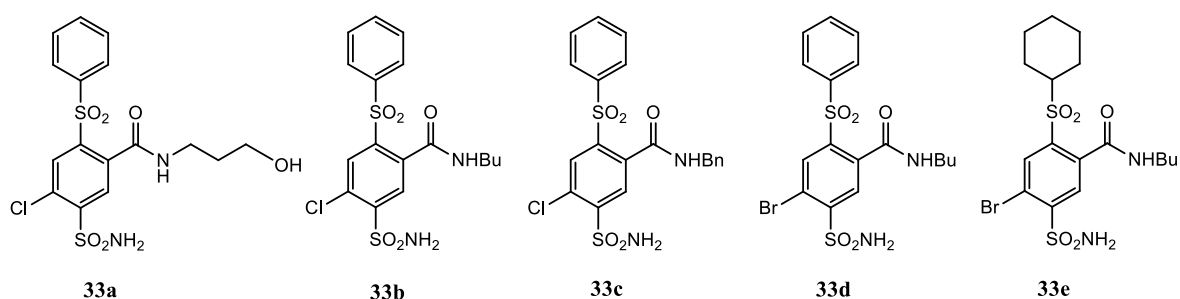


Figura 4.6. Estructura de las benzenosulfonamidas halogenadas y dos colas **33**.

Compuestos organosulfurados

Los compuestos organosulfurados están ampliamente presentes en nuestro organismo y en nuestro entorno natural, siendo el azufre, elemento que pertenece al grupo de los calcógenos de la Tabla Periódica, el séptimo mineral más abundante en el cuerpo humano. Posee una amplia variedad de estados rédox que le permiten formar enlaces intercalcógenos y reacciones de intercambio de átomos dando lugar a una gran cantidad de especies que participan en procesos biológicos.¹⁰⁷

105. Carta, F.; Pothen, B.; Maresca, A.; Tiwari, M.; Singh, V.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of cytosolic carbonic anhydrase isozymes II and VII with simple aromatic sulfonamides and some azo dyes. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 196–202.

106. Zaksauskas, A.; Capkauskaitė, E.; Jezepcikas, L.; Linkuviene, V.; Paketyryte, V.; Smirnoc, A.; leitans, J.; Kazaks, A.; Dvinskis, E.; Manakova, E.; Grazulis, S.; Tras, K.; Matulis, D. Halogenated and di-substituted benzenesulfonamides as selective inhibitors of carbonic anhydrase isoforms. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *185*, 111825.

107. Francioso, A.; Conrado, A.B.; Mosca, L.; Fontana, M. Chemistry and biochemistry of sulfur natural compounds: key intermediates of metabolism and redox biology. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 8294158.

Existen dos aminoácidos proteicos que contiene azufre, que son la cisteína, y la metionina; dichos aminoácidos son componentes importantes en proteínas, péptidos, enzimas y hormonas¹⁰⁸ y pueden interactuar con o neutralizar Especies Reactivas del Oxígeno (ROS).¹⁰⁹

Los puentes disulfuro que se forman durante las modificaciones postraduccionales de las proteínas y generados a partir del grupo tiol de los residuos de cisteína, son muy importantes para mantener la estructura terciaria de las proteínas y, por tanto, su actividad funcional.¹¹⁰

Se ha demostrado que numerosos compuestos organosulfurados ejercen diversos efectos beneficiosos, tales como antioxidantes,¹¹¹ propiedades antiinflamatorias,¹¹² reducción de los niveles de colesterol,¹¹³ o antidiabéticos,¹¹⁴ entre otros.

Un ejemplo son los compuestos sulfurados del género *Allium*, destacando los sulfuros de alilo provenientes del ajo (**Figura 4.7**), con actividades anticancerígenas y quimiopreventivas.¹¹⁵ Así pues, el trisulfuro de alilo resultó activo frente a las líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama)¹¹⁶ y A549 (cáncer de pulmón);¹¹⁷ el disulfuro de alilo resultó activo frente a la línea celular HL-60 (leucemia),¹¹⁸ y el sulfuro de alilo, frente a la línea celular HT29 (colon).¹¹⁹

-
108. Goncharow, N.; Orekhov, A.; Voitenko, N.; Ukolox, A.; Jenkins, R.; Avdonin, P. Organosulfur compounds as nutraceuticals. *Nutraceuticals* **2016**, 555–568.
109. Jones, D.P. Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signaling. *J. Intern. Med.* **2010**, *268*, 432–448.
110. Patil, N.A.; Tailhades, J.; Hughes, R.A.; Separovc, F.; Wade, J.D.; Hossain, M.A. Cellular disulfide bond formation in bioactive peptides and proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 1791–1805.
111. Ozgeris, B. Synthesis of substituted phenethylamine-based thioureas and their antimicrobial and antioxidant properties. *Russ. J. Org. Chem.* **2021**, *57*, 422–429.
112. Cao, X.; Cao, L.; Zhang, W.; Lu, R.; Bian, J.S.; Nie, X. Therapeutic potential of sulfur-containing natural products in inflammatory diseases. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *216*, 107687.
113. Rose, P.; Whiteman, M.; Moore, P.K.; Zhu, Y.Z. Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 351–368.
114. Long, N.; Gresley, A.L.; Wren, S.P. Thiazolidinediones: An in-depth study of their synthesis and application to medicinal chemistry in the treatment of diabetes mellitus. *ChemMedChem.* **2021**, *16*, 1717–1736.
115. Ariga, T.; Seki, T. Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: a review. *Biofactors* **2006**, *26*, 93–103.
116. Pinto, J.T.; Rivlin, R.S. Antiproliferative effects of allium derivatives from garlic. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 1058S–1060S.
117. Knowles, L.M.; Milner, J.A. Allyl sulfides modify cell growth. *Drug Metabol. Drug Interact.* **2000**, *17*, 81–107.
118. Lin, L.G.; Chen, G.W.; Su, C.C.; Hung, C.F.; Yang, C.C.; Lee, J.H.; Chung, J.G. Effects of garlic components diallyl sulfide and diallyl disulfide on arylamine N-acetyltransferase activity and 2-aminofluorene-ADN adducts in human promyelocytic leukemia cells. *Am. J. Chin. Med.* **2002**, *30*, 315–325.
119. Robert, V.; Mouille, B.; Mayeur, C.; Michaud, M.; Blachier, F. Effects of the garlic compound diallyl disulfide on the metabolism, adherence and cell cycle of HT-29 colon carcinoma cells: evidence of sensitive and resistant sub-populations. *Carcinogenesis*, **2001**, *2*, 1155–1161.

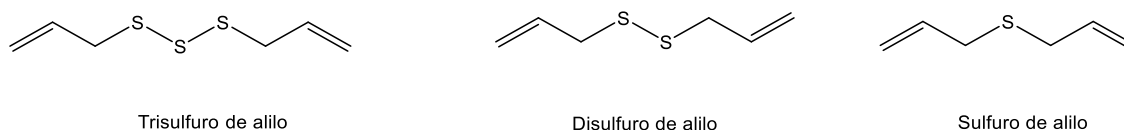


Figura 4.7. Estructuras de compuestos organosulfurados con actividad anticancerígena encontrados en el ajo.

Compuestos organoselénicos

El selenio es un metaloide descubierto en 1818 por el químico sueco Berzelius en la fábrica de Gripsholm, destinada a la producción de H_2SO_4 ; recibió su nombre de la diosa griega de la luna, Selene.¹²⁰ El primer compuesto organoselénico conocido fue el seleniuro de dietilo preparado por Lowig en 1836.¹²¹

En la década de 1950, el selenio fue objeto de controversias por sus efectos tanto beneficiosos como tóxicos; se requieren pequeñas cantidades de selenio para evitar el desarrollo de ciertas enfermedades, pero su acumulación conduce a selenosis (envenenamiento por selenio), que origina distrofia muscular o necrosis hepática aguda.¹²²

La investigación de los compuestos organoselénicos se intensificó durante la década de 1970, cuando el descubrimiento de varias reacciones y una variedad de novedosas estructuras con propiedades inusuales comenzó a incrementar el interés general dentro de la comunidad científica.¹²³

Actualmente se conocen aproximadamente 25 selenoproteínas que contienen un residuo de selenocisteína en su centro activo, donde el Se juega un papel clave en varias rutas importantes.¹²⁴

Las selenoproteínas participan en procesos como la regulación de la hormona tiroidea,¹²⁵ homeostasis rédox,¹²⁶ respuesta inflamatoria e inmunológica,¹²⁷

120. Kelszek, M. Selenium- fascinating microelement, properties and sources in food. *Molecules* **2019**, *24*, 1298.

121. Zhang, X.W. In my Element: Selenium. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 2649–2650.

122. Duntas, L.H.; Benvenga, S. Selenium: an element for life. *Endocrine*. **2015**, *48*, 756–775.

123. Muges, G.; du Mont, W.W.; Sies, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2125–2179.

124. Chua Tan, L.; Nncharaiah, Y.V.; van Hullebusch, E.D.; Lens, P.N.L. Selenium: environmental significance, pollution, and biological treatment technologies. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 886–907.

125. Wu, Q.; Rayman, M.P.; Lv, H.; Schomburg, L.; Cui B.; Gao, C.; Chen, P.; Zhuang, G.; Zhang, Z.; Peng, X.; Li, h.; Zhao, Y.; He, X.; Zeng, G.; Qin, F.; Hou, P.; Shi, B. Low population selenium status associated with increased prevalence of thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, 4037–4047.

126. Xiao, Y.; Huang, Q.; Zheng, Z.; Guan, H.; Liu, S. Construction of a *Cordyceps sinensis* exopolysaccharide-conjugated selenium nanoparticles and enhancement of their antioxidant activities. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *99*, 438–491.

metabolismo de los carbohidratos,¹²⁸ procesos cardiovasculares,¹²⁹ salud reproductiva¹³⁰ y mantenimiento de la función cerebral.¹³¹

Las selenoproteínas se pueden clasificar en subfamilias según sus funciones celulares, como las implicadas en las actividades antioxidantes (las glutatión peroxidasas GPx1¹³² GPx2,¹³³ GPx3,¹³⁴ GPx4¹³⁵), regulación redox (las tioredoxina reductasas¹³⁶ TrxR1, TrxR2, TrxR3, la metionina sulfóxido reductasa B1 (MSRB1)¹³⁷, SELENOH (selenoproteína H),¹³⁸ SELENOM (selenoproteína M),¹³⁹ SELENOW (selenoproteína W),¹⁴⁰ metabolismo de la hormona tiroidea (las yodotironina deiodinasas¹⁴¹ DIO1, DIO2, DIO3), transporte y almacenamiento de selenio (selenoproteína P, SELENOP¹⁴²), síntesis

-
127. Wu, F.; Cao, W.; Xu, H.; Wang, J.; Ke, X. Treatment with a selenium-platinum compound induced T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma cells apoptosis through the mitochondrial signaling pathway. *Oncol. Lett.* **2017**, *13*, 1702–1710.
128. Kohler, L.N.; Florea, A.; Kelley, C.P.; Chow, S.; Shu, P.; Batai, K.; Saboda, K.; Lance, P.; Jacobs, E.T. Higher plasma selenium concentrations are associated with increased odds of prevalent type 2 diabetes. *J. Nutr.* **2018**, *148*, 1333–1340.
129. Casaril, A.M.; Ignasiak, M.T.; Chuang, C.Y.; Viera, B.; Padilha, N.B.; Carroll, L.; Lenardao, E.J.; Savegnago, L.; Davies, M.J. Selenium-containing indolyl compounds: kinetics of reaction with inflammation-associated oxidants and protective effect against oxidation of extracellular matrix protein. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *113*, 395–405.
130. Raiz, M.; Mahmood, Z.; Shaid, M.; Saeed, M.U.; Tahir, I.M.; Shah, S.A.; Munir, N.; El-Ghorab, A. Impact of reactive oxygen species on antioxidant capacity of male reproductive system. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2016**, *29*, 421–425.
131. Jin, N.; Zhu, H.; Liang, X.; Huang, W.; Xie, Q.; Xiao, P.; Ni, J.; Liu, Q. Sodium selenate activated Wnt/ β -catenin signaling and repressed amyloid- β formation in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* **2017**, *297*, 36–49.
132. Lubos, E.; Loszalzo, J.; Handy, D.E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanism to therapeutic opportunities. *Antiox. Redox. Signal.* **2011**, *15*, 1957–1999.
133. Brigelius-Flohé, R.; Kipp, A.P. Physiological functions of GPx2 and its role in inflammation-triggered carcinogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2012**, *1259*, 19–25.
134. Chang, C.; Worley, B.L.; Phaeton, R.; Hempel, N. Extracellular glutathione peroxidase GPx3 and its role in cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 2197.
135. Shi, Z.Z.; Fan, Z.W.; Chen, Y.X.; Xie, X.F.; Jiang, W.; Wang, W.J.; Qiu, Y.T. Ferroptosis in carcinoma: regulatory mechanisms and new method for cancer therapy. *Onco. Targets Ther.* **2019**, *12*, 11291–11304.
136. Patwardhan, R.S.; Sharma, D.; Sandur, S.K. Thioredoxin reductase: An emerging pharmacologic target for radiosensitization of cancer. *Transl. Oncol.* **2022**, *17*, 101341.
137. Lee, B.C.; Lee, S.G.; Choo, M.K.; Kim, J.H.; Lee, H.M.; Kim, S.; Fomenk, D.E.; Kim, H.Y.; Park, J.M.; Gladyshev, V.N. Selenoprotein MsrB1 promotes anti-inflammatory cytokine gene expression in macrophages and controls immune response *in vivo*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5119.
138. Bertz, M.; Kuhn, K.; Koeberle, S.C.; Muller, M.F.; Hoelzer, D.; Thies, K.; Deubel, S.; Thierbach, R.; Kipp, A.P. Selenoprotein H controls cell cycle progression and proliferation of human colorectal cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *127*, 98–107.
139. Gong, T.; Hahimoto, A.C.; Sasuclark, A.R.; Khadka, V.S.; Gurary, A.; Pitts, M.W. Selenoprotein M promotes hypothalamic leptin signaling and thioredoxin antioxidant activity. *Antioxid. Redox Signal.* **2019**, *35*, 775–787.
140. Kim, H.; Lee, K.; Kim, J.M.; Kim, M.Y.; Kim, J.R.; Lee, H.W.; Chung, Y.W.; Shin, H.I.; Kim, T.; Park, E.S.; Rho, J.; Lee, S.H.; Kim, N.; Lee, N.; Lee, S.Y.; Choi, Y.; Jeong, D. Selenoprotein W ensures physiological bone remodeling by preventing hyperactivity of osteoclasts. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2258.
141. Gereben, B.; McAninch, E.; Ribeiro, M.; Bianco, A.C. Scope and limitations of iodothyronine deiodinases in hypothyroidism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 642–652.
142. Barret, C.W.; Reddy, V.K.; Short, S.P.; Motley, A.K.; Lintel, M.K.; Bradley, A.M.; Freeman, T.; Vallance, J.; Ning, W.; Parang, B.; Poindexter, S.V.; Fingleton, B.; Chen, X.; Washington, M.K.; Wilson, K.T.;

de selenofosfato (selenofosfato sintasa 2, SPHS2¹⁴³), metabolismo del calcio (selenoproteínas K (SELENOK),¹⁴⁴ y T, SELENOT¹⁴⁵), miogénesis (selenoproteínas F (SELENOF),¹⁴⁶ I (SELENOI),¹⁴⁷ y O (SELENOO¹⁴⁸)); las funciones de otras selenoproteínas como GPX6 y SELENOV aún se desconocen.¹⁴⁹

Actualmente es de sobra conocido que los ROS, como el anión superóxido o los radicales hidroxilo, destruyen componentes biológicos clave y causan daño a las membranas celulares a través de procesos de degradación oxidativa. Estas especies reactivas están involucradas en el inicio de procesos inflamatorios crónicos, cáncer y otras enfermedades degenerativas.¹⁵⁰

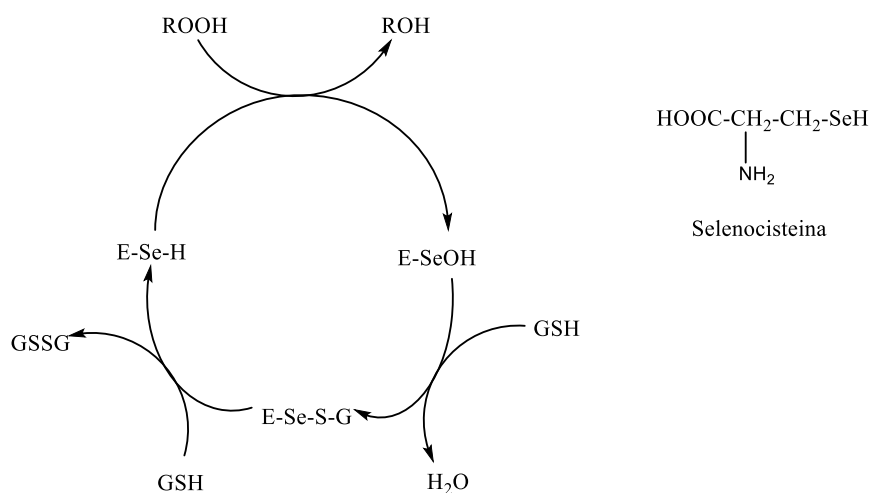
Entre las numerosas estrategias adoptadas para el tratamiento del cáncer, una de ellas es la modulación de las especies ROS, que desempeñan un papel central en la regulación e inducción de la apoptosis, la proliferación, supervivencia celular y la resistencia a fármacos.

La glutatión peroxidasa (GPx) juega un papel importante en la desintoxicación de estas especies. La GPx fue la primera selenoenzima identificada y consta de cuatro subunidades, cada una de las cuales posee un átomo de selenio en un residuo de selenocistena.¹²⁰

El átomo de selenio del sitio catalítico de la GPx experimenta un ciclo catalítico redox mediante el cual la selenoproteína es capaz de eliminar H₂O y alquil peróxidos (**Esquema 4.5**), llevando a cabo su reducción hasta H₂O o alcoholes, respectivamente. El grupo selenol del residuo de selenocisteína se oxida, por reacción con los peróxidos (ROOR) hasta ácido selénico (SeOH), el cual a su vez reacciona con el glutatión reducido (GSH) para dar un aducto selenosulfuro (ESESG). Una segunda molécula de glutatión regenera la forma activa de la enzima, oxidándose aquel hasta disulfuro (GSSG). Por

-
- Shroyer, N.F.; Hill, K.E.; Burk, R.F.; Willams, C.S. Selenoprotein P influences colitis-induced tumorigenesis by mediating stemness and oxidative damage. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 2646–2660.
143. Nunziata, C.; Polo, A.; Sorice, A.; Capone, F.; Accardo, M.; Guerriero, E.; Marino, F.M.; Orditura, M.; Costantini, S. Structural analysis of human SEPHS2 protein, a selenocysteine machinery component, over-expressed in triple negative breast cancer. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16131.
144. Marcial, M.P.; Hoffmann, P.R. Molecular mechanisms by which selenoprotein K regulates immunity and cancer. *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, *192*, 60–68.
145. Pitts, M.W.; Hoffmann, P.R. Endoplasmic reticulum-resident selenoproteins as regulators of calcium signaling and homeostasis. *Cell. Mol. Biol.* **2018**, *70*, 76–86.
146. Yim, S.H.; Everley, R.A.; Schildberg, F.A.; Lee, S.G.; Orsi, A.; Barbati, Z.R.; Karatepe, K.; Fomenko, D.E.; Tsuji, P.A.; Luo, H.R.; Gygi, S.; Sitia, R.; Sharpe, A.H.; Hatfield, D.L.; Gladyshev, V.N. Role of selenof as a gatekeeper of secreted disulfide-rich glycoproteins. *Cell. Rep.* **2018**, *23*, 1387–1398.
147. Ma, C.; Martínez-Rodríguez, V.; Hoffmann, P.R. Roles for selenoprotein I and ethanolamide phospholipid synthesis in T cell activation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11174.
148. Yan, J.D.; Fei, Y.; Han, Y.; Lu, S.M. Selenoprotein O deficiencies suppress chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *Cell. Biol. Int.* **2016**, *40*, 1033–1040.
149. Kang, D.; Lee, J.; Wu, C.; Guo, X.; Lee, B.J.; Chun, J.S.; Kim, J.H. The role of selenium metabolism and selenoproteins in cartilage homeostasis and arthropathies. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 1198–1208.
150. Muges, G.; Singh, H.B. Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: glutathione peroxidase activity. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 347–357.

tanto, en el proceso global, dos moléculas de glutatión se oxidan a la forma disulfuro y agua, mientras que el hidroperóxido se reduce al alcohol correspondiente o agua (**Esquema 4.5**).¹⁵⁰



Esquema 4.5. Mecanismo catalítico de reducción de peróxidos por la enzima GPx.

Esto ayuda a mantener la integridad de las membranas celulares¹⁵¹ y reduce la probabilidad de propagación del daño oxidativo a biomoléculas como lípidos, lipoproteínas y al ADN.¹⁵²

Uno de los compuestos organoselénicos más estudiados es el ebselén (2-fenilbenzo[d][1,2]selenazol-3(2H)-ona, **Figura 4.8**), el cual a partir de su identificación como excelente mimético de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa, ha sido objeto de diversos estudios.¹⁵³ Recientemente se ha estudiado su uso como antidepresivo (mimético del catión Li^+),¹⁵⁴ antitumoral,¹⁵⁵ anti-Alzheimer,¹⁵⁶ agente antibacteriano¹⁵⁷ y como un posible tratamiento para SARS-CoV-2 (COVID-19).¹⁵⁸

151. Rayman, M.P. The importance of selenium to human health. *Lancet* **2000**, *356*, 233–241.

152. Nève, J. Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Risk* **1996**, *3*, 42–47.

153. Santi, C.; Scimmi, C.; Sancineto, L. Ebselen and analogues: pharmacological properties and synthetic strategies for their preparation. *Molecules* **2021**, *26*, 4320.

154. Ramli, F.F.; Cowen, P.J.; Godlewska, B.R. The potential use of ebselen in treatment-resistant depression. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 485.

155. Feng, Q.; Sun, W.; Li, Y.; Yuan, Y.; Guan, B.; Zhang, S. Discovery of ebselen as an inhibitor of 6PGF for suppressing tumor growth. *Cancer Manag. Res.* **2021**, *12*, 6921–6934.

156. Landgraf, A.D.; Alsegiani, A.S.; Alaql, S.; Thanna, S.; Shah, Z.A.; Sucheck, S. Neuroprotective and anti-neuroinflammatory properties of ebselen derivatives and their potential to inhibit neurodegeneration. *ACS. Chem. Neurosci.* **2020**, *19*, 3008–3016.

157. Chen, C.; Yang, K. Ebselen bearing polar functionality: identification of potent antibacterial agents against multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Bioorg. Chem.* **2019**, *93*, 103286.

158. Sun, L.Y.; Chen, C.; Su, J.; Li, J.Q.; Gao, H.; Chigan, J.Z.; Ding, H.H.; Zhai, L.; Yang, K.W. Ebsulfur and ebselen as highly potent scaffolds for the development of potential SARS-CoV-2 antivirals. *Bioorg.Chem.* **2021**, *112*, 104889.

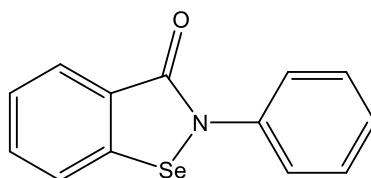


Figura 4.8. Estructura del ebselén.

Los grupos de investigación donde se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral poseen una amplia experiencia en la preparación de compuestos organoselénicos (**Figura 4.9**) con actividad antiproliferativa (ej. **34**, **35**, **39**),¹⁵⁹⁻¹⁶¹ antioxidantes (ej. **36**, **37**),¹⁶² inhibidores de glicosidasas (**38**)¹⁶³ o anti-Alzheimer (**38**, **39**),¹⁶¹ en este último caso inhibiendo enzimas clave de la enfermedad, como la AChE (acetilcolinesterasa) o BuChE (butirilcolinesterasa).

-
159. Begines, P.; Sevilla-Horrillo, L.; Puerta, A.; Puckett, R.; Bayor, S.; Lagunes, I.; Maya, I.; Padrón, J.M.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J.G. Masked phenolic-selenium conjugates: potent and selective antiproliferative agents overcoming P-gp resistance. *Pharmaceuticals*. **2020**, *12*, 358.
160. Fuentes-Aguilar, A. Romero-Hernández, L.L.; Arenas-González, A.; Merino-Montiel, P.; Montiel-Smith, S.; Meza-Reyes, S.; Vega Baez, J.L.; Plata, G.B.; Padrón, J.M.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J.G. New selenosteroids as antiproliferative agents. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 5041–5054.
161. Roldán-Peña, J.M.; Alejandre-Ramos, D.; López, Ó.; Maya, I.; Lagunes, I.; Padrón, J.M.; Peña-Altamira, L.E.; Bartolini, M.; Monti, B.; Bolognesi, M.L, Fernández-Bolaños, J.G. New tacrine dimers with antioxidant linkers as dual drugs: Anti-Alzheimer's and antiproliferative agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 761–773.
162. Begines, P.; Martos, S.; Lagunes, I.; Maya, I.; Padrón, J.M.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J.G. Chemoselective preparation of new families of phenolic-organoselenium hybrids-a biological assessment. *Molecules*, **2022**, *27*, 1315.
163. Olsen, J.I.; Plata, G.B.; Padrón, J.M.; López, Ó.; Bols, M.; Fernández- Bolaños J.G. Selenoureido- iminosugars: a new family of multitarget drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *123*, 155–160.

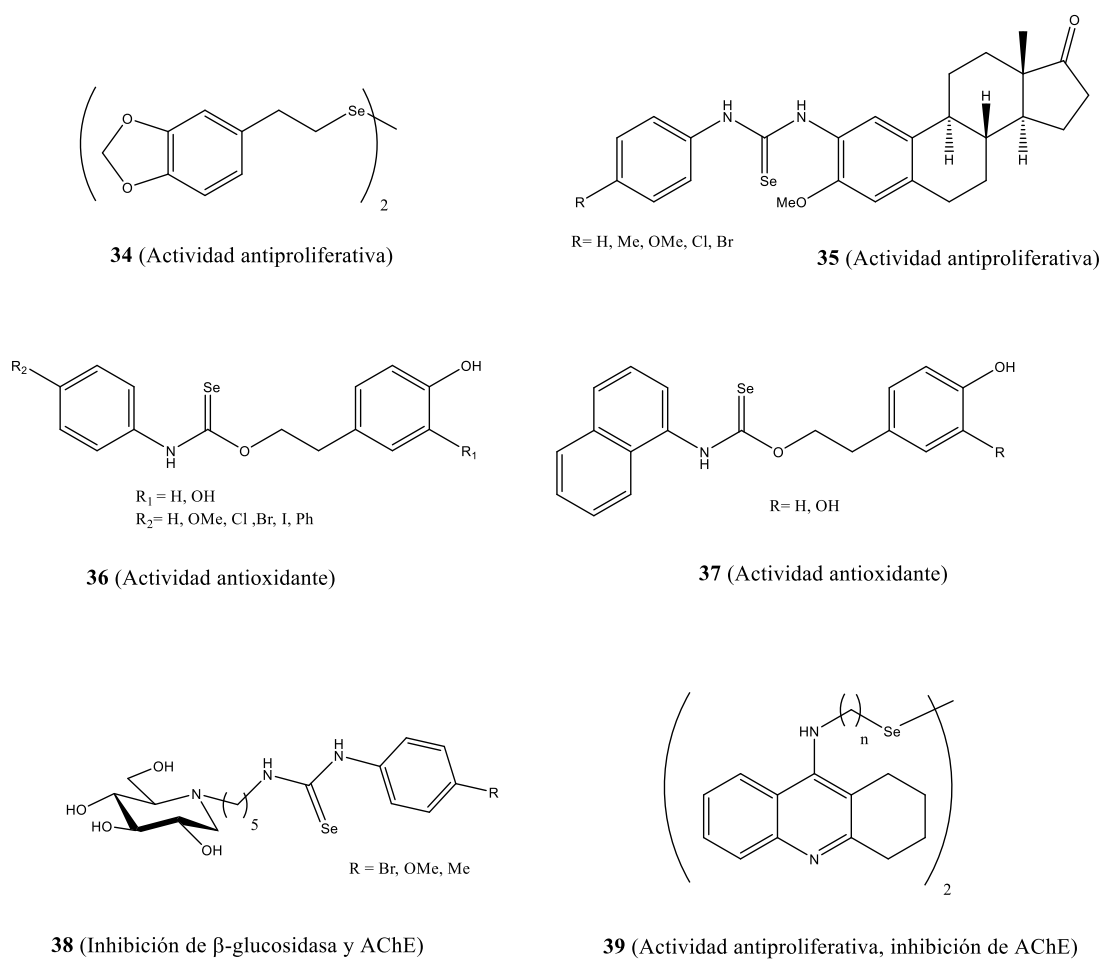


Figura 4.9. Ejemplos de derivados organoselénicos con diferentes actividades biológicas.

En conexión con las CAs, Angeli *et al.*¹⁶⁴ evaluaron una serie de selenoureas *N*-aciladas derivadas de arilsulfonamidas **40–44** (Figura 4.10) como inhibidores de las CAs I, II, VII y IX. Los compuestos se sintetizaron siguiendo el método de Koketsu *et al.*¹⁶⁵ Se obtuvo así el correspondiente *N*-acil isoselenocianato mediante reacción de diversos cloruros de ácido con $KSeCN$, seguido de reacción *in situ* con las amino benzenosulfonamidas comerciales.

Estos compuestos mostraron excelente actividad de inhibición para todas las isoformas, alcanzándose en algunos casos el rango nanomolar y con una cierta selectividad por la isoforma CA IX.

164. Angeli, A.; Carta, F.; Bartolucci, G.; Supuran C.T. Synthesis of novel acyl selenourea benzene sulfonamides as carbonic anhydrase I, II, VII and IX inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 3567–3573.

165. Koketsu, M.; Yamamura, Y.; Aoki, H.; Ishihara, H. The preparation of acylselenourea and selenocarbamate using isoselenocyanate. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **2006**, *181*, 2699–2708.

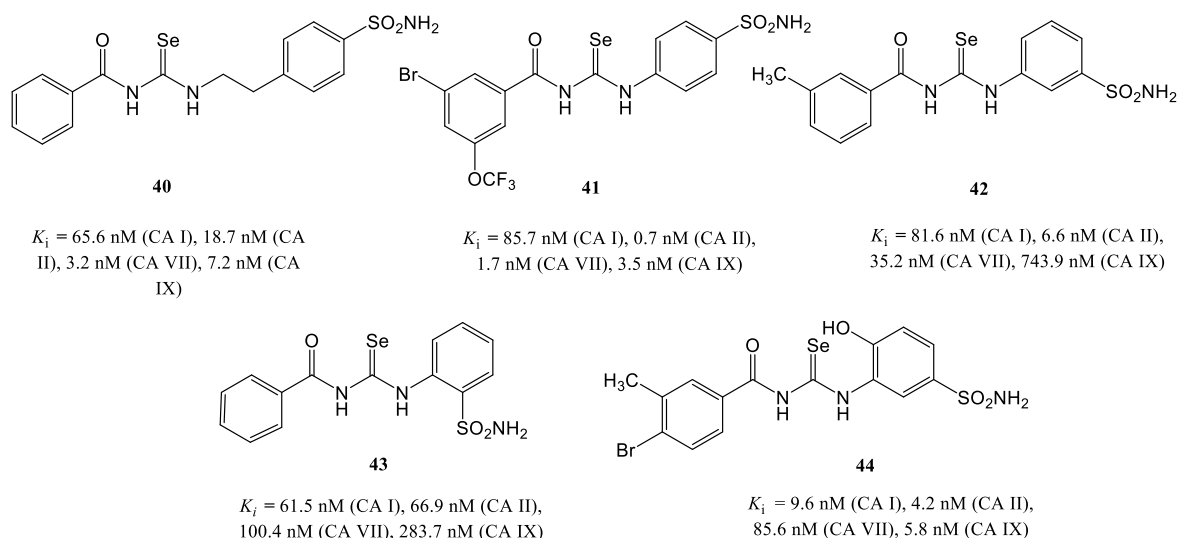


Figura 4.10. Estructura de selenoureas *N*-aciladas derivadas de arilsulfonamidas.

Recientemente, ciertos alquil-¹⁶⁶ y arilselenoles¹⁶⁷ se han identificado como nuevos quimiotipos de inhibidores de anhidrasas carbónicas, de estructura muy diferente a los inhibidores clásicos.

Bases de Schiff

De acuerdo con la IUPAC, se considera como bases de Schiff a las iminas, es decir, el producto de condensación entre una amina primaria y un aldehído o cetona, y por tanto, con fórmula general $R_3N=CR_1R_2$, donde R_1 , R_2 y R_3 podrían ser un grupo alquilo, arilo, heteroarilo o cicloalquilo, o H, salvo R_3 (**Figura 4.11**); algunos autores se refieren a estos compuestos como derivados de tipo azometino.¹⁶⁸

El enlace C=N (imino) en las bases de Schiff juega un papel único al conferirle importantes actividades biológicas. En dicho enlace, el átomo de carbono muestra un carácter electrófilo, mientras que el átomo de nitrógeno se comporta como nucleófilo, lo cual abre un amplio abanico de interacciones con numerosas especies, permitiendo a muchos de estos derivados comportarse como inhibidores enzimáticos, o actuar sobre la replicación de ADN.¹⁶⁹

166. Tanini, D.; Capperucci, A.; Ferraroni, M.; Carta, F.; Angeli, A.; Supuran, C.T. Direct and straightforward access to substituted alkyl selenols as novel carbonic anhydrase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *185*, 111811.

167. Angeli, A.; Tanini, D.; Nocentini, A.; Capperucci, A.; Ferraroni, M.; Gratteri, P.; Supuran, C.T. Selenols: a new class of carbonic anhydrase inhibitors. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 648–651.

168. IUPAC Gold Book, <https://goldbook.iupac.org/terms/view/S05498>. Último acceso: 24/05/2022.

169. da Silva, C.M.; da Silva, D.L.; Mondolo, L.V.; Alves, R.B.; De Resende, M.A.; Martis, C.V.B.; de Fatima, A. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *J. Adv. Res.* **2011**, *2*, 1–8.

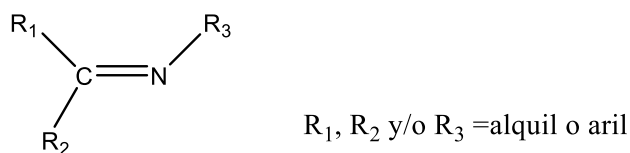


Figura 4.11. Estructura general de una base de Schiff.

Las bases de Schiff poseen una muy amplia variedad de aplicaciones, y se utilizan como pigmentos y tintes, así como catalizadores, intermediarios en síntesis orgánica y estabilizadores de polímeros.¹⁷⁰ También se ha demostrado que las bases de Schiff exhiben una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo antifúngicas,¹⁷¹ antibacterianas,¹⁷¹ antimaláricas,¹⁷² antiproliferativas,¹⁷³ antivirales¹⁷⁴ o propiedades antipiréticas,¹⁷⁵ entre otras.

Las bases de Schiff también se emplean como ligandos versátiles para coordinarse con una amplia variedad de iones metálicos en diferentes geometrías de coordinación y estados de oxidación. Se sabe que las bases de Schiff forman complejos con todos los metales del bloque d así como con lantánidos a través del nitrógeno azometínico.¹⁷⁶ Los complejos metálicos ocupan un lugar único en la Química Médica debido a sus diversas propiedades biológicas.¹⁷⁷ Los complejos metálicos de iminas derivados de sulfonamidas^{178,179} mostraron diferentes propiedades biológicas.

-
170. Ceramella, J.; Iacopetta, D.; Catalano, A.; Cirillo, F.; Lappano, R.; Sinicropi, M.S. A review on the antimicrobial activity of Schiff bases: data collection and recent studies. *Antibiotics* **2022**, *11*, 191.
171. Chen, Y.; Mi, Y.; Li, Q.; Dong, F.; Gou, Z. Synthesis of Schiff bases modified inulin derivatives for potential antifungal and antioxidant applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *143*, 714–723.
172. Savir, S.; Wei, Z.J.; Liew, J.W.K.; Vythilingam, I.; Lim, Y.A.L.; Saad, H.M.; Sim, K.S.; Tan, K.W. Synthesis, cytotoxicity and antimarial activities of thiosemicarbazones and their nickel(II) complexes. *J. Mol. Struct.* **2020**, 1211, 128090.
173. Al Rasheed, H.H.; Malebari, A.M.; Dahlous, K.A.; Fayne, D.; El-Faham, A. Synthesis anti-proliferative activity and molecular docking study of new series of 1,3-5-triazine Schiff base derivatives. *Molecules* **2020**, *25*, 4065.
174. Wang, y.y; Xu, F.Z.; Zu, Y.Y.; Song, B.; Luo, D.; Yu, G.; Chen, S.; Xue, W.; Wu, J. Pyrazolo[3, 4-d]pyrimidine derivatives containing a Schiff base moiety as potential antiviral agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 2979–2984.
175. Chen, Y.; Li, P.; Su, S.; Chen, M.; He, J.; Liu, L.; He, M.; Wang, H.; Xue, W. Synthesis and antibacterial and antiviral activities of myricetin derivatives containing a 1,2,4 triazole Schiff base. *RSC. Adv.* **2019**, *9*, 23045–23052.
176. Humeed, A.; Al-Rashida, M.; Uroos, M., Khan, K.M. Schiff bases in medicinal chemistry: a patent review (2010-2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, *27*, 63–79.
177. Singh, K.; Kumar, Y.; Puri, P.; Sharma, C.; Aneja, K.R. Metal-based biologically active compounds: synthesis, spectral, antimicrobial studies of cobalt, nickel and zinc complexes of triazole-derived Schiff bases. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2011**, *2011*, 1–10.
178. Chohan, Z.H.; Hernandez, M.Z.; Sensato F.R.; Moreira, D.R.M.; Alves-Perieria, V.R.; de Andrade J.K.; Pereira-Oliveira A.; Coutinho de Oliveira, B.; Lima-Leite, A.C. Sulfonamide–metal complexes endowed with potent anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2014**, *29*, 230–236.
179. Chohan, Z.H.; Shad, H.A. Sulfonamide-derived compounds and their transition metal complexes: synthesis, biological evaluation and X-ray structure of 4-bromo-2-[(E)-{4-[(3,4-dimethylisoxazol-5-yl)sulfamoyl]phenyl} iminiomethyl] phenolate. *Appl. Organomet. Chem.* **2011**, *25*, 591–600.

Entre ellos, las bases de Schiff con sulfonamidas son potentes inhibidores de las enzimas anhidrasas carbónicas.^{180,181}

Existen otras familias de compuestos que, si bien desde un punto de vista estricto, no pueden considerarse como bases de Schiff, sí son análogos estructurales de estas al poseer un enlace de tipo imino, y también son destacables por sus marcadas propiedades biológicas; dichos compuestos son las oximas, hidrazonas, carbazonas, tiosemicarbazonas, o sus selenoderivados, así como sus complejos metálicos. De hecho, numerosos autores las engloban también en la bibliografía, de manera errónea desde un punto de vista formal, en el concepto de base de Schiff. En este capítulo de la Tesis Doctoral nos centraremos en las tio- y selenosemicarbazonas.

Tiosemicarbazonas

Las tiosemicarbazonas tienen la estructura general mostrada en la **Figura 4.12** y se obtienen por condensación con catálisis ácida entre un aldehído/cetona y una tiosemicarbazida. Estos compuestos orgánicos tienen diversas aplicaciones de síntesis y biológicas, así como medicinales y farmacéuticas.¹⁸²

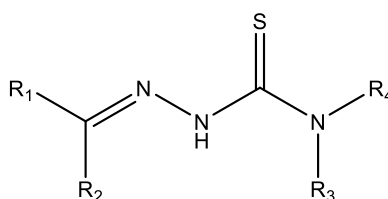


Figura 4.12. Estructura general de una tiosemicarbazona.

Las tiosemicarbazonas son bien conocidas por su amplio espectro biológico. Por ejemplo, la tiosemicarbazona derivada del *p*-acetilaminobenzaldehído **45** se usó para tratar la tuberculosis después de la Segunda Guerra Mundial,¹⁸³ mientras que la tiosemicarbazona derivada de 2-formilpiridina **46**¹⁸⁴ fue el primer representante de este tipo de compuestos con actividad anticancerígena (**Figura 4.13**). La triapina **47** es una

-
180. Alyar, S.; Ozmen, U.O.; Ademn, S.; Aylar, H.; Bilen, E.; Kaya, K. Synthesis, spectroscopic characterizations, carbonic anhydrase II inhibitory activity, anticancer activity and docking studies of new Schiff bases of sulfa drugs. *J. Mol. Struct.* **2021**, *1223*, 128911.
181. El-Azab, A.S.; Abdel-Aziz, A.A.M.; Bua, S.; Nocentini, A.; Alanazi, M.M; Alsaif, N.A.; Al-Suwaidan, I.A.; Hefnawy, M.M; Supuran, C.T. Synthesis and comparative carbonic anhydrase inhibition of new Schiff's bases incorporating benzenesulfonamide, methanesulfonamide, and methylsulfonylbenzene scaffolds. *Bioorg. Chem.* **2019**, *92*, 103225.
182. Islam, M.; Khan, A.; Shehzad, M.T.; Hameed, A.; Ahmed, N.; Ahsan, S.; Khiat, M.; Anwar, M.U.; Hussain, J.; Csuk, R.; Shafiq, Z.; Al-Harrasi, A. Synthesis and characterization of new thiosemicarbazonas, as potent urease inhibitors: *In vitro* and *in silico* studies. *Bioorg. Chem.* **2019**, *87*, 155–162.
183. Steinhagen, H. The evolution of drug discovery: from traditional medicines to modern drugs. *ChemMedChem*, **2011**, *6*, 1746–1747.
184. Brockman, R.W.; Thomson, J.R.; Bell, M.J.; Skipper, H.E. Observations on the antileukemic activity of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and thiocarbohydrazone. *Cancer Res.*, **1956**, *16*, 167–170.

tiosemicarbazona que ha obtenido un enorme interés como agente quimioterapéutico en el tratamiento del cáncer.¹⁸⁵ Desafortunadamente, tras varios estudios clínicos se abandonó debido a sus efectos secundarios y respuesta limitada sobre algunos tipos de cáncer.¹⁸⁶

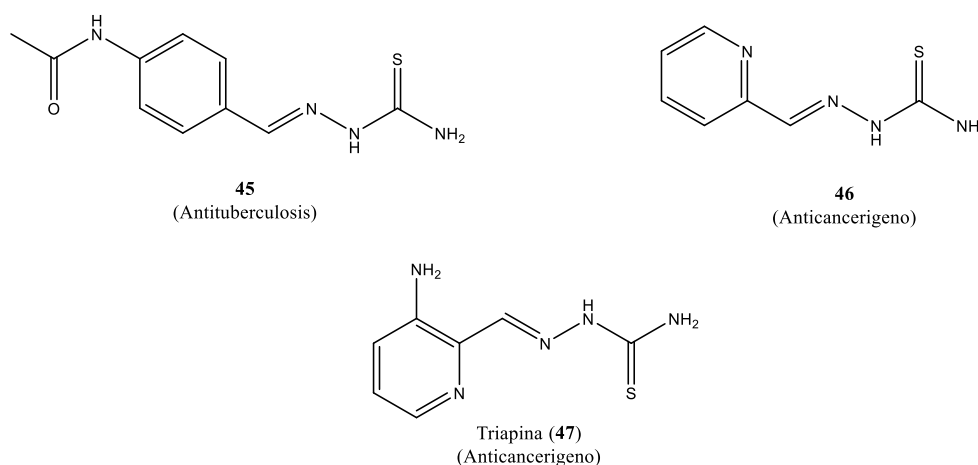


Figura 4.13. Estructuras de algunas tiosemicarbazonas con actividades farmacológicas relevantes.

Entre las numerosas actividades biológicas exhibidas por las tiosemicarbazonas, destacan las antibacterianas,¹⁸⁷ antifúngicas,¹⁸⁸ antidiabéticas,¹⁸⁹ antitumorales,¹⁹⁰ antiproliferativas,¹⁹¹ anticorrosivas¹⁹² o antiinflamatorias.¹⁹³

-
185. Finch, R.A.; Liu, M.C.; Cory, A.; Cory J.G.; Sartorelli, A.C. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, 3-AP): an inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity. *Adv. Enzyme Regul.* **1999**, *39*, 3–12.
186. Traynor, A.M.; Lee, J.W.; Bayer, G.K.; Tate, J.M.; Thomas, S.P.; Mazurczak, M.; Graham, D.L.; Kolesar J.M.; Schiller, J.H. A phase II trial of triapine (NSC# 663249) and gemcitabine as second line treatment of advanced non-small cell lung cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study 1503. *Invest. New Drugs* **2010**, *28*, 91–97.
187. Hassan, M.; Ghaffari, R.; Sardari, S.; Farahani, Y.F.; Mohebbi, S. Discovery of novel isatin-based thiosemicarbazones: synthesis, antibacterial, antifungal, and antimycobacterial screening. *Res. Pharm. Sci.* **2020**, *15*, 281–290.
188. Bajaj, K.; Buchanan, R.M.; Grapperhuas, C.A. Antifungal activity of thiosemicarbazones, bis(thiosemicarbazones), and their metal complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *225*, 111620.
189. Shehzad, M.T.; Hameed, A.; Al-Rashida, M.; Imran, A.; Uroos M.; Asari, A.; Mohamad, I.; Iftik, S.; Shafiq, Z.; Iqbal, J. Benzoxanone-thiosemicarbazone as antidiabetic leads via aldose reductase inhibition: Synthesis, biological screening and molecular docking study. *Bioorg. Chem.* **2019**, *92*, 103244.
190. Yee, E.M.H.; Brandl, M.B.; Black, D.S.; Vittorio, O.; Kumar, N. Synthesis of isoflavene-thiosemicarbazone hybrids and evaluation of their anti-tumor activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2454–2458.
191. Qi, j.; Qian, K.; Tian, L.; Cheng, Z.; Yan, D.; Wang, Y. Synthesis, antiproliferative activity and mechanism of gallium(III)-thiosemicarbazone complexes as potential anti-breast cancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *154*, 91–100.
192. Zang, H.H.; Chen, Y.; Zhang, Z. Comparative studies of two benzaldehyde thiosemicarbazone derivatives as corrosion inhibitors for mild steel in 1.0 M HCl. *Results Phys.* **2018**, *22*, 554–563.
193. Kanso, F.; Khalil, A.; Noureddine, H.; El-Makhour, Y. Therapeutic perspective of thiosemicarbazones derivatives in inflammatory pathologies: a summary of *in vitro/in vivo* studies. *Int. Immunopharmacol.* **2021**, *96*, 10778.

Los derivados de tiosemicarbazonas constituyen unos ligandos versátiles en la formación de complejos metálicos, confiriendo una elevada estabilidad a los mismos.

Pueden coordinarse como moléculas neutras o tras desprotonación como ligandos aniónicos y pueden adoptar una variedad de modos de coordinación. La capacidad quelatante del resto de la tiosemicarbazona puede aumentar al insertar algún átomo donador para convertirlo en un ligando polidentado.¹⁹⁴ Se ha comprobado que la complejación de numerosas tiosemicarbazonas con un amplio abanico de iones metálicos mejoran las propiedades citotóxicas hacia las células tumorales.¹⁹⁵

Las tiosemicarbazonas heterocíclicas han despertado un interés considerable debido a su capacidad para difundirse a través de la membrana semipermeable de las células. Estos compuestos muestran actividades biológicas como antibacterianos,¹⁹⁶ antipalúdicos,¹⁹⁷ antivirales¹⁹⁸ y antitumorales.¹⁹⁹

Su actividad anticancerígena se debe principalmente a la capacidad de inhibición de alguno de los procesos mencionados a continuación. Por un lado, la inhibición de la ribonucleótido reductasa (RR), que contiene hierro y que participa en el paso limitante de la velocidad de síntesis del ADN.²⁰⁰

Recientemente se descubrió que ciertas tiosemicarbazonas son también inhibidores de los transportadores ABC (sistema de excreción de xenobióticos), que desempeñan un papel clave en el desarrollo de la resistencia a múltiples fármacos. Por tanto, las tiosemicarbazonas pueden ser de gran utilidad en uno de los principales problemas que surge en la quimioterapia del cáncer, como es la quimiorresistencia.²⁰⁰

-
194. Belicchi-Ferrai, M.; Biscegli, F.; Pelosi, G.; Pinelli, S.; Tarascani, P. Crystal structure and antiproliferative *in vivo* activity of long chain aliphatic thiosemicarbazone and their Ni(II) complexes. *Polyhedron* **2007**, *26*, 5150–5161.
 195. Pitucha M.; Plewko-Korga, A.; Czyrkowska, A.; Rogalewics, B.; Drozd, M.; Iwan, M.; Kubik, J.; Humeniuk, E.; Adamczuk, G.; Karczmarzyk, Z.; Fornal, E.; Wysocki, W.; Bartnik, P. Influence of complexation of thiosemicarbazone derivatives with Cu(II) ion and their antitumoral activity against melanoma cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3104.
 196. Kumar, V.A.; Sarala, Y.; Sikkikha, S.; Vanitha, S.; Babu, S.; Reddy, V. Synthesis, characterization antimicrobial and antioxidant activities of 2,4-dihydroxybenzaldehyde,4-phenyl-3thiosemicarbazone (DHBPTSC) and its Pd(II), Ni(II) dppm mixed ligand and Cu(II) complex having heterocyclic bases. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2018**, *8*, 71–78.
 197. Matsa, R.; Makam, P.; Kaushik, M.; Hoti, S.L.; Kannan, T. Thiosemicarbazone derivatives, design, synthesis and *in vitro* antimalarial activity studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *137*, 104986.
 198. Sevincli, Z.S.; Duran, G.N.; Ozbil, M.; Karali, N. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of new amides of 4-chlorothiocolchicine as anticancer agents. *Bioorg. Chem.* **2020**, *104*, 104202.
 199. Malik, M.A.; Dar, O.A.; Gull, P.; Wani, M.Y.; Hashmi, A.A. Heterocyclic Schiff base transition metal complexes in antimicrobial and anticancer chemotherapy. *MedChemComm*, **2018**, *9*, 409–436.
 200. Zhao, Y.; Wang, L.; Gou, C.; Li, X.; Liu, K.; Shi, D. Metal complex of the thiosemicarbazones as potent anticancer agents: a minireview. *Med. Res.* **2018**, *2*, 180009.

Sibuh *et al.*²⁰¹ sintetizaron y evaluaron la actividad antitumoral de las tiosemicarbazonas derivadas del 2- y 4-hidroxibenzaldehído (2-HBTSc y 4-HBTSc) (**Figura 4.14**) frente a la línea celular MCF-9 (cáncer de mama), encontrándose valores de IC_{50} de 3.36 $\mu\text{g/ml}$ y 3.60 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Con un aumento de la dosis de 5 a 20 $\mu\text{g/ml}$, la inhibición del crecimiento tumoral osciló entre el 38–49% en las células tratadas con 4-HTBSc y entre el 19–25% en las células tratadas con 2-HBTSc.

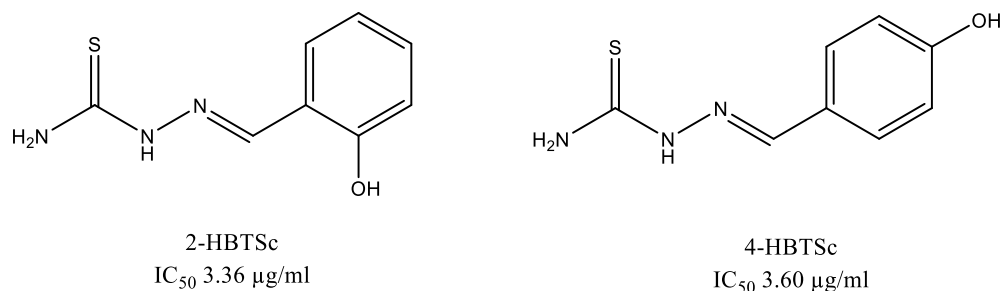


Figura 4.14. Estructuras de las tiosemicarbazonas derivadas del 2- y 4-hidroxibenzaldehído.

Conjugando tiosemicarbazonas y sulfonamidas, el hilo conductor de este capítulo, Karili *et al.*²⁰² describieron la síntesis de nuevos derivados de 2-indolinona (isatina) con arilsulfonamidas (**48**, **Figura 4.15**).

Los ensayos de inhibición enzimática indicaron que los compuestos sintetizados mostraron selectividad frente a las enzimas CA IX ($K_i = 13.3\text{--}66.3$ nM) y CA XII ($K_i = 1.2\text{--}87.3$ nM), generalmente con mayor potencia hacia esta última. De hecho, los únicos compuestos con mayor actividad frente a CA IX son aquellos que presentan sustituyentes de tipo F o Cl en las posiciones 7 y 5 (7-F, 7-Cl, 5,7-diCl), con valores de $K_i = 45.5$ nM, 87.3 nM y 82.3 nM, respectivamente para CA XII, frente a $K_i = 20.8$, 13.3 y 21.3, respectivamente para CA IX. Sin embargo, el compuesto que incorpora un patrón de sustitución de tipo 5,7-diBr presentó de nuevo una mejora de la inhibición frente a CA XII de unas 9 veces, con $K_i = 6.3$ nM. Por otra parte, parece que los sustituyentes cargados negativamente en la posición 5, como el 5- NO_2 y 5- SO_3Na mejoran la actividad de la CA XII, conduciendo a los compuestos más activos de la serie ($K_i = 1.2$ nM y 4.1 nM respectivamente).

201. Sibuh, B.Z.; Khanna, S.; Taneja, P.; Sarkar, P.; Taneja, N.K. Molecular docking, synthesis and anticancer activity of thiosemicarbazone derivatives against MCF-7 human breast cancer cell line. *Life Sci.* **2021**, *273*, 119305.

202. Karali, N.; Akdemir, A.; Goktas F.; Elma, P.E; Angeli, A.; Kizilirmak, M.; Supuran C.T. Novel sulfonamide-containing 2-indolinones that selectively inhibit tumor-associated alpha carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *14*, 3714–3718.

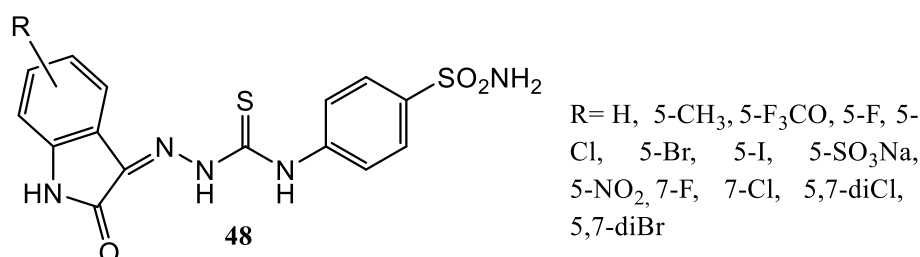


Figura 4.15. Estructura de nuevas tiosemicarbazonas derivadas de isatina y arilsulfonamidas **48**.

Selenosemicarbazonas

Las selenosemicarbazonas (**Figura 4.16**) se obtienen mediante condensación entre un aldehído/cetona y una selenosemicarbazida. Son una clase de compuestos orgánicos que se han investigado principalmente por sus propiedades antimicrobianas y antipalúdicas, así como antiparasitarias.²⁰³

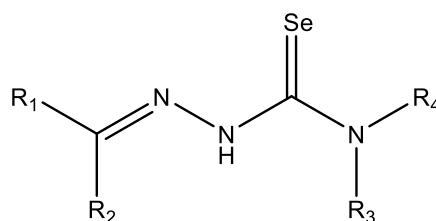


Figura 4.16. Estructura general de las selenosemicarbazonas.

Numerosas selenosemicarbazonas poseen también actividad antiproliferativa destacable sobre varias líneas celulares tumorales.^{160,204} Ciertos complejos metálicos de selenosemicarbazonas indujeron apoptosis a través de la ruta de la mitocondria en células cancerosas;²⁰⁵ además algunos complejos con Ni(III) de selenosemicarbazonas inhibieron eficazmente la metástasis y la angiogénesis en las células de cáncer de mama.²⁰⁶ Las selenosemicarbazonas de compuestos aromáticos pueden actuar como ligandos mono o bidentados; la capacidad de coordinación puede extenderse mediante la presencia de nitrógenos adicionales adecuados para formar el quelato.²⁰⁷

203. Alcolea, V.; Silanes-Pérez, S. Selenium as an interesting option for the treatment of Chagas disease: a review. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *206*, 112673.

204. Calcaterra, V.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J.G.; Plata, G.B.; Padrón, J.M. Phenolic thio- and selenosemicarbazonas as multi-target drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *94*, 63–72.

205. Srdic-Rajic, T.; Zec, M.; Todorovic, T.; Andelkovic, K.; Radulovic, S. Non-substituted *N*-heteroaromatic selenosemicarbazonas metal complexes induce apoptosis in cancer cells via activation of mitochondrial pathway. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3734–3747.

206. Zec, M.; Srdic-Rajic, T.; Konic-Ristic, A.; Todorovic, T.; Andjelkovic, K.; Filipovic-Ljeskovic, I.; Radulovic, S. Anti-metastatic and anti-angiogenic properties of potential new anti-cancer drugs based on metal complexes of selenosemicarbazonas. *Anti Cancer Agents Med. Chem.* **2012**, *12*, 1071–1080.

207. Dekansky, D.; Todorovic, T.; Mitic, D.; Filipovic, N.; Polovic, N.; Andelkovic, K. High antioxidative potential and low effects of selenosemicarbazone metal complexes. *J. Serb. Chem. Soc.* **2013**, *78*, 1503–1512.

Actividad antiparasitaria de bases de Schiff y análogos

Una actividad biológica interesante que presentan tanto las tiosemicarbazonas como las selenosemicarbazonas, y que será abordada en la última parte de este capítulo, es la antiparasitaria. En el caso de las tiosemicarbazonas se ha observado que tienen actividad frente a *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*.

Se sabe que los protozoos causan enfermedades en los humanos y representan una amenaza para la salud y son responsables de infectar a cientos de millones de personas, lo que lleva a la muerte de más de un millón de personas cada año en todo el mundo;²⁰⁸ algunas de estas enfermedades se han clasificado en un grupo llamado Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTDs, *Neglected Tropical Diseases*).²⁰⁹ A pesar de la clara necesidad clínica para el tratamiento de estas infecciones hay muy poco desarrollo de nuevos medicamentos.²¹⁰

El desarrollo de vacunas exitosas es un objetivo que aún no se ha alcanzado, y por otra parte, los agentes quimioterapéuticos que se encuentran disponibles son fármacos antiguos que están desarrollando quimiorresistencia y tienen graves efectos secundarios y baja eficacia. Además, su precio elevado, junto con los complejos protocolos de administración hace que no sean accesibles para países subdesarrollados.²¹³ Es por ello que la necesidad de desarrollo de nuevos fármacos antiprotozoarios ha impulsado la investigación y el desarrollo de estrategias innovadoras para garantizar el descubrimiento de nuevos compuestos con un perfil farmacológico adecuado frente a estas enfermedades parasitarias.²¹¹

Entre ellas destaca la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, identificado en la primera década del siglo XX.²¹² La infección se produce por el contacto del hombre con heces u orina de insectos triatomíneos infectados, pero también se puede transmitir por vías no vectoriales, como la iatrogénica y la congénita.²¹³ El ciclo de vida del parásito consta de tres etapas: epimastigotes (forma extracelular y replicativa que se encuentra en el intestino del vector), amastigotes (forma intracelular y proliferativa del hospedador vertebrado) y

208. Rawat, A.; Roy, M.; Jyoti, A.; Kaushij, S.; Verma, K.; Srivastava, K.V. Cysteine proteases: battling pathogenic parasitic protozoans with omnipresent enzymes. *Microbiol. Res.* **2021**, *249*, 16784.

209. Molyneux, D.H.; Savioli, L.; Engeles, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. *Lancet* **2017**, *398*, 312–325.

210. Koning, H.P. Drug resistance in protozoan parasites. *Emerg. Top. Life. Sci.* **2017**, *1*, 627–632.

211. Capela, R.; Moreira, R.; Lopes, F. An overview of drug resistance in protozoal diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5748.

212. Pérez-Molina, J.A.; Molina, I. Chagas disease. *Lancet* **2017**, *17*, 31612–31614.

213. OMS. WHO. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(ntiprot-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(ntiprot-trypanosomiasis)). Último acceso: 25/05/2022.

tripomastigotes (estado extracelular y no replicativo que se encuentra en el torrente sanguíneo).^{214,215}

Clínicamente tiene dos fases: una temprana que dura pocas semanas y se caracteriza por fiebre y numerosos parásitos en el torrente sanguíneo, y la fase crónica, que se puede clasificar en indeterminada y determinada. En la primera se caracteriza por un estado febril y pocos parásitos en el torrente sanguíneo, mientras que la forma determinada se manifiesta con cambios cardíacos, digestivos y neurológicos.²¹⁶

A pesar de que fue descrita hace más de un siglo, sólo existen en la actualidad dos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: el benznidazol y nifurtimox (**Figura 4.17**), que se desarrollaron hace más de 40 años. Ambos fármacos, con estructuras de tipo nitroheterocíclica (imidazol, furano) producen efectos secundarios significativos y muestran baja eficacia para la fase crónica de la enfermedad.²¹⁷

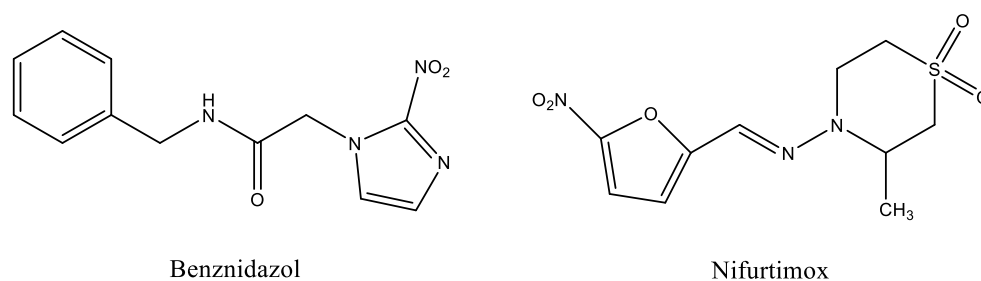


Figura 4.17. Estructura de los dos fármacos disponibles para la enfermedad de Chagas.

En este contexto, las tiosemicarbazonas surgieron como una alternativa interesante. Du *et al.*²¹⁸ publicaron un estudio exhaustivo de más de cien tiosemicarbazonas derivadas de aldehídos y cetonas y encontraron que muchas de ellas resultaron activas frente a *T. cruzi*, destacándose la tiosemicarbazona de la 3'-bromopropiofenona **49** (**Figura 4.18**). Dado que el selenio posee propiedades electrónicas similares al azufre se llevó a cabo el replazo del azufre por el selenio,²¹⁹ sintetizándose algunas seleniosemicarbazonas también activas frente a *T. cruzi*, como **50** (**Figura 4.18**). En cuanto al mecanismo de acción, se ha demostrado que la diana

-
214. Brindha, J.; Balamurali, M.M; Kaushik, C. An overview on the therapeutics of neglected infectious diseases- Leishmaniasis and Chagas diseases. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 622286.
215. Teixeira, D.E.; Benchimol, M., Crepaldi, P.H.; de Souza, W.; Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1749.
216. Scarim, C.B.; Jornada-Hartmann, D.; Consolin-Chelucci, R.; Almeida, L.; dos Santos, J.L.; Chin, C.M. Current advances in drug discovery for Chagas disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 824–838.
217. Villalta, F.; Rachakonda, G. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. *Expert. Opin. Drug. Discov.* **2019**, *14*, 1161–1174.
218. Du, X., Guo, C.; Hansell, E.; Doyle, P. S.; Caffrey, C. R.; Holler, T. P.; McKerrow, J. H.; Cohen, F. E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2695–2707.
219. Pizzo, C.; Faral-Tello, P.; Salinas, G.; Flo, M.; Robello, C.; Wipf, P.; Maheler, S.G. Seleniosemicarbazonas as potent cruzipain inhibitors and their antiparasitic properties against *Trypanosoma cruzi*. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 362–368.

biológica de muchas tiosemicarbazonas y selenosemicarbazonas activas frente a *T. cruzi* resulta ser la cruzipaina.²²⁰ Esta enzima es una cisteína proteasa esencial en el ciclo de vida del parásito que participa en la infección y la replicación de *T. cruzi* en las células huésped, por lo cual ha surgido como una diana validada para el desarrollo de nuevos fármacos antitripanosomales.²²¹

Greenbaum *et al.*²²² describieron la actividad de una librería de tiosemicarbazonas como inhibidores de las cisteína proteasas de los parásitos *P. falciparum*, *T. brucei* y *T. cruzi*.

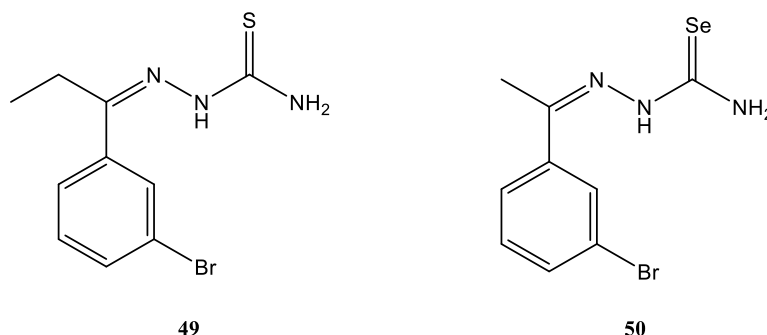


Figura 4.18. Ejemplos de tiosemicarbazona y selenosemicarbazona como inhibidores de cruzipaina.

Por otra parte, existen infecciones de transmisión sexual curables (ITS), entre las que encontramos clamidia, gonorrea y sífilis, causadas por bacterias, mientras que la tricomoniasis es provocada por un protozoo flagelado.²²³

La tricomoniasis humana se ha caracterizado como una infección parasitaria desatendida y representa más del 40% de las ITS curables pero representa un grave riesgo para la salud,²²⁴ ya que puede aumentar la susceptibilidad al VIH, al virus del papiloma humano (VPH) o hasta infecciones por el virus del herpes simple (HSV), así como favorecer el desarrollo de cáncer de cuello uterino o de próstata.²²³ Es por ello

220. Duschak, V. G.; Couto, A. S. Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*; a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review. *Curr. Med. Chem.*, **2009**, *16*, 3174–3202.

221. Ndao, M.; Beaulieu, C.; Black, W. C.; Isabel, E.; Vasquez-Camargo, F.; NathChowdhury, M.; Massé, F.; Mellon, C.; Methot, N.; Nicoll-Griffith, D. A. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for Chagas disease cure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 1167–1178.

222. Greenbaum, D. C., Mackey, Z., Hansell, E., Doyle, P., Gut, J., Caffrey, C. R., Lehrman, J., Rosenthal, P. J., McKerrow, J. H., Chibale, K. Synthesis and biochemical evaluation of benzoylbenzophenone thiosemicarbazone analogues as potent and selective inhibitors of cathepsin L. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 3212–3219.

223. Menezes, C.B.; Frason, A.P.; Tasca, T. Trichomoniasis-are we giving the deserved attention to the most non-vital sexually transmitted disease worldwide? *Micro. Cell.* **2016**, *3*, 404–419.

224. Mielczarek, E.; Blaszowska, J. *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. *Infection* **2016**, *44*, 447–458.

que se ha manejado de manera positiva el impacto del tratamiento de la tricomoniasis en la prevención de la transmisión VIH.²²⁵

Para el tratamiento de la tricomoniasis hoy en día hay dos fármacos disponibles, de nuevo de tipo nitroheterociclos, en concreto, derivados del imidazol. En 1959 fue descubierto el metronidazol (MTZ), que sigue siendo el fármaco de referencia, mientras que el tinidazol fue aprobado en 2004 (**Figura 4.19**). Debido a la existencia de tan sólo dos fármacos para la tricomoniasis, el paciente se enfrenta a un problema serio cuando surge farmacorresistencia, efectos secundarios o hipersensibilidad, ya que no se dispone de ningún tratamiento alternativo.²²⁶

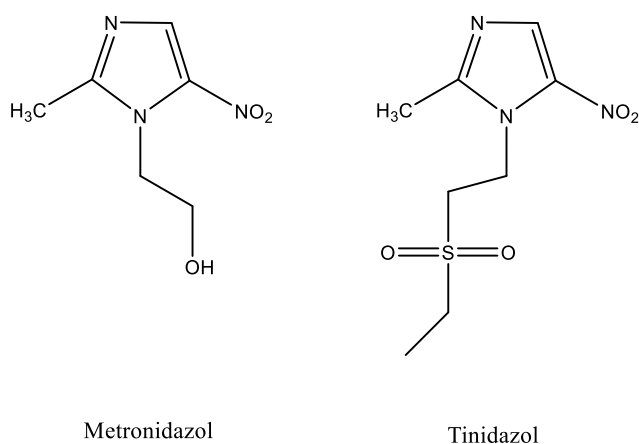


Figura 4.19. Estructura del metronidazol y tinidazol.

En este contexto, Moreno-Rodríguez *et al.* llevaron a cabo²²⁷ la síntesis de las tiosemicarbazonas **51**, derivadas de 2-furaldehído y se evaluaron como agentes antiparasitarios en el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (**Figura 4.20**). Estos compuestos se prepararon mediante reacción de sustitución aromática nucleofílica de tiolatos trifuometilados sobre el 5-bromo-2-furaldehído, seguido de condensación con tiosemicarbazida.

-
225. Stark, J.R.; Judson, G.; Alderete, J.F.; Mundodi, V.; Kucknoor, A.D.; Giovannucci, E.L.; Platz, E.A.; Sutcliffe, S.; Fall, K.; Kurth, T.; Ma, J.; Stampfer, M.J.; Mucci, L.A. Comparison of seropositivity to *Trichomonas vaginalis* between men with prostatic tumor and normal men. *J. Natl. Cancer Inst.* **2009**, *101*, 1406–1411.
226. Cudmore, S.L.; Delgaty, K.L.; Hayward-McClelland, S.F.; Petrin, D.P.; Garber, G.E. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 783–793.
227. Moreno-Rodríguez, A.; Salazar-Schettino, P.M.; Bautista, J.L.; Hernández-Luis, F.; Torrens, H.; Guevara-Gómez, Y.; Pina-Canseco, S.; Bucio-Torres, M.; Cabrera-Bravo, M.; Mendoza-Martínez, C.; Pérez-Campo, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 23–29.

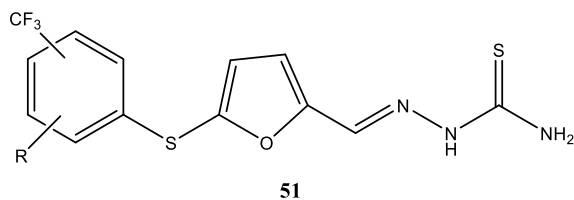


Figura 4.20. Estructura general de tiosemicarbazonas derivadas de 2-furaldehído.

Los derivados **51** se ensayaron frente a *T. cruzi*, y mostraron una actividad más potente o similar al del nifurtimox y benznidazol. El compuesto con R = NO₂ mostró mayor actividad antiparasitaria. Los derivados de tiosemicarbazona no mostraron apoptosis en plaquetas ni monocitos, por lo que se reduce la probabilidad de efectos secundarios tóxicos. La actividad tripanocida de estos compuestos representa, por tanto, un punto de partida interesante para fármacos en la terapia de la enfermedad de Chagas.²²⁷

4.2. Objetivo general

El objetivo general del presente capítulo de la Tesis Doctoral es la síntesis de una serie de tio- y selenosemicarbazonas derivadas del 2-piridincarboxialdehído y de arilsulfonamidas como potenciales inhibidores de anhidrasas carbónicas, en concreto, de isoformas relacionadas con procesos tumorales, y también como potenciales agentes antiprotozoarios.

4.3. Objetivos particulares

1. Realizar la síntesis de tio- y selenosemicarbazonas derivadas del 2-piridincarboxialdehído.
2. Realizar la síntesis de tiosemicarbazonas derivadas de arilsulfonamidas.
3. Caracterización estructural de los compuestos preparados.
4. Evaluación biológica de los compuestos preparados como inhibidores de las anhidrasas carbónicas, como agentes antiproliferativos y como antiprotozoarios.

4.4. Discusión de resultados

4.4.1. Preparación de tio- y selenosemicarbazonas derivadas de 2-piridincarboxialdehído

Recientemente se ha descrito que algunas bases de Schiff actúan como potentes agentes antiproliferativos²²⁸ debido a su propiedad quelatante de cationes metálicos a través del nitrógeno azometínico.²²⁹ Nos propusimos estudiar si la inhibición de las anhidrasas carbónicas, por complejación del ion Zn^{2+} del centro activo de las mismas, podría ser uno de los mecanismos de acción de este tipo de compuestos.

Para ello se prepararon las 3 familias mostradas en la **Figura 4.21**: las tio- y selenosemicarbazonas **A**, con un fragmento de tipo 2-piridilo (para favorecer la acción quelatante), un anillo aromático con distintos sustituyentes en posición *para* (H, alcoxilo, alquilo, halógeno, nitro), y un espaciador variable. Por otro lado, se abordó la preparación de tiosemicarbazonas derivadas de sulfonamidas (estructuras **B**), tanto con un residuo de tipo 2-piridilo sobre el carbono azometínico, o un anillo de tipo fenilo sustituido. De esta forma, se pretende profundizar en los requerimientos estructurales de estas familias de análogos de bases de Schiff para que actúen como inhibidores de anhidrasas carbónicas de interés terapéutico.

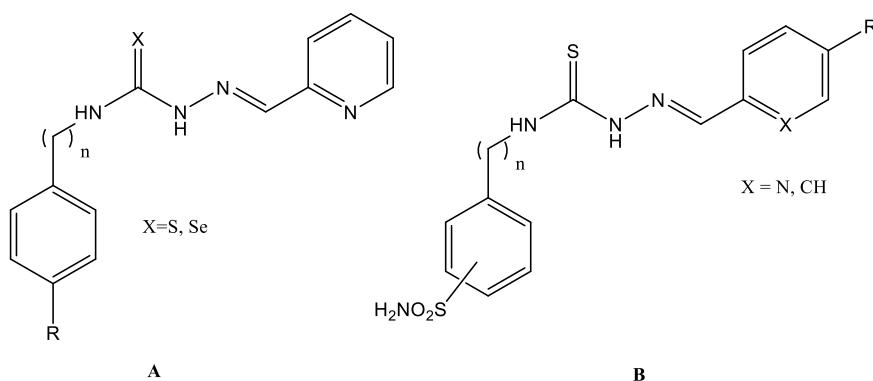


Figura 4.21. Estructura general de las tio- y selenosemicarbazonas preparadas en este capítulo.

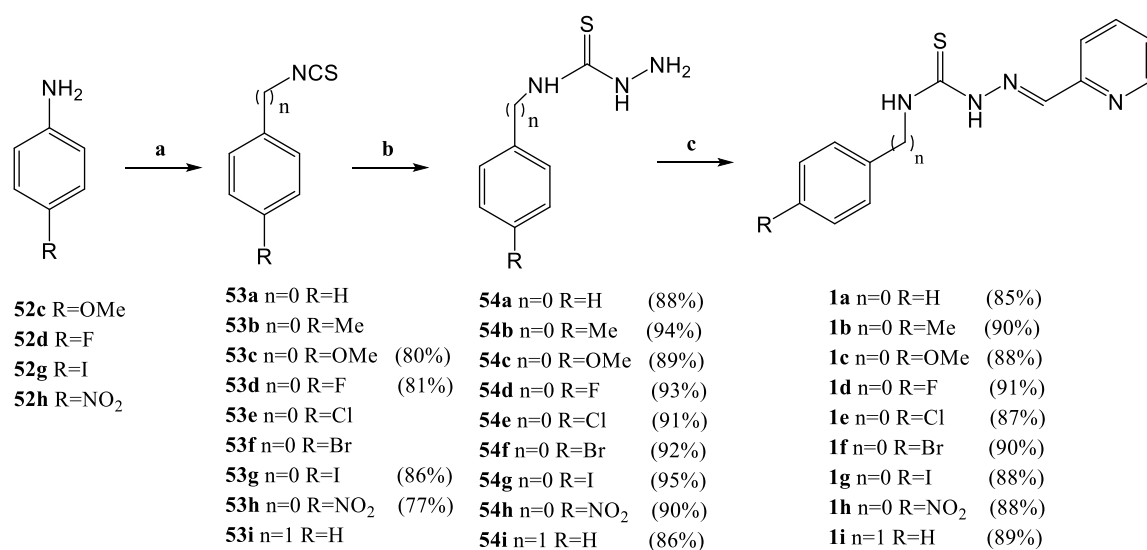
La metodología sintética para el acceso a la primera serie de compuestos, los derivados **1a-i**, se muestra en el **Esquema 4.6**, y consiste en la adición de hidrazina monohidratada a los isotiocyanatos **53**, seguido de condensación de las correspondientes tiosemicarbazidas **54** con 2-piridincarboxialdehído comercial. Las tiosemicarbazidas **54a**, **54b**, **54e**, **54f** y **54i** (**Esquema 4.6**) se obtuvieron a partir de los isotiocyanatos de arilo comerciales **53a**, **53b**, **53e**, **53f**, **53i**; los correspondientes

228. He, Z.X.; Huo, J.L.; Gong, Y.P.; An, Q.; Zhang, X.; Quiao, H.; Yang, F.F.; Zhang, X.H.; Jiao, L.M.; Liu, H.M.; Ma, L.Y.; Zhao, W. Design, synthesis and biological evaluation of novel thiosemicarbazone-indole derivatives targeting prostate cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *210*, 112970.

229. More, M.S.; Joshi, P.G.; Mishra, Y.K.; Khanna, P.K. Metal complexes driven from Schiff bases and semicarbazones for biomedical and allied applications: a review. *Mater. Today. Chem.* **2019**, *14*, 100195.

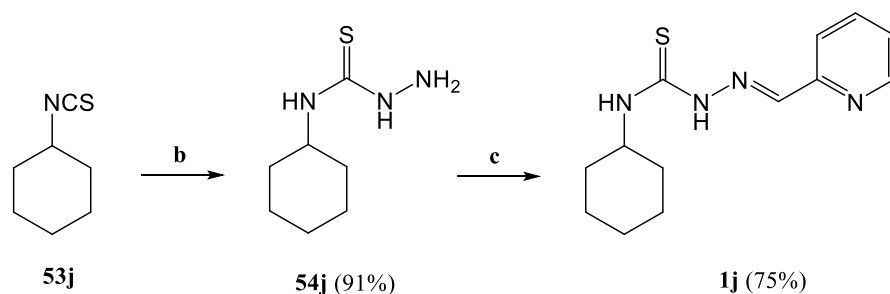
productos finales **1a**, **1b**, **1e**, **1f** y **1i** se obtuvieron con excelentes rendimientos (85–90%) tras la precipitación del compuesto en el medio de reacción.

Por otra parte, los isotiocyanatos **53c**, **53d**, **53g** y **53h**, no comerciales, se obtuvieron a partir de las correspondientes anilinas **52c**, **52d**, **52g** y **52h** mediante tratamiento con tiofosgeno en un medio trifásico (H_2O , CH_2Cl_2 , CaCO_3), y rendimientos comprendidos entre el 77 y el 86% tras extracción líquido-líquido; estos compuestos se usaron directamente para la siguiente etapa, sin ninguna purificación adicional. Las tiosemicarbazonas **1c**, **1d**, **1g** y **1h**, al igual que en los casos anteriores, precipitaron en el medio de reacción, siendo aislados con rendimientos excelentes (80–91%).



Esquema 4.6. Síntesis de las diferentes tiosemicarbazonas **1a-i**. Reactivos y condiciones: a) CSCl_2 , CaCO_3 , $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1, t.a, 2h; b) NH_2NH_2 , MeOH, t.a. 2h; c) 2-piridincarboxialdehído, AcOH, EtOH, reflujo, 4h.

La obtención de la tiosemicarbazona **1j** (**Esquema 4.7**) se realizó a partir del isotiocianato de ciclohexilo comercial **53j** y se siguió la misma metodología de los compuestos anteriores, obteniéndose dicho compuesto con un rendimiento del 75%.



Esquema 4.7. Síntesis de la tiosemicarbazonas **1j**. Reactivos y condiciones: a) NH_2NH_2 , MeOH, t.a. 2h; b) 2-piridincarboxialdehído, AcOH, EtOH, Reflujo, 4h.

Las tiosemicarbazidas **54a**,²³⁰ **54b**,²³¹ **54c**,²³² **54d**,²³⁰ **54e**,²³⁰ **54f**,²³⁰ **54g**,²³³ **54h**,²³² **54i**,²³¹ y **54j**,²³⁴ así como las tiosemicarbazonas **1a**,²³⁵ **1b**,²³² **1c**,²³² **1d**,²³⁶ **1e**,²³⁷ **1h**,²³² **1i**,²³¹ y **1j**,²³² se encuentran ya reportadas, coincidiendo sus datos espectroscópicos con los descritos en la bibliografía.

A modo de ejemplo, en la **Figura 4.22** se muestra el espectro de ¹H-RMN del compuesto **1f**; los protones más característicos, que demuestran la formación de la tiosemicarbazona, son los NH, que resuenan a 12.12 ppm y 10.64 ppm y el protón azometínico (8.21 ppm).

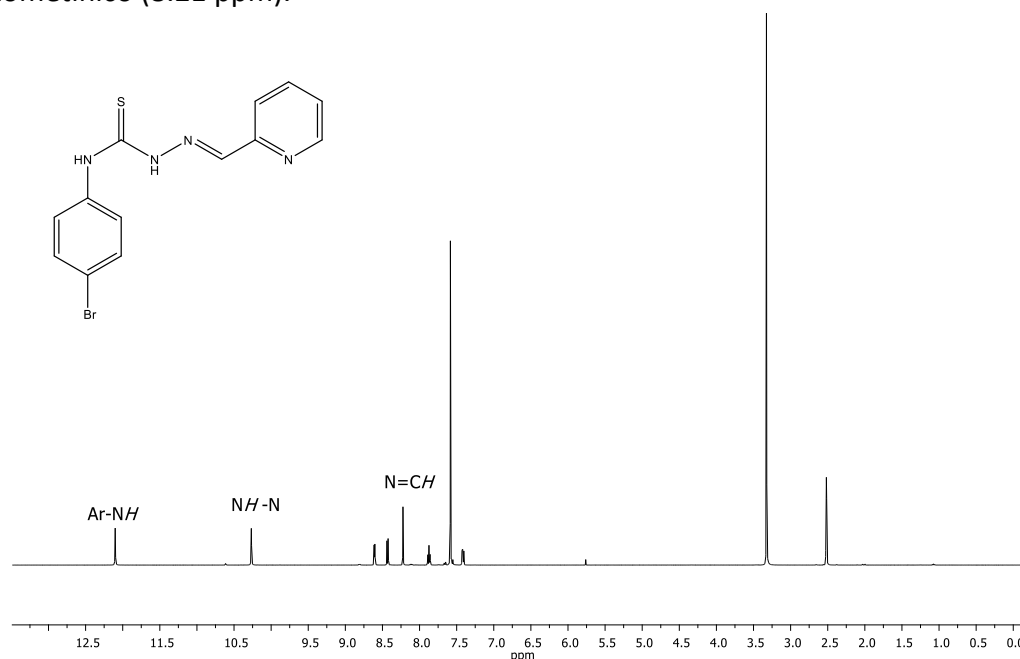


Figura 4.22. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, (CD₃)₂SO) del producto **1f**.

230. Tripathi, K.; Kumar, P.; Singh, R.; Stables, J.P. Design, synthesis and anticonvulsant evaluation of novel *N*-(4-substituted phenyl)-2-[4-(substituted) benzylidene]-hydrazinecarbothioamides. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *47*, 153–166.
231. He, Z.; Qiao, H.; Yang, F.; Zhou, W.; Gong, Y.; Zhang, X.; Wang, H.; Zhao, B.; Ma, L.; Liu, H.; Zhao, W. Novel thiosemicarbazone derivatives containing indole fragment as potent and selective anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *184*, 111764.
232. Pape, V.F.S.; Toth, S.; Furedi, A.; Szebenyi, K.; Lovrics, A.; Szabo, P.; Wiese, M.; Szakacs, G. Design, synthesis and biological evaluation of thiosemicarbazonas, hydrazinobenzothiazoles and arylhydrazones as anticancer agents with a potential to overcome multidrug resistance. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *117*, 335–354.
233. Pervez, H.; Saira, N.; Iqbal, M.S.; Yaqub, M.; Khan, K.M. Synthesis and toxicity evaluation of some *N*-(4-aryl substituted 5-trifluoromethoxyisatin-3-thiosemicarbazonas). *Molecules* **2011**, *16*, 6408–6421.
234. Katritzky A.R.; Kashab N.M.; Gromova, A.V. Preparation of diversely substituted thiosemicarbazides and *N*-hidroxythioureas. *Arkivoc*, **2006**, *3*, 226–236.
235. Amendola, V.; Boiocchi, M.; Fabbrizzi, L.; Mosca, L. Metal-controlled anion-binding tendencies of the thiourea unit of thiosemicarbazonas. *Chem. Eur J.* **2008**, *14*, 9683–9696.
236. Raphael, P.F.; Manoj, E.; Prathapachandra, M.R. Cooper (II) complexes of *N*(4)-substituted thiosemicarbazone derived pyridine-2-carbaldehyde: crystal structure of binuclear complex. *Polyhedron* **2007**, *26*, 818–828.
237. Saghatfoush, L.; Hosseinpour, S.; Moein, K.; Mardani, Z. Bezpalko, M.W.; Kasse, W.S. Investigation of the binding ability of a new thiosemicarbazone-based ligand and its Zn(II) complex toward proteins and DNA: spectral structure theoretical and docking studies. *J. Struct. Chem.* **2021**, *62*, 748–761.

En el espectro de ^{13}C -RMN (**Figura 4.23**) se observa una señal característica a 176 ppm, correspondiente al grupo C=S.

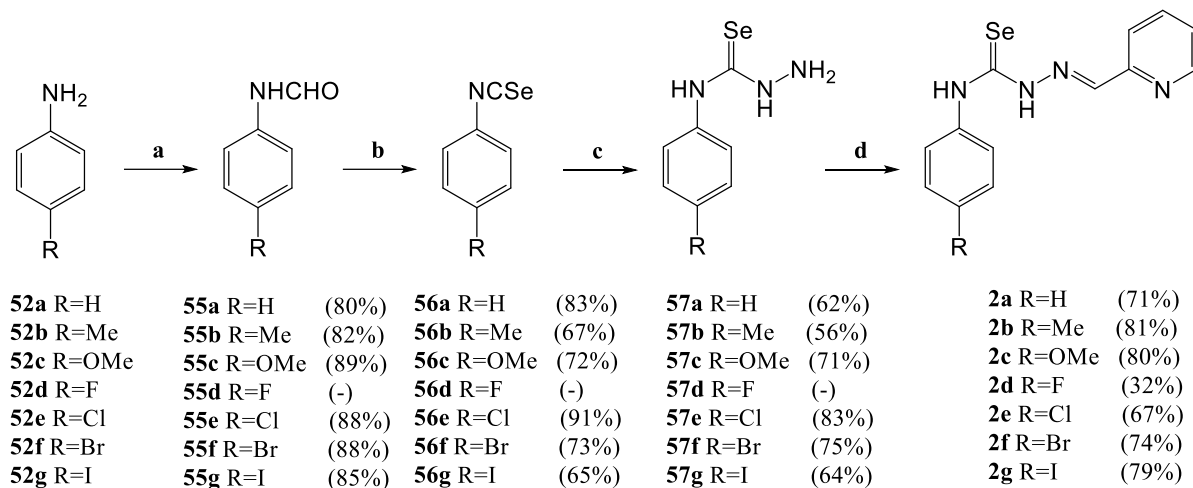


Figura 4.23. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) del producto **1f**.

También se llevó a cabo la obtención de los selenoisómeros de las tiosemicarbazonas **1** (**Esquema 4.8**), con objeto de analizar la influencia del átomo de calcógeno en las propiedades biológicas; con este fin se siguió la metodología descrita por Calcaterra y col.²⁰⁴ en la preparación de selenosemicarbazonas fenólicas. Para ello se partió de distintas anilinas comerciales (**52a-g**), que fueron transformadas en las correspondientes formamidas **55a-g** mediante tratamiento con HCOOEt en medio ácido. A continuación, las formamidas se transformaron en los correspondientes isoselenocianatos **56a-g** mediante una metodología *one-pot* en dos etapas: deshidratación del grupo formamido promovida por trifosgeno, para dar lugar a un isonitrilo intermedio no asilado, seguido de acoplamiento *in situ* de este con selenio negro elemental. Esta metodología fue desarrollada y ampliamente utilizada en el grupo de investigación de la Universidad de Sevilla.²³⁸

El tratamiento de los isoselenocianatos con hidracina monohidratada permitió obtener las correspondientes selenosemicarbazidas **57a-g** con rendimientos de moderados a buenos (46-83%). Estas se hicieron reaccionar con el 2-piridincarboxialdehído con catálisis ácida para la obtención de las selenosemicarbazonas **2a-g** correspondientes con rendimientos de moderados a buenos (32-81%).

238. López, Ó.; Maza, S.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J.G. Synthesis of sugar-derived isoselenocyanates, selenoureas, and selenazoles. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2556–2566.



Esquema 4.8. Síntesis de las selenosemicarbazonas derivadas de 2-piridincarboxaldehído **2a-g**.

Reactivos y condiciones: a) HCOOEt, AcOH, t.a. 15 h; b) 1ª etapa: Trifosgeno, CH₂Cl₂ anh., Et₃N, reflujo, 2.5h, 2ª etapa: Selenio, reflujo, 4-18h; c) NH₂NH₂, CH₂Cl₂ anh., t.a. 2h; d) 2-piridincarboxialdehído, AcOH, EtOH, Reflujo, 4h.

En el caso de las selenosemicarbazonas se presenta, a modo de ejemplo, el espectro de ¹H-RMN del compuesto **2e** (Figura 4.24) donde se observan las señales características del grupo, como son los protones correspondientes a los grupos NH en 12.42 ppm y 10.64 ppm y el protón azometínico a 8.32 ppm.

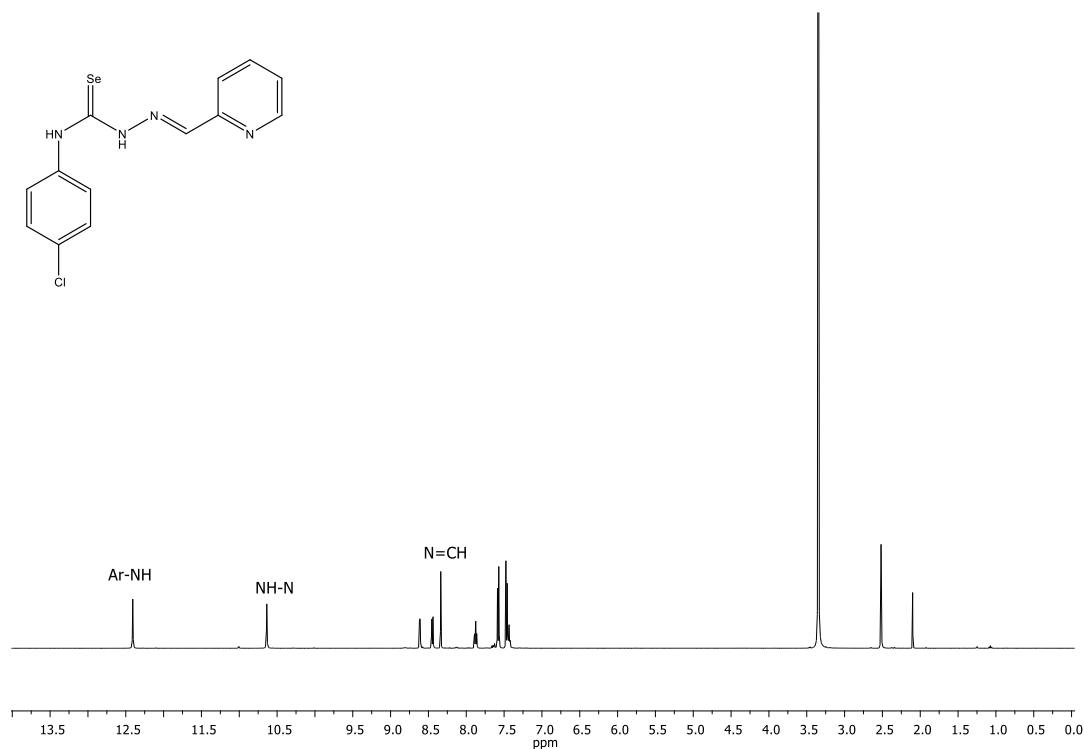


Figura 4.24. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, (CD₃)₂SO) del producto **2e**.

El espectro de ^{13}C -RMN (**Figura 4.25**) proporciona también información del grupo selenosemicarbazona de **2e**, observándose un pico a 175 ppm correspondiente al C=Se.

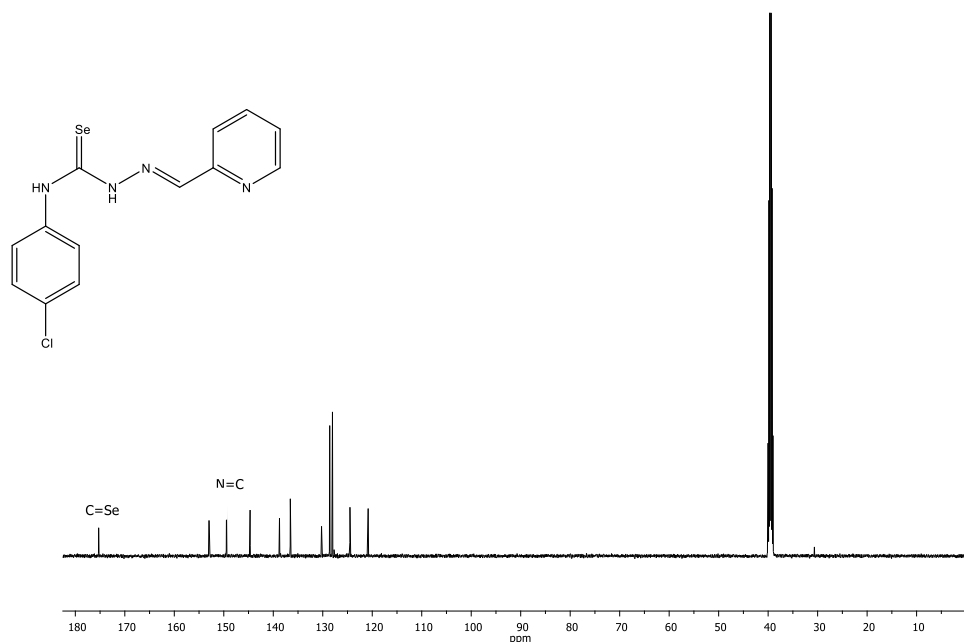
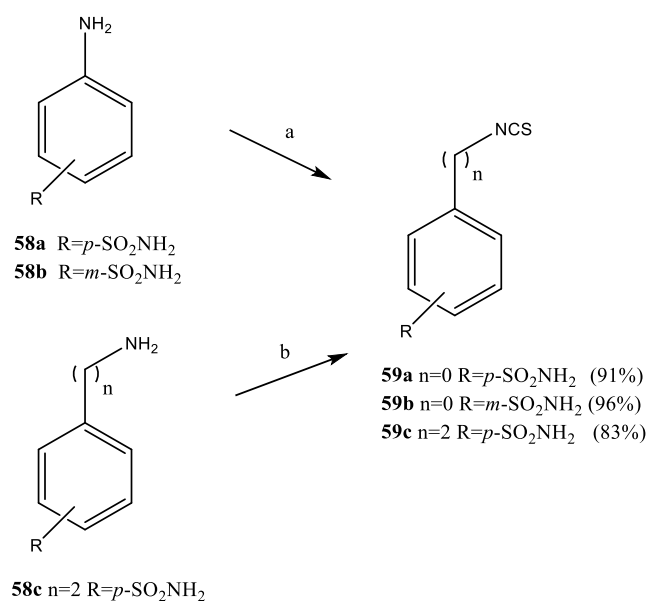


Figura 4.25. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) del producto **2e**.

Preparación de nuevas tiosemicarbazonas derivadas de sulfonamidas.

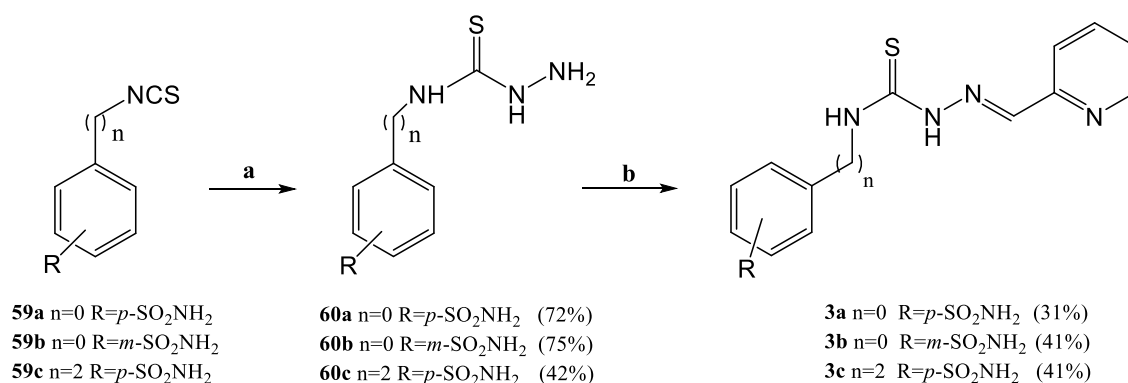
Tal y como se ha descrito en la sección anterior, en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la preparación de un amplio panel de tio(seleno)semicarbazonas derivadas de piridin-2-carboxialdehído, con objeto de obtener agentes quelatantes que pudieran interactuar con el Zn^{2+} del centro activo de las CAs. No obstante, aunque exhibieron valores excelentes de antiproliferación, alcanzando el rango submicromolar a nanomolar bajo, y un incremento de actividad de hasta varios miles de veces con respecto a fármacos comúnmente usados en quimioterapia, su actividad no se debió a la inhibición de las CAs, ya que resultaron prácticamente inactivas frente a dichas enzimas. Es por ello que se decidió incorporar la función sulfonamido a la estructura de la tiosemicarbazona, una función clásica en la quelación del ion metálico de su centro activo.

Para ello, los isotiocianatos **59a-c**, obtenidos a partir de las aminosulfonamidas comerciales **58a-c**, fueron los intermedios sintéticos clave en este proceso (**Esquema 4.9**). Los compuestos **59a** y **59b** se obtuvieron a partir de las sulfonamidas **58a** y **58b** mediante reacción con tiofosgeno; alternativamente, la formación del isotiocianato **59c** resultó más eficaz mediante tratamiento de la sulfonamida **58c** con CS_2 y DCC. En ambos casos se obtuvieron los isotiocianatos como sólidos blancos, que se emplearon para la siguiente etapa sin purificación adicional (**Esquema 4.9**).



Esquema 4.9. Síntesis de los isotiocianatos derivados de sulfonamidas **59a-c**. Reactivos y condiciones: a) HCl, H₂O, tiofosgeno, t.a. 4h; b) DCC, CS₂, piridina, 1 h, t.a.

Los isotiocianatos **59a-c** se hicieron reaccionar con hidracina monohidratada, para dar lugar a las tiosemicarbazidas **60a-c**, que a su vez experimentaron una reacción de condensación con el piridin-2-carboxialdehído comercial en presencia de AcOH para obtener las tiosemicarbazonas **3a-c** (**Esquema 4.10**); estos compuestos permitirían incorporar en el mecanismo de acción como antiproliferativos, la capacidad de inhibir a las anhidrasas carbónicas.



Esquema 4.10. Síntesis de sulfonamidas derivadas de piridin-2-carboxialdehído **3a-c**. Reactivos y condiciones: a) NH₂NH₂, MeOH, t.a. 4h; b) Piridin-2-carboxialdehído, EtOH, H₂SO₄, reflujo, 4h.

A modo de ejemplo, en el espectro de ¹H-RMN del compuesto **3a** (**Figura 4.26**) se observan las señales características de la función tiosemicarbazona, como son los protones de los grupos NH en 12.47 ppm y 10.52 ppm y en 8.73 ppm, el protón azometínico. En 8.23 ppm se observa un singulete para dos protones asignado al grupo NH₂ de la sulfonamida.

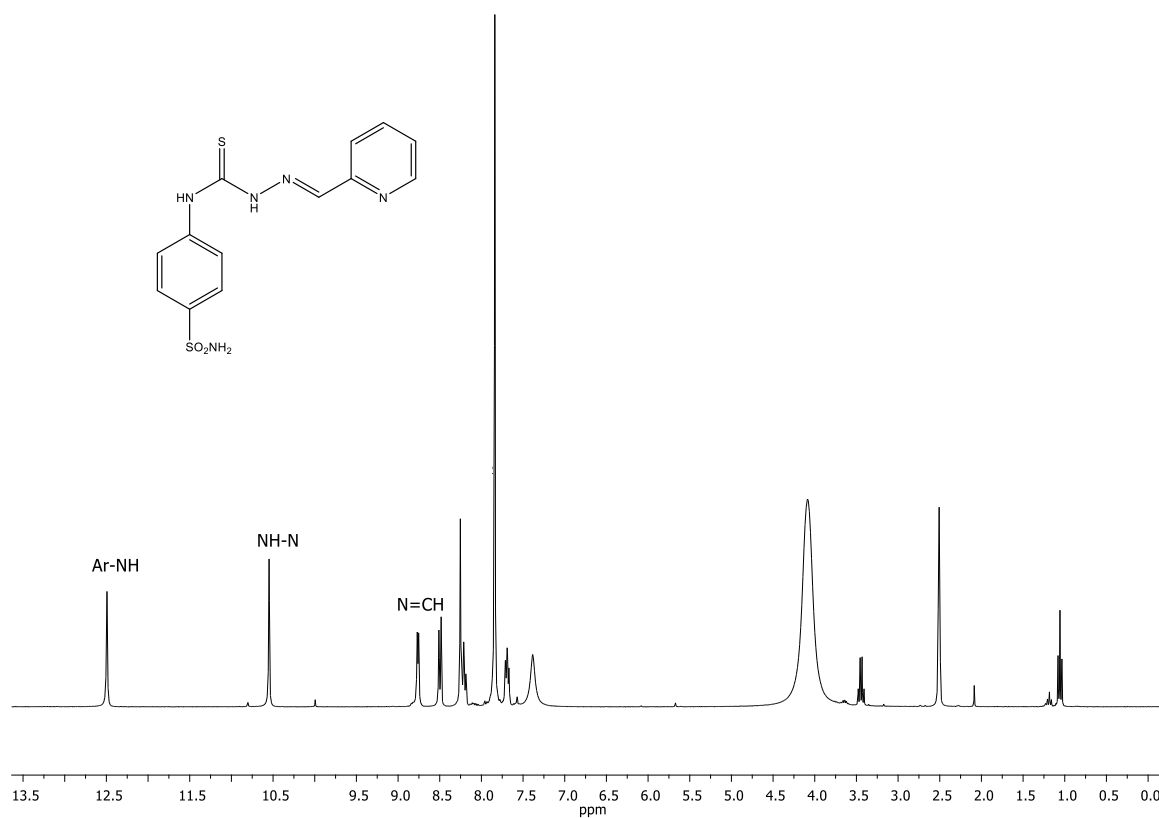


Figura 4.26. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) del producto **3a**.

En el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **3a** (**Figura 4.27**) destaca la señal a 176 ppm, atribuida al grupo tiona ($\text{C}=\text{S}$).

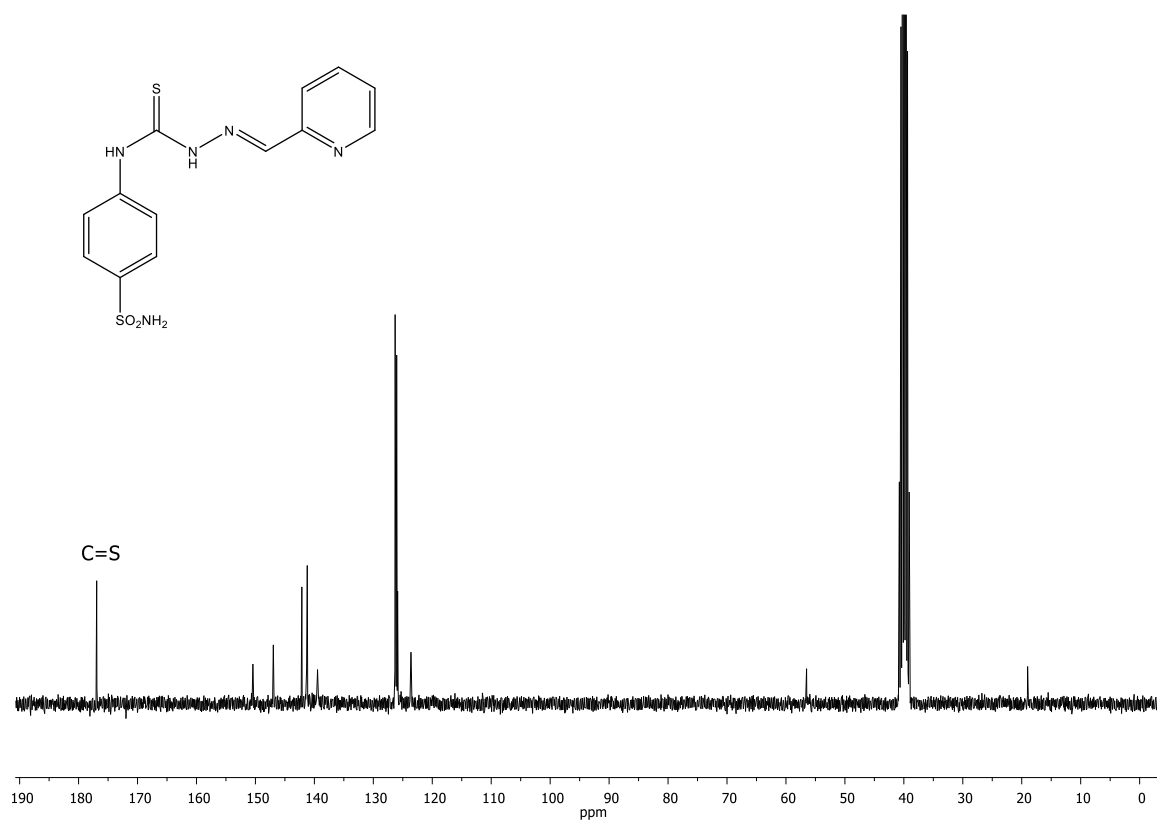
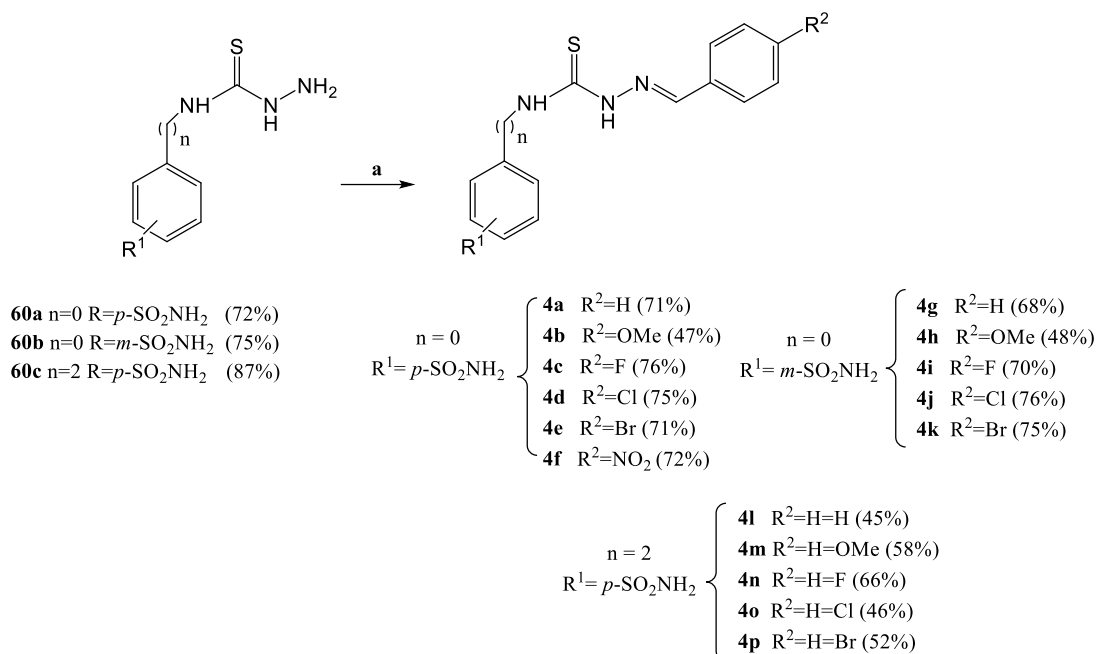


Figura 4.27. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) del producto **3a**.

A partir de las tiosemicarbazidas **60a-c** previamente sintetizadas, el tratamiento con diferentes aldehídos en presencia de AcOH, permitió obtener las tiosemicarbazonas **4a-p** (**Esquema 4.11**), con rendimientos de moderados a buenos (45–76%). De esta forma, se ha modificado la longitud del espaciador entre N-1 y el anillo aromático, la posición del grupo sulfonamido, así como la naturaleza estereoelectrónica de los sustituyentes en el anillo aromático conectado a N-1.



Esquema 4.11. Síntesis de tiosemicarbazonas derivadas de sulfonamidas **4a-p**. Reactivos y condiciones: a) $R^2\text{-CHO}$, EtOH, H_2SO_4 , reflujo, 4h.

En el espectro de ^1H -RMN del compuesto **4b** (Figura 4.28) se observan las señales características del grupo tiosemicarbazona, los protones correspondientes a los grupos NH (11.89 ppm y 10.21 ppm) y el protón azometínico (8.13 ppm). En 7.34 ppm se observa un singulete que integra para dos protones, correspondiente a los protones de la amina del grupo sulfonamido, y en 3.81 ppm, el OMe.

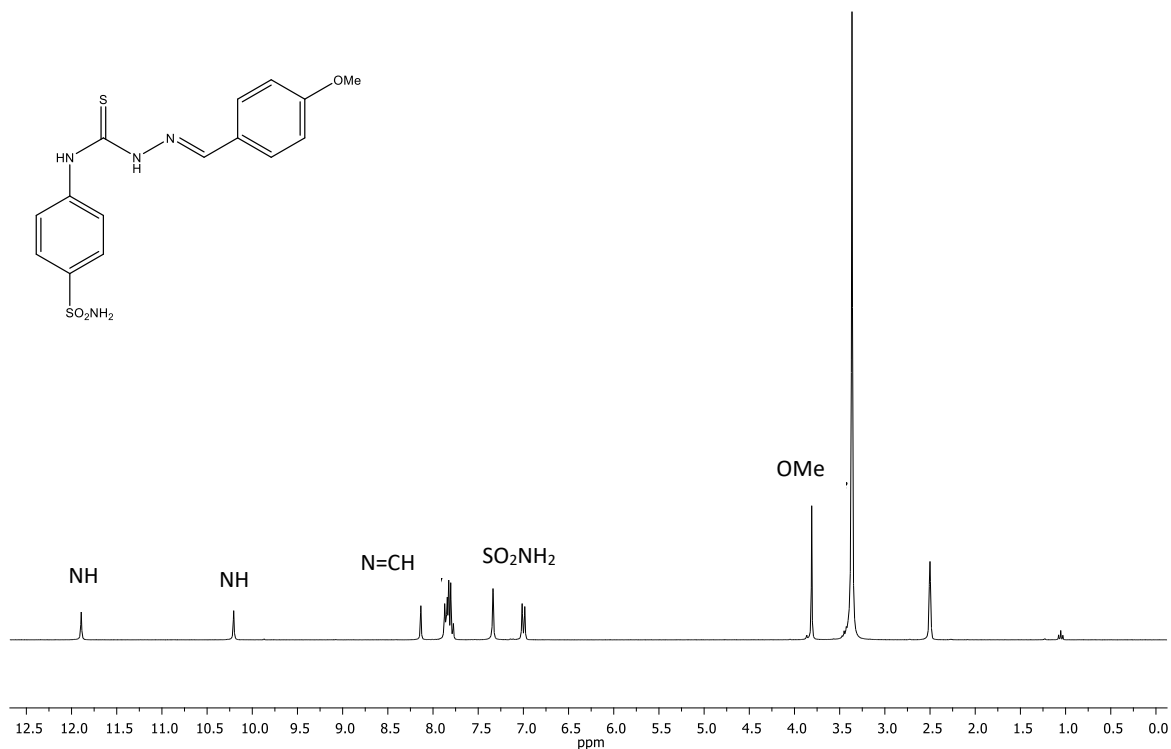


Figura 4.28. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) del producto **4b**.

En el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **4b** (Figura 4.29) se observan señales en 176 ppm (C=S), 144 ppm (N=C) y 55 ppm (OMe), que confirman la estructura propuesta.

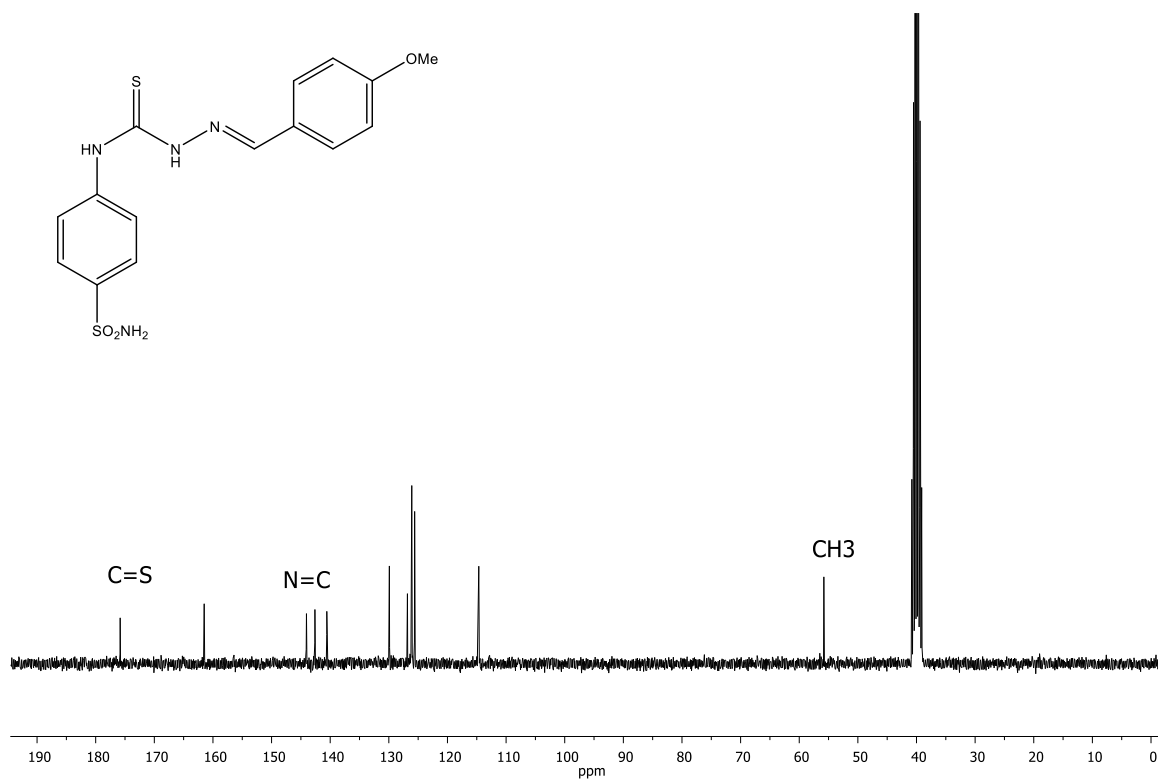


Figura 4.29. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) del producto **4b**.

Preparación de nuevas selenosemicarbazonas fenólicas como agentes antiprotozoarios.

En la última sección de este capítulo se incluye la síntesis de dos selenosemicarbazonas fenólicas como continuación de un proyecto iniciado en el grupo de investigación para el acceso a tiosemicarbazonas fenólicas como agentes antiprotozoarios. En dicha investigación se había llevado a cabo el acceso a un amplio panel de tiosemicarbazonas fenólicas, cuya estructura general se muestra en la **Figura 4.30**, que fueron evaluadas *in vitro* frente a los parásitos responsables de la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) y tricomoniasis (*Trichomonas vaginalis*).

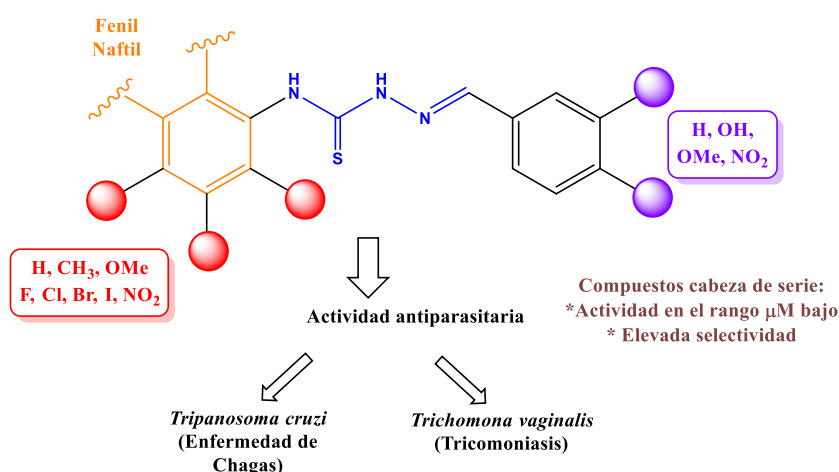


Figura 4.30. Estructura general de las tiosemicarbazonas fenólicas preparadas en el grupo de investigación como agentes antiparasitarios.

En particular, los tio-isómeros con mejor perfil antiparasitario resultaron ser la *p*-bromofenil tiosemicarbazona **61a** y su *p*-yodo isómero **61b** (**Figura 4.31**).

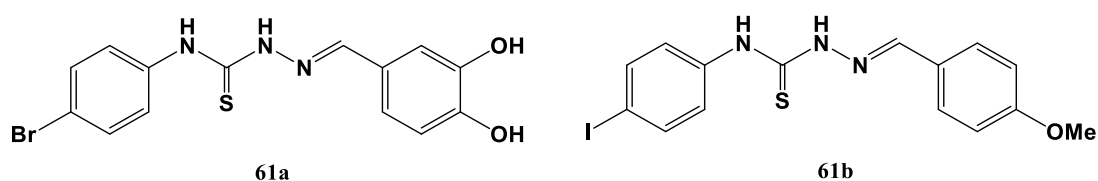
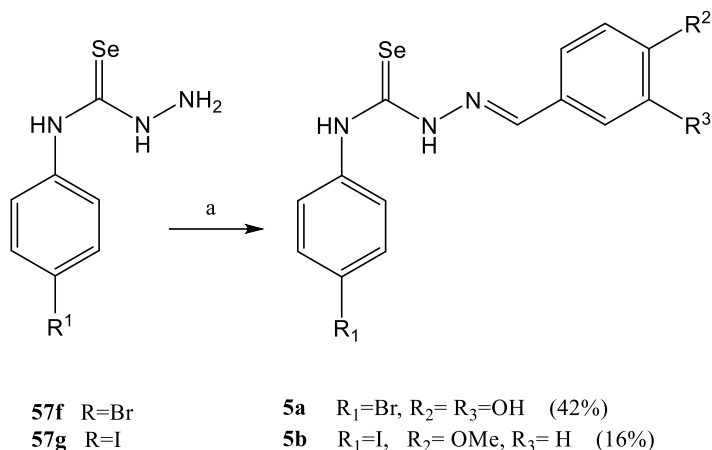


Figura 4.31. Estructura de las tiosemicarbazonas **61a,b** preparadas en el grupo de investigación.

Es por ello que en la presente Tesis Doctoral se decidió abordar la preparación de los selenoisómeros de **61a,b**, con objeto de analizar la influencia del átomo de calcógeno en las propiedades antiparasitarias *in vitro*, en cuanto a la potencia, y selectividad.

Para la obtención de estas selenosemicarbazonas (**Esquema 4.12**) se partió de las selenosemicarbazidas **57f** (Br) y **57g** (I), cuya síntesis se abordó en el **Esquema 4.8**, y se trataron con 3,4-dihidroxibenzaldehído y con 4-metoxibenzaldehído, respectivamente, empleando catálisis ácida (AcOH). Los selenoderivados **5a,5b** se obtuvieron con rendimientos moderados (42 y 16%, respectivamente) tras purificación cromatográfica.



Esquema 4.12. Síntesis de las selenosemicarbazonas derivadas de 2-piridincarboxaldehído **5a,b**.
 Reactivos y condiciones: a) Aldehído, AcOH, EtOH, Reflujo, 4h.

En el espectro de ¹H-RMN del compuesto **5a** (**Figura 4.32**) se observan las señales características del grupo selenosemicarbazona, como son los protones correspondientes a los grupos NH en 11.98 ppm y 10.30 ppm y el protón azometínico, que resuena en 8.13 ppm. En 9.33 y 8.98 ppm se observan sendos singuletes ensanchados para un protón, que corresponden a los protones de los dos grupos hidroxilos fenólicos.

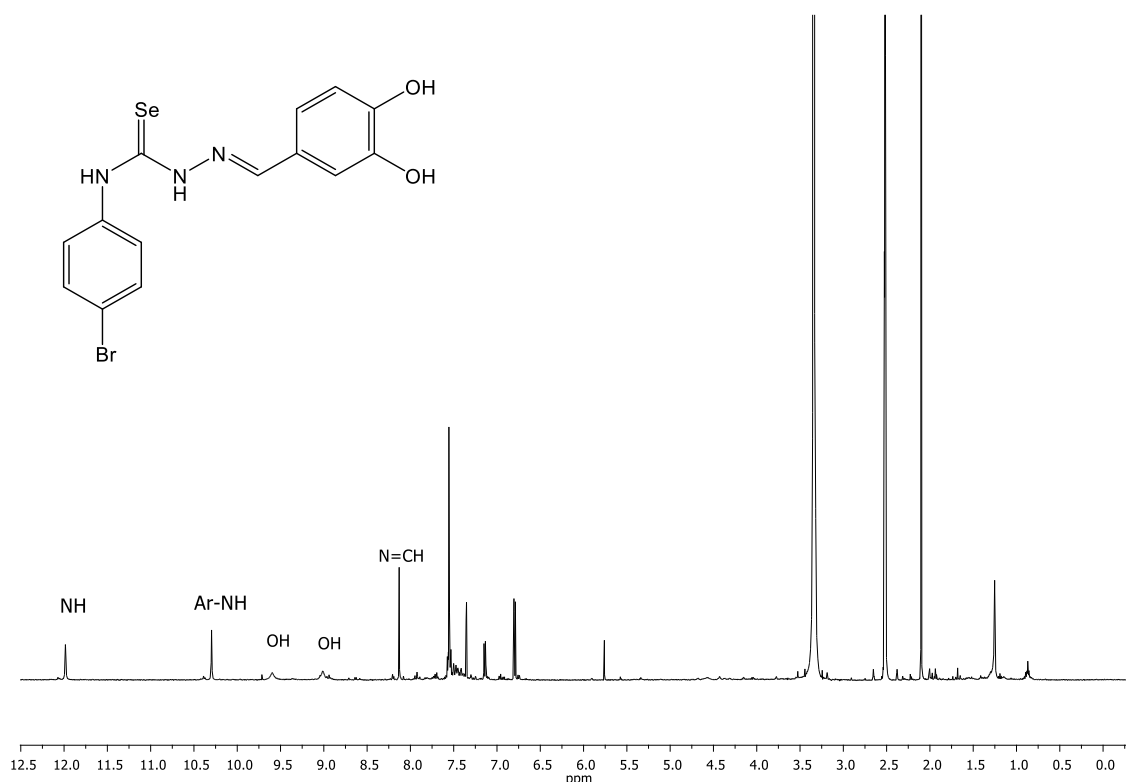


Figura 4.32. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, (CD₃)₂SO) del producto **5a**.

En el espectro de ¹³C-RMN del compuesto **5a** (**Figura 4.33**) se observan señales en 173 (C=S), 148 (C-4'), 146 (C-3') y a 139 (N=C) ppm, que confirman de manera inequívoca la estructura propuesta.

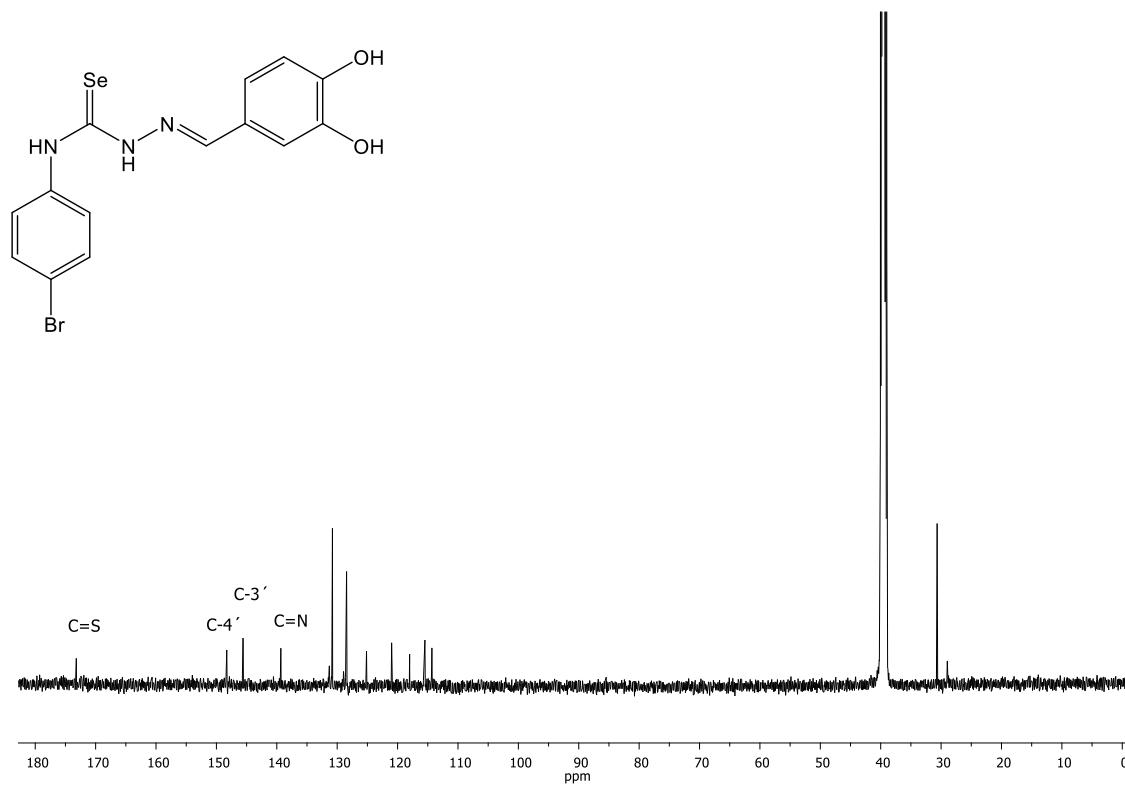


Figura 4.33. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) del producto **5a**.

Los datos de la actividad antiprotozoaria exhibida por las selenosemicarbazonas **5a,b** se describe en la sección dedicada a actividades biológicas.

5. SÍNTESIS DE GLICOCONJUGADOS DERIVADOS DE SULFONAMIDAS Y CUMARINAS COMO INHIBIDORES DE ANHIDRASAS CARBÓNICAS Y AGENTES ANTIPROLIFERATIVOS

5.1. Introducción y antecedentes

Los carbohidratos, conocidos como la tercera clase de biomacromoléculas, tras las proteínas y los ácidos nucleicos, han suscitado, desde hace más de un siglo, un interés creciente en el desarrollo de terapias contra el cáncer.²³⁹ Por otro lado, tal y como se ha descrito en el capítulo 4 de la presente Tesis Doctoral, las CAs se han postulado como interesantes dianas terapéuticas cuya investigación ha conducido a la comercialización de algunos fármacos que actúan como inhibidores de las mismas.⁷⁹ A lo largo de la introducción de este capítulo se describirá cómo la conexión de ambos tipos de estructuras, carbohidratos y farmacóforos que permitan la inhibición de CAs (fragmentos que contengan un ZBG) ha permitido el desarrollo de inhibidores selectivos de isoformas localizadas en el medio extracelular (CA IX, XII).⁷⁹

En el presente capítulo de la Tesis Doctoral se abordará la preparación de nuevos glicoconjugados como potenciales inhibidores de CAs, donde un residuo de carbohidrato se conectará a una arilsulfonamida, o a una cumarina.

5.1.1. Cumarinas

Las cumarinas (2H-cromen-2-ona) (**Figura 5.1**) consisten en una numerosa familia de lactonas naturales constituidas por la fusión entre un anillo de benceno y una α -pirona.²⁴⁰ Las cumarinas son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en plantas, bacterias, hongos, aceites esenciales, aunque también se han desarrollado numerosas rutas sintéticas para su obtención.²⁴¹

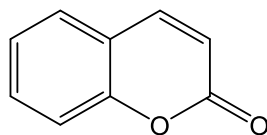


Figura 5.1 Estructura general de una cumarina

En 1820 la cumarina (**Figura 5.1**) fue aislada de las habas de Tonka (semilla del árbol *Dipteryx odorata*) por A. Vogel en Alemania y por Nicholas Guilbour en Francia, de manera independiente.²⁴² En 1868 William Henry Perkin sintetizó por primera vez una

239. Fu, J.; Yang, J.; Seeberger, H.; Yin, J. Glycoconjugates for glucose transporter-mediated cancer-specific targeting and treatment. *Carbohydr. Res.* **2020**, *498*, 108195.

240. Aoyama, A.; Katayama, T.; Yamamoto, M.; Tanaka, H.; Kon, K. A new antitumor antibiotic product, demethylchartreusin. Isolation and biological activities. *J. Antibiot. Res.* **1992**, *45*, 875–878.

241. Mishra, S.; Pandey, A.; Manvati, S. Coumarin: an emerging antiviral agent. *Helyion* **2020**, *6*, e03217.

242. Venugopala, K.N.; Rashmi, V.; Odhav, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–14.

cumarina.²⁴³ Su nombre proviene del término francés para el haba Tonka “camarú”²⁴⁴ y se consideran como “estructuras privilegiadas” por sus numerosas actividades biológicas; en el ámbito de la Química Medicinal proporcionan un núcleo recurrente para el acceso a nuevos fármacos.²⁴⁵ Los derivados de la cumarina se pueden sintetizar mediante diferentes rutas sintéticas:

- Condensación de Perkin²⁴⁶
- Condensación de Knoevenagel²⁴⁷
- Reacción de Pechmann²⁴⁸ (aproximación empleada en la presente Tesis Doctoral)
- Reacción de Baylis-Hillman²⁴⁹
- Reordenamiento de Claisen ²⁵⁰

Las cumarinas poseen una amplia gama de actividades biológicas, tales como antimicrobiana,²⁵¹ antibacteriana,^{252,253} antiparasitaria²⁵⁴, anticancerígena,²⁵⁵

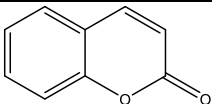
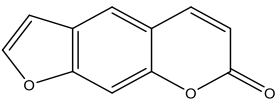
-
243. Perkin, W.H. On the artificial production of coumarin and formation of its homologues. *J. Chem. Soc.* **1868**, 21, 53–63.
244. Bairagi, S.H.; Salaskar, P.P.; Loke, S.D.; Surve, N.N.; Tandel, D.V.; Dusara, M.D. Medicinal significance of coumarins. *Int. J. Pharm. Res.* **2012**, 4, 16–19.
245. Vianna, D.R.; Ruschel, L.; Dietrich, F.; Figueiró, F.; Morrone, F.B.; Canto, R.F.S.; Corvello, F.; Velho, A.; Crestani, A.; Teixeira, H.; von Poser, G.L.; Battastini, A.M.O.; Eifler-Lima, V.L. 4-Methylcoumarins with cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cancer cell lines. *Med. Chem. Commun.* **2015**, 6, 905–911.
246. Robledo-O’Ryan, N.; Matos, M.J.; Vázquez-Rodríguez, S.; Sanatana, L.; Uriarte, E.; Moncada-Basualto, M.; Mura, F.; Lapier, M.; Maya, J.D.; Olea-Azar, C. Synthesis, antioxidant and antichagasic properties of a selected series of hydroxy-3-arylcoumarins. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, 25, 621–632.
247. Ghomi, J.S.; Akbarzadeh, Z. Ultrasonic accelerated Knoevenagel condensation by magnetically recoverable MgFe₂O₄ noncatalyst: a rapid and green synthesis of coumarins under solvent-free conditions. *Ultrason. Sonochem.* **2018**, 40, 78–83.
248. Wu, J.; Liu, W.; Liang, L.; Gan, Y.; Xia, S.; Gou, X.; Sun, X. Facile synthesis and characterization of indene 4-methylcoumarins and an unexpected skeletal rearrangement via Pechmann condensation. *Tetrahedron Lett.* **2020**, 61, 151917.
249. Deng, Z.X.; Zheng, Y.; Xie, Z.Z.; Gao, Y.H.; Xiao, J.A.; Xie, S.Q.; Xiang, H.Y.; Chen, X.Q.; Yang, H. Phosphine-mediated MBH-type/umpolung addition domino sequence: divergent construction of coumarins. *Org. Lett.* **2019**, 22, 488–492.
250. Bakthados, M.; Selvakumar, R. One-pot synthesis of benzothiazole-tethered chromanones/coumarins via Claisen rearrangement using the solid state melt reaction. *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 3391–3399.
251. Alnufaie, R.; Raj, K.C.; Alsup, N.; Whitt, J.; Chambers, S.A.; Gilmore, D.; Alam, M.A. Haiba, M.E.; Alkahtani, H.M.; Awad, G.E.A.; Mohmoud, A.M.; Ibrahim B.M.M.; Bari, A.; Villinger, A. Synthesis and antimicrobial studies of coumarin-substituted pyrazole derivatives as potent anti-*Staphylococcus Aureus* agents. *Molecules* **2020**, 25, 2758.
252. Qin, H.L.; Zhang, Z.W.; Ravindar, L.; Rakesh, K.P. Antibacterial activities with the structure-activity relationship of coumarin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 207, 112832.
253. Hu, Y.; Shen, Y.; Wu, X.; Tu, X.; Wang, G.X. Synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives containing imidazole skeleton as potential antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 143, 958–969.
254. Yang, G.; Jin, Q.; Xu, C.; Fan, S.; Wang, C.; Xie, P. Synthesis, characterization and antifungal activity of coumarin-functionalized chitosan derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 106, 179–184.
255. Fayer, E.A.; Sabour, R.; Harras, M.F.; Mehany, A.B. Design, synthesis, biological evaluation and molecular modeling of new coumarin derivatives as potent anticancer agents. *Med. Chem. Res.* **2020**, 28, 1284–1297.

antiviral,²⁵⁶ anticoagulante, antihiperglucémica,²⁵⁷ antiinflamatoria,²⁵⁸ o anti-VIH.²⁵⁹ También presentan actividad como inhibidores de la acetilcolinesterasa²⁶⁰ y de la enzima monoamina oxidasa (MAO),²⁶¹ ambas relacionadas con el Alzheimer.

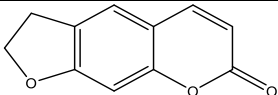
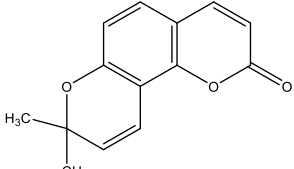
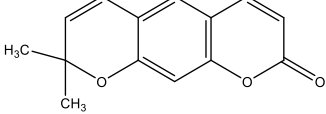
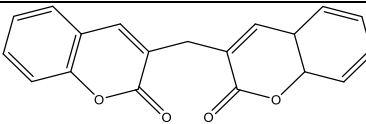
Clasificación de las cumarinas

Las cumarinas naturales se clasifican de acuerdo a su estructura química; por otro lado, sus propiedades y posibles aplicaciones terapéuticas dependerán en gran manera de los sustituyentes que contengan en su estructura (**Tabla 5.1**).

Tabla 5.1 Clasificación de las cumarinas

Tipo de cumarina	Estructura química general	Ejemplo	Actividad farmacológica
1. Cumarina simple		Esculetina	Antiinflamatorio ²⁶² Antioxidante ²⁶³ Anticancerígeno ²⁶⁴
2. Cumarina de furano		Imperatorina	Neuroprotector ²⁶⁵ Anticancerígeno ²⁶⁶ Antiinflamatorio ²⁶⁷

256. Hu, Y.; Chen, W.; Shen, Y.; Zhu, B.; Wang, G.X. Synthesis and antiviral activity of coumarin derivatives against infectious hematopoietic necrosis virus. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 1749–1755.
257. Kenchappa, R.; Bodke, Y.D.; Chandrashekar, A.; Sindhe, M.A.; Peethambar, S.K. Synthesis of coumarin derivatives containing pyrazole and indenone rings as potent antioxidant and antihyperglycemic agents. *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, S3895–S3906.
258. Chen, L.Z.; Sun, W.W.; Bo, Li.; Wang, J.Q.; Xiu, C.; Tang, W.J.; Zhou, H.P.; Liu, X.H. New arylpyrazoline-coumarins: synthesis and anti-inflammatory activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 170–181.
259. Srivastav, V.K.; Tivari, M.; Zhang, X.; Yao, X.J. Synthesis and antiretroviral activity of 6-acetyl-coumarin derivatives against HIV infection. *Indian. J. Pharm. Sci.* **2018**, *80*, 108–117.
260. Shi, D.H.; Min, W.; Song, M.Q.; Si, X.X.; Li, M.C.; Zhang, Z.Y.; Liu, Y.W.; Liu, W.W. Synthesis, characterization, crystal structure and evaluation of four carbazole-coumarin hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease *J. Mol. Struct.* **2020**, *5*, 127897.
261. Serra, S.; Ferino, G.; Matos, M. J.; Rodríguez, S. V.; Delogu, G.; Vina, D.; Cadoni, E.; Santana, L.; Uriarte, E. Hydroxycoumarins as selective MAO-B inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 258–261.
262. Jeong, N.-H.; Yang, E.J.; Lee, J.Y.; Cho, Y.A.; Park, P.H.; Lee, S.R.; Kim, S.U.; Shing, T.Y.; Kwon, T.K.; Jang, Y.H.; Song, K.S.; Kim, S.H. Esculetin from *Fraxinus rhynchophylla* attenuates atopic skin inflammation by inhibiting the expression of inflammatory cytokines. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *59*, 209–216.
263. Zhang, Y.; An, Y.; He, X.; Zhang, D.; He, W. Esculetin protects human corneal epithelial cells from oxidative stress through Nrf-2 signaling pathway. *Exp. Eye. Res.* **2021**, *202*, 108360.
264. Jiang, R.; Su, G.; Chen, X.; Chen, S.; Li, Q.; Xie, B.; Zhao, Y. Esculetin inhibits endometrial cancer proliferation and promotes apoptosis via hnRNPA1 to downregulate BCLXL and XIAP. *Cancer Lett.* **2021**, *521*, 308–321.
265. Chowdhury, A.A.; Gawali, N.B.; Shinde, P.; Munshi, R.; Juvekar, A.R. Imperatorin ameliorates lipopolysaccharide induced memory deficit by mitigating proinflammatory cytokines, oxidative stress and modulating brain-derived neurotrophic factor. *Cytokine* **2018**, *110*, 78–86.
266. Deng, M.; Xie, L.; Zhong, L.; Liao, Y.; Liu, L.; Li, X. Imperatorin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. *Eur. J. Pharm.* **2020**, *879*, 173124.
267. Wang, K.S.; Lv, Y.; Wang, Z.; Ma, J.; Mi, C.L.; Li, X.Z.; Jin, X.J. Imperatorin efficiently blocks TNF- α -mediated activation of ROS/PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Oncol. Rep.* **2017**, *37*, 3397–3404.

3. Cumarina de hidrofurano		Felamidina	Antibacteriano ²⁶⁸
Cumarinas de pirano			
4a. Tipo angular		Inofilum A,B,C,E,P,G1 y G2	Antiviral ²⁶⁹
4b. Tipo lineal		Agasilina	Antibacteriano ²⁷⁰
5. Bicumarina		Dicumarol	Anticoagulante ²⁷¹

Cumarinas como agentes anticancerígenos

Las propiedades antitumorales de las cumarinas han sido atribuidas al hecho de que su particular estructura, plana y aromática, puede establecer numerosas interacciones no covalentes del tipo π - π , electrostáticas, hidrofóbicas, coordinación de metales, enlaces de hidrogeno y fuerzas de van der Waals con los sitios activos en los receptores o enzimas de los diversos organismos.²⁷² Se han identificado numerosos mecanismos de acción en la actividad antitumoral de derivados de cumarinas. Así pues, se ha descrito agentes intercalantes,²⁷³ inhibidores de la topoisomerasa,²⁷⁴ antagonistas de hormonas,²⁷⁵ inhibidores de la angiogénesis,²⁷⁶ agentes antimetabólicos,²⁷⁷ inductores de apoptosis,²⁷⁸ inhibidores de CAs²⁷⁹ o inhibidores de la telomerasa²⁸⁰ (**Figura 5.2**).

-
268. Rosselli, S.; Maggio, A.M.; Faraone, N. The cytotoxic properties of natural coumarins isolated from roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae) and of synthetic ester derivatives of aegelinol. *Nat. Prod. Comm.* **2009**, *4*, 1701–1706.
269. Patil, A.; Freyer, A.J.; Eggleston, D.S.; Haltiwanger, R.C.; Bean, M.F.; Taylor, P.B.; Caranfa, M.J.; Breen, A.L.; Bartur, H.R.; Johnson, R.K. The inophyllums novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 4131–4138.
270. Basile, A.; Sorbo, S.; Spadaro, V.; Bruno, M., Maggio, A., Faraone, N.; Roselli, S. Antimicrobial and antioxidant activities of coumarin from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae). *Molecules*, **2009**, *14*, 939–952.
271. Sun, C.; Zhao, W.; Wang, X.; Sun, Y.; Chen, X. A pharmacological review of dicoumarol: An old natural anticoagulant agent. *Pharmacol. Res.* **2020**, *160*, 105193.
272. Ren, J.Q.C.; Gao, C.; Xu, Z.; Feng, L.S.; Liu, M.L.; Wu, X.; Zhao, F. Bis-coumarin derivatives and their biological activities. *Curr. Top. Med. Chem.* **2018**, *18*, 101–113.
273. Amin, K.M.; Taha, A.M.; George, R.F.; Mohamed, N.M.; Elsenduny, F.F. Synthesis, antitumor activity evaluation and DNA-binding study of coumarin-based agents. *Arch. Pharm.* **2017**, *351*, e1700199.
274. Hueso-Falcon, A.; Amesty, L.; Anaissi-Afonso, I.; Lorenzo-Castrillejo, F.; Machin, A. Synthesis and biological evaluation of naphthoquinone-coumarin conjugates as topoisomerase II inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *27*, 484–489.
275. Luo, G.; Li, X.; Zhang, G.; Wu, C.; Tang, Z.; Liu, L.; You, Q.; Xiang, H. Novel SERMs bases on 3-aryl-4-aryloxy-2-H-chromen-2-one skeleton- a possible way to dual $E\alpha$ / VEGFR-ligands for treatment of breast cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *140*, 252–273.

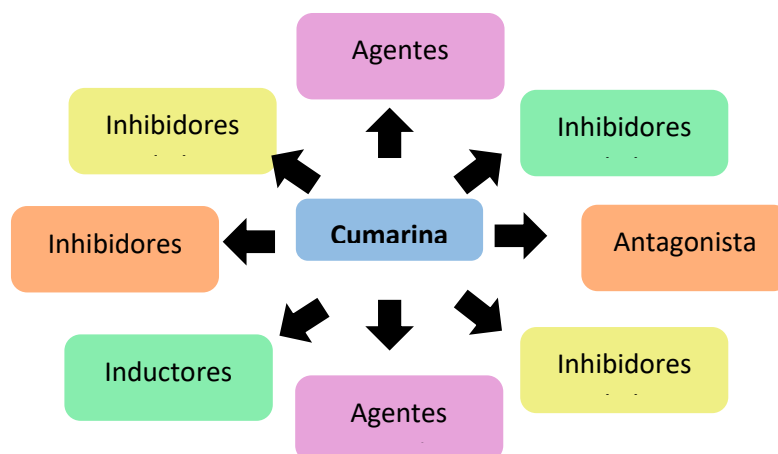


Figura 5.2. Mecanismos de actividad antitumoral descritos para derivados de cumarinas.

El núcleo de la cumarina es un punto de partida interesante para el desarrollo de nuevos fármacos con actividad frente a diversos tipos de cáncer; la incorporación a dicho núcleo de distintos farmacóforos en una única arquitectura molecular podría permitir modular la afinidad y actividad antitumoral, a la vez que reducir los efectos secundarios y evitar la quimiorresistencia a fármacos.

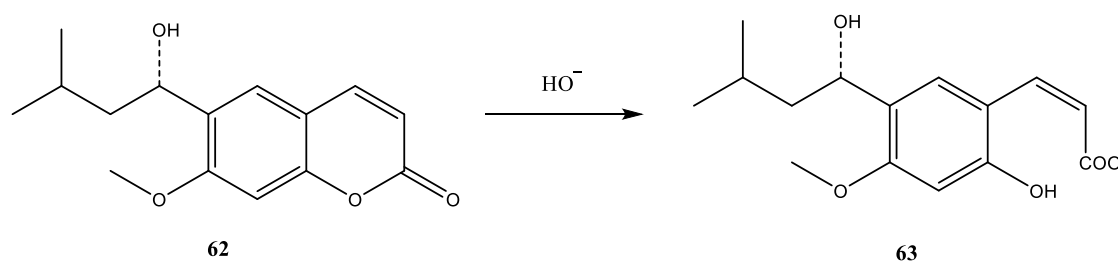
Las anhidrasas carbónicas, tal y como se ha mencionado en el capítulo anterior, son enzimas que catalizan la hidratación reversible del CO_2 , dando lugar a la formación de bicarbonato y protones. Esto provoca la acidificación del entorno, situación muy común en el caso de tumores. Se sabe que las cumarinas controlan el equilibrio del pH de diferentes células cancerosas e inhiben la actividad de las isoformas IX y XII relacionadas con tumores hipóxicos.²⁸¹

Los derivados de cumarina son una clase prometedora de inhibidores de CAs debido a que no interactúan directamente con el ion Zn^{2+} , como es en el caso de las sulfonamidas y análogos, sino que poseen un mecanismo de inhibición totalmente diferente. De hecho, actúan en realidad como profármacos, debido a que experimentan una hidrólisis de la lactona, debido a la acción esterasa que también manifiestan las CAs;

-
276. Cui, N.; Lin, D.D.; Shen, Y.; SHI, j.g.; Wang, B.; Zhao, M.Z.; Zheng, L.; Chen, H.; Shi, J.H. Triphenylethylene-coumarin hybrid TCH-5c suppresses tumorigenic progression in breast cancer mainly through the inhibition of angiogenesis. *Anticancer Agents Med.Chem.* **2019**, *19*, 1253–1261.
277. Singh, H.; Singh, J.V.; Gupta, M.K.; Saxena, A.K.; Sharma, S.; Nepali, K.; Bedi, P.M.S. Triazole tethered isatin-coumarin based molecular hybrids as novel antitubulin agents: design, synthesis, biological investigation and docking studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 3974–3979.
278. Sabt, O.M.; Abdelhafez, R.S.; El-Haggag, H.M.F.; Madkour, W.M.; Eldehna, E.E.A.M.; El-Khrisy, M.A.; Abdel-Rahman, L.A. Novel coumarin-6-sulfonamides as apoptotic antiproliferative agents: synthesis, in vitro biological evaluation and QSAR studies. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **2018**, *33*, 1095–1107.
279. Thacker, P.S.; Alvala, M.; Arifuddin, M.; Angeli, A.; Supuran, C.T. Design, synthesis and biological evaluation of coumarin-3-carboxamides as selective carbonic anhydrase IX and XII inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2019**, *86*, 386–392.
280. Lv, N.; Sun, M.; Liu, C.; Li, J. Design and synthesis of 2-phenylpyrimidine coumarin derivatives as anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *17*, 4578–4581.
- 281 Al-Wharhi, T.; Sabt, A.; Elkaeed, E.B.; Eldehna, W.M. Recent advancements of coumarin-based anticancer agents: an up-to-date review. *Bioorg. Chem.* **2020**, *103*, 104163.

en este contexto, también se les denomina inhibidores suicidas.²⁸² Esto conduce a la formación de un derivado del ácido 2-hidroxicinámico (**Figura 4.2D**); se ha descrito que esta forma hidrolizada del esqueleto de cumarina se une a la entrada del sitio activo, bloqueando la entrada del sustrato y así se previene la catálisis.²⁸³

Maresca *et al.*,²⁸³ con objeto de comprender mejor el mecanismo por el cual las cumarinas inhibían a las anhidrasas carbónicas, resolvieron la estructura del cristal de rayos X del complejo de la cumarina **62** (**Esquema 5.1**) y la CA II. Se observó que es el producto de la hidrólisis de la cumarina (**63**), y no la cumarina original, el que interacciona con la CA.



Esquema 5.1. Hidrólisis de la cumarina **62** por la actividad esterasa de las CAs.

Se comprobó que el compuesto **63** se une a la entrada de la cavidad del sitio activo, con el fragmento hidroxipentilo dirigido hacia la mitad hidrofílica de la enzima, y el fragmento de *cis*-carboxietileno, hacia la mitad hidrófoba.²⁸² Los grupos metoxi y carboxilo participan en varios enlaces de hidrógeno con el sitio activo; por otro lado, el fragmento 1S-OH exhibe una fuerte interacción dipolo-dipolo con el oxígeno del carbonilo de la cadena lateral del residuo Asn67. También se observa una interacción de apilamiento entre el anillo aromático del compuesto **63** con el anillo de fenilo del Phe 131.²⁸² En la **Figura 5.3** se muestra la estructura de difracción de rayos-X para el complejo **63**-CA II.

282. Maresca A., Temperini C., Vu H., Pham N.B., Poulsen S.-A., Scozzafava A., Quinn R.J., Supuran C.T. Non-Zinc mediated inhibition of carbonic anhydrases: coumarins are a new class of suicide inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3057–3062.

283. Maresca, A.; Temperini, C.; Pochet, L.; Masereel, B.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. Deciphering the mechanism of carbonic anhydrase inhibition with coumarins and thiocoumarins. *J. Med. Chem.* **2010**, *5*, 335–344.

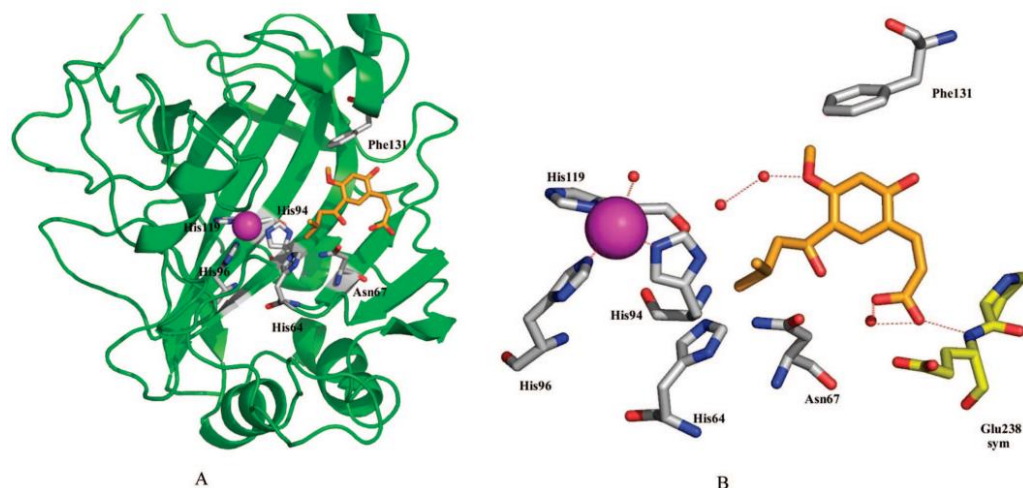


Figura 5.3. Aducto de la CA II con el compuesto **63** (tomado de referencia 282).

5.1.2. Glicoconjugados derivados de cumarinas y sulfonamidas como inhibidores de anhidrasas carbónicas

Se ha descrito que la conjugación de farmacóforos responsables de la inhibición de CAs (ej. sulfonamidas) a residuos de carbohidrato permite obtener inhibidores selectivos de las isoformas IX y XII,²⁸⁴ que tal y como se ha descrito en el capítulo anterior, están relacionadas con procesos tumorales. Ello es debido a que, mientras el grupo sulfonamido interacciona con el sitio activo de la enzima, el residuo sacarídico, considerado como la cola polar, se orienta hacia la región hidrofílica, estabilizándose mediante puentes de hidrógeno con algunos aminoácidos presentes.²⁸⁵ En este tipo de estrategia se persigue reducir la permeabilidad del compuesto a través de la membrana, teniendo en cuenta que las isoformas IX y XII son enzimas transmembrana, con el sitio activo dirigido hacia el medio extracelular.⁷⁹

Tal y como se mostrará en el apartado de Resultados y discusión, el objetivo primordial de este capítulo ha sido la preparación de nuevos inhibidores de CAs basados en la conexión de sulfonamidas y cumarinas a fragmentos de carbohidrato como *cola* polar.

De forma general, en la bibliografía se describe que los inhibidores obtenidos con este enfoque se pueden agrupar esquemáticamente en dos clases principales: glicosídicos (cuando el ZBG, bien sulfonamida o isóster, se encuentra en la posición

284. Winum, J.Y.; Colinas, P. A.; Supuran, C. T. Glycosidic carbonic anhydrase IX inhibitors: a sweet approach against cancer. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1419–1426.

285. Winum, J.Y.; Casini, A.; Mincione, F.; Starnotti, M.; Montero, J.L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors : X-ray crystallography structure of the adduct of human isozyme II with EMATE, a dual inhibitor of carbonic anhydrase and steroid sulfate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 231–234.

anomérica o en C-6 del carbohidrato) y glicoconjugados, cuando existe un espaciador entre el carbohidrato y el ZBG.⁷⁹

Entre los inhibidores de CAs de tipo glicosídico⁷⁹ pueden destacarse (**Figura 5.4**), entre otros, análogos del topiramato **64**, **65**²⁸⁶ (fármaco empleado en el tratamiento de la epilepsia), sulfonamidas (**66**)²⁸⁷ y sulfamidas (**67**) anoméricas,²⁸⁸ o carbohidratos con un grupo sulfamoilo en posición C-6 (**68**).²⁸⁹ En estas familias se han empleado diversas configuraciones en el residuo de carbohidrato, estando sus hidroxilos protegidos en forma de acetal/sulfato en el caso de los derivados del topiramato, o bien libres o en forma de ésteres (acetato, propionato, butirato) en el resto. Los residuos de carbohidrato incluyen tanto mono- como disacáridos, así como glicales.

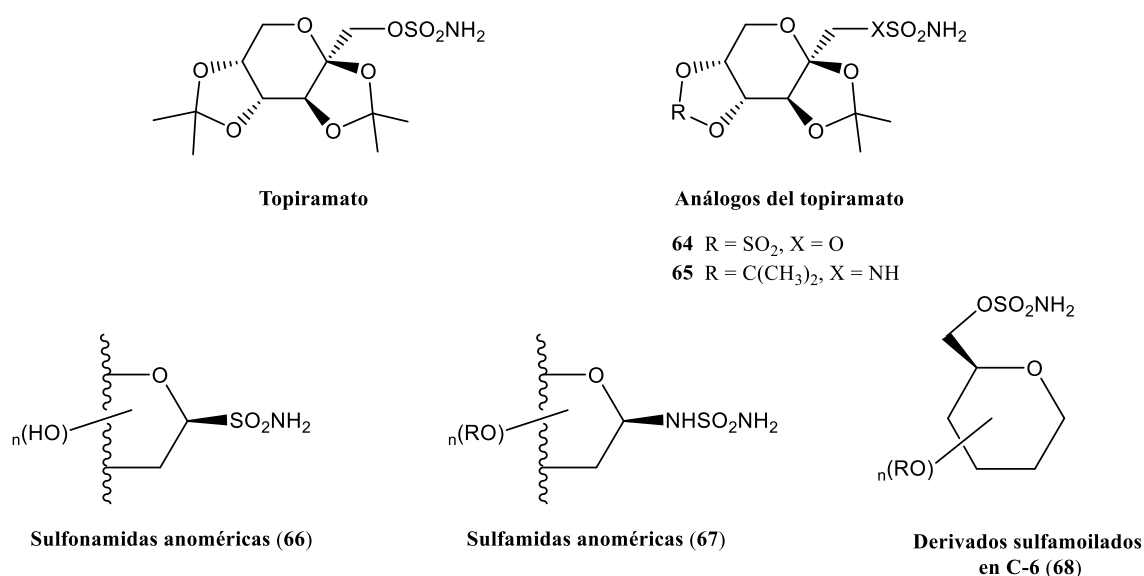


Figura 5.4. Principales familias de derivados glicosídicos de sulfonamidas y análogos.

En la **Tabla 5.2** se muestran las constantes de inhibición (K_i) de los mejores derivados de cada una de las familias mostradas en la **Figura 5.4** frente a CA IX, así como la selectividad CA I/IX.⁷⁹ De los resultados puede extraerse la conclusión de que las cuatro familias tienen una potencia análoga frente a la CA IX, en el rango nM bajo, pero existen sustanciales diferencias en cuanto a la selectividad, encontrándose la situación

286. Maryanoff, B.E.; McComsey, D.F.; Costanzo, M.J.; Hochman, C.; Smith-Swintosky, V. Shank, R.P. Comparison of sulfamate and sulfamide groups for the inhibition of carbonic anhydrase-II by using topiramate as a structural platform. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1941–1947.
287. Lopez, M.; Paul, B.; Hofmann, A.; Morizzi, J.; Wu, Q. K.; Charman, S. A.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Supuran, C.T.; Poulsen, S.-A. S-Glycosyl primary sulfonamides—a new structural class for selective inhibition of cancer-associated carbonic anhydrases. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6421–6432.
288. Rodríguez, O.M.; Maresca, A.; Témpera, C.A.; Bravo, R.D.; Supuran, C.T. N-β-glycosyl sulfamides are selective inhibitors of the cancer associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4447–4450.
289. Lopez, M.; Trajkovic, J.; Bornaghi, L.F.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Supuran, C.T.; Poulsen, S.-A. Design, synthesis, and biological evaluation of novel carbohydrate-based sulfamates as carbonic anhydrase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1481–1489.

óptima para los derivados sulfamoidados en C-6, con un índice de selectividad superior a 670; también presentan una selectividad destacable las sulfamidas anoméricas. Por el contrario, el prototipo de derivados de topiramato muestra una actividad ligeramente superior para la inhibición de la CA I, y en el caso de las sulfonamidas, virtualmente no presentan selectividad.⁷⁹

Tabla 5.2. Actividad frente a CA I y CA IX de inhibidores glicosídicos (K_i , nM)

Familia	CA IX	Selectividad CA I/IX
Análogos de topiramato	4.5	0.75
Sulfonamidas anoméricas	4	1.05
Sulfamidas anoméricas	9	86
Derivados sulfamoidados en C-6	8.4	674

Entre los inhibidores de tipo glicoconjugado,⁷⁹ las principales familias son las que se muestran en la **Figura 5.5**: tioureas derivadas del topiramato (**69**),²⁹⁰ sulfamatos (**70**),²⁹¹ glicosil sulfenamidas (**71**) y sulfonamidas (**72**),²⁹² glicosil tioureas (**73**),²⁹³ amidofenilsulfonamidas (**74**),²⁹⁴ triazoles, tanto 1,4- (**75**)²⁹⁵ como 1,5-disustituídos (**76**),²⁹⁶ glicósidos derivados de cumarinas (**77**)²⁹⁷ y C-glicósidos (**78**).²⁹⁸

-
290. Winum, J.-Y.; Thiry, A.; El Cheikh, K.; Dogné, J.-M.; Montero, J.-L.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Masereel, B.; Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of isoforms I, II, IV, VA, VII, IX, and XIV with sulfonamides incorporating fructopyranose-thioureido tails. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2685–2691.
291. Mahon, B.P.; Lomelino, C.L.; Ladwig, J.; Rankin, G.M.; Driscoll, J.M.; Salguero, A.L.; Pinard, M.A.; Vullo, D.; Supuran, C.T.; Poulsen, S.-A.; McKenna, R. Mapping selective inhibition of the cancer-related carbonic anhydrase IX using structure-activity relationships of glucosyl-based sulfamates. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6630–6638.
292. Lopez, M.; Bornaghi, L.F.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Charman, S.A.; Supuran, C.T.; Poulsen, S.-A. Sulfonamide linked neoglycoconjugates—a new class of inhibitors for cancer-associated carbonic anhydrases. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2913–2926.
293. Moeker, J.; Teruya, K.; Rossit, S.; Wilkinson, B.L.; Lopez, M.; Bornaghi, L.F.; Innocenti, A.; Supuran, C.T.; Poulsen, S.-A. Design and synthesis of thiourea compounds that inhibit transmembrane anchored carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2392–2404.
294. Hou, Z.; Li, C.; Liu, Y.; Zhang, M.; Wang, Y.; Fan, Z.; Guo, C.; Lin, B.; Liu, Y. Design, synthesis and biological evaluation of carbohydrate-based sulphonamide derivatives as topical antiglaucoma agents through selective inhibition of carbonic anhydrase II. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*, 383–390.
295. Carroux, C.J.; Rankin, G.M.; Moeker, J.; Bornaghi, L.F.; Katneni, K.; Morizzi, J.; Charman, S.A.; Vullo, D.; Supuran, C.T.; Poulsen, S.-A. A prodrug approach toward cancer-related carbonic anhydrase inhibition. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9623–9634.
296. Salmon, A.J.; Williams, M.L.; Maresca, A.; Supuran, C.T.; Poulsen, S.-A. Synthesis of glycoconjugate carbonic anhydrase inhibitors by ruthenium-catalysed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6058–6061.
297. Touisni, N.; Maresca, A.; McDonald, P.C.; Lou, Y.; Scozzafava, A.; Dedhar, S.; Winum, J.-Y.; Supuran, C.T. Glycosyl coumarin carbonic anhydrase IX and XII inhibitors strongly attenuate the growth of primary breast tumors. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8271–8277.

Son especialmente abundantes los ejemplos con espaciadores de tipo tioureido y triazolilo; ambos son fragmentos robustos, compatibles con una amplia variedad de condiciones de reacción, y que puede aportar interacciones no covalentes con regiones clave del sitio activo de la enzima. La formación de los anillos de 1,2,3-triazol es el ejemplo más característico de la familia de reacciones conocidas como *click chemistry*;²⁹⁹ dicha reacción es una cicloadición 1,3-dipolar entre una azida y un alquino. Cuando dicha reacción se lleva a cabo en presencia de un catalizador de Cu(I), conduce de manera regioselectiva a la formación del triazol 1,4-disustituido (CuAAC, *Cu(I)-Catalyzed Azido-Alkyne cycloaddition*), mientras que el empleo de un catalizador de Ru (RuAAC, *Ruthenium-Catalyzed Azido-Alkyne cycloaddition*) conduce al isómero 1,5-disustituido.

En el contexto de la inhibición de las CAs, los triazoles **76** fueron, en general, inhibidores más potentes frente a la CA IX que sus regioisómeros **75**.⁷⁹

De forma análoga a la familia de los inhibidores de tipo glicósido, en la **Tabla 5.3** se muestran las constantes de inhibición (K_i) de los mejores derivados de cada una de las familias de glicoconjugados mostradas en la **Figura 5.5** frente a CA IX, así como la selectividad CA I/IX.⁷⁹

Como puede comprobarse, los derivados cabeza de serie, tanto en potencia, como selectividad, serían las tioureas (derivadas de topiramato y en posición glicosídica), y los sulfamatos, ambas familias con actividades en el rango nM bajo, y excelentes selectividades (1070–4750).

298. Riafrecha, L.E.; Rodríguez, M.A.; Vullo, D.; Supuran, C.T.; Colinas, P.A. Synthesis of C-cinnamoyl glycosides and their inhibitory activity against mammalian carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1489–1494.

299. Gil, M.V.; Arévalo, M.J.; López, Ó. Click Chemistry - What's in a name? Triazole synthesis and beyond. *Synthesis* **2007**, 1589–1620.

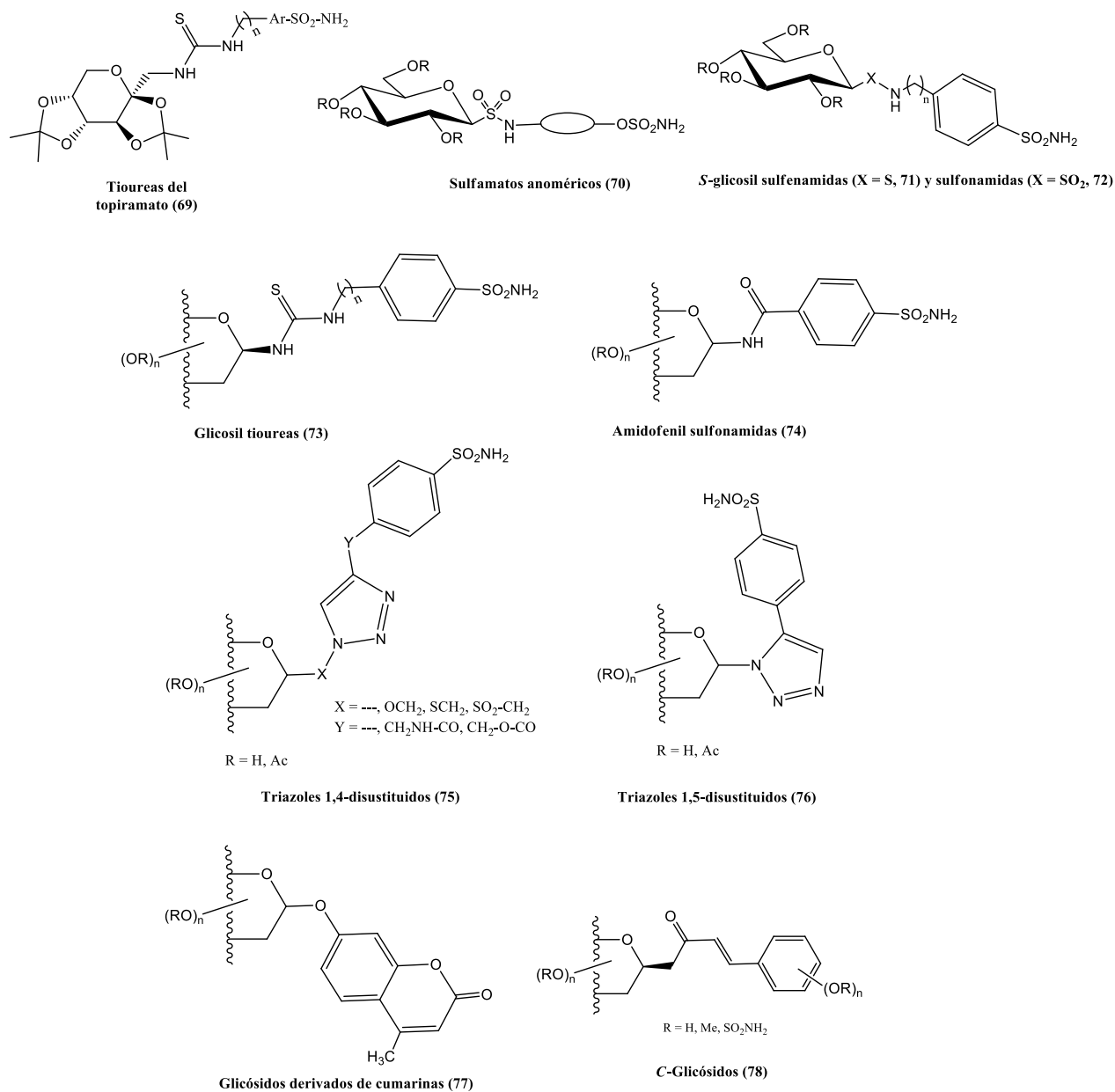


Figura 5.5. Principales familias de inhibidores de CAs de tipo glicoconjugado

Tabla 5.3. Actividad frente a CA I y CA IX de inhibidores glicosídicos (K_i , nM)

Familia	CA IX	Selectividad CA I/IX
Tioureas de topiramato	10	1070
Sulfamatos anoméricos	2	4750
Derivados S-glicosilados	94	72
Glicosiltioureas	2	2029
Amidofenil sulfenamidas	700	17.4
Glicosil triazoles	6	60
Glicosil cumarinas	9	>11
C-Glicósidos	16	4

Especialmente interesantes resultaron ser los glicósidos derivados de cumarina **77**, en particular proceden de la *O*-glicosilación de la 4-metil-7-hidroxicumarina.²⁹⁷ En la **Figura 5.6** se muestra el pequeño panel de compuestos preparados, donde se modificó la configuración del carbohidrato, el número de los mismos (monosacáridos/disacáridos), así como la anomería del correspondiente derivado. Los compuestos **77** resultaron ser inhibidores débiles (rango $\mu\text{M}/\text{nM}$) o totalmente inactivos frente a las CAs I y II, mientras que mostraron una actividad potente (rango nM) para las isoformas transmembrana IX y XII.

En particular, el manopiranosido **77a** inhibió de manera significativa el crecimiento de tumores primarios de células tumorales de mama 4T1, altamente agresivas.

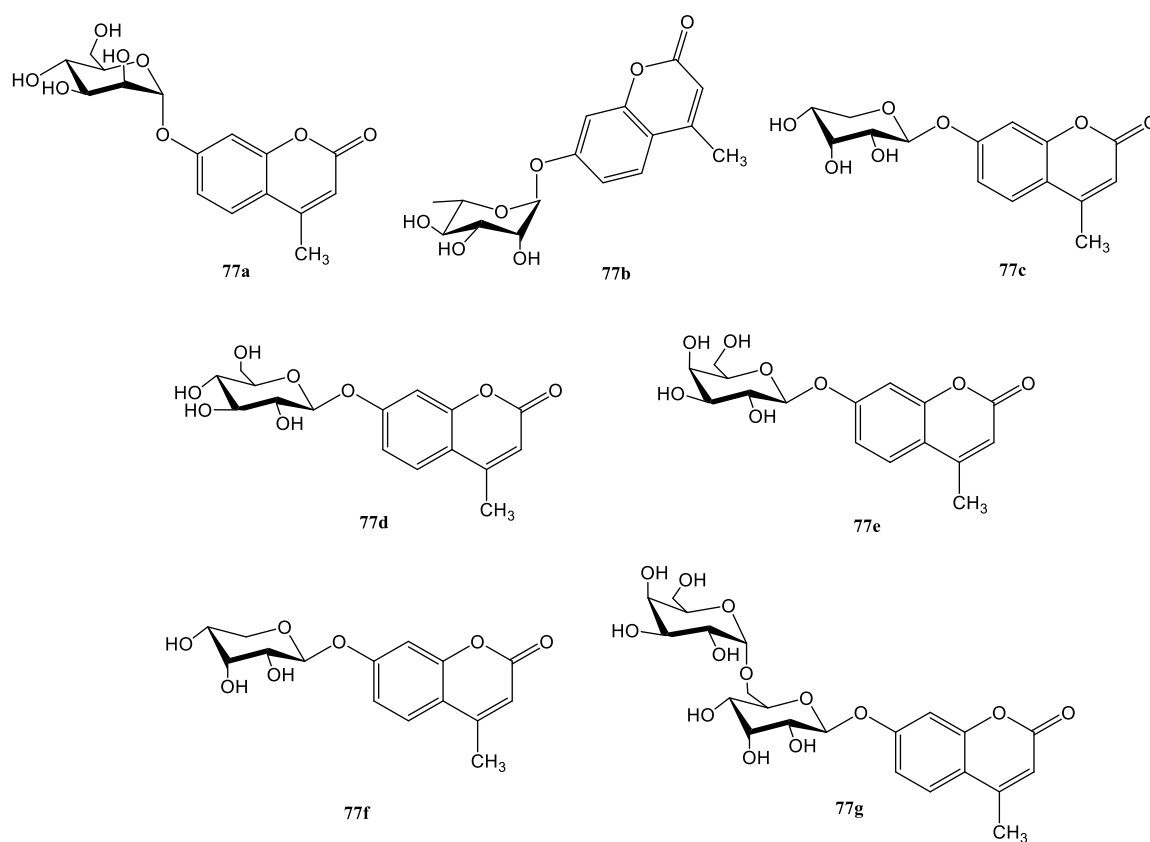


Figura 5.6. Estructura de las glicosilcumarinas **77a-g** como inhibidores de CAs.

Con objeto de incrementar la interacción con el centro activo de la enzima, Tanpure *et al.* emplearon³⁰⁰ el modelo de “doble cola”, en el que el ZBG está unido directamente a dos tipos de cola, una hidrófoba y otra, hidrófila, pudiendo de esta manera interactuar simultáneamente con ambas mitades (polar y poco polar) existentes en el sitio activo de las CAs. Uno de los compuestos preparados fue el glucosil

300. Tanpure, R.P.; Ren, B.; Peat, T.S.; Bornaghi, L.F.; Vullo, D.; Supuran, C.T.; Poulsen, S.-A. Carbonic anhydrase inhibitors with dual-tail moieties to match the hydrophobic and hydrophilic halves of the carbonic anhydrase active site. *J. Med. Chem.* **2015**; *58*, 1494–1501.

triazol **79**, donde el grupo sulfonamido sería el ZBG, el fragmento de tipo β -D-glucopiranosilo, la cola hidrófila, y el anillo de fenilo, la cola apolar (**Figura 5.7**).

De forma análoga, Hou *et al.* describieron³⁰¹ la preparación de la familia de bencenosulfonamidas **80**, con el residuo de carbohidrato como cola hidrófila, y el fragmento de ácido cinámico como cola hidrófoba. Estos compuestos resultaron ser excelentes inhibidores de CA II y IX, con constantes de inhibición en el rango 7–152 nM. En particular, el compuesto con sustituyentes metoxilo en las posiciones 2 y 4 del anillo del residuo de ácido cinámico fue el mejor de la serie (IC_{50} = 7 nM, CA IX), permitiendo además reducir de manera significativa la acidificación extracelular en modelos de células tumorales bajo condiciones de hipoxia, exhibiendo una mejora de la capacidad inhibitoria en comparación con el fármaco AAZ.

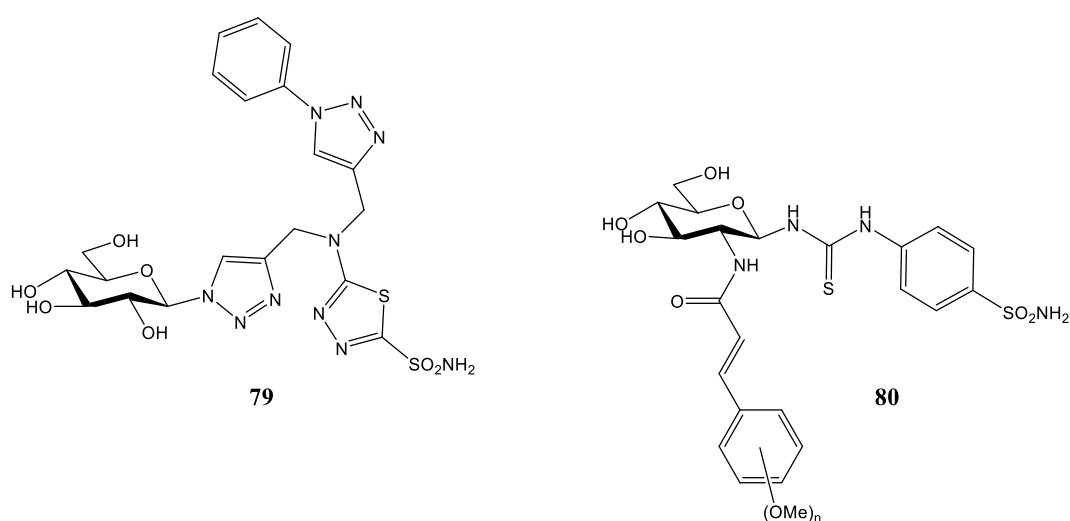
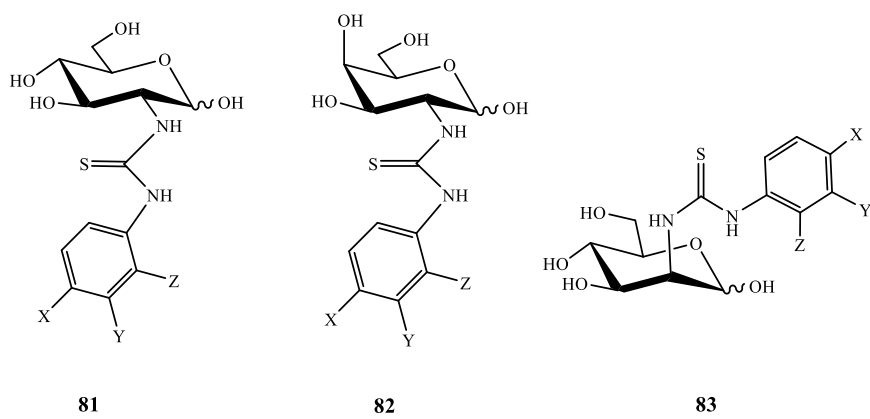


Figura 5.7. Ejemplos de derivados de carbohidratos diseñados con la aproximación de “doble cola”

Como antecedente directamente relacionado con la investigación desarrollada en este capítulo de la Tesis Doctoral destacan las bencenosulfonamidas **81–83**,³⁰² preparadas mediante acoplamiento de hidrocloreto de D-glucosamina/galactosamina/manosamina con isotiocianatos derivados de diversas aminobencenosulfonamidas (**Figura 5.8**). Sus actividades inhibitorias se compararán con las de los compuestos preparados, en el capítulo dedicado a actividades biológicas.

301. Hou, Z.; Lin, B.; Bao, Y.; Yan, H.-N.; Zhang, M.; Chang, X.-W.; Zhang, X.-X.; Wang, Z.-J.; Wei, G.F.; Cheng, M.-S.; Liu, Y.; Guo, C. Dual-tail approach to discovery of novel carbonic anhydrase IX inhibitors by simultaneously matching the hydrophobic and hydrophilic halves of the active site. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *132*, 1–10.

302. Smaine, F.Z.; Winum, J.Y.; Montero J.L.; Regainia, Z.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran C.T. Carbonic anhydrase inhibitors: selective inhibition of extracellular, tumor-associated isoforms IX and XII over isozymes I and II with glycosyl -thioureido-sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5096–5100.



81

82

83

- a $X=\text{SO}_2\text{NH}_2$, $Y=Z=\text{H}$
- b $X=\text{SO}_2\text{NH}_2$, $Y=\text{H}$, $Z=\text{F}$
- c $X=\text{SO}_2\text{NH}_2$, $Y=\text{H}$, $Z=\text{Cl}$
- d $X=\text{H}$, $Y=\text{SO}_2\text{NH}_2$, $Z=\text{H}$

Figura 5.8. Tioureas derivadas de carbohidratos y bencenosulfonamidas en C-2.

5.2. Objetivo general

El principal objetivo perseguido en el presente capítulo ha sido llevar a cabo la síntesis de glicoconjugados derivados de sulfonamidas y cumarinas como potenciales agentes antiproliferativos e inhibidores de anhidrasas carbónicas.

5.3. Objetivos particulares

1. Realizar la síntesis de una serie de glico-sulfonamidas (imidazolidina-2-tionas bicíclicas).
2. Realizar la síntesis de una serie de glico-cumarinas (imidazolidina-2-tionas bicíclicas).
3. Caracterización de los compuestos preparados.
4. Evaluación biológica (inhibidores de las CAs y como agentes antiproliferativos).

5.4. Discusión de resultados.

En el presente capítulo de la Tesis Doctoral se ha abordado la preparación de nuevos inhibidores de CAs, en particular glicoconjugados de arilsulfonamidas/cumarinas, donde el farmacóforo se encuentra unido a un biciclo sacarídico de tipo imidazolidina-2-tiona (**Figura 5.9**); esta estructura, que en realidad se trata de una tiourea cíclica, sería un análogo conformacionalmente rígido de los derivados **81–83** (**Figura 5.8**). Con ello pretendemos analizar la influencia de la restricción conformacional del carbohidrato en la interacción con las CAs.

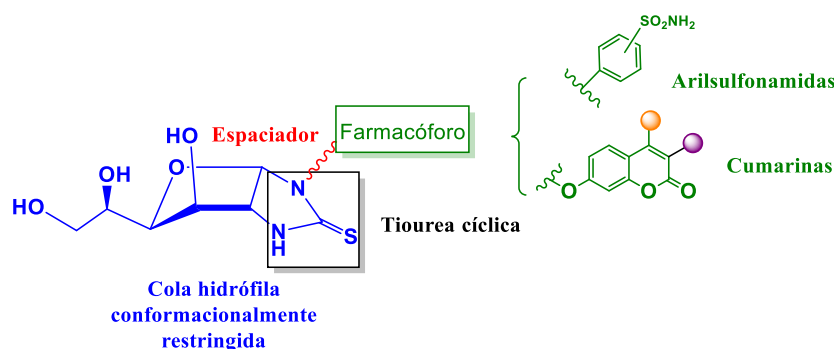


Figura 5.9. Estructura general de las imidazolidina-2-tionas derivadas de arilsulfonamidas y cumarinas.

Este tipo de aproximación, donde se reduce la libertad conformacional, es ampliamente usado en la búsqueda de fármacos, ya que de esta manera se puede minimizar la pérdida de entropía en la interacción ligando-proteína, a la vez que mejorar la selectividad hacia ciertas isoformas, o reducir la metabolización del fármaco, incrementando de esta manera su biodisponibilidad.³⁰³

5.4.1. Preparación de imidazolidina-2-tionas derivadas de arilsulfonamidas

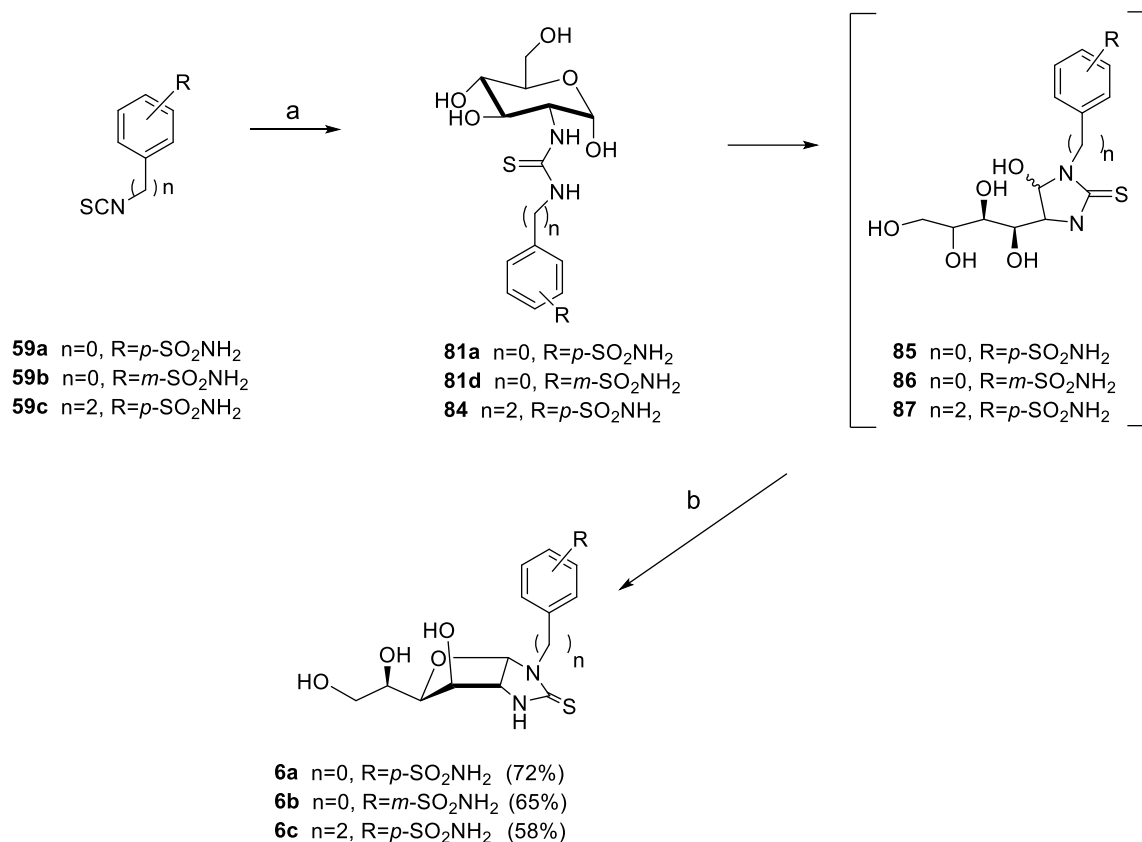
El acceso a las imidazolidina-2-tionas bicíclicas se llevó a cabo empleando la metodología desarrollada en el grupo de investigación de la Universidad de Sevilla donde se ha desarrollado parte de la Tesis Doctoral, que ha permitido al Prof. Fernández-Bolaños y col. acceder a una amplia familia de pseudonucleósidos.³⁰⁴ Dicha metodología consiste en el acoplamiento de un isotiocianato con un carbohidrato reductor que porte un grupo amino en la posición C-2, conduciendo a una tiourea.

De esta forma, se llevó a cabo el tratamiento de los isotiocianatos derivados de arilsulfonamida **59a-c** con hidrocloreuro de D-glucosamina, originando las tioureas **81a,d** y **84** (**Esquema 5.2**). El calentamiento *in situ* en presencia de AcOH permite evolucionar hacia las 5-hidroxi-imidazolidina-2-tionas **85-87**, obtenidas por ciclación intramolecular

303. Fang, Z.; Song, Y.; Zhan, P.; Zhang, Q.; Liu, X. Conformational restriction: an effective tactic in 'follow-on'-based drug discovery. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 885–901.

304. Fernández-Bolaños, J.G.; Zafra, E.; López, Ó.; Robina, I.; Fuentes, J. Stereoselective synthesis of imidazolidine imidazoline and imidazole C- and N- pseudonucleosides. *Tetrahedron:Asymmetry*, **1999**, *10*, 3011–3023.

entre el NH-3 y el grupo carbonilo latente. La posterior ciclodeshidratación en medio ácido originó las sulfonamidas bicíclicas buscadas **6a-c**.



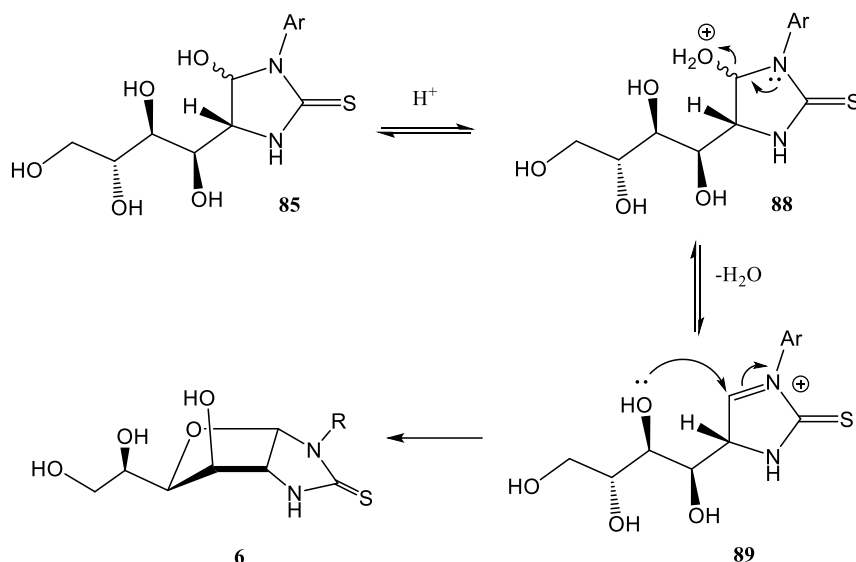
Esquema 5.2. Síntesis de sulfonamidas derivadas de glucosamina **6a-c**. Reactivos y condiciones
 a) D-glucosamina, NaHCO_3 , $\text{EtOH:H}_2\text{O}$ 2:1, 75°C b) AcOH , 90°C

En la metodología original, que empleaba isotiocyanatos de arilo/alquilo sencillos, no se observaba la formación de la tiourea, sino que esta evolucionaba espontáneamente a la correspondiente 5-hidroxi-imidazolidina-2-tiona, por ciclación del grupo NH-3 sobre el grupo carbonilo latente del azúcar reductor; dicho compuesto fue aislado como una mezcla de epímeros, con configuración mayoritaria $5R$.³⁰⁴

Cabe destacar que, en la presente Tesis Doctoral, posiblemente debido al fuerte carácter electrón atrayente del grupo sulfonamido en los isotiocyanatos derivados de aminosulfonamidas **59**, la ciclación se encuentra dificultada y por ello, el grupo del Prof. Supuran pudo aislar las tioureas reductoras **81-83**. En la presente Tesis Doctoral, la formación de las 5-hidroxi-imidazolidina-2-tionas **85-87** (partiendo de D-glucosamina), se forzó mediante calentamiento. La secuencia completa puede comprobarse en el **Esquema 5.2**, para el caso de la D-glucosamina.

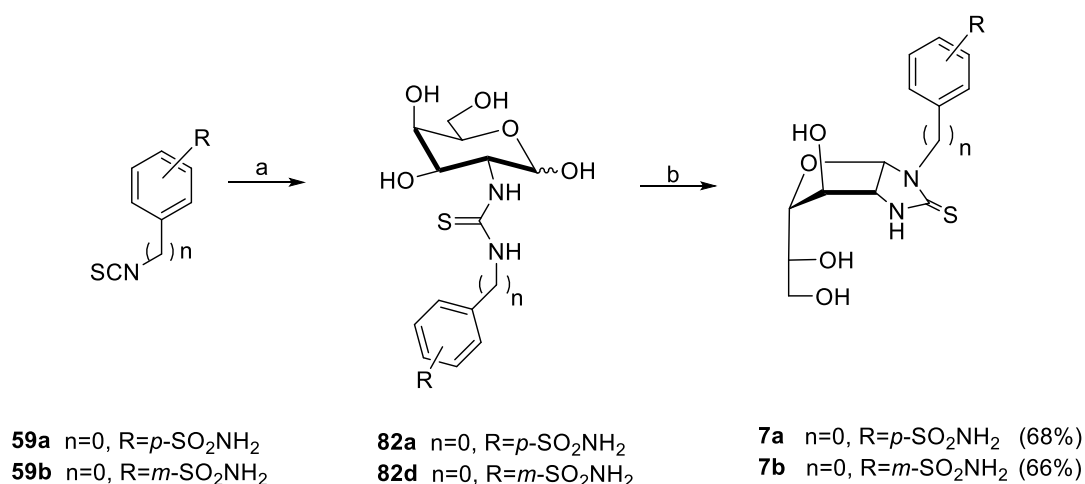
A continuación, mediante tratamiento con AcOH y calentamiento, los derivados **85-87** experimentaron una reacción de ciclodeshidratación, para dar lugar a las

glucofurano-imidazolidina-2-tionas bicíclicas **6**, cuyo mecanismo genérico se muestra en el **Esquema 5.3**. La protonación del hidroxilo localizado en C-5 de **85** favorece la eliminación de una molécula de agua, y la formación de un carbocatión estabilizado por resonancia (**89**), debido a la presencia del grupo NH-Ar. A continuación, la ciclación intramolecular espontánea del hidroxilo de la posición C-2' de la cadena tetrahidroxilada condujo a la formación del correspondiente biciclo **89**.

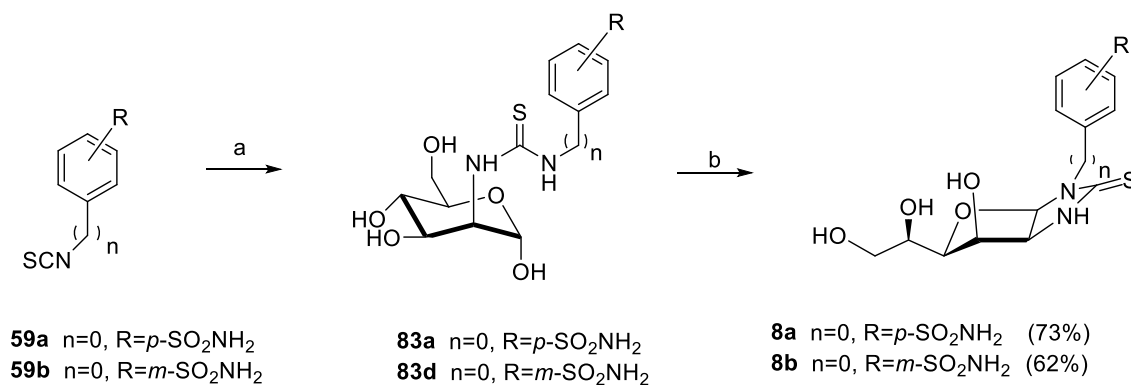


Esquema 5.3. Mecanismo de formación de las glucofurano-imidazolidina-2-tionas bicíclicas

La misma metodología se aplicó para la obtención de los derivados de D-galactosamina **7** (**Esquema 5.4**) y D-manosamina **8** (**Esquema 5.5**); en estos casos, los intentos de derivatización de dichos carbohidratos con el isotiocianato **59c** resultaron infructuosos.



Esquema 5.4. Síntesis de sulfonamidas derivadas de galactosamina **7a,b**. Reactivos y condiciones a) D-galactosamina, NaHCO₃, EtOH:H₂O 2:1, 75 °C b) AcOH, 90 °C.



Esquema 5.5. Síntesis de sulfonamidas derivadas de manosamina **8a,b**. Reactivos y condiciones a) D-manosamina, NaHCO₃, EtOH:H₂O 2:1, 75 °C b) AcOH, 90 °C.

Se analizará la influencia de la reducción de la libertad conformacional del biciclo, así como la configuración de estos y la posición del grupo sulfonamido en las propiedades biológicas (actividad antiproliferativa e inhibición de CAs).

A modo de ejemplo, en el espectro de ¹H-RMN del compuesto **6a** (**Figura 5.10**), los valores de las constantes de acoplamiento $J_{1,2}$ (6.0 Hz), $J_{2,3}$ (≈ 0 Hz), y $J_{4,5}$ (3.1 Hz) muestran una conformación E_4 del carbohidrato, donde los protones H-1 y H-2 adoptan una disposición relativa *sin* (constante de acoplamiento $J_{1,2}$ muy superior a lo esperable para ser un anómero α), mientras que los protones H-2 y H-3 adoptan un ángulo próximo a 90°, responsable de la constante de acoplamiento próxima a 0 Hz. Estos datos están de acuerdo con los descritos previamente para pseudonucleósidos análogos.³⁰⁴

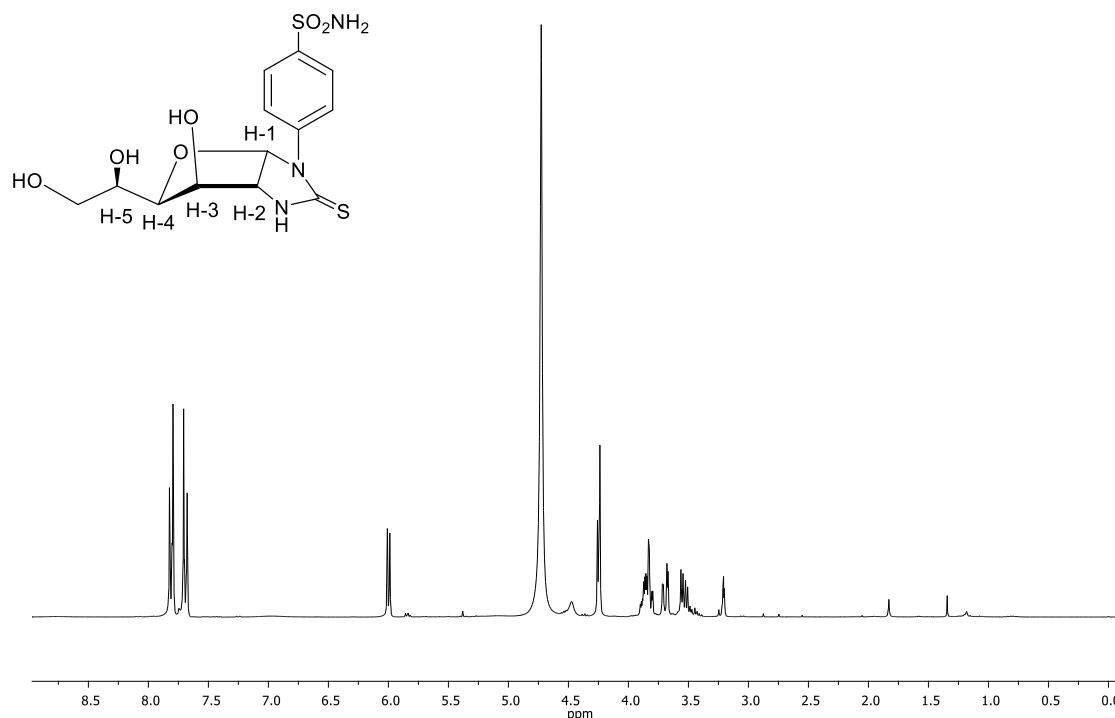


Figura 5.10. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) del producto **6a**.

En el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **6a** (Figura 5.11) se observa una señal a 181.8 ppm correspondiente al C=S; por otro lado, entre 146.2-126.2 ppm se encuentran las señales del anillo aromático, y a 95.0 ppm se encuentra la señal del carbono anomérico.

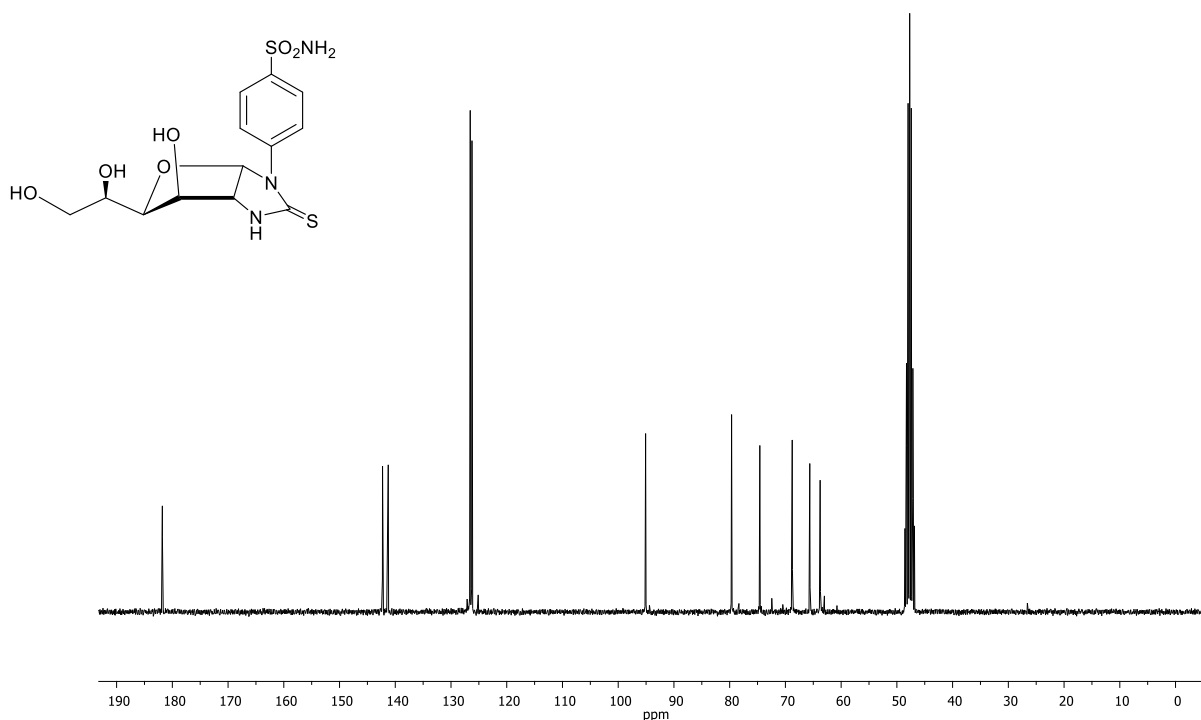
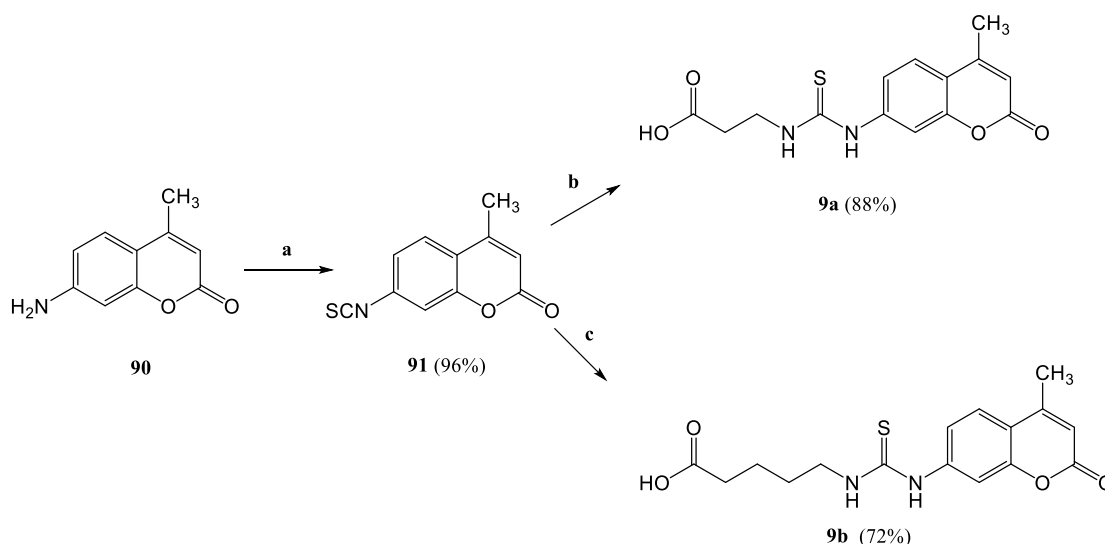


Figura 5.11. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CD_3OD) del producto **6a**.

5.4.2. Preparación de imidazolidina-2-tionas derivadas de cumarinas

En esta sección se abordará la preparación de nuevos híbridos cumarinas-carbohidratos como potenciales inhibidores de CAs. Se comenzó por llevar a cabo la preparación de cumarinas conectadas a través de un espaciador a un residuo polar, pero de naturaleza no sacarídica; en concreto, las cumarinas se conectaron a un fragmento de ácido carboxílico, que también podría complejarse al Zn^{2+} del centro activo de la enzima, y actuar por consiguiente como ZBG. En concreto, la 7-amino-4 metilcumarina comercial **90** se hizo reaccionar con tiofosgeno para obtener el correspondiente isotiocianato **91**³⁰⁵ (Esquema 5.6), el cual a su vez se acopló con la β -alanina para dar el derivado **9a** o con el ácido 5-aminovalérico para la obtención del derivado **9b** con buenos rendimientos (88 y 72%, respectivamente).

305. Mayekar, S.A.; Chaskar, A.C.; Mulwad, V.V. Facile synthesis of coumarinyl isothiocyanate from amino coumarin. *Synt. Commun.* **2010**, *40*, 46–51.



Esquema 5.6. Síntesis de diferentes ácidos carboxílicos derivados de cumarina. Reactivos y condiciones: a) CSCl_2 , CH_2Cl_2 , Et_3N 35°C , 20 min. b) β -alanina, Py, 50°C , 12 h. c) Acido 5-aminovalerico, Py, 50°C , 12 h.

En el espectro de ^1H del compuesto **9a** (Figura 5.12) se observa una señal simple a 2.40 ppm, correspondiente a los protones del CH_3 del cuerpo de la cumarina. A 2.59 ppm se observa un triplete correspondiente a los protones del CH_2 en posición α del COOH , mientras que entre 3.7 ppm se encuentra un cuartete que corresponde a los protones del otro CH_2 en posición vecinal al grupo tioureido; esta señal, que se encuentra acoplada con el grupo NH , demuestra la formación de la función tioureido. Por otra parte, el protón de NH unido al anillo aromático se encuentra a 10.05 ppm y el protón del OH del ácido resuena a 12.39 ppm.

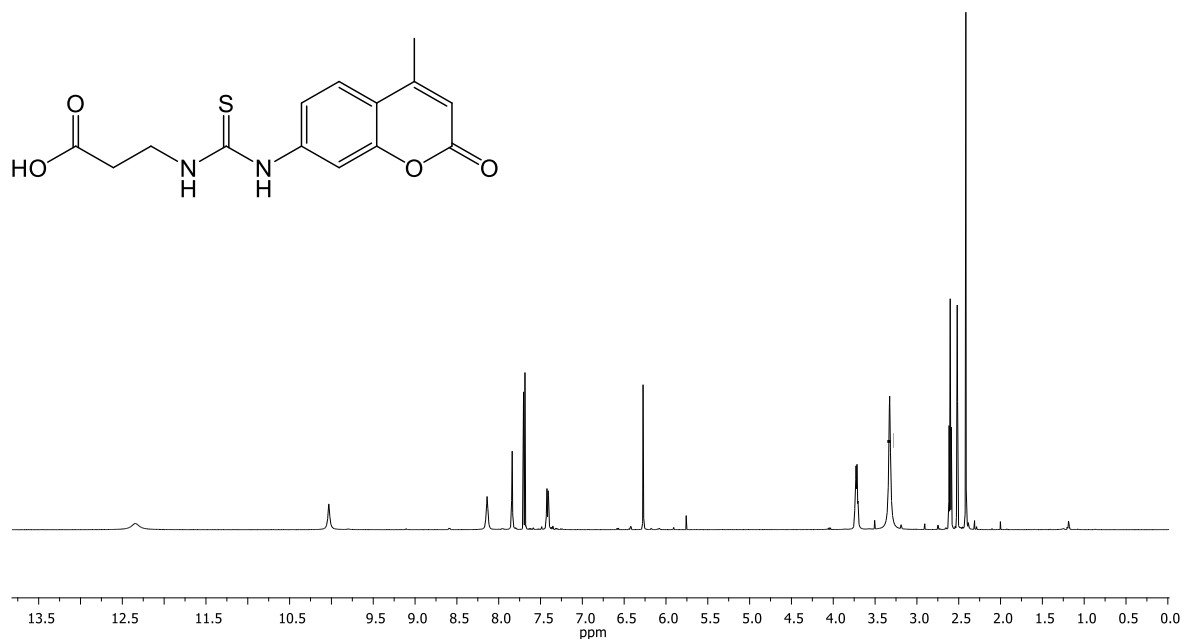


Figura 5.12. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) del producto **9a**.

El espectro de ^{13}C -RMN (**Figura 5.13**) de **9a** muestra un pico a 180 ppm, correspondientes al C=S, y otro a 173 ppm, correspondiente al grupo carboxílico; por otro lado, a 18 ppm resuena el carbono correspondiente al metilo del cuerpo de la cumarina.

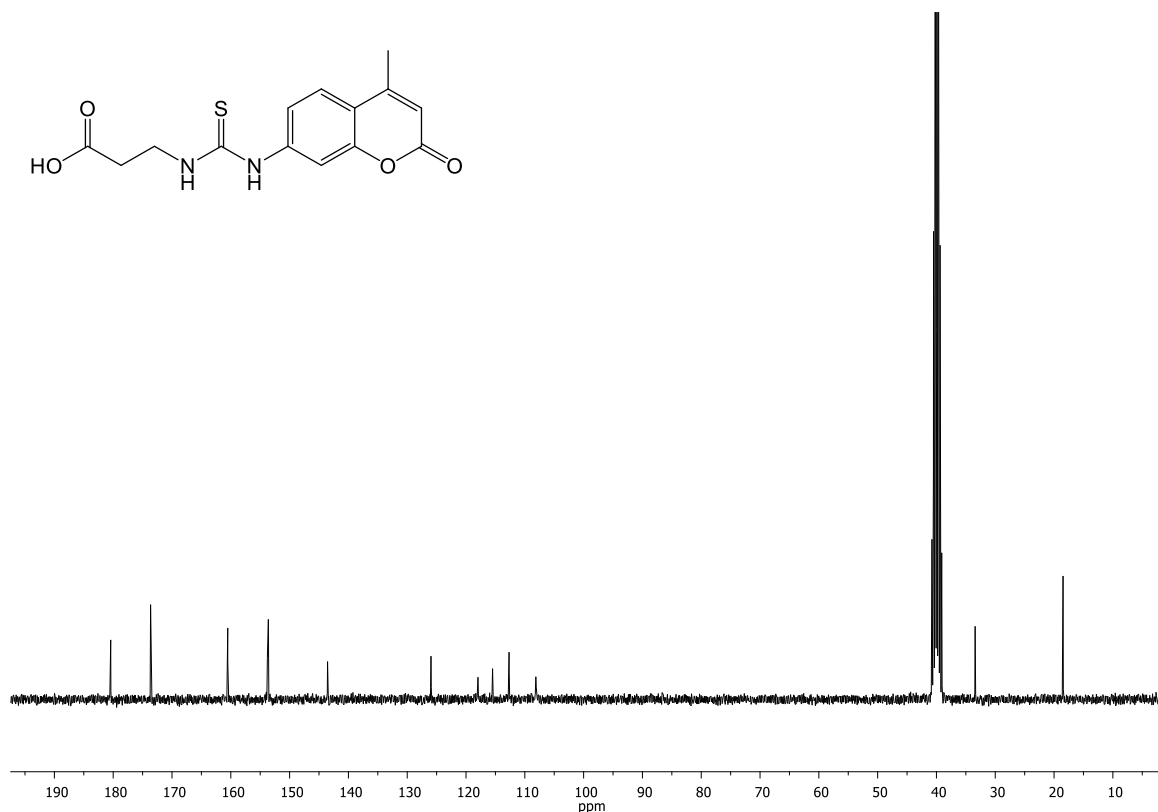
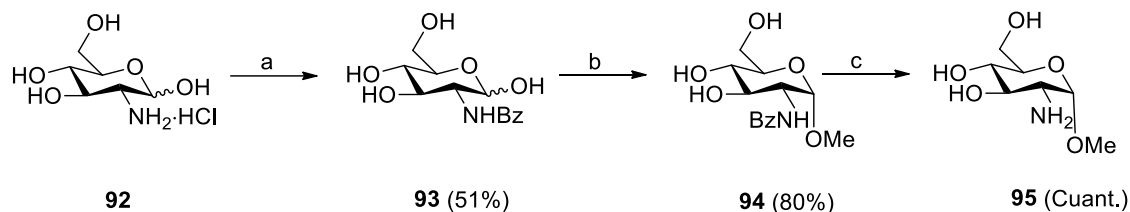


Figura 5.13. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) del producto **9a**.

A continuación, se abordó la preparación de imidazolidina-2-tionas derivadas de cumarinas, de manera análoga a lo descrito en la sección anterior para las arilsulfonamidas. En este caso, se modificarán numerosos aspectos estructurales, con objeto de obtener relaciones estructura-actividad (SARs) que permitan diseñar una molécula optimizada en cuanto a propiedades biológicas. Así pues, se ha modificado la configuración del carbohidrato, la distancia entre este y la cumarina, así como los sustituyentes en las posiciones C-3 y C-4 de la misma.

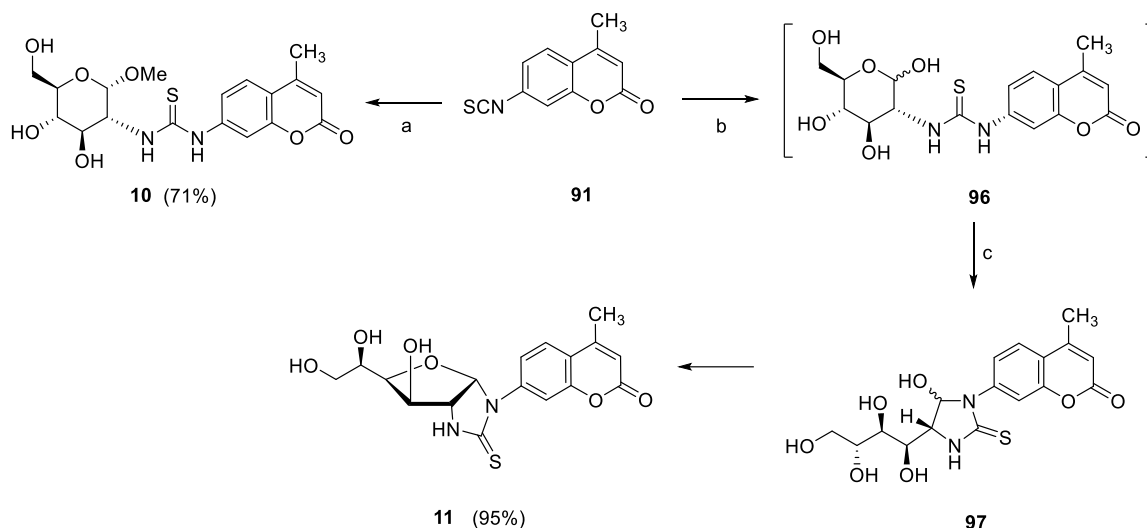
En primer lugar, se abordó la preparación de la imidazolidina-2-tiona **11** (tiourea bicíclica), y la de su análogo lineal **10** (**Esquema 5.8**); la presencia de un metil glucósido en el derivado **10** evita la ciclación intramolecular para dar lugar al biciclo correspondiente. En la preparación de ambos derivados, el intermedio sintético clave es el isotiocianato de cumarina **91**. Con objeto de preparar la tiourea **10**, se debe llevar a cabo el acoplamiento de **91** con el metil 2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido **94**, cuya síntesis se ilustra en el **Esquema 5.7**. Así pues, se parte del hidrocloreto de D-glucosamina comercial **92**, que es sometido a una protección quimioselectiva del grupo

amino con BzCl, seguido de formación del metil glicósido **93** por tratamiento con MeOH y catálisis ácida (Amberlita IR-120(H⁺)) y desprotección del grupo amino en medio básico. La reacción de **91** con **95** condujo a la cumarina **10**, aislada con rendimiento cuantitativo tras purificación cromatográfica.



Esquema 5.7. Síntesis del metil glicósido **94**. Reactivos y condiciones: a) BzCl, NaHCO₃, H₂O, 0 °C; b) Amberlita IR-120(H⁺), MeOH; c) NaOH 3M, reflujo.

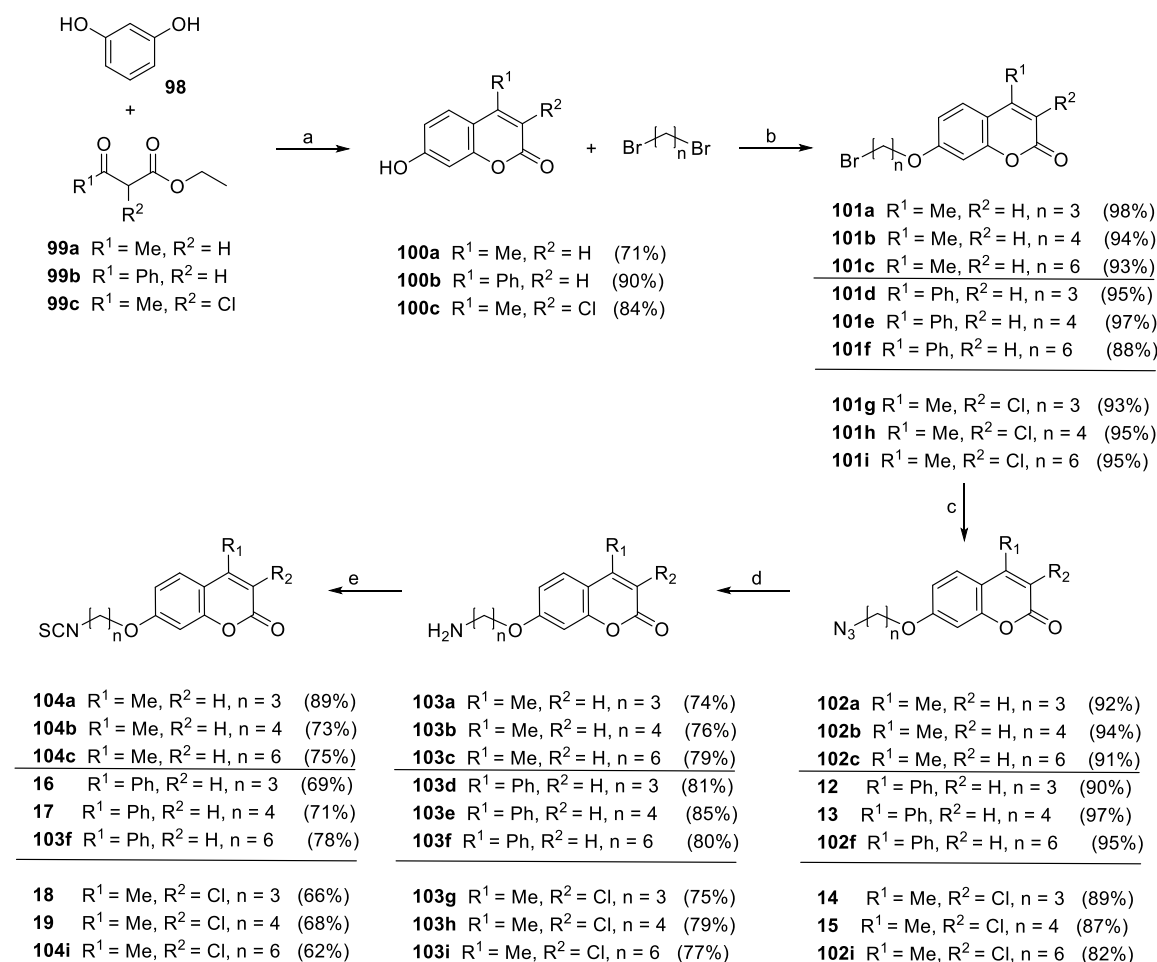
Por otro lado, para la preparación de **11** se llevó a cabo el acoplamiento del isotiocianato **91** con el hidrocloreto de D-glucosamina comercial (**Esquema 5.8**); esto conduciría a la formación de la correspondiente tiourea **96**, no detectada, ya que, al ser el carbohidrato reductor, experimenta una ciclación intramolecular espontánea entre NH-3 y el grupo carbonilo latente de **96**. Como consecuencia, y de igual manera que se describió previamente para los análogos con sulfonamidas, se obtendría la 5-hidroxiimidazolidina-2-tiona **97**. La ciclodeshidratación de dicho derivado en medio ácido (AcOH) condujo a la cumarina bicíclica **11** con un 95% de rendimiento (**Esquema 5.8**).



Esquema 5.8. Obtención de las cumarinas **10** y **11**. a) Metil 2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido; b) D-Glucosamina; c) AcOH, 60 °C.

Con objeto de analizar la influencia de la distancia entre el residuo de cumarina y de carbohidrato, se llevó a cabo la síntesis de glico-cumarinas con diferentes espaciadores. Al mismo tiempo se modificó la naturaleza de los sustituyentes sobre las posiciones C-3 y C-4 de las cumarinas.

La ruta sintética comenzó con la condensación de Pechmann³⁰⁶ catalizada por ácido (H_2SO_4) entre el resorcinol **98** y diversos β -cetoésteres comerciales con diferentes sustituyentes (**99a-c**) para dar lugar a los derivados de umbeliferona **100a-c**, con rendimientos de buenos a excelentes (**Esquema 5.9**). Dichos derivados poseen distintos sustituyentes en las posiciones C-3 y/o C-4 de la cumarina, con objeto de intentar modular las propiedades biológicas.



Esquema 5.9. Síntesis de isotiocyanatos de cumarinas. a) 60% H_2SO_4 , 0 °C; b) K_2CO_3 , CH_3CN anh., 65 °C, 2h; c) NaN_3 , DMF, 2h; d) Pd/H, MeOH-THF, 1h t.a.; e) Et_3N , $CSCl_2$, CH_2Cl_2 , 35 °C, 3 h.

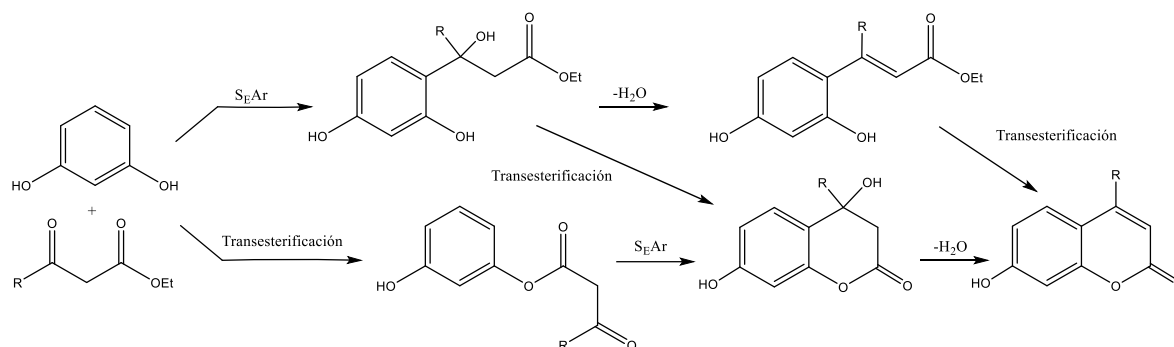
Aunque la condensación de Pechmann se desarrolló en el último cuarto del S. XIX,³⁰⁷ aún existe controversia acerca del mecanismo exacto. Se postula que se trata de un proceso *one-pot* con tres etapas diferenciadas: S_EAr , transesterificación y deshidratación (**Esquema 5.10**),³⁰⁸ pero se desconoce el orden exacto de estos procesos.

306. Lončarić, M.; Gašo-Sokač, D.; Jokić, S.; Molnar, M. Recent advances in the synthesis of coumarin derivatives from different starting materials. *Biomolecules* **2020**, *10*, 151.

307. Pechmann, H.v. Neue Bildungsweise der Coumarine. Synthese des Daphnetins. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, *17*, 929–936.

308. Tyndall, S.; Wong, K.F.; VanAlstine-Parris, M.A. Insight into the mechanism of the Pechmann condensation reaction using NMR. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 8951–8953.

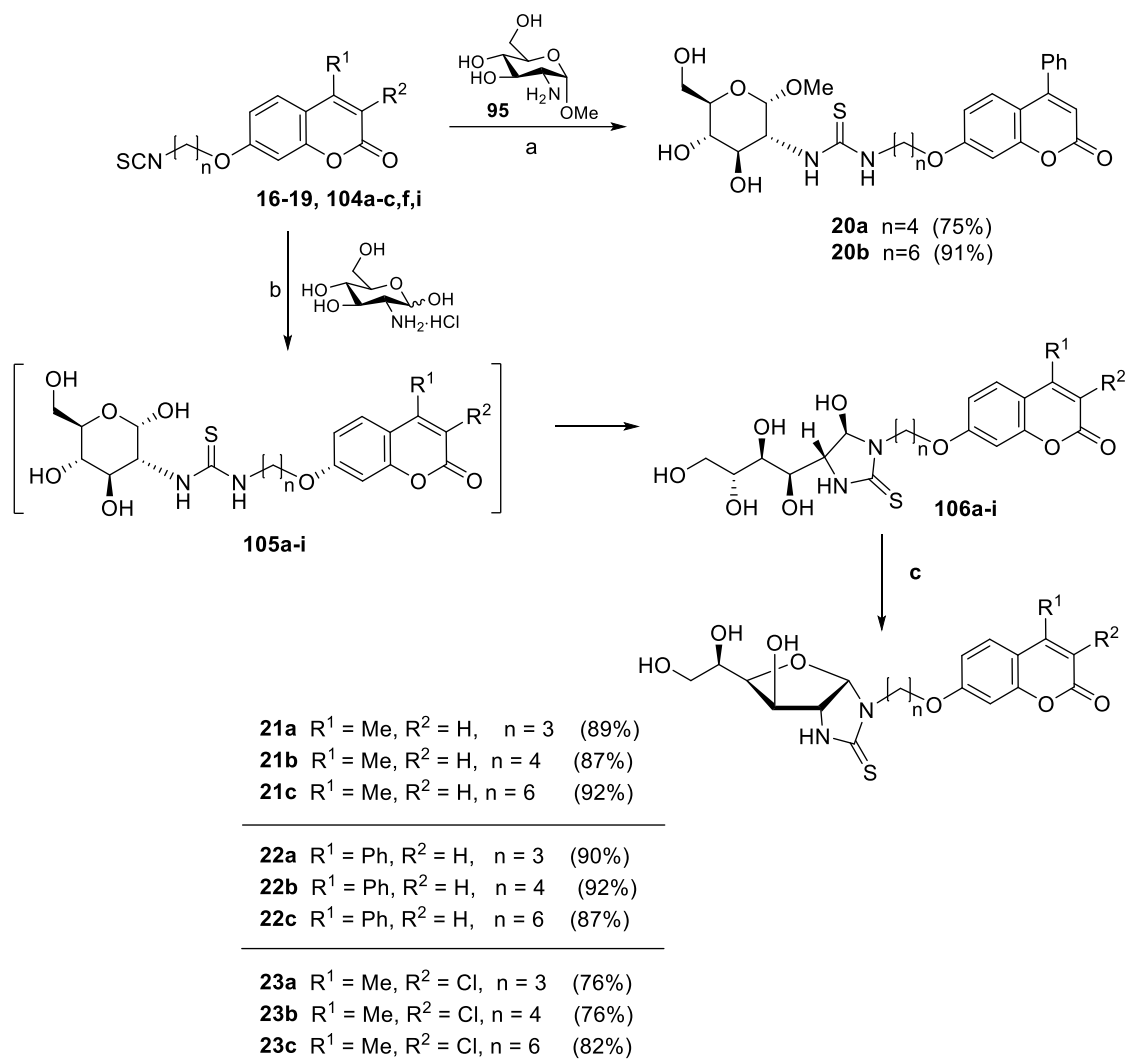
Tyndall *et al.* realizaron³⁰⁸ un estudio mecanístico de la reacción empleando 4,4,4-trifluoroacetoacetato de etilo, resorcinol y I₂ como catalizador. La monitorización de la reacción mediante ¹⁹F-RMN, así como el aislamiento de algún producto intermedio los llevó a sugerir que, al menos, para un sistema con un grupo con fuerte carácter electrón atrayente, la condensación de Pechmann transcurre mediante S_EAr, seguida de transesterificación y deshidratación.



Esquema 5.10. Posibles rutas en el mecanismo de la condensación de Pechmann.

Una vez preparadas cumarinas **100**, el grupo hidroxilo en la posición C-7 se sometió a una síntesis de Williamson (**Esquema 5.9**), utilizando un exceso de un α -dibromoalcano (para favorecer el proceso de monosustitución), en condiciones básicas suaves (K₂CO₃); esto permitirá analizar la influencia de la longitud del espaciador. Posteriormente, el átomo de bromo terminal se sometió a sustitución nucleofílica con NaN₃, seguida de una hidrogenación con catálisis heterogénea (Pd/C), originando los correspondientes aminoderivados **103**. El tratamiento final con CCl₄ permitió obtener los isotiocianatos **16–19**, **104a-c,f,i** (**Esquema 5.9**).

Finalmente, dichos isotiocianatos se transformaron tanto en las tioureas lineales **20a,b**, como en los sistemas bicíclicos **21–23**; el acceso a dichos compuestos tuvo lugar por reacción de los isotiocianatos con el α -metil glicósido derivado de la D-glucosamina **95**, o con hidrocloreuro de d-glucosamina seguido de deshidratación en medio ácido, respectivamente (**Esquema 5.11**). Estos compuestos se obtuvieron con excelentes rendimientos (76–92%) tras purificación cromatográfica.



Esquema 5.11. Obtención de las glico-cumarinas **20–23**. a) EtOH–H₂O 2:1, 60 °C; b) NaHCO₃, H₂O, EtOH, 60 °C, reflujo; c) AcOH, 60 °C.

En el espectro de ¹H-RMN del compuesto **21b** (Figura 5.14), los valores de las constantes de acoplamiento $J_{1,2} = 6.10$ Hz, $J_{2,3} \approx 0$ Hz y $J_{4,5} = 3.43$ Hz vuelven a confirmar la conformación E_4 del anillo de glucofuranosa, tal y como se encontró para los análogos derivados de sulfonamidas, y previamente, para pseudonucleósidos.³⁰⁴

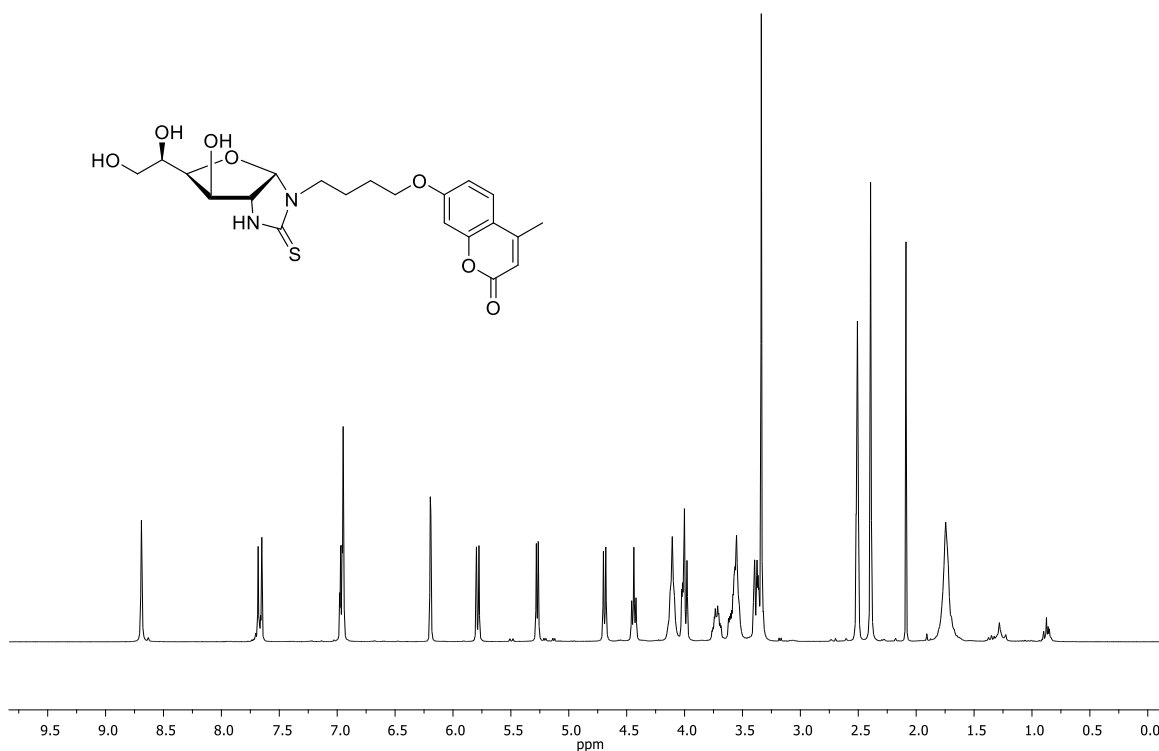


Figura 5.14. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) del producto **21b**.

Por otro lado, en el espectro de ^{13}C -RMN de **21b** (**Figura 5.15**) destaca la señal en 182.1 ppm, asignada al grupo $\text{C}=\text{S}$; por otro lado, entre 162.2 y 101.6 resuena las señales correspondientes al cuerpo de la cumarina.

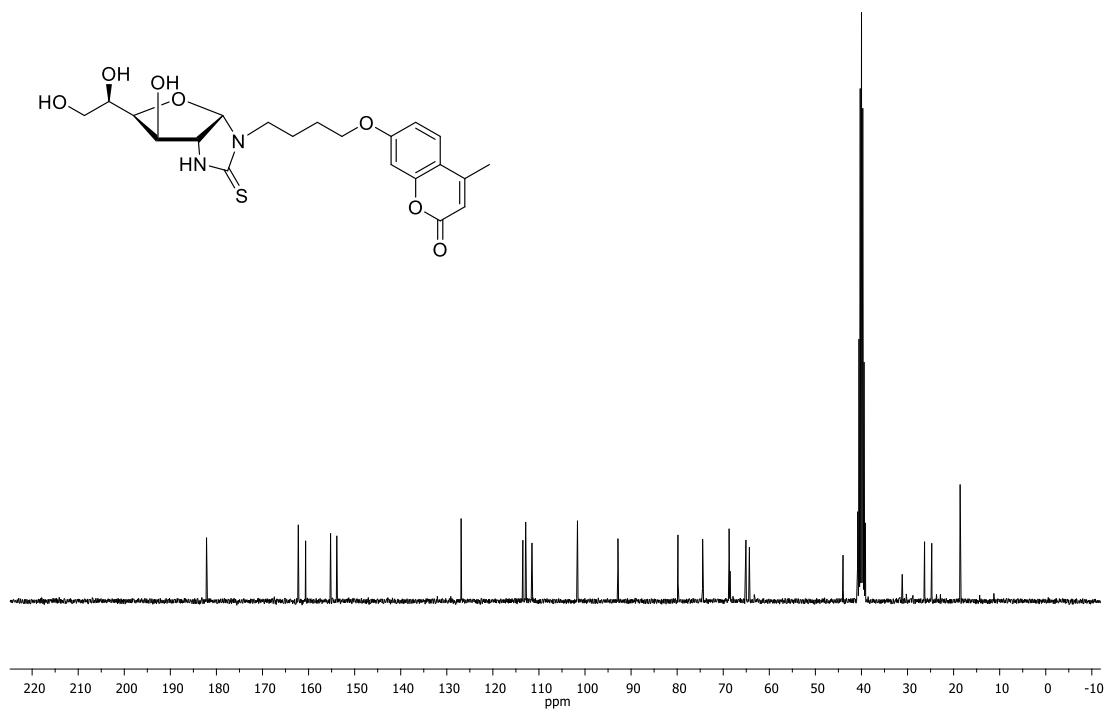
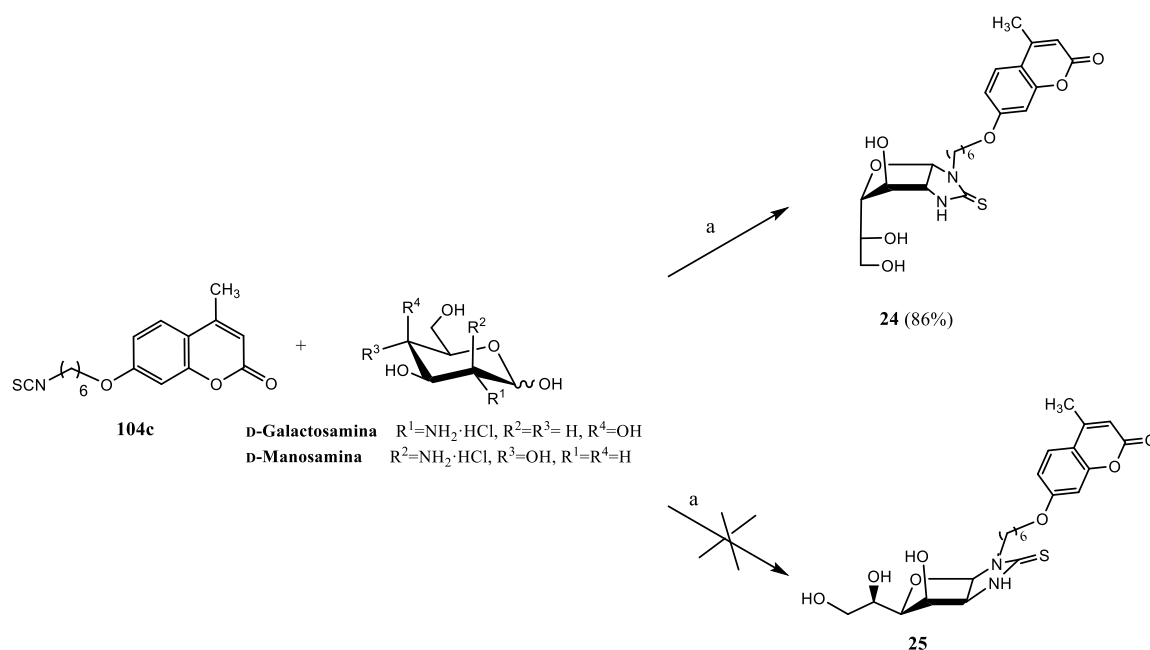


Figura 5.15. Espectro de ^{13}C -RMN (300 MHz, CD_3OD) del producto **21b**.

Con objeto de analizar la posible influencia de la configuración del residuo de carbohidrato en las propiedades biológicas (inhibición de CAs, antiproliferación), se abordó también la preparación de los derivados **24** y **25**, de configuración *D-galacto* y *D-mano*, respectivamente. El acceso a dichos compuestos tuvo lugar usando la misma metodología sintética que para la preparación de los isómeros de configuración *D-gluco* **21–23**: acoplamiento del isotiocianato **104c** con el hidrocloreto de *D-galactosamina* o *D-manosamina* comerciales, seguido de calentamiento en presencia de AcOH (**Esquema 5.12**). El derivado **24** se obtuvo con un excelente rendimiento (86%) tras purificación cromatográfica.

No obstante, el análisis de ^1H -RMN del producto aislado tras la reacción con el hidrocloreto de *D-manosamina*, no puro, indica que no se obtuvo el derivado **25**. En dicha mezcla no se observa un doblete en torno a 5.7 ppm, y con una $J_{1,2}$ próxima a 7 Hz, indicativa de la formación del sistema bicíclico.



Esquema 5.12. Preparación de las glico-cumarinas **24**, **25**. Metodos y condiciones a) i. Hidrocloreto de *D-galactosamina* o *D-manosamina*, NaHCO_3 , EtOH, 60°C , 4h; ii) AcOH, 60°C .

Los compuestos sintetizados están siendo evaluados como potenciales inhibidores de anhidrasas carbónicas en el laboratorio del Dr. Claudiu T. Supuran (Universidad de Florencia, Italia) y como posibles agentes antiproliferativos en el laboratorio del Dr. José Manuel Padrón (Universidad de La Laguna, Tenerife, España).

6. SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS MITOCONDRIOTRÓPICOS DEL ÁCIDO OLEANÓLICO COMO POTENCIALES AGENTES ANTITUMORALES

6.1. Introducción.

6.1.1. Ácido oleanólico.

El ácido oleanólico (OA, ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico, **Figura 6.1**) es un triterpenoide pentacíclico biológicamente activo y bastante común en la naturaleza, donde se puede encontrar en su forma libre o como aglicón de saponinas triterpénicas.³⁰⁹ El AO es uno de los compuestos principales en muchos tratamientos de la medicina tradicional gracias a sus propiedades antiinflamatorias; también ha sido utilizado en el tratamiento de la fibrosis hepática y en algunos tumores.³¹⁰

El OA se ha aislado de un elevado número de especies de plantas dedicadas a alimentación y también medicinales.³¹¹ La principal fuente de ácido oleanólico comercial proviene de las plantas pertenecientes a la familia *Oleaceae*, principalmente el olivo (*Olea europea*), de donde proviene su nombre.³¹² Adicionalmente, también se puede encontrar en plantas como *Eugenia Jambolana*,³¹³ *Tiarella polyphylla*,³¹⁴ *Rosmarinus officinalis*,³¹⁵ *Couepia polyandra*,³¹⁶ *Ludwigia octovalvis*,³¹⁷ *Plantago major*,³¹⁸ *Glechoma hederacea*³¹⁹ o *Hyptis capitata*,³¹⁸ entre otras. El OA se consume frecuentemente por la

-
309. Liu, L.; Li, H.; Hu, K.; Xu, Q.; Wen, X.; Cheng, K.; Chen, C.; Yuan, H.; Dai, L.; Sun, H. Synthesis and anti-inflammatory activity of saponin derivatives of δ -oleanolic Acid. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112932.
310. Liu, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 92–94.
311. Castellano, J. M.; Ramos-Romero, S.; Perona, J. S. Oleanolic acid: Extraction, characterization and biological activity. *Nutrients* **2022**, *14*, 623.
312. Pollier, J.; Goossens, A. Oleanolic acid. *Phytochemistry* **2012**, *77*, 10–15.
313. Rajasekaran, M.; Bapna, J. S.; Lakshmanans, S.; Nair, A. G. R.; Veliathd, A. J.; Panchanadam, M. Antifertility effect in male rats of oleanolic acid, a triterpene from *Eugenia Jambolana* flowers. *J. Ethnopharmacol.* **1988**, *24*, 115–121.
314. Shen, G.; Oh, S.-R.; Min, B.-S.; Lee, J.; Ahn, K. S.; Kim, Y. H.; Lee, H.-K. Phytochemical Investigation of *Tiarella polyphylla*. *Arch. Pharm. Res.* **2008**, *31*, 10–16.
315. Abe, F.; Yamauchi, T.; Nagao, T.; Kinjo, J.; Okabe, H.; Higo, H.; Akahane, H. Ursolic Acid as a Trypanocidal Constituent in Rosemary. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 1485–1487.
316. Chaturvedula, V. S. P.; Gao, Z.; Hecht, S. M.; Jones, S. H.; Kingston, D. G. I. A New acylated oleanane triterpenoid from *Couepia polyandra* that inhibits the lyase activity of DNA polymerase β . *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1463–1465.
317. Chang, C.-I.; Kuo, C.-C.; Chang, J.-Y.; Kuo, Y.-H. Three new oleanane-type triterpenes from *Ludwigia octovalvis* with cytotoxic activity against two human cancer cell lines. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 91–93.
318. Ringbom, T.; Segura, L.; Noreen, Y.; Perera, P.; Bohlin, L. Ursolic Acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1212–1215.
319. Tokuda, H.; Ohigashi, H.; Koshimizu, K.; Ito, Y. Inhibitory Effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Lett.* **1986**, *33*, 279–285.

población, ya que se encuentra ampliamente distribuido en la dieta alimentaria por su presencia en algunas frutas.³²⁰

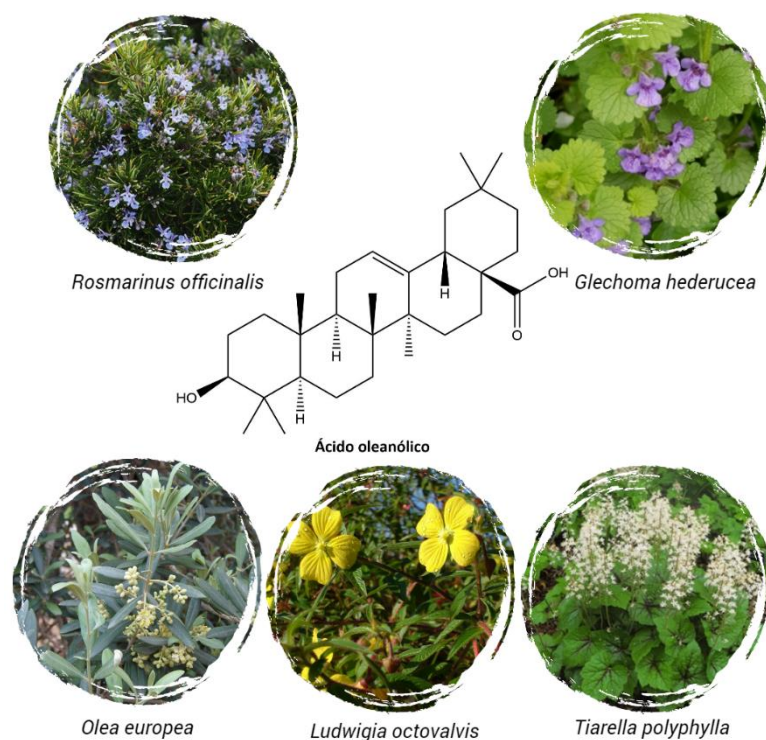


Figura 6.1. Estructura del ácido oleanólico y algunas fuentes naturales.³²¹

El OA ha sido reconocido como eficiente en el tratamiento de la obesidad; recientemente un estudio en ratones demostró que la administración de OA no sólo reduce el peso corporal de ratones obesos, sino que adicionalmente mejora la resistencia a la glucosa, disminuyendo la cantidad de glucosa e insulina en el plasma. También se observó una disminución en el tejido adiposo hepático y visceral.³²²

Diversos estudios han demostrado que el ácido oleanólico tiene un efecto hepatoprotector frente a diversos agentes hepatotóxicos tales como metales, alcohol, ácidos biliares, toxinas naturales o sintéticas, microorganismos o perturbaciones isquémicas.³²⁰ Uno de los principales problemas secundarios en el tratamiento de diversas enfermedades es el daño hepático a causa de la metabolización de los distintos

320. Sen, A. Prophylactic and therapeutic roles of oleanolic acid and its derivatives in several diseases. *World. J. Clin. Cases.* **2020**, *8*, 1767–1792.

321. a) *Ludwigia octovalvis* [Fotografía], Tau'olunga (2007). Wikimedia Commons. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2342775>. CC BY-SA 3.0. b) Olive blossoms [Fotografía], Sputnikcccp (2005). English-language Wikipedia, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=13282197>. CC BY-SA 3.0. c) *Rosmarinus officinalis* [Fotografía], (2020). Magazine online Flores y plantas <https://www.floresyplantas.net/rosmarinus-officinalis>. d) Hiedra Terrestre (*Glechoma hederacea*) [Fotografía], Jadesmith (2018). Naturalista. <https://www.naturalista.mx/photos/16687369>. CC BY-NC.

322. Djeziri, F. Z.; Belarbi, M.; Murtaza, B.; Hichami, A.; Benammar, C.; Khan, N. A. Oleanolic acid improves diet-induced obesity by modulating fat preference and inflammation in mice. *Biochimie* **2018**, *152*, 110–120.

fármacos; por ejemplo, en el tratamiento de la tuberculosis con isoniacida, rifampicina y pirazinamida, se desencadena la formación de una serie de metabolitos que conducen a un daño hepático serio.³²³ En un estudio realizado en el Instituto Mexicano del Seguro Social,³²⁴ se ha descrito la capacidad como agente microbiano para combatir la tuberculosis en ratones, de una mezcla de ácido oleanólico y ácido ursólico; además también se observó que la mezcla triterpénica genera un mecanismo hepatoprotector en el tratamiento tradicional de la tuberculosis.

Debido a los amplios antecedentes en cuanto a las propiedades biológicas del OA, existe un gran interés en el estudio de derivados sintéticos de este triterpenoide. En la bibliografía se encuentran descritos diferentes compuestos que han resultado activos como antitumorales,³²⁵ antiinflamatorios,³²⁶ antidiabéticos,³²⁷ antimicrobianos,³²⁸ antifúngicos,³²⁹ o con efectos neuroprotectores.³³⁰

Entre la gran variedad de actividades biológicas que se han encontrado para el ácido oleanólico y sus derivados, es de resaltar los múltiples ensayos en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. El OA y sus derivados tienen capacidad de modular varios procesos de señalización en células cancerosas.³³¹ Se ha demostrado que el OA tiene efectos antitumorales frente a diferentes líneas celulares cancerosas de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-453), astrocitoma (321N1), carcinoma hepatocelular y colorrectal (HCT-116), entre otras.³³¹

-
323. Nader, L.A.; de Mattos, A.A.; Picon, P.D.; Bassanesi, S.L.; De Mattos, A.Z.; Rodriguez, M.P. Hepatotoxicity due to rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in patients with tuberculosis: Is anti-HCV a risk factor? *Ann. Hepatol.* **2010**, *9*, 70–74.
324. Gutiérrez-Rebolledo, G. A.; Sordia-Reyes, A. G.; Meckes-Fischer, M.; Jiménez-Arellanes, A. Hepatoprotective properties of oleanolic and ursolic acids in antitubercular drug-induced liver damage. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2016**, *9*, 644–651.
- 325 Jo ,H.; Oh, J.-H.; Park, D.-W.; Lee, C.; Min, C. K. Oleanolic acid 3-acetate, a minor element of ginsenosides, induces apoptotic cell death in ovarian carcinoma and endometrial carcinoma cells via the involvement of a reactive oxygen species-independent mitochondrial pathway. *J. Ginseng Res.* **2020**, *44*, 96–104.
- 326 Raghuvanshi, D.; Verma, N.; Singh, S.; Luqman, S.; Gupta, A. C.; Bawankule, D. U.; Tandon, S.; Nagar, A.; Kumar, Y.; Khan, F. Design and synthesis of novel oleanolic acid based chromenes as anti-proliferative and anti-inflammatory agents. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 16782–16794.
- 327 Zhong, Y.Y.; Chen, H.S.; Wu, P.P.; Zhang, B.J.; Yang, Y.; Zhu, Q.Y.; Zhang, G.; Zhao, S.Q. Synthesis and biological evaluation of novel oleanolic acid analogues as potential α -glucosidase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *164*, 706–716.
- 328 Spivak, A. Y.; Khalitova, R. R.; Nedopekina, D. A.; Gubaidullin, R. R. Antimicrobial properties of amine- and guanidine-functionalized derivatives of betulinic, ursolic and oleanolic acids: Synthesis and structure/activity evaluation. *Steroids* **2020**, *154*, 108530.
329. Zhao, H.; Zhou, M.; Duan, L.; Wang, W.; Zhang, J.; Wang, D.; Liang, X. Efficient synthesis and anti-fungal activity of oleanolic acid oxime esters. *Molecules* **2013**, *18*, 3615–3629.
- 330 Dong, S.-Q.; Wang, S.-S.; Zhu, J.-X.; Mu, R.-H.; Li, C.-F.; Geng, D.; Liu ,Q.; Yi, L.-T. Oleanolic acid decreases SGK1 in the hippocampus in corticosterone-induced mice. *Steroids* **2019**, *149*, 108419.
331. Shanmugama, M. K.; Dai, X.; Kumar, A. P.; Tan, B. K. H.; Sethi, G.; Bishayee, A. Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical evidence. *Cancer Lett.* **2014**, *346*, 206–216.

Se ha comprobado que su efecto anticancerígeno se produce a través de diferentes mecanismos, por ejemplo la inhibición de la proliferación celular a través de diversas rutas metabólicas (**Figura 6.2**) tales como, la reducción de la expresión de la forma fosforilada de la proteína quinasa B (PKB) y mecanismos en cascada desencadenados por PKB. También se ha comprobado la modulación de la expresión del macrófago M2 y la producción asociada de citoquinas antiinflamatorias o la disminución de la expresión de enzimas glicolíticas que al limitar la concentración de enzimas de la glicólisis inhiben el gen de la YAP (yes-associated protein).³³²

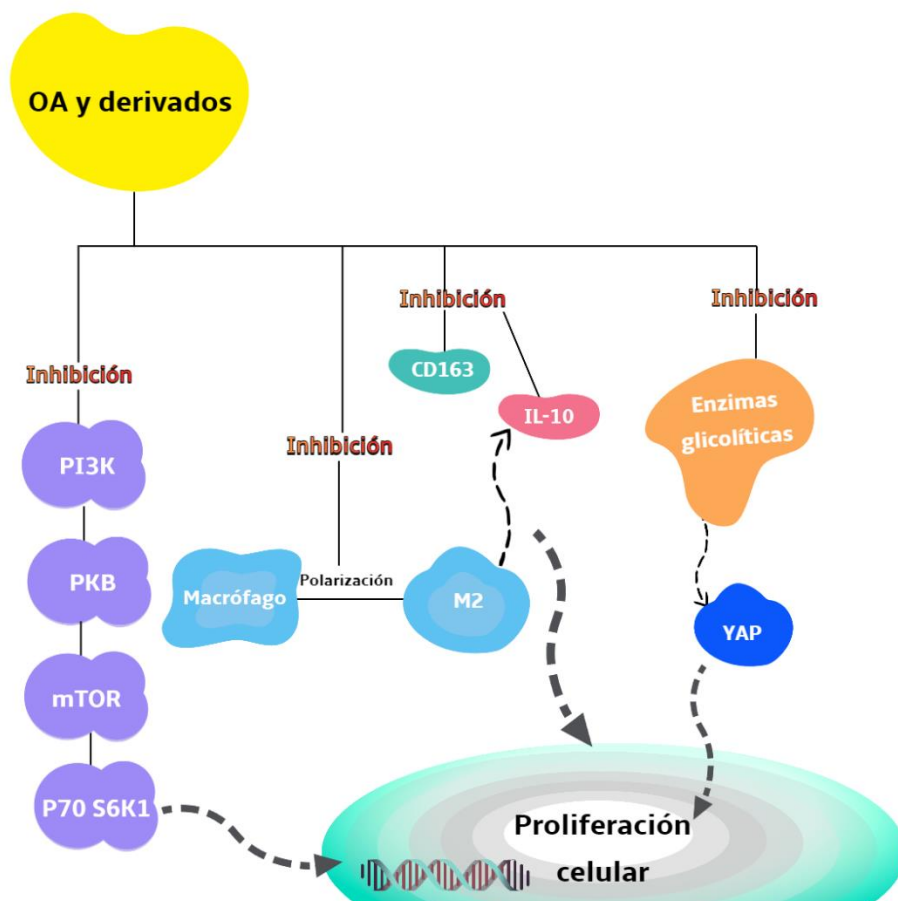


Figura 6.2. Mecanismos de antiproliferación de células cancerosas del OA y derivados.³³²

Otro importante mecanismo desencadenado por el ácido oleanólico y sus derivados es la inducción de la apoptosis del tumor a través de varios procesos metabólicos (**Figura 6.3**), por ejemplo al mediar la liberación del citocromo c en el citosol y la consecuente activación de caspasas. También es capaz de inhibir selectivamente a la AKR1B10 y por consiguiente su ruta metabólica en cascada, así como la inhibición de la PI3K oncogénica y sus procesos derivados.³³²

332. Tang, Z.-Y.; Li, Y.; Tang, Y.-T.; Ma, X.-D.; Tang, Z.-Y. Anticancer activity of oleanolic acid and its derivatives: Recent advances in evidence, target profiling and mechanisms of action. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *145*, 112397.

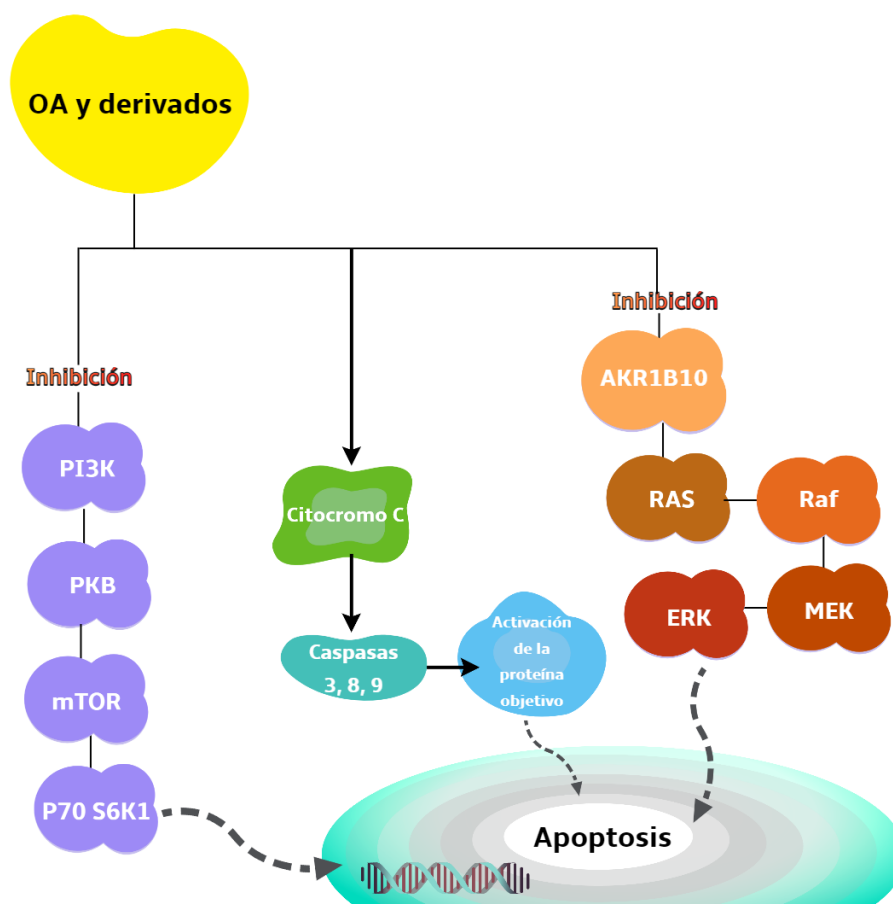


Figura 6.3. Mecanismos de apoptosis celular del OA y derivados.³³²

Las propiedades anticancerígenas del OA han sido estudiadas y aprovechadas desde hace décadas,^{319,333} de tal manera que se ha utilizado ampliamente como esqueleto estructural en la búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos. Las principales modificaciones estructurales que se han llevado a cabo han sido a través del hidroxilo en C-3, así como a través de la función ácido carboxílico. Tal es el caso del disulfuro **107**, el sulfuro **108** y el selenuro **109**, descritos por Li y col.,³³⁴ y obtenidos a través de la esterificación del OH-3 con diferentes ácidos funcionalizados. Los compuestos fueron evaluados frente a líneas cancerosas de hígado (BEL-7402 y HepG-2) y de colon (HCT116) observándose actividades en el rango micromolar bajo (Figura 6.4). Estudios de ciclos celulares revelaron que el compuesto **108** detiene las células BEL-7402 en la fase G2/M y aumenta el porcentaje de células apoptóticas.

333. Xu, A.-L.; Xue, Y.-Y.; Tao, W.-T.; Wang, S.-Q.; Xu, H.-Q. Oleanolic acid combined with olaparib enhances radiosensitization in triple negative breast cancer and hypoxia imaging with ¹⁸F-FETNIM micro PET/CT. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *150*, 113007.

334. Li, Y.-M.; Zhang, Y.; Luan, T.; Liu, C.-F. Design and synthesis of novel oleanolic acid-linked disulfide, thioether, or selenium ether moieties as potent cytotoxic agents. *Chem. Biodiversity* **2022**, *19*, e202100831.

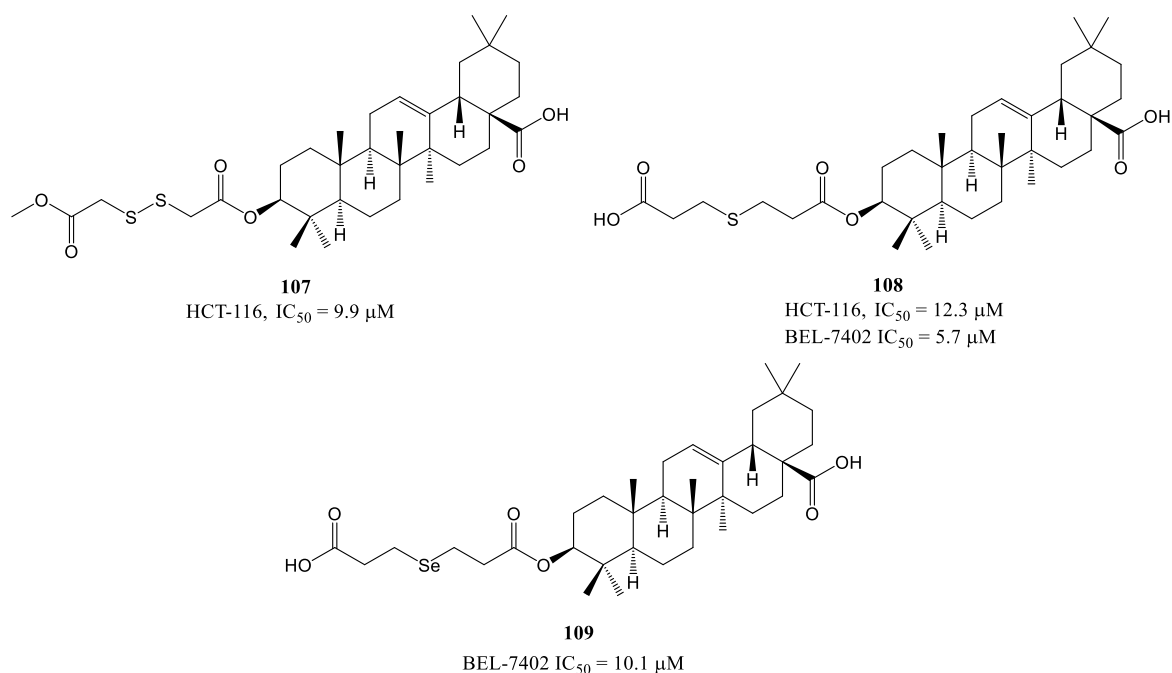


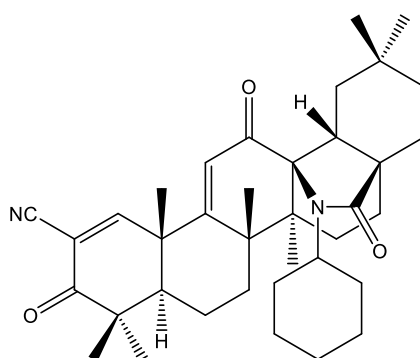
Figura 6.4. Disulfuro, sulfuro y selenuro derivados del OA con actividad anticancerígena.

Otro ejemplo es la lactama **110**, obtenida a partir de una ciclación intramolecular radicalaria, y que resultó tener una potente actividad antiproliferativa frente a cuatro líneas celulares de cáncer: DU-145 (cáncer de próstata), H460 (cáncer de pulmón de células no pequeñas), Bxpc-3 (carcinoma pancreático), y BEL-7404 (carcinoma hepatocelular), siendo el valor más relevante frente al cáncer de páncreas (**Figura 6.5**).³³⁵

Estudios detallados para la elucidación del mecanismo de acción del compuesto **110** frente el adenocarcinoma pancreático, permitieron establecer que el compuesto ejerce una acción pro-oxidante, promoviendo una generación excesiva de ROS. Esto aumenta el daño oxidativo, que a su vez conduce a la muerte por apoptosis y genera una crisis bioenergética de la célula.³³⁶

335. Ai, Y.; Hu, Y.; Kang, F.; Lai, Y.; Jia, Y.; Huang, Z.; Peng, S.; Ji, H.; Tian, J.; Zhang, Y. Synthesis and biological evaluation of novel olean-28,13 β -lactams as potential antiprostata cancer agents. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4506-4520.

336. Wu, S.; Ai, Y.; Huang, H.; Wu, G.; Zhou, S.; Hong, W.; Akuetteh, P. D. P.; Jin, G.; Zhao, X.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Lan, L. A synthesized olean-28,13 β -lactam targets YTHDF1-GLS1 axis to induce ROS-dependent metabolic crisis and cell death in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Cell Int.* **2022**, *22*, 143.

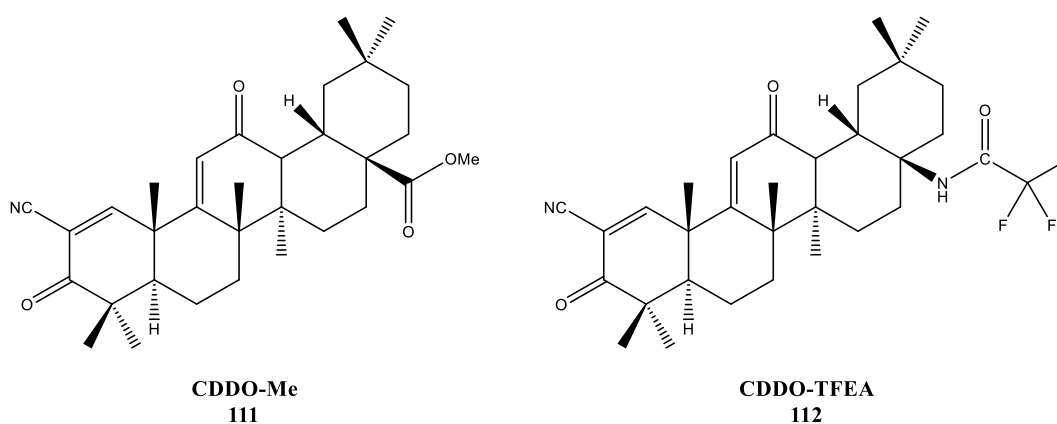


110

DU-145, $IC_{50} = 0.39 \mu M$ Bxpc-3, $IC_{50} = 0.33 \mu M$
 H460, $IC_{50} = 0.38 \mu M$ BEL-7404, $IC_{50} = 0.46 \mu M$

Figura 6.5. Lactama con potente actividad antiproliferativa.

Recientemente se ha descrito que los derivados del ácido oleanólico **CDDO-Me (111)** y **CDDO-TFEA (112)** actúan como inhibidores duales KEAP1/BACH1, reduciendo la proliferación de células de cáncer de pulmón (**Figura 6.6**).³³⁷ El factor de transcripción BACH1, es una potencial diana terapéutica para el tratamiento de varias enfermedades crónicas asociadas al estrés oxidativo y la inflamación, así como a procesos cancerosos de metástasis.



CDDO-Me
111

CDDO-TFEA
112

Figura 6.6. Derivados de OA con actividad antiproliferativa.

337. Casares, L.; Moreno, R.; Ali, K. X.; Higgins, M.; Naidu, S. D.; Neill, G.; Cassin, L.; Kiib, A. E.; Svenningsen, E. B.; Minassi, A.; Honda, T.; Poulsen, T. B.; Wielb, C.; Sayin, V. I.; Dinkova-Kostova, A. T.; Olganier, D.; de la Vega, L. The synthetic triterpenoids CDDO-TFEA and CDDO-Me, but not CDDO, promote nuclear exclusion of BACH1 impairing its activity. *Redox Biol.* **2022**, *51*, 102291.

6.1.2. Agentes mitocondriotropicos: Mitocans

La mitocondria (**Figura 6.7**) es un orgánulo intracelular dinámico que contiene su propio ADN (mtADN), y es importante debido a que controla muchas funciones de la célula como:³³⁸

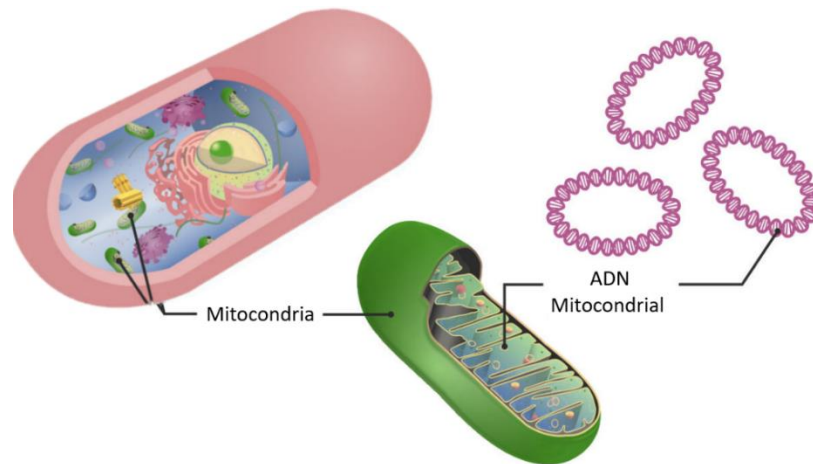


Figura 6.7. La mitocondria y el ADN mitocondrial.³³⁹

- Generación de trifosfato de adenosina (ATP)
- Señalización metabólica
- Proliferación
- Homeostasis redox
- Promoción o supresión de las vías de señalización apoptóticas

La alteración de alguno o varios de estos procesos está relacionado con desórdenes neurodegenerativos, tales como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington, o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).³⁴⁰ Particularmente, la mitocondria resulta ser una diana terapéutica de gran interés en el tratamiento del cáncer debido a la posibilidad de diseñar fármacos selectivos y que, por consiguiente, distingan entre células cancerosas y sanas.³⁴⁰ En la actualidad hay muchos fármacos de las terapias anticancerígenas que se sabe actúan sobre la mitocondria, al alterar su ruta energética y provocar estrés oxidativo, lo cual conduce a la muerte celular.³⁴⁰ Los fármacos que se dirigen de forma selectiva hacia la mitocondria se denominan agentes mitocondriotropicos, y cuando particularmente poseen actividad antitumoral reciben el nombre de *mitocans* (contracción de mitocondria + cáncer).³³⁸

338. Dong, L.; Gopalan, V.; Holland, O.; Neuzil. Mitocans revisited: Mitochondrial targeting as efficient anti-cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7941.

339. ADN Mitocondrial [Fotografía], Lectorio (2022). Domina conceptos médicos. <https://www.lecturio.com/es/concepts/herencia-mitocondrial/>

340. Panda, V.; Khambat, P.; Patil, S. Mitocans as novel agents for anticancer therapy: An overview. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *2*, 515-529.

Clasificación de los mitocans.

La clasificación de este tipo de compuestos se basa en el sitio de acción, desde la superficie de la membrana externa mitocondrial hasta la matriz mitocondrial.³³⁸

- **Efecto sobre el metabolismo mitocondrial**

Existe evidencia de que varios procesos metabólicos de la mitocondria son esenciales en los procesos de tumorigénesis, por lo que se han desarrollado diversas estrategias enfocadas a la interrupción de estos procesos. Fundamentalmente existen dos formas de comunicación entre la mitocondria y el resto de la célula: la transmisión de señal desde la mitocondria hacia el citosol (señalización retrógrada) y desde el citosol a la mitocondria (señalización anterógrada).

Para la señalización retrógrada existen diversos mecanismos, de los cuales la formación de ROS a través de la cadena de transporte de electrones (CTE) toma especial interés, ya que en muchos tipos de células cancerosas se ha observado un aumento en la producción de ROS. Aunque estas especies pueden causar estrés oxidativo y conducir a la muerte celular, también participan en la señalización de procesos celulares tales como la proliferación de células cancerosas.³⁴¹ La CTE también modula la producción de ATP, y en muchos procesos cancerosos, las necesidades energéticas de las células son cubiertas en gran medida por la producción de ATP mitocondrial.³⁴²

Varios agentes con actividad anticancerígena, como los mostrados en la **Figura 6.8**, actúan alterando la función de la CTE de la mitocondria produciendo la muerte celular a través del estrés oxidativo.³⁴³

341. Schieber, M.; Chandel, N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* **2014**, *24*, R453–R462.

342. Fan, J.; Kamphorst, J.J.; Robin, M.R.; Chung, M.K.; White, E.; Shlomi, T.; Rabinowitz, J.D. Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Mol. Syst. Biol.* **2013**, *9*, 712.

343. Mani, S.; Swargiary, G.; Singh, K. K. Natural agents targeting mitochondria in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6992.

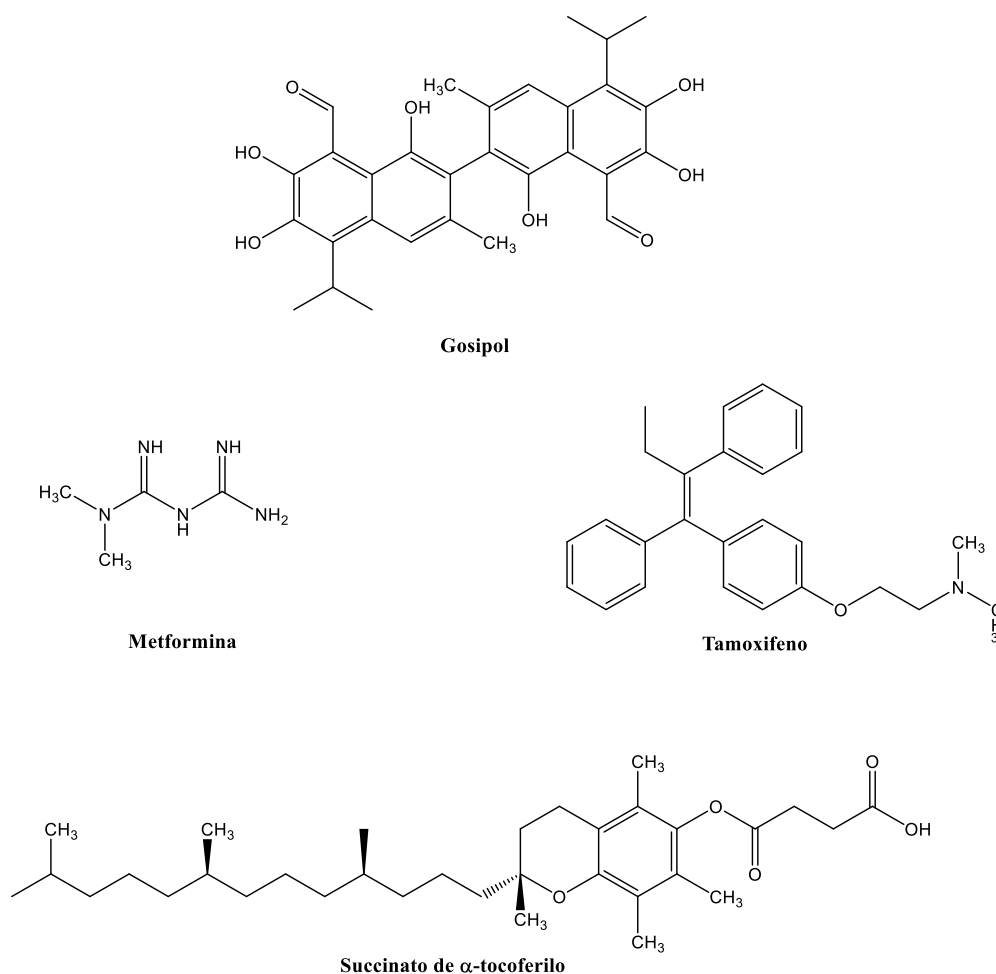


Figura 6.8. Mitocans con actividad en la CTE

La producción de ATP en la mitocondria se logra mediante la coordinación de electrones de NADH o FADH₂ en los complejos de la cadena transportadora de electrones ETC (1-V). Desregularizar la CTE conduce a una alta concentración de ROS, que pueden provocar la interrupción del metabolismo celular.

El uso de sorafenib (**Figura 6.9**), constituye la primera terapia sistemática aprobada por la FDA, para tratar el carcinoma hepatocelular; este compuesto inhibe varias quinasas que se dirigen a el receptor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y al receptor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR); adicionalmente puede llevar a cabo la activación de la proteína quinasa activada por AMP.³⁴⁴

344. Fan, G.; Wei, X.; Xu, X. Is the era of sorafenib over? A review of the literature. *Ther. Ad. Med. Oncol.* **2020**, *12*, 1758835920927602.

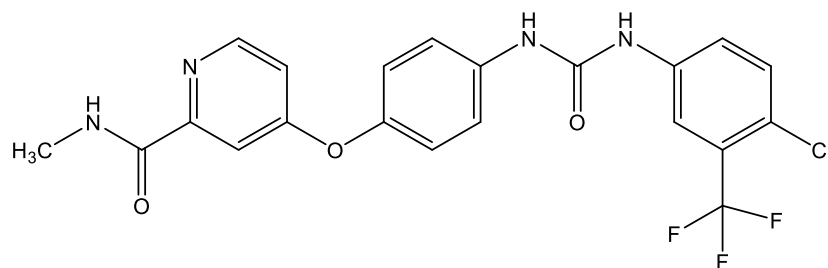


Figura 6.9. Estructura del sorafenib.

Otros compuestos actúan sobre el ciclo de Krebs, particularmente en el catabolismo de glutamina y en la conversión de glutamato a α -cetoglutarato para reducir el crecimiento tumoral.³³⁸

Otras sustancias se dirigen a la hexoquinasa II (HKII), que cataliza la primera reacción de la ruta glucolítica, la fosforilación de la glucosa para convertirla en glucosa-6-fosfato (G6P) a través de la transferencia un grupo fosfato del ATP a la glucosa. La HKII se asocia con el sitio citosólico del canal aniónico dependiente de voltaje (VCDA) que es una proteína transmembrana en la membrana externa mitocondrial relacionada con el proceso apoptótico.

En el caso de células cancerosas, la HKII se ve sobreexpresada, por lo que hay una relación directa entre el crecimiento de carcinomas y los niveles de actividad de HKII. La inhibición de HKII genera una interrupción en la glicólisis y además suprime el efecto antiapoptótico de la interacción HKII-VCDA.³³⁸

En este contexto, el 3-bromopiruvato (3BP), un potente inhibidor de la hexoquinasa (**Figura 6.10**), causa una modificación covalente de la HKII, desencadenando su separación de la mitocondria y el proceso de apoptosis celular.³⁴⁵ Se ha encontrado de forma particular que el 3BP actúa principalmente sobre la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), cuya inhibición causa que la producción de ATP intracelular merme y además promueve estrés celular que en conjunto llevan a la muerte celular.³⁴⁶

Por otra parte, la lonidamina (**Figura 6.10**) interfiere con la producción de energía mitocondrial debido a que se une con la HKII, pero también se ha descubierto que otras dianas terapéuticas pueden ser la CTE y el PTPC (*Permeability Transition Pore Complex*). La lonidamina se utiliza ya en algunos países para el tratamiento de cáncer, aunque con muchas limitaciones.³⁴⁷ El derivado mito-lonidamina (**Figura 6.10**), resultó ser 100 veces más potente que la lonidamina, inhibiendo la tumorigénesis en el pulmón y la

345. Chen, Z.; Zhang, H.; Lu, W.; Huang, P. Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1787*, 553–560.

346. Ganapathy-Kanniappan, S.; Kunjithapatham, R.; Geschwind, J.-F. Anticancer efficacy of the metabolic blocker 3-bromopyruvate: Specific molecular targeting. *Anticancer Res.* **2013**, *33*, 13–20.

347. Huang, Y.; Sun, G.; Sun, X.; Li, F.; Zhao, L.; Zhong, R.; Peng, Y. The potential of lonidamine in combination with chemotherapy and physical therapy in cancer treatment. *Cancers* **2020**, *12*, 3332.

metástasis en el cerebro.³⁴⁸ Este compuesto pertenece a la familia de cationes lipofílicos que se dirigen a la mitocondria, y que será descrita en esta sección.

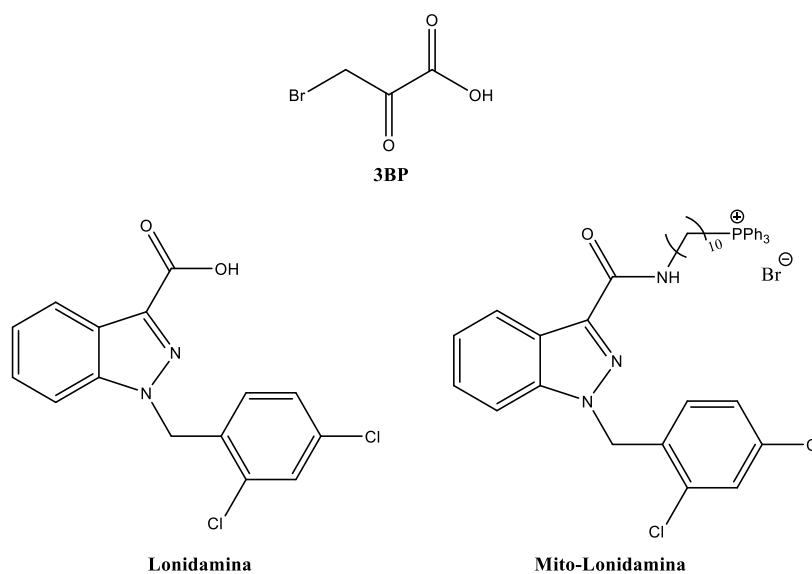


Figura 6.10. Ejemplos de inhibidores de HKII

- **Efecto sobre las rutas redox mitocondriales y homeostasis de ROS**

Como ya ha sido mencionado, el equilibrio celular de los ROS es esencial para su supervivencia, por lo que la promoción de la producción y acumulación de ROS que conduzca a estrés oxidativo en la célula cancerosa es una estrategia atractiva para los tratamientos contra el cáncer. Los compuestos mostrados en la **Figura 6.11** han demostrado su efectividad como agentes citotóxicos a través del estrés oxidativo.

348. Cheng, G.; Zhang, Q.; Pan, J.; Lee, Y.; Ouari, O.; Harde, M.; Zielonka, M.; Myers, C. R.; Zielonka, J.; Weh, K.; Chang, A. C.; Chen, G.; Kresty, L.; Kalyanaraman, B.; You, M. Targeting lonidamine to mitochondria mitigates lung tumorigenesis and brain metastasis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2205.

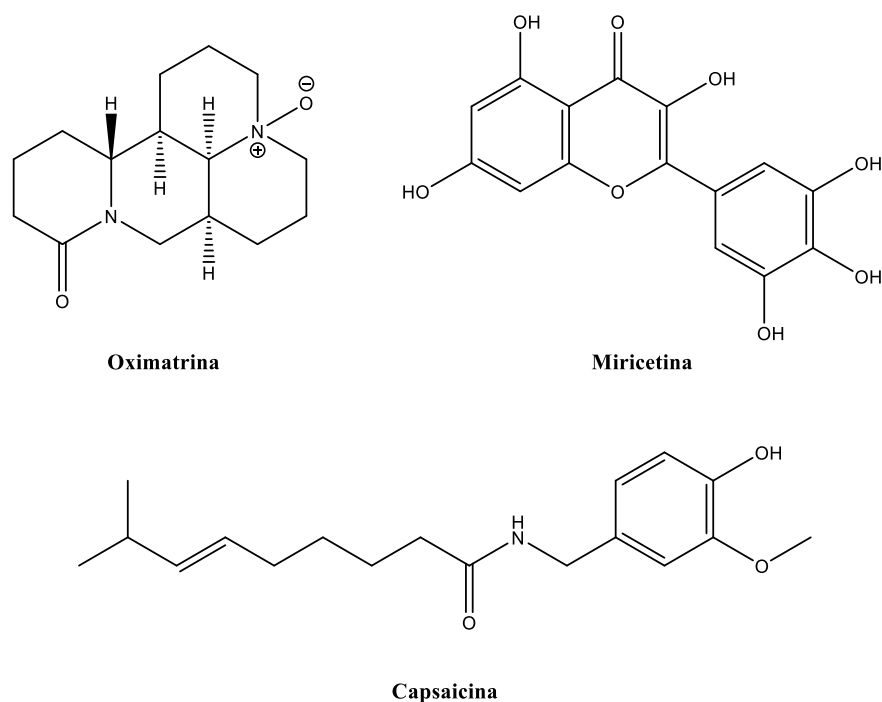


Figura 3.11. Agentes antimitocondriales con efecto en el equilibrio redox

Por otra parte, compuestos que oxidan al grupo tiol del glutatión de las mitocondrias tienen la capacidad de generar apoptosis de las células cancerosas. El trióxido de arsénico forma parte de esta clase de agentes, que se usa en el tratamiento de segunda línea en pacientes con leucemia promielocítica; este tratamiento combinado con ATRA (ácido transretinoico) es superior en eficacia a la monoterapia con una mortalidad significativamente menor.³⁴⁹

Las Bcl-2 son una familia de proteínas cuya función es regular los procesos de permeabilización mitocondrial en la vía intrínseca de la apoptosis celular.³⁵⁰ Estas proteínas tienen cuatro dominios conservados BH1, BH2, BH3 y BH4, los cuales se requieren para que interactúen entre ellas.

Esta familia está a su vez compuesta por varios grupos, en función de la estructura y función:

- Proteínas anti-apoptóticas entre las que se encuentran las proteínas Bcl-x_L, Bcl-w, MCL-1, y Bcl-2. Estas inhiben la apoptosis uniéndose directamente al dominio a las proteínas con dominio BH3.

349. Jambrovics, K.; Uray, I. P.; Keillor, J. W.; Fésüs, L.; Balajthy, Z. Benefits of combined all-*trans* retinoic acid and arsenic trioxide treatment of acute promyelocytic leukemia cells and further enhancement by inhibition of atypically expressed transglutaminase 2. *Cancers* **2020**, *12*, 648.

350. Labi, V.; Grespi, F.; Baumgartner, F.; Villunger, A. Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 977–987.

- Proteínas pro-apoptóticas Bax/Bak, comparten homología en el dominio BH1, BH2 y BH3, se unen a la mitocondria y permiten la liberación del citocromo c.³⁵¹

Algunos mitocans actúan sobre esta familia de proteínas, activando el mecanismo de apoptosis que conduce la muerte celular. Ejemplos de este tipo de agentes son el Navitoclax (**Figura 6.12**) que ha tenido buenos resultados en los ensayos clínicos de fase I y II en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica y cáncer de pulmón.³⁵²

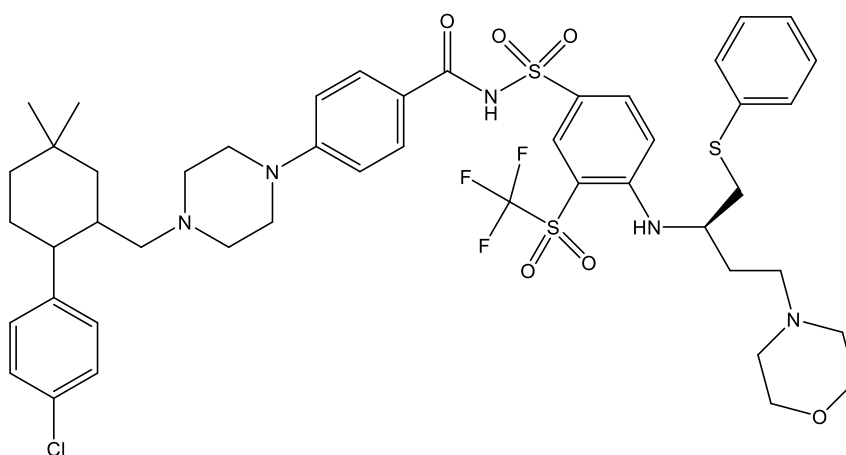


Figura 6.12. Estructura del Navitoclax.

- **Cationes lipofílicos que se dirigen a la membrana interna**

El potencial de transmembrana es relativamente mayor en las células cancerosas que en las células normales debido a alteraciones bioenergéticas en la mitocondria; esto permite que algunos cationes lipofílicos, como las sales de trifenilfosfonio se dirijan de manera selectiva hacia las células cancerosas.

Estos agentes se basan en la Ley de Nernst; los cationes lipofílicos pueden atravesar la barrera hidrofóbica de la membrana plasmática y se acumulan en la membrana mitocondrial interna. En consecuencia, los cationes lipofílicos cargados positivamente reducen el potencial transmembranal negativo.³⁴³

Un ejemplo de este tipo de compuestos es el succinato de vitamina E dirigido a mitocondrias (MitoVES, **Figura 6.13**), que muestra una muy buena actividad anticancerígena; este compuesto provoca la formación de altos niveles de ROS que conducen a la apoptosis.³³⁸

351. Warren, C. F. A.; Wong-Brown, M. W.; Bowden, N. A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 177.

352. Anuar, N. N. M.; Hisam, N. S. N.; Liew, S. L.; Uguzman, A. Clinical review: Navitoclax as a pro-apoptotic and anti-fibrotic agent. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 564108.

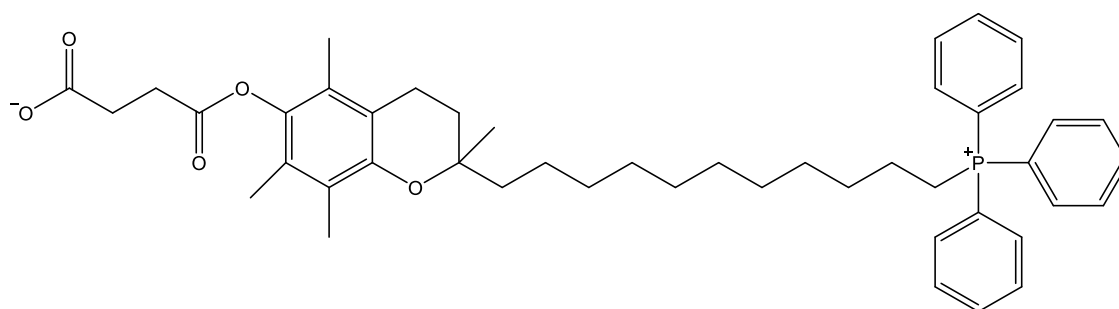
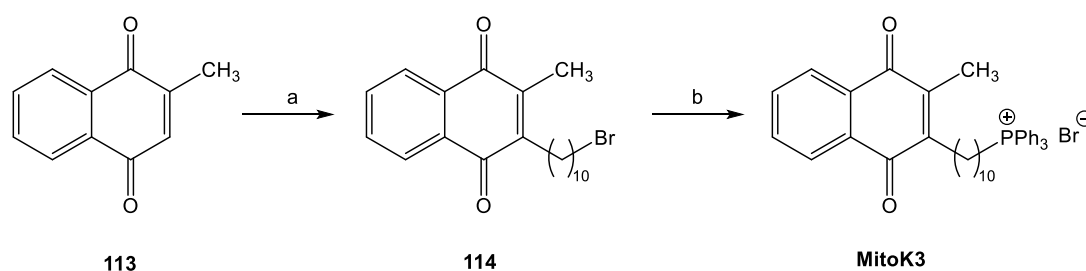


Figura 6.13. Estructura de MitoVES.

Usualmente las sales de trifenilfosfonio se preparan a través de una reacción S_N2 de haluros de alquilo/acilo en presencia de trifenilfosfina. Se ha observado que dependiendo del anión pueden cambiar las propiedades del compuesto, por lo que se puede llevar a cabo un intercambio de iones mediante el tratamiento con ácidos fuertes o sales metálicas.³⁵³ Teixeira y col.³⁵⁴ sintetizaron el derivado **MitoK3** a partir de la menadiona (**113**), mediante el acoplamiento con el ácido 11-bromoundecanoico para la obtención del compuesto (**114**), que finalmente reacciona con el trifenilfosfina (**Esquema 6.1**).



Esquema 6.1. Síntesis del compuesto **MitoK3**. Reactivos y condiciones: a) Acido 11-bromoundecanoico, $AgNO_3$, $(NH_4)_3S_2O_8$, $AcCN:H_2O$; b) Ph_3P , MW.

El **MitoK3** se dirige hacia la mitocondria y trastorna el ambiente bioenergético de la célula, conduciendo a una pérdida de producción del ATP mitocondrial. El **Mitok3** asociado con el agente anticancerígeno doxorubicina (DOX), mostró una mayor citotoxicidad que cada molécula individualmente, ya que la administración de la mezcla desencadenó la muerte celular apoptótica.

353. Noroozi-Shad, N.; Gholizadeh, M.; Sabet-Sarvestani, H. Quaternary phosphonium salts in the synthetic chemistry: Recent progress, development, and future perspectives. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1257*, 132628.

354. Teixeira, J.; Amorim, R.; Santos, K.; Soares, P.; Datta, S.; Cortopassi, G. A.; Serafim, T. L.; Sardao, V. A.; Garrido, J.; Borges, F.; Oliveira, P. J. Disruption of mitochondrial function as mechanism for anti-cancer activity of a novel mitochondriotropic menadione derivative. *Toxicology* **2018**, *393*, 123–139.

En una aproximación distinta, Silva *et al.* describieron la preparación de carboxilatos derivados del ácido betulínico, otro triterpenoide estructuralmente relacionado con el OA, donde el contraión era el trihexiltetradecilfosfonio.³⁵⁵

En este capítulo de la Tesis Doctoral se ha abordado la preparación de sales de trifenilfosfonio derivadas del OA como nuevos agentes mitocondriotrópicos.

- **Fármacos dirigidos al ADNmt**

Las mitocondrias portan su propia información genética que está codificada en un pequeño genoma circular, llamado ADN mitocondrial (ADNmt); la región llamada bucle D es importante para la regulación y la replicación del ADNmt.

Se han descrito ciertos mitocans que se dirigen al ADNmt de las células cancerosas interfiriendo con su estabilidad, afectando a la polimerasa- γ e induciendo así la apoptosis. El catión 1-metil-4-fenil-piridinio (**Figura 6.14**) desestabiliza la estructura de bucle en el ADNmt en celuas HeLa S3.³⁵⁶

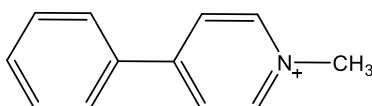


Figura 6.14. Estructura del catión 1-metil-4-fenil-piridinio.

355. Silva, A.T.; Cerqueira, M.J.; Prudencio, C.; Fernandes, M.H.; Costa-Rodrigues, J.; Teixeira, C.; Gomes, P.; Ferraz, R. Antiproliferative organic salts derived from betulinic acid: disclosure of an ionic liquid selective against lung and liver cancer cells. *ACS Omega* **2019**, *4*, 5682–5689.

356. Umeda, S.; Muta, T.; Ohsato, T.; Takamatsu, C.; Hamasaki, N.; Kang, D. The D-loop structure of human mtDNA is destabilized directly by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+), a parkinsonism-causing toxin. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 200–206.

6.2. Objetivo General

El objetivo del presente capítulo de la Tesis Doctoral es la síntesis de una serie de nuevos compuestos mitocondriotrópicos derivados del ácido OA, y su evaluación como agentes antiproliferativos.

6.3. Objetivos particulares

1. Realizar la síntesis de nuevos agentes mitocondriotrópicos empleando el grupo ácido carboxílico como punto de anclaje del espaciador.
2. Caracterización de los compuestos preparados.
3. Evaluación biológica de los compuestos preparados como agentes antiproliferativos.

6.4. Discusión de resultados.

Como se ha mencionado anteriormente, en este capítulo se abordó la síntesis de nuevos agentes mitocóndriotropicos derivados del OA con propiedades antiproliferativas. Los compuestos sintetizados incorporan un catión trifenilfosfonio lipofílico que actuará como vector selectivo, dirigiendo al compuesto específicamente hacia las mitocondrias de las células tumorales.

Se espera que con estas modificaciones estructurales se puedan mejorar las propiedades antitumorales del ácido oleanólico, haciendo que atraviesen de manera más fácil las membranas biológicas y que sean más selectivos hacia las células tumorales en donde las mitocondrias tiene un potencial de membrana más negativo que en las células normales. El tamaño del espaciador será fundamental para observar los cambios, ya que pequeñas modificaciones podrían alterar las propiedades biológicas de los compuestos (**Figura 6.15**).

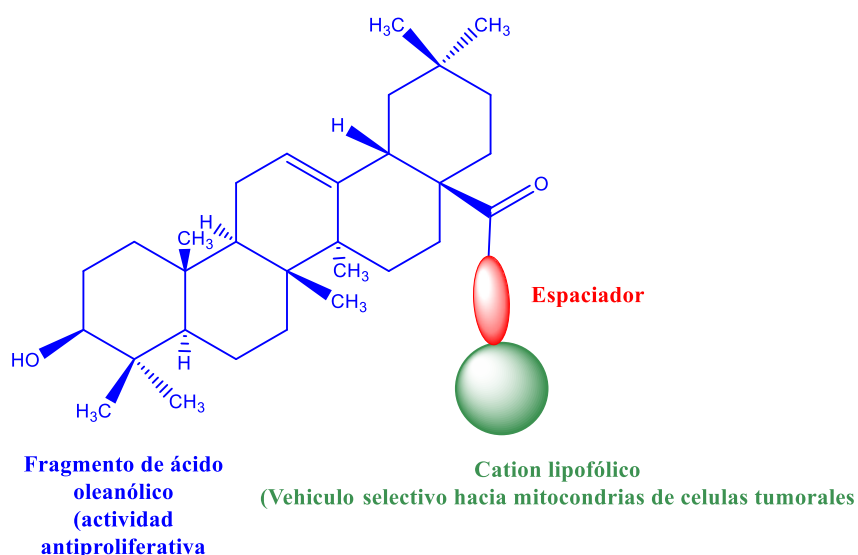
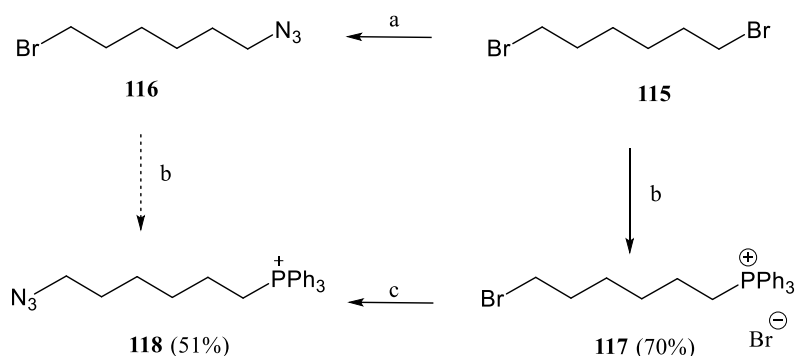


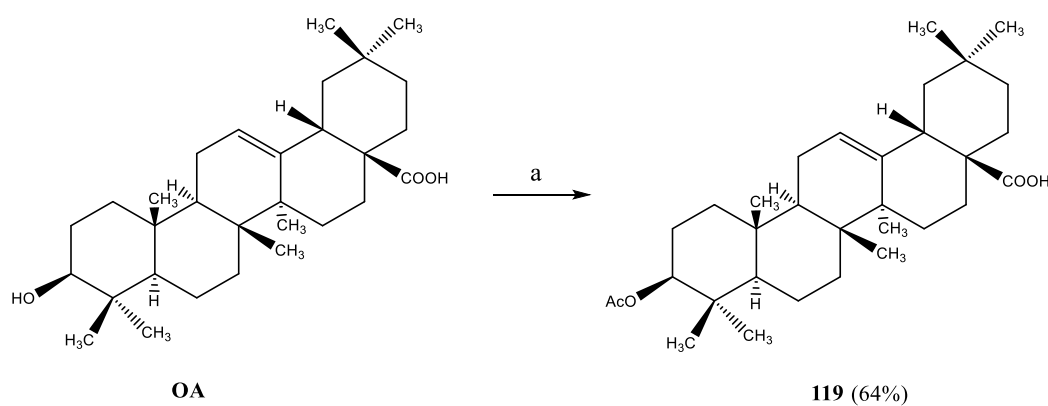
Figura 6.15. Estructura general de los nuevos agentes mitocóndriotropicos diseñados.

En primer lugar se planteó llevar a cabo la unión de tipo amida con un espaciador hidrocarbonado, de naturaleza flexible. Como materia prima se seleccionó el 1,6-dibromohexano comercial, y se planteó su transformación en el derivado **118**, mediante dos desplazamientos nucleofílicos, con NaN_3 y con Ph_3P . Se ensayaron dos posibilidades (**Esquema 6.2**), la introducción en primer lugar del grupo azido (**116**), o de la Ph_3P (**117**). Dado que la segunda metodología es la que dio mejores resultados, fue la que se empleó. El compuesto **118** será posteriormente hidrogenado para efectuar el acoplamiento peptídico con el OA.



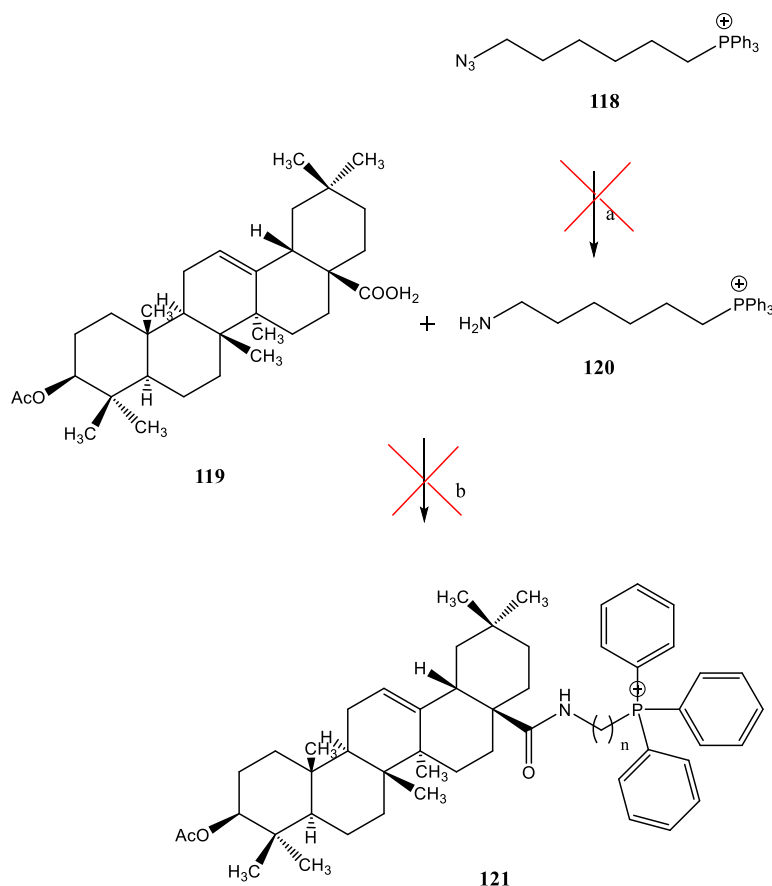
Esquema 6.2. Síntesis del compuesto **118**. Reactivos y condiciones: a) NaN_3 , DMF/ H_2O , 60 °C, 28 h; b) Ph_3P , DMF, 90 °C, 6 h; c) NaN_3 , DMF, 70 °C, 12 h.

Con objeto de evitar reacciones secundarias cuando se lleve a cabo la reacción de acoplamiento peptídico, se realizó la acetilación del hidroxilo en C-3 del OA para dar lugar al compuesto **119**, evitando con esto que el grupo hidroxilo compitiera en la reacción con el grupo carboxílico (**Esquema 6.3**). Con objeto de evitar la posterior eliminación tediosa de la Py de una acetilación convencional, se substituyó esta por CH_2Cl_2 y DMAP como catalizador nucleófilo.



Esquema 6.3. Acetilación del OA. Reactivos y condiciones: a) Ac_2O , CH_2Cl_2 , DMAP, t.a., 2 h.

Se planteó la formación de la amida entre el ácido carboxílico de **119** y la amina **120** resultante de la reducción de **118**, en presencia de PYBOP como agente activante (**Esquema 6.4**). No obstante, la hidrogenación catalítica que conduciría a **120** no se produjo de manera satisfactoria; presumiblemente, la presencia del catión trifenilfosfonio altera la acción catalítica del Pd.

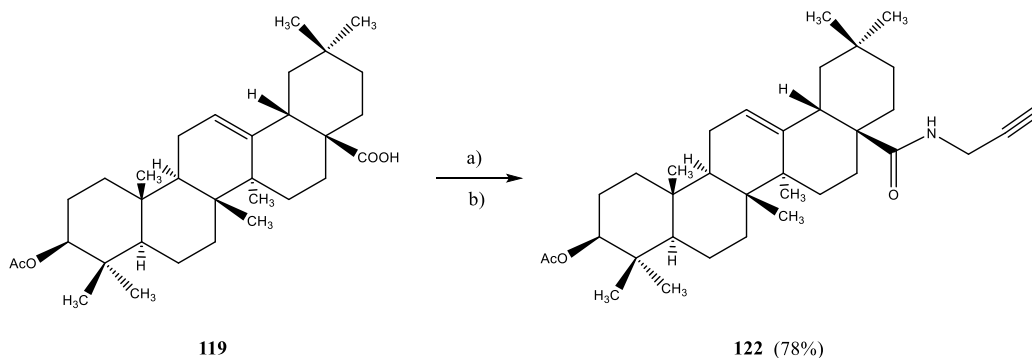


Esquema 6.4. Síntesis del compuesto **113**. Reactivos y condiciones: a) H₂, Pd/C; b) PYBOP.

Se descartó, por tanto, este procedimiento y se modificó la estrategia sintética; se decidió entonces el empleo de un anillo de tipo 1,2,3-triazolilo como conector entre el **OA** y el catión trifenilfosfonio. Este tipo de fragmentos se obtiene mediante una cicloadición 1,3-dipolar azido-alquilo catalizada por Cu(I) (CuAAC), el ejemplo más característico de las reacciones catalogadas como *click chemistry*.³⁵⁷

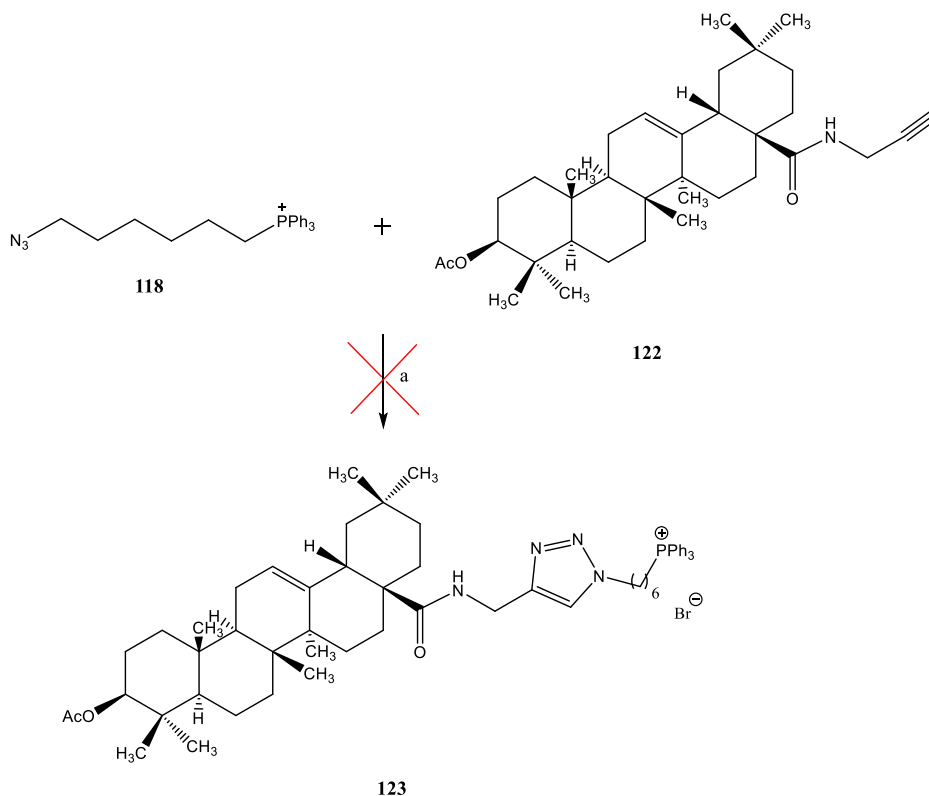
Como azida se utilizó el derivado **118**, que ya incorpora la función trifenilfosfonio, y como alquino terminal, el derivado propargilado **122** (**Esquema 6.5**). En este caso, la unión de tipo amida se obtuvo mediante transformación del grupo carboxílico del **OA** en cloruro de ácido (SOCl₂), seguido de reacción *in situ* con propargilamina en presencia de Et₃N.

357. Gil, M.V.; Arévalo, M.J.; López, Ó. Click chemistry—What's in a name? Triazole synthesis and beyond. *Synthesis* **2007**, 1589–1620.



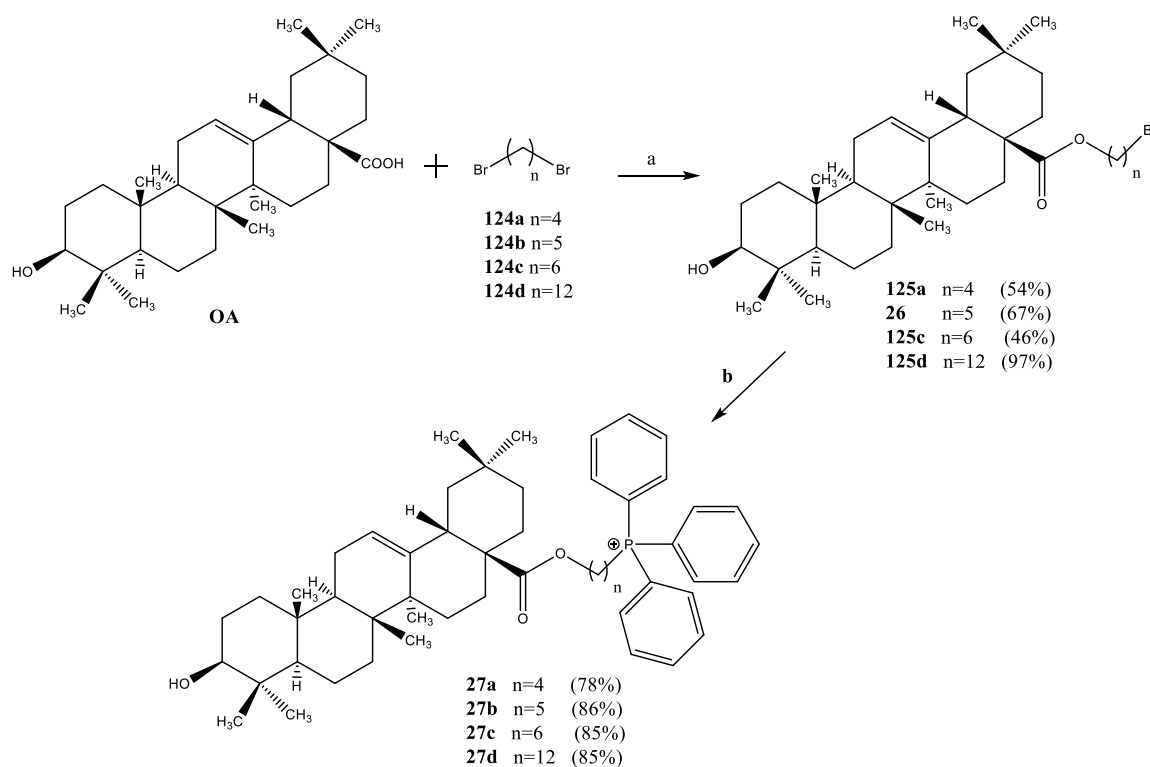
Esquema 6.5. Síntesis del derivado propargilado **122**. Reactivos y condiciones: a) SOCl_2 , t.a., 1 h; b) Propargilamina, Et_3N , THF anhidro, t.a., 3 h.

A continuación se abordó la reacción *click* entre **118** y **122** (**Esquema 6.6**), empleando las condiciones clásicas, que implican la reducción *in situ* de una sal de Cu(II) (CuSO_4) con ascorbato de sodio. No obstante, tras varios intentos infructuosos se abandonó esta ruta. Es posible que de nuevo, al igual que había ocurrido en la reacción de hidrogenación, el catión trifenilfosfonio altere las propiedades catalíticas del metal.



Esquema 6.6. Intento de acoplamiento *click* entre **118** y **122**. a) CH_2Cl_2 , H_2O , CuSO_4 , L-ascorbato de sodio, t.a., 12 h.

Por ello se procedió de nuevo a modificar la estrategia sintética. Se optó en este caso por llevar a cabo la conexión entre el **OA** y el catión trifenilfosfonio a través de un espaciador hidrocarbonado, caracterizado por una importante flexibilidad. Para ello se llevó a cabo la esterificación del **OA** con un exceso de α,ω -dibromoalcanos comerciales **124** (para favorecer la monosustitución) en medio básico suave (K_2CO_3) en DMF para originar los derivados **125** (Esquema 6.7). A continuación, una segunda reacción de tipo S_N2 con Ph_3P originó, ahora sí, los derivados buscados **27a-d** con rendimientos excelentes tras purificación cromatográfica (84–95%). Es importante destacar que, a pesar del buen carácter nucleófilo de la Ph_3P y del uso de un disolvente polar aprótico (MeCN), se requirió de un tupo Fisher-Porter para acelerar la reacción, al poder calentar por encima del punto de ebullición del disolvente en condiciones normales.



Esquema 6.7. Síntesis de las sales de trifenilfosfonio **27a-d**. Reactivos y condiciones: a) K_2CO_3 , DMF, t.a., 12 h; b) PPh_3 , MeCN, 115 °C, 24 h.

En el espectro de 1H -RMN del compuesto **27a** se puede observar entre 7.5–7.9 ppm señales que integran para 15 H, correspondiente a los protones aromáticos de los tres anillos de fenilo del grupo trifenilfosfonio. En 5.15 ppm existe un triplete correspondiente al H-19 del cuerpo del ácido oleanólico y a 4.07 ppm, un multiplete que integra para 4 protones correspondiente a H-29 Y H-32. Esto demuestra la conexión del **OA** con la cadena hidrocarbonada y con el catión trifenilfosfonio (**Figura 6.16**).

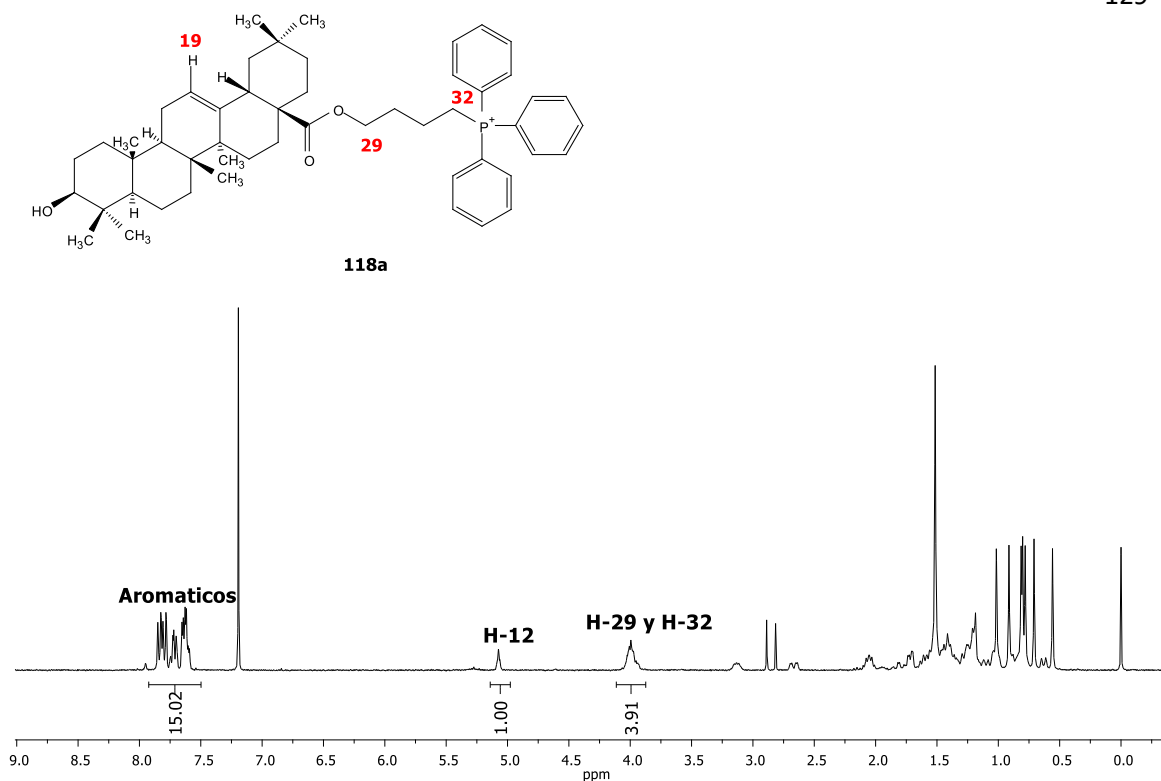


Figura 6.16. Espectro de ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) del producto 27a.

En el espectro de ¹³C- RMN se observa una señal alrededor de alrededor de 179 ppm correspondiente al grupo carbonilo y a 64 ppm se el metileno unido en posición α al éster (Figura 6.17).

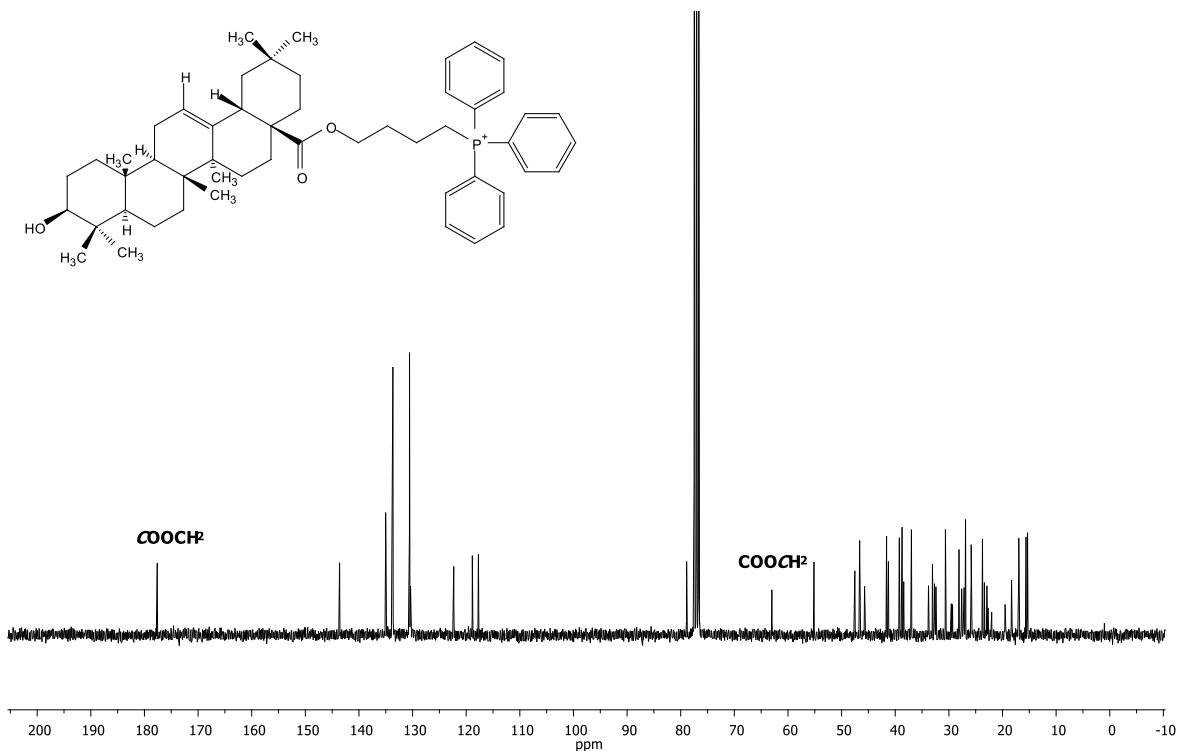


Figura 6.17. Espectro de ¹³C-RMN (127.5 MHz, CDCl₃) del producto 27a.

El átomo de P es activo en RMN. El único isótopo estable es el ^{31}P , con spin nuclear $I=1/2$ (igual que el ^1H y ^{13}C), por lo que se puede identificar de manera sencilla, observándose acoplamientos, tanto con protones, como con carbonos a varios enlaces de distancia.

En la **Figura 6.18** se muestra, a modo de ejemplo, una ampliación del espectro de ^{13}C -RMN, correspondiente a la región aromática para el compuesto **27d**, en el cual se observan cuatro familias de picos, identificados en la figura con los colores azul (*ipso*), rojo (*orto*), violeta (*meta*) y verde (*para*). Todas estas señales se encuentran desdobladas en forma de dobletes, y la J depende de la distancia entre los átomos de carbono y fósforo acoplados: 85.8 Hz para el *ipso*, 9.9 Hz para el *orto*, 12.5 Hz para el *meta* y 2.9 Hz para el *para*, los cuales coinciden con los reportados para otras sales de trifenilfosfonio.³⁵⁴

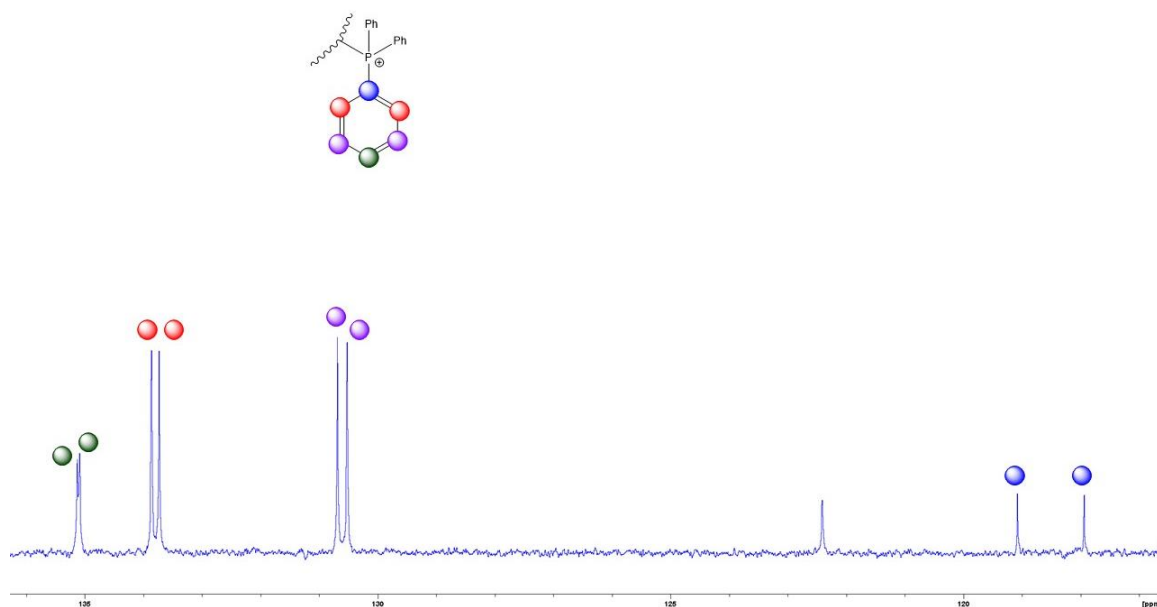


Figura 6.18. Ampliación del espectro de ^{13}C RMN (127.5 MHz, CDCl_3) del producto **27a**.

7. ENSAYOS BIOLÓGICOS

7.1. Predicción de propiedades farmacocinéticas de las tio(seleno)semicarbazonas

La comprensión de las propiedades farmacocinéticas de una molécula es esencial en el proceso de diseño de nuevos fármacos, en particular la absorción, distribución, metabolismo y excreción, que se conocen a través de sus siglas (ADME). El acceso temprano a las propiedades ADME de un fármaco reduce las tasas de fracaso en ensayos clínicos;³⁵⁸ de hecho, perfiles inadecuados en cuanto a seguridad y toxicidad causan más de la mitad de los fracasos de los candidatos a fármaco en su fase final de evaluación.

En el período de tiempo comprendido entre el final de los años 1990s y el comienzo de la década de los años 2000s, se postularon³⁵⁹ una serie de reglas teóricas que permitían predecir el comportamiento como fármaco de un determinado compuesto. Entre ellas, la más popular es la *regla de Lipinski* o *regla de los 5*,³⁶⁰ formulada por Christopher A. Lipinski en 1997 (Pfizer) basándose en la observación de que la mayoría de los compuestos comercializados como fármacos son moléculas relativamente pequeñas y lipófilas. Esta regla establece las propiedades que debería cumplir un fármaco administrado por vía oral:

- P.m. < 500 g/mol
- < 5 donadores de enlaces de hidrógeno
- < 10 aceptores de puentes de hidrógeno
- $\log P < 5$ (o MLogP (partición octano-agua de Moriguchi) < 4.15)
- Número de enlaces rotables (nrotb) iguales o inferiores a 10

En este contexto, el enorme desarrollo de la quimioinformática ha permitido el desarrollo de dos tipos de cálculos de propiedades ADME *in silico*:³⁵⁸ modelización molecular (basada en la estructura tridimensional de proteínas: *docking*, dinámica molecular, cálculos de mecánica cuántica) y modelización de datos (QSAR (relaciones estructura-actividad cuantitativas), modelización de farmacocinética basada en fisiología (PBPK)). A tal efecto, se han desarrollado numerosos tipos de *software*³⁶¹ que permiten llevar a cabo este tipo de cálculos. Algunas de estas herramientas son comerciales (e.j.

358. Wu, F.; Zhou, Y.; Li, L.; Shen, X.; Chen, G.; Wang, X.; Liang, X.; Tan, M.; Huang, Z. Computational approaches in preclinical studies on drug discovery and development. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 726.

359. Pantaleão, S.Q.; Fernandes, P.O.; Gonçalves, J.E.; Maltarollo, V.G.; Honorio, K.M. Recent advances in the prediction of pharmacokinetics properties in drug design studies: A review. *ChemMedChem* **2022**, *17*, e202100542.

360 Benet. L.Z.; Hosey, C.M.; Ursu, O.; Oprea, T.I. BDDCS, the rule of 5 and drugability. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2016**, *101*, 89-98.

361. Kar, S.; Leszczynski, J. Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. *Expert Opin. Drug Discov.* **2020**, *15*, 1473–1487.

CASE ULTRA, DEREK, META-PC, METEOR, PASS, o GUSAR), y otras son de acceso abierto, principalmente a través de plataformas *online* (ej. ADMETlab, admetSAR, pkCSM, SwissADME). Cada vez más investigadores, tanto desde el ámbito universitario, como de la industria farmacéutica se apoyan en este tipo de predicciones para focalizar la estructura óptima del compuesto a sintetizar.

En la presente Tesis Doctoral se han empleado diversas herramientas informáticas para predecir este tipo de propiedades en algunos de los compuestos sintetizados. A continuación, se mostrarán las predicciones llevadas a cabo sobre las selenosemicarbazonas **2a-g** (Figura 7.1).

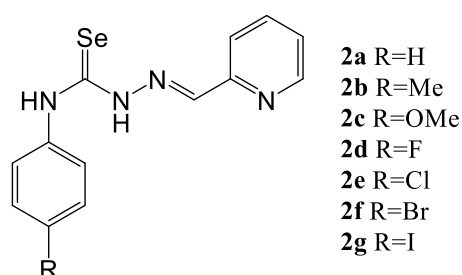


Figura 7.1. Estructura de las selenosemicarbazonas **2a-g** sometidas a predicciones de sus propiedades físico-químicas.

En primer lugar se empleó el programa Molinspiration, que ofrece una amplia gama de herramientas quimioinformáticas y permite el cálculo de diversas propiedades necesarias en estudios QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), permitiendo de esta manera el acceso a predicción teórica de la actividad biológica del compuesto sometido a estudio. En la **Tabla 7.1** se muestran los datos básicos de las selenosemicarbazonas **2a-g** arrojados por el programa: logP, TPSA, número de átomos, P.m., y el número de violaciones de las propiedades físico-químicas.

Tabla 7.1. Datos del programa Molinspiration para los derivados **2a-g**

Compuesto	LogP	TPSA Å	No. de átomos	MW g/mol	No. de violaciones
2a (R=H)	2.90	49.31	18	303.23	0
2b (R=Me)	3.35	49.31	19	317.25	0
2c (R=OMe)	2.96	58.54	20	333.25	0
2d (R=F)	3.06	49.31	19	321.22	0
2e (R=Cl)	3.58	49.31	19	337.67	0
2f (R=Br)	3.71	49.31	19	382.12	0
2g (R=I)	3.98	49.31	19	429.12	0

Un parámetro físico-químico esencial en el diseño de fármacos es el coeficiente de partición octanol-agua (LogP), que se emplea en estudios QSAR y en el diseño racional de fármacos como medida de la hidrofobicidad molecular. La hidrofobicidad afecta a la absorción de fármacos, la biodisponibilidad, las interacciones hidrofóbicas fármaco-receptor, el metabolismo de las moléculas, así como su toxicidad.³⁶²

El parámetro LogP debe tener un valor inferior a 5 para considerar una hidrofobicidad adecuada; como puede observarse, los compuestos **2a–g** cumplen con esta regla, estando los valores calculados para dicho parámetro en un intervalo de 2.90 a 3.98.

Otro parámetro interesante es el área de superficie polar (TPSA, *Topological Polar Surface Area*), muy útil para la predicción de las propiedades de transporte de fármacos. El área de la superficie polar se define como la suma de las superficies de los átomos polares en una molécula. Se ha demostrado que este parámetro se correlaciona muy bien con la absorción intestinal humana, la permeabilidad de las monocapas de Caco-2 y la penetración de la barrera hematoencefálica. Las moléculas con un área de superficie polar de más de 140 Å² tienden a ser deficientes para penetrar las membranas celulares. Las selenosemicarbazonas **2a–2g** poseen valores de TPSA comprendidos entre 49.31 y 58.54, que sugieren que dichos compuestos podrían penetrar las membranas celulares.

Otro programa que se ha empleado en esta Tesis Doctoral es SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) que brinda acceso gratuito a un conjunto de modelos predictivos rápidos para obtener las propiedades fisicoquímicas, farmacocinética, similitud con los fármacos y compatibilidad con la química farmacéutica. Esto lo hace mediante los parámetros ADME, que se evalúan por separado mediante métodos específicos.³⁶³

En la **Tabla 7.2** se muestra que las selenosemicarbazonas poseen 2 grupos donadores y 2 grupos aceptores de enlaces de hidrogeno, o 3 grupos aceptores de enlaces de hidrogeno en el caso del compuesto **2c**, como consecuencia de la presencia del grupo metoxilo. Por consiguiente, los compuestos **2a–g** entran en el rango aceptado de la regla de Lipinski.

El peso molecular de las selenosemicarbazonas oscila aproximadamente de 300 a 450 g/mol, encontrándose por tanto por debajo del rango establecido en las reglas de Lipinski.

362. Ziu, I.; Retting I.; Luo, D.; Dutta, A.; McCormick, T.M.; Wu, C.; Martic, S. The multifunctional dopamine D2/D3 receptor agonists also possess inhibitory activity against the full-length tau 411 protein aggregation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *28*, 115667.

363. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717.

El número de enlaces rotables (nRotb) es una medida de la flexibilidad molecular. Se ha demostrado que es un muy buen descriptor de la biodisponibilidad oral de los fármacos. En este caso los compuestos **2a-g** cuentan con 5 enlaces rotables los cuales entran en el rango de estas reglas.

Por consiguiente, en base a los datos arrojados, puede concluirse que las selenosemicarbazonas cumplen con los requisitos de la regla de Lipinski, y puede se puede predecir una buena biodisponibilidad en un potencial uso como fármacos.

Tabla 7.2. Propiedades fisicoquímicas de las selenosemicarbazonas **2a-2g**

Compuesto	Formula	No. de átomos arom.	No. de enlaces rotables	No. H-acep.	No. de H dona.
2a	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ Se	12	5	2	2
2b	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ Se	12	5	2	2
2c	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ OSe	12	5	3	2
2d	C ₁₃ H ₁₁ FN ₄ Se	12	5	2	2
2e	C ₁₃ H ₁₁ ClN ₄ Se	12	5	2	2
2f	C ₁₃ H ₁₁ BrN ₄ Se	12	5	2	2
2g	C ₁₃ H ₁₁ IN ₄ Se	12	5	2	2

El parámetro LogP se calculó adicionalmente y se observa que el compuesto **2c**, con un grupo metoxi, posee el valor menor de la serie; además, para los derivados halogenados, se comprueba que el valor de Log P_{o/w} aumenta al incrementarse el tamaño del halógeno, siendo el *p*-yodofenilderivado (**2g**) el de mayor valor.

Para el cálculo de la lipofilia se utilizan múltiples predictores para estimar un valor de consenso (**Tabla 7.3**). Los valores obtenidos para las selenosemicarbazonas sugieren una difusión a través de los fluidos biológicos en el organismo y una difusión pasiva a través de las membranas biológicas.

Tabla 7.3. Propiedades lipofílicas de las selenosemicarbazonas **2a-g**

Compuesto	Log P _{o/w} (iLOGP)	Log P _{o/w} (XLOGP3)	Log P _{o/w} (WLOGP)	Log P _{o/w} (MLOGP)	Log P _{o/w} (SILICOS-IT)	Consenso Log P _{o/w}
2a	0	2.36	1.18	1.36	0.9	1.16
2b	0	2.27	1.49	1.62	1.42	1.45
2c	0	2.33	1.19	1.06	0.96	1.11
2d	0	2.46	1.74	1.76	1.34	1.47
2e	0	2.99	1.84	1.89	1.56	1.66
2f	0	3.05	1.94	2.02	1.6	1.72
2g	0	3.01	1.79	2.14	01.89	1.77

En la **Tabla 7.4** se muestra el cálculo de la solubilidad en agua (log S) empleando tres modelos distintos; dichos modelos predicen que la solubilidad de las selenosemicarbazonas **2a-g** en agua oscila de moderadamente solubles a solubles.

Tabla 7.4. Cálculo de la solubilidad en agua de las selenosemicarbazonas **2a-2g**

Compuesto	Log S (ESOL)	Solubilidad	Clase	Log S (Ali)	Solubilidad	Clase
2a	-3.37	1.29e-01 mg/ml; 4.26e-04 mol/ml	Soluble	-3.04	2.79e-01 mg/ml; 9.21 e-04 mol/ml	Soluble
2b	-3.66	6.97e-02 mg/ml; 2.20e-04 mol/ml	Soluble	-3.41	1.24e-01 mg/ml; 3.90 e-04 mol/ml	Soluble
2c	-3.42	1.26e-01 mg/ml; 3.78e-04 mol/ml	Soluble	-3.2	2.11e-01 mg/ml; 6.33 e-04 mol/ml	Soluble
2d	-3.95	3.75e-02 mg/ml; 1.11e-04 mol/ml	Soluble	-3.69	6.90e-02 mg/ml; 2.04 e-04 mol/ml	Soluble
2e	-3.52	9.73e-02 mg/ml; 3.03e-04 mol/ml	Soluble	-3.14	2.33e-01 mg/ml; 27.25 e-04 mol/ml	Soluble
2f	-4.27	2.06e-02 mg/ml; 5.40e-05 mol/ml	Soluble	-3.75	6.77e-02 mg/ml; 1.77 e-04 mol/ml	Soluble
2g	-4.53	1.25e-02 mg/ml; 2.92e-05 mol/ml	Soluble	-3.71	8.36e-02 mg/ml; 1.95 e-04 mol/ml	Soluble

En el caso de la farmacocinética (**Tabla 7.5**), existen distintos parámetros de absorción, distribución y metabolismo que pueden ser evaluados, tales como las predicciones para la absorción gastrointestinal (Absorción GI) y la permeación de la barrera hematoencefálica (BBB). Se incluyen también otros modelos de clasificación que se centran en analizar qué tan propensa es una molécula pequeña a ser sustrato o inhibidor de proteínas que controlan comportamientos farmacocinéticos importantes.

El conocimiento acerca de los compuestos que son sustrato o no sustrato de la glicoproteína de permeabilidad (P-gp, sugerida como el miembro más importante entre los transportadores unión a ATP o transportadores ABC) es clave para evaluar la salida activa a través de las membranas biológicas, por ejemplo, del tracto gastrointestinal.³⁶⁴

364. Montanari, F.; Ecker, G. F. Prediction of drug-ABC-transporter interaction—Recent advances and future challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *86*, 17–26.

Una función importante de la P-gp es proteger el sistema nervioso central (SNC) de los xenobióticos.³⁶⁵ La P-gp se sobreexpresa en algunas células tumorales y conduce a cánceres resistentes a múltiples fármacos.³⁶⁶

Es importante también el conocimiento sobre la interacción de las moléculas con los citocromos P450 (CYP). Esta superfamilia de isoenzimas es un factor clave en la eliminación de fármacos a través de la biotransformación metabólica. Es por ello por lo que se ha sugerido que CYP y P-gp pueden procesar moléculas pequeñas de forma sinérgica para mejorar la protección de tejidos y órganos.³⁶⁷

Se estima que del 50 al 90% de las moléculas terapéuticas son sustrato de cinco isoformas principales (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4).³⁶⁸ La inhibición de estas isoenzimas es sin duda una de las principales causas de las interacciones farmacocinéticas que conducen a efectos adversos tóxicos u otros no deseados debido a la menor eliminación y acumulación del fármaco o sus metabolitos.³⁶⁹ Es de gran importancia para el desarrollo de nuevos fármacos predecir la propensión con la que la molécula causará interacciones farmacológicas significativas a través de la inhibición de CYP y determinar qué isoformas se ven afectadas.

Este programa proporciona una estimación de si una molécula será sustrato de P-gp o inhibidor de las isoenzimas CYP más importantes.

Los cálculos *in silico* revelaron que las selenosemicarbazonas pueden experimentar una alta absorción gastrointestinal, que es la principal área de absorción de los fármacos orales, que no serían sustratos de la P-Gp y que no inhibirían a alguna isoenzima CYP (**Tabla 7.5**).

365. Szakács, G.; Váradi, A.; Ozvegy-Laczka, C., Sarkadi, B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 379–393.

366. Sharom, F.J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* **2008**, *9*, 105–127.

367. van Waterschoot, R.A.B.; Schinkel, A.H. A critical analysis of the interplay between cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: recent insights from knockout and transgenic mice. *Pharmacological Rev.* **2011**, *63*, 390–410.

368. Di, L. The role of drug metabolizing enzymes in clearance. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2014**, *10*, 379–393.

369. Kirchmair, J.; Goller, A.H.; Lang, D.; Kunze, J.; Testa, B.; Wilson, I.D.; Glen, R.C.; Schneider, G. Predicting drug metabolism: experiment and/or computation? *Nature Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 387–404.

Tabla 7.5. Farmacocinética de las selenosemicarbazonas **2a-g**

Compuesto	Absorción GI	Permeable BBB	Substrato P-gp	Inhib. CYP1A2	Inhib. CYP2C19	Inhib. CYP2C9	Inhib. CYP2D6
2a	Alto	Si	No	No	No	No	No
2b	Alto	Si	No	No	No	No	No
2c	Alto	Si	No	No	No	No	No
2d	Alto	Si	No	No	No	No	No
2e	Alto	Si	No	No	No	No	No
2f	Alto	Si	No	No	No	No	No
2g	Alto	Si	No	No	No	No	No

Otro programa que se utilizó fue PASS *online* (www.pharmaexpert.ru/passonline/predict.php), el cual es un software diseñado para evaluar el potencial biológico general de una molécula similar a un fármaco. Este programa proporciona predicciones simultáneas de varias actividades biológicas basadas en la estructura del compuesto. El valor de Pa (probabilidad de ser activo) estima la probabilidad de que el compuesto estudiado permanezca a la subclase de compuestos activo y el valor Pi (probabilidad de ser inactivo) estima la probabilidad de que el compuesto estudiado permanezca a la subclase de compuestos inactivos. Los resultados de este análisis se presentan en la tabla siguientes tablas (**Tablas 7.6–7.11**) En el caso del compuesto **2d** no se obtuvieron resultados.

Tabla 7.6. Resultados arrojados en la plataforma Passonline para el compuesto **2a**

Pa	Pi	Actividad
0,787	0,004	Isomerasa de cadena lateral de corticosteroides
0,784	0,005	Potenciador de expresión HMCS2
0,738	0,006	Inhibidor de la amina deshidrogenasa
0,745	0,022	Inhibidor de taurina deshidrogenasa
0,719	0,010	Regulador del metabolismo de nucleótidos
0,696	0,002	Inhibidor de ribonucleósido-trifostado reductasa
0,671	0,043	Antagonita nicotínico
0,639	0,022	Agonista de apoptosis
0,646	0,050	Inhibidor de la amina dishidrogenasa
0,624	0,030	inhibidor de la glicosilfosfatidilinositol (GPI) fosfolipasa D
0,619	0,041	Antineoplásico
0,595	0,025	Inhibidor de peroxidasa de manganeso
0,566	0,005	Antineoplásico (melanoma)
0,560	0,004	Inhibidor de alcohol deshidrogenasa
0,600	0,048	Antagonista nicotínico
0,546	0,004	Antineoplásico (cáncer de mama)
0,462	0,004	Antineoplásico (cáncer renal)
0,448	0,019	Tratamiento de Alzheimer
0,419	0,027	Tratamiento de la neuropatia diabetica
0,322	0,034	Inhibidor de la adhesion de VIH

Tabla 7.7. Resultados arrojados en la plataforma Passonline para el compuesto **2b**

Pa	Pi	Actividad
0,729	0,007	Isomerasa de cadena lateral de corticosteroides
0,728	0,008	Potenciador de expresión HMCS2
0,700	0,011	Regulador del metabolismo de nucleótidos
0,703	0,031	Inhibidor de taurina deshidrogenasa
0,635	0,012	Inhibidor de la amina deshidrogenasa
0,618	0,003	Inhibidor de ribonucleósido-trifostado reductasa
0,576	0,029	Agonista de apoptosis
0,557	0,020	Inhibidor de la quinasa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
0,525	0,005	Antineoplásico (melanoma)
0,490	0,004	Inhibidor de alcohol deshidrogenada
0,541	0,059	Inhibidor de oxdoreducción
0,485	0,005	Antineoplasico (cáncer de mama)
0,502	0,028	Inhibidor de la 5 hidroxitriptamina
0,531	0,062	Antineoplásico
0,474	0,007	Inhibidor de la cadena ligera de la neurotoxina A botulínica
0,470	0,005	Substrato de CYP2C3
0,451	0,004	Agonista de interleucina
0,479	0,045	Endopeptidase So inhibitor
0,446	0,020	Antituberculosis
0,415	0,005	Antineoplásico (cáncer renal)

Tabla 7.8. Resultados arrojados en la plataforma Passonline para el compuesto **2c**

Pa	Pi	Actividad
0,738	0,006	Inhibidor de la amina deshidrogenasa
0,713	0,009	Potenciador de expresión HMCS2
0,687	0,012	Regulador del metabolismo de nucleótidos
0,687	0,034	Inhibidor de taurina deshidrogenasa
0,679	0,068	Inhibidor de gluconato 2-deshidrogenasa (aceptor)
0,622	0,024	Agonista de apoptosis
0,593	0,047	Antineoplásico
0,517	0,005	Antineoplásico (melanoma)
0,492	0,005	Antineoplásico (cáncer de mama)
0,487	0,004	Inhibidor de ribonucleósido trifosfato reductasa
0,561	0,088	Inhibidor de la sacaropepsina
0,561	0,088	Inhibidor de acrocilindropepsina
0,561	0,088	Inhibidor de quimosina
0,495	0,023	Isomerasa de cadena lateral de corticosteroides
0,492	0,033	Inhibidor de la quinasa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
0,470	0,013	Inhibidor de la quinasa 2 de adhesión focal
0,487	0,032	Inhibidor de la 5 hidroxitriptamina
0,486	0,050	Inhibidor de fructosa 5-deshidrogenasa
0,472	0,036	Inhibidor de la nicotina deshidrogenasa

Tabla 7.9. Resultados arrojados en la plataforma Passonline para el compuesto **2e**

Pa	Pi	Actividad
0,773	0,006	Potenciador de expresión HMCS2
0,746	0,022	Inhibidor de taurina deshidrogenasa
0,716	0,002	Inhibidor de ribonucleósido-trifostado reductasa
0,726	0,029	Inhibidor de glicosilfosfatidilinositol fosfolipasa D
0,694	0,008	Inhibidor de la amina deshidrogenasa
0,687	0,012	Regulador del metabolismo de nucleótidos
0,598	0,018	Substrato de CYP2A8
0,606	0,035	Inhibidor de ftalato 4,5-dioxigenasa
0,569	0,003	Inhibidor de la cadena ligera de la neurotoxina A botulínica
0,556	0,018	Isomerasa de cadena lateral de corticosteroides
0,514	0,015	Inhibidor de nicotina deshidrogenasa
0,539	0,040	Inhibidor de cloruro peroxidasa
0,520	0,026	Inhibidor de la quinasa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
0,489	0,005	Antineoplásico (cáncer de mama)
0,520	0,038	Inhibidor de fructosa 5-deshidrogenasa
0,517	0,038	Agonista de apoptosis
0,476	0,008	Antineoplásico (melanoma)
0,472	0,005	Substrato de CYP2C3
0,467	0,009	Tratamiento de la neuropatía diabética

Tabla 7.10. Resultados arrojados en la plataforma Passonline para el compuesto **2f**

Pa	Pi	Actividad
0,851	0,004	Potenciador de expresión HMCS2
0,632	0,003	Inhibidor de alcohol deshidrogenada
0,607	0,025	Inhibidor de fosfatidilserina descarboxilasa
0,556	0,018	Isomerasa de cadena lateral de corticosteroides
0,562	0,031	Agonista de apoptosis
0,579	0,050	Antineoplásico
0,526	0,005	Antineoplásico (melanoma)
0,542	0,025	Regulador del metabolismo de nucleótidos
0,525	0,009	Inhibidor de la aminopeptidasa PfA-M1
0,514	0,005	Antineoplásico (cáncer de mama)
0,507	0,004	Tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad
0,499	0,004	Inhibidor de ribonucleósido trifosfato reductasa
0,497	0,013	Antituberculosis
0,470	0,024	Antimicobacteriano
0,457	0,037	Inhibidor de la amina deshidrogenasa
0,504	0,087	Inhibidor de taurina deshidrogenasa
0,453	0,041	Inhibidor de proteínas asociado a centrómeros
0,414	0,003	Estimulante de la catalasa
0,404	0,005	Antineoplásico (cáncer renal)

Tabla 7.11. Resultados arrojados en la plataforma Passonline para el compuesto **2g**

Pa	Pi	Actividad
0,690	0,010	Potenciador de expresión HMCS2
0,688	0,012	Regulador del metabolismo de nucleótidos
0,622	0,040	Antineoplásico
0,596	0,027	Agonista de apoptosis
0,556	0,018	Isomerasa de cadena lateral de corticosteroides
0,531	0,005	Antineoplásico (melanoma)
0,505	0,004	Inhibidor de alcohol deshidrogenada
0,499	0,004	Inhibidor de ribonucleósido-trifostado reductasa
0,494	0,013	Antituberculosis
0,475	0,005	Antineoplásico (cancer de mama)
0,509	0,047	Antiviral (picornavirus)
0,462	0,004	Agonista de interleucina
0,479	0,035	Inhibidor de proteínas asociado a centrómeros
0,457	0,037	Inhibidor de la amina dishidrogenasa
0,504	0,087	Inhibidor de taurina deshidrogenasa
0,415	0,018	Inhibidor de la cadena ligera de la neurotoxina A botulínica
0,390	0,005	Antineoplásico (cáncer renal)
0,415	0,037	Antihelmíntico (nematodos)
0,463	0,091	Inhibidor de ftalato 4,5-dioxigenasa

Se puede observar en las tablas anteriores que en este análisis las selenosemicarbazonas **2a-2g** pueden exhibir actividad como agentes antineoplásicos, es decir, como sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento, o proliferación de células tumorales malignas. En particular, el software predice actividad en el caso de cáncer renal, de mama y melanoma.

La HMCS2 (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa mitocondrial) es una enzima limitante de la cetogénesis, que es vital para la iniciación del tumor o la metástasis. Algunos resultados han demostrado que la expresión de HMGS2 se reduce significativamente en diferentes tipos de cáncer.³⁷⁰ Las predicciones realizadas sobre las selenosemicarbazonas **2a-2g** indican que estas poseen una alta probabilidad de actuar como potenciadores de la expresión de HMCS2.

Las tiosemicarbazonas **4a-p** (Figura 7.2) también se sometieron a este tipo de estudio computacional. Así pues, mediante el empleo del programa Molinspiration se obtuvieron los datos físico-químicos mostrados en la **Tabla 7.12**.

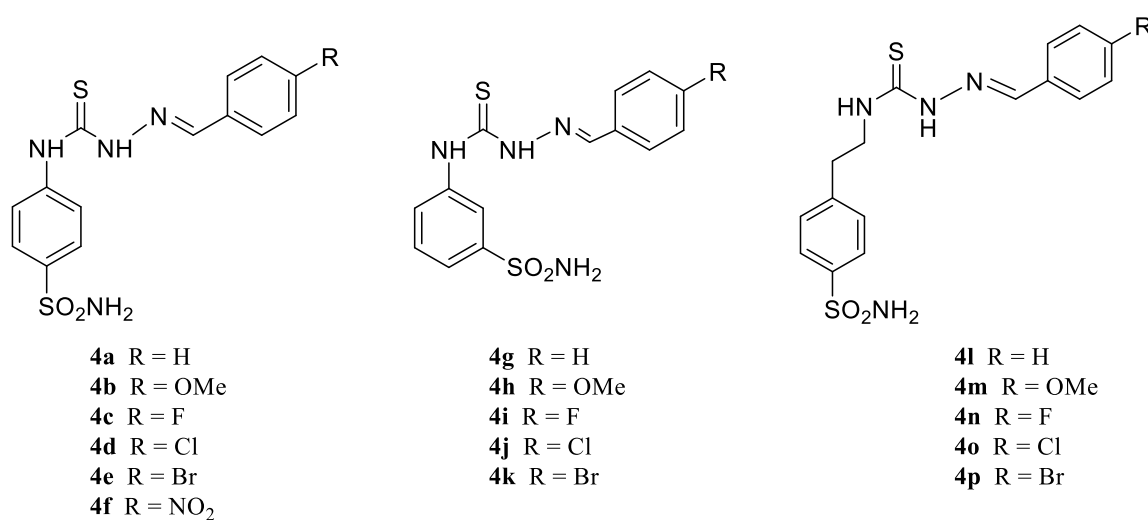


Figura 7.2. Estructura de las tiosemicarbazonas **4a-p** sometidas a predicciones de sus propiedades físico-químicas.

370. Shafqat, N.; Turnbull, A.; Zschocke, J.; Oppermann, U.; Yue, W.W.; Crystal structure of human HMG-CoA synthase isoforms provide insights into inherited ketogenesis disorders and inhibitor design. *J. Mol. Biol.* **2010**, *14*, 497-506.

Tabla 7.12. Datos del programa Molinspiration de las tiosemicarbazonas **4a-p**

Compuesto	MiLogP	TPSA Å	No. de átomos	MW g/mol	No. de violaciones
4a	2.01	95.58	22	334.43	0
4b	2.07	105.82	24	364.45	0
4c	2.17	95.58	23	352.42	0
4d	2.69	95.58	23	368.87	0
4e	2.82	95.58	23	413.32	0
4f	1.97	142.41	25	379.42	0
4g	1.99	95.58	22	334.43	0
4h	2.04	105.82	24	364.44	0
4i	2.15	95.58	23	352.42	0
4j	2.67	95.58	23	368.87	0
4k	2.8	95.58	23	413.32	0
4l	2.75	95.58	24	362.48	0
4m	2.81	105.82	26	392.51	0
4n	2.92	95.58	25	380.47	0
4o	3.43	95.58	25	396.93	0
4p	3.56	95.58	25	441.38	0

Referente al coeficiente de partición octanol-agua (logP) de los derivados **4a-p**, puede comprobarse que en todos los casos es inferior a 5, y en particular, está en el rango 2.01–3.92, por lo que puede considerarse que estos compuestos presentan una hidrofobicidad adecuada. Puede observarse que el valor de logP aumenta al introducir el grupo metoxi, así como los halógenos, aumentando con el tamaño atómico de este.

En cuanto al área de superficie polar molecular (TPSA), los compuestos **4a-p** están dentro del rango establecido. Se puede observar que este parámetro aumenta en el caso de los compuestos que portan el grupo metoxilo (**4b**, **4h** y **4m**), al igual que para el nitroderivado **4f**.

Se utilizó también la aplicación *online* SwissADME (**Tabla 7.13**); con relación a la regla de los cinco de Lipinski se observa que el peso molecular de las tiosemicarbazonas **4a-p** oscila aproximadamente de 300 g/mol a 450 g/mol, por lo que los compuestos se encuentran por debajo del rango establecido en esta regla. Las tiosemicarbazonas poseen entre 4 y 6 grupos donadores de enlaces de hidrogeno y 3 grupos aceptores de enlaces de hidrogeno.

En cuanto al parámetro nRotb (No. de enlaces rotables), los derivados **4a-p** cuentan entre 9 y 6. 5 enlaces rotables, lo cual está en el rango de estas reglas. En el caso de los compuestos **4l-p** poseen más enlaces rotatorios debido a que tienen un fragmento de etileno que separa el grupo bencenosulfonamida de la función tiosemicarbazona.

En conclusión, con los datos obtenidos de este programa se puede mencionar que en relación a la regla de Lipinski, las tiosemicarbazonas analizadas cumplen con todos

estos requerimientos, por lo cual podrían ser consideradas como posibles fármacos en cuanto a sus propiedades físico-químicas.

Tabla 7.13. Propiedades fisicoquímicas de las tiosemicarbazonas **4a-p**

Compuesto	Formula	Peso molecular (g/mol)	No. de átomos	No. de átomos arom.	No. de enlaces rotables	No. de H-acep.	No. de H-dona.
4a	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ O ₂ S ₂	334.42	22	12	6	4	3
4b	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₃ S ₂	364.44	24	12	7	5	3
4c	C ₁₄ H ₁₃ FN ₄ O ₂ S ₂	352.41	23	12	6	5	3
4d	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₄ O ₂ S ₂	368.86	23	12	6	4	3
4e	C ₁₄ H ₁₃ BrN ₄ O ₂ S ₂	413.31	23	12	6	4	3
4f	C ₁₄ H ₁₃ N ₅ O ₄ S ₂	379.41	25	12	7	6	3
4g	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ O ₂ S ₂	334.42	22	12	6	4	3
4h	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₃ S ₂	364.44	24	12	7	5	3
4i	C ₁₄ H ₁₃ FN ₄ O ₂ S ₂	352.41	23	12	6	5	3
4j	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₄ O ₂ S ₂	368.86	23	12	6	4	3
4k	C ₁₄ H ₁₃ BrN ₄ O ₂ S ₂	413.31	23	12	6	4	3
4l	C ₁₆ H ₁₈ N ₄ O ₂ S ₂	362.47	24	12	8	4	3
4m	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₃ S ₂	392.5	26	12	9	5	3
4n	C ₁₆ H ₁₇ FN ₄ O ₂ S ₂	380.46	25	12	8	5	3
4o	C ₁₆ H ₁₇ ClN ₄ O ₂ S ₂	396.91	25	12	8	4	3
4p	C ₁₆ H ₁₇ BrN ₄ O ₂ S ₂	441.37	25	12	8	4	3

Por otra parte, se calculó la lipofilia (**Tabla 7.14**) para cada una de las tiosemicarbazonas anteriores mediante 5 modelos diferentes, y la media de estos (consensus Log P_{o/w}) proporciona un valor comprendido entre 1.76 y 2.82, el cual se encuentra en un rango aceptado. Puede comprobarse cómo, a medida que crece el tamaño atómico del halógeno, lo hace el valor de consensus Log P_{o/w}.

Con estos valores puede concluirse que las tiosemicarbazonas **4a-p** presentan un carácter lipofílico adecuado como para experimentar difusión a través de los fluidos biológicos en el organismo, y tener una difusión pasiva a través de las membranas biológicas.

Tabla 7.14. Propiedades lipofílicas de las tiosemicarbazonas **4a-p**

Compuesto	Log P _{o/w} (iLOGP)	Log P _{o/w} (XLOGP3)	Log P _{o/w} (WLOGP)	Log P _{o/w} (MLOGP)	Log P _{o/w} (SILICOS-IT)	Consenso Log P _{o/w}
4a	1.5	1.72	2.54	1.3	1.75	1.76
4b	2.09	1.69	2.55	1.02	1.82	1.83
4c	1.5	1.82	3.1	1.7	2.19	2.06
4d	2.24	2.35	3.2	1.82	2.41	2.4
4e	2.33	2.41	3.31	1.95	2.45	2.49
4f	1.59	1.55	2.98	0.34	0.4	1.3
4g	1.59	1.72	2.54	1.3	1.75	1.78
4h	1,71	1.69	2.55	1.02	1.82	1.76
4i	1.44	1.82	3.1	1.7	2.19	2.05
4j	1.84	2.35	3.2	1.82	2.41	2.32
4k	2.36	2.41	3.31	1.95	2.45	2.49
4l	1.82	2.12	2.46	1.54	2.52	2.09
4m	2.67	2.09	2.46	1.25	2.6	2.22
4n	2.12	2.22	3.01	1.93	2.96	2.45
4o	2.27	2.75	3.11	2.05	3.18	2.67
4p	2.67	2.81	3.22	2.17	3.22	2.82

En la **Tabla 7.15** se muestra la predicción de la solubilidad en agua (logS) mediante dos aproximaciones; los valores obtenidos sugieren que la solubilidad en agua de estas semicarbazonas oscila desde moderadamente solubles a solubles.

Tabla 7.15. Solubilidad de las tiosemicarbazonas **4a-4p**

Compuesto	Log S (ESOL)	Solubilidad	Clase	Log S (Ali)	Solubilidad	Clase
4a	-3.0	3.31e-01 mg/ml; 9.89e-04 mol/ml	Soluble	-4.21	2.04e-02 mg/ml; 6.11e-05 mol/ml	Moderadamente soluble
4b	-3.07	3.09e-01 mg/ml; 8.47e-04 mol/ml	Soluble	-4.38	1.53e-02 mg/ml; 4.20e-05 mol/ml	Moderadamente soluble
4c	-3.16	1.43e-01 mg/ml; 6.89e-04 mol/ml	Soluble	-4.32	1.70e-02 mg/ml; 4.81e-05 mol/ml	Moderadamente soluble
4d	-3.6	9.32e-02 mg/ml; 2.53e-04 mol/ml	Soluble	-4.78	5.0e-03 mg/ml; 1.36e-05 mol/ml	Moderadamente soluble
4e	-3.91	5.07e-02 mg/ml; 1.23e-04	Soluble	-4.93	4.85e-04 mg/ml; 1.17e-05	Moderadamente soluble

		mol/ml			mol/ml	
4f	-3.06	3.29e-01 mg/ml; 8.67- 04 mol/ml	Soluble	-5.0	3.79e-03 mg/ml; 1.00e-05 mol/ml	Moderadamente soluble
4g	-3.0	3.31e-01 mg/ml; 9.89e-04 mol/ml	Soluble	-4.21	2.04e-02 mg/ml; 6.22e-05 mol/ml	Moderadamente soluble
4h	-3.07	3.31e-01 mg/ml; 9.89e-04 mol/ml	Soluble	-4.38	1.53e-02 mg/ml; 4.20e-05 mol/ml	Moderadamente soluble
4i	-3.16	2.43e-01 mg/ml; 6.89e-04 mol/ml	Soluble	-4.32	1.70e-02 mg/ml; 4.81e-05 mol/ml	Moderadamente soluble
4j	-3.6	9.32e-02 mg/ml; 2.53e-04 mol/ml	Soluble	-4.87	5.0e-03 mg/ml; 1.36e-05 mol/ml	Moderadamente soluble
4k	-3.91	5.07e-02 mg/ml; 1.23e-04 mol/ml	Soluble	-4.93	4.85e-03 mg/ml; 1.17e-065 mol/ml	Moderadamente soluble
4l	-3.26	1.97e-01 mg/ml; 5.43e-04 mol/ml	Soluble	-4.63	8.51e-03 mg/ml; 2.35e-05 mol/ml	Moderadamente soluble
4m	-3-34	1.80e-01 mg/ml; 4.60e-04 mol/ml	Soluble	-4.79	6.34e-03 mg/ml; 1.61e-05 mol/ml	Moderadamente soluble
4n	-3.42	1.43e-01 mg/ml; 3.76e-04 mol/ml	Soluble	-4.73	7.04e-03 mg/ml; 1.85e-05 mol/ml	Moderadamente soluble
4o	-3.86	5.47e-02 mg/ml; 1.38e-04 mol/ml	Soluble	-5.28	2.07e-03 mg/ml; 5.21e-06 mol/ml	Moderadamente soluble
4p	-4.17	2.96e-02 mg/ml; 6.70e-05 mol/ml	Moderadamente soluble	-5.35	1.99e-03 mg/ml; 4.52e-06 mol/ml	Moderadamente soluble

En el caso de las propiedades farmacocinéticas (**Tabla 7.16**), considerando los parámetros de absorción, distribución y metabolismo, se observa que las tiosemicarbazonas **4a**, **4g** y **4k** son las que previsiblemente tendrían una alta absorción gastrointestinal.

Se predice que los compuestos **4a-p** no tienen la capacidad de cruzar la barrera hemato-encefalica, que actúa como una barrera de protección frente a sustancias extrañas al cerebro. Por otro lado, el compuesto **4f** es el único que podría ser sustrato de la proteína P-gp.

El CYP2C9 es parte de esta familia la familia de citocromo P450 es responsable de descomponer varios medicamentos que se utilizan comúnmente, La mayoría de los compuestos podrían ser activos como inhibidores del CYP29, solo el compuesto **55i** no tiene esta actividad.

Tabla 7.16. Propiedades farmacocinéticas de las tiosemicarbazonas **4a-p**

Compuesto	Absorción GI	Permeable BBB	Substrato P-gp	Inhib. CYP1A2	Inhib. CYP2C19	Inhib. CYP2C9	Inhib. CYPP2D6
4a	Alto	No	No	No	No	No	No
4b	Bajo	No	No	No	No	Si	No
4c	Bajo	No	No	Si	Si	Si	No
4d	Bajo	No	No	No	No	Si	No
4e	Bajo	No	No	No	No	Si	No
4f	Bajo	No	Si	No	No	Si	No
4g	Alto	No	No	No	No	Si	No
4h	Bajo	No	No	No	No	Si	No
4i	Bajo	No	No	No	No	No	No
4j	Bajo	No	No	No	No	Si	No
4k	Bajo	No	No	No	No	Si	No
4l	Alto	No	No	No	No	Si	No
4m	Bajo	No	No	No	No	Si	Si
4n	Bajo	No	No	No	No	Si	No
4o	Bajo	No	No	No	Si	Si	No
4p	Bajo	No	No	Si	No	Si	No

En *druglikeness* (Tabla 7.17), los compuestos **4a-p** presentan una violación. El compuesto **4f**, con un grupo *p*-nitrofenilo, presenta violaciones en 3 de los 5 métodos analizados, y por tanto, sería el que tendría previsiblemente menos opciones de ser desarrollado como fármaco.

Las tiosemicarbazonas **4a-p** presentan un promedio de biodisponibilidad consenso de 0.55, lo que significa que estos compuestos el 55% de biodisponibilidad oral en ratas o permeabilidad de Caco-2 medible.

Tabla 7.17. Druglikeness de las tiosemicarbazonas 4a-4p

Compuesto	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge	Biodisponibilidad
4a	Si, cero violaciones	Si	Si	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4b	Si, cero violaciones	Si	No, 1 violación TPSA>140	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4c	Si, cero violaciones	Si	Si	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4d	Si, cero violaciones	Si	Si	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4e	Si, cero violaciones	Si	Si	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4f	Si, cero violaciones	No 1 violación TPSA>140	No, 1 violación TPSA>140	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4g	Si, cero violaciones	Si	Si	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4h	Si, cero violaciones	Si	No, 1 violación TPSA>140	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4i	Si, cero violaciones	Si	Si	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4j	Si, cero violaciones	Si	Si	No, 1 violación MW>350	Si	0.55
4k	Si, cero violaciones	Si	Si	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4l	Si, cero violaciones	Si	Si	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4m	Si, cero violaciones	Si	No, 1 violación TPSA>140	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4n	Si, cero violaciones	Si	Si	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4o	Si, cero violaciones	Si	Si	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55
4p	Si, cero violaciones	Si	Si	No, 1 violación TPSA>131.6	Si	0.55

Tomando como modelo la tiosemicarbazona **4h**, en la Tabla **7.18** se muestran las predicciones realizadas empleando el software PASS online en cuanto a las posibles actividades biológicas.

Tabla 7.18. Resultados arrojados en la plataforma Passonline para el compuesto **4h**

Pa	Pi	Actividad
0,875	0,003	Antimicobacteriano
0,84	0,004	Potenciador de expresión HMGCS2
0,83	0,003	Antituberculosis
0,752	0,003	Inhibidor de la fosfatasa alcalina
0,61	0,005	Inhibidor de la aminopeptidasa PfA-M1
0,56	0,002	Antilepra
0,559	0,009	Antagonista del neuropeptido Y2
0,55	0,021	Estimulante de la Caspasa 3
0,497	0,02	Substrato de CYP2D15
0,36	0,04	Antibacteriano
0,33	0,029	Antihelmíntico
0,341	0,045	Antiparasitario
0,19	0,02	Inhibidor de la Histona deacetilasa clase III
0,137	0,003	Inhibidor de ahidrasa carbónica II
0,113	0,005	Inhibidor de ahidrasa carbónica VII
0,054	0,008	Inhibidor de ahidrasa carbónica V
0,049	0,014	Inhibidor de ahidrasa carbónica XIV
0,033	0,005	Inhibidor de ahidrasa carbónica IX
0,028	0,005	Inhibidor de ahidrasa carbónica I
0,018	0,004	Inhibidor de ahidrasa carbónica IV

Se puede observar que para el compuesto **4h** se predice actividad como inhibidor de diferentes anhidrasas carbónicas, así como actividad antiparasitaria o antibacteriana, las cuales ya han sido reportadas para moléculas con grupos sulfonamido.

Las probabilidades que se muestran en la tabla son bajas; esto quiere decir que en la base de datos del programa no hay moléculas evaluadas similares a **4h** por lo tanto, se trata de nuevas entidades químicas (*in vitro* demostraron actividad) y esto concuerda con que Pa (probabilidad de ser activo), aunque bajo, sea mayor a Pi (probabilidad de ser inactivo).

7.2. Actividad antiparasitaria

Como se mencionó en el Capítulo 4, los grupos de investigación en los que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral, llevaron a cabo la preparación de un amplio panel de análogos de bases de Schiff (8 tiosemicarbazidas y 30 tiosemicarbazonas) con objeto de ser estudiados como potenciales agentes antiparasitarios frente a *Trypanosoma cruzi* y al *Trichomonas vaginalis*. La evaluación de estos derivados fue llevada a cabo por el grupo de la Dra. Alicia Gómez-Barrio, de la Unidad de Parasitología del Departamento de Micromobiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense (Madrid, España).

Para ello se empleó el protocolo³⁷¹ de diagrama de flujo secuencial del cribado de fármacos, en el que las moléculas más activas se evalúan posteriormente frente a células Vero (mamíferos) para determinar su índice de selectividad (I.S.). Aproximadamente un 37% de los derivados evaluados frente a *Trichomonas vaginalis* presentaron valores de $IC_{50} < 50 \mu M$, entre los que destacan especialmente las tiosemicarbazonas halogenadas **61a** y **61b** (Figura 7.3), con valores de $IC_{50} = 16.4$ y $14.9 \mu M$, respectivamente. Además, carecían de citotoxicidad inespecífica frente a células Vero a la máxima concentración ensayada ($IC_{50} > 300 \mu M$), lo que arrojaba un índice de selectividad de 18 y 20, respectivamente. Es por ello que, tal y como se indicó en el Capítulo 4, en la presente Tesis Doctoral decidimos preparar los selenoisómeros **5a** y **5b** (Figura 7.1), con objeto de analizar la influencia del átomo de Se en la potencia, e I.S.

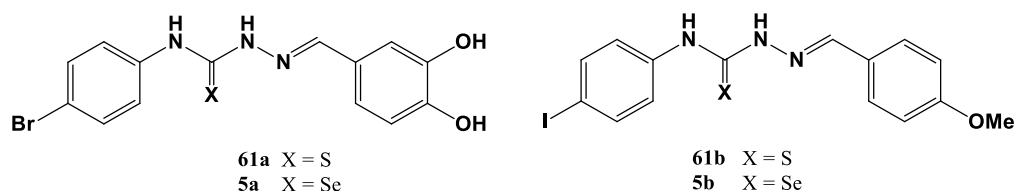


Figura 7.3. Tio(seleno)semicarbazonas optimizadas como agentes anti-*Trichomonas*.

Los selenoderivados **5a** y **5b** mostraron una pequeña mejora en la actividad anti-*Trichomonas* con respecto a sus tio-isómeros ($IC_{50} = 11.1, 11.0 \mu M$). En cuanto a la selectividad, la bromo-selenosemicarbazona **5a** presentó baja citotoxicidad frente a células Vero ($IC_{50} = 114.5 \mu M$, I.S. = 10), mientras que su análogo **5b** no exhibió citotoxicidad inespecífica ($IC_{50} > 300 \mu M$), y por consiguiente, mostró una mejor selectividad (I.S. > 27). De esta forma, puede considerarse que ambos derivados poseen un buen perfil antiparasitario en cuanto a potencia y selectividad. Estos resultados han sido publicados por nosotros recientemente.³⁷²

371. Ibáñez-Escribano, A.; Meneses-Marcel, A.; Marrero-Ponce, Y.; Nogal-Ruiz, J.J.; Arán, V.J.; Gómez-Barrio, A.; Escario, J.A. A sequential procedure for rapid and accurate identification of putative trichomonad agents. *J. Microbiol. Methods* **2014**, *105*, 162–167.

372. Ibáñez-Escribano, A.; Fonseca-Berzal, C.; Martínez-Montiel, M.; Álvarez-Márquez, M.; Gómez-Núñez, M.; Lacueva-Arnedo, M.; Espinosa-Buitrago, T.; Martín-Pérez, T.; Escario, J.A.; Merino-Montiel, P.; Montiel-Smith, S.; Gómez-Barrio, A.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J.G. Thio- and

7.3. Inhibición de anhidrasas carbónicas

Los compuestos descritos en los capítulos 4 y 5 de la presente Tesis Doctoral han sido o están siendo evaluados en el laboratorio del Dr. Claudiu T. Supuran (Universidad de Florencia, Italia) como potenciales inhibidores de las anhidrasas carbónicas IX y XII (enzimas transmembrana, relacionadas con procesos tumorales); dicha actividad, con objeto de determinar su selectividad será comparada con la mostrada frente a las isoformas I y II (enzimas citosólicas). En este estudio se empleó el fármaco acetazolamida (AAZ) como control positivo.

7.3.1. Tio(seleno)semicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina y de arilsulfonamidas

Las tiosemicarbazonas derivadas de 2-piridincarboxaldehído (**1a-j**) carecieron de actividad relevante frente a las CAs; por otro lado, el *screening* de los derivados **2a-g** (Figura 7.4) sobre las CA I y II humanas, mostró ausencia de actividad a una concentración de 100 μM , o actividad muy débil ($K_i = 35\text{--}85 \mu\text{M}$) para los derivados **2f,g**, que a su vez exhibieron $K_i > 100 \mu\text{M}$ para las isoformas IX y XII. El resto no se evaluó sobre las CAs IX y XII. Estos resultados ponen de manifiesto que, si bien, está ampliamente documentado que el grupo tiosemicarbazona posee una importante actividad quelatante de metales, no es capaz de quelatar el catión Zn^{2+} del sitio activo de las CAs.

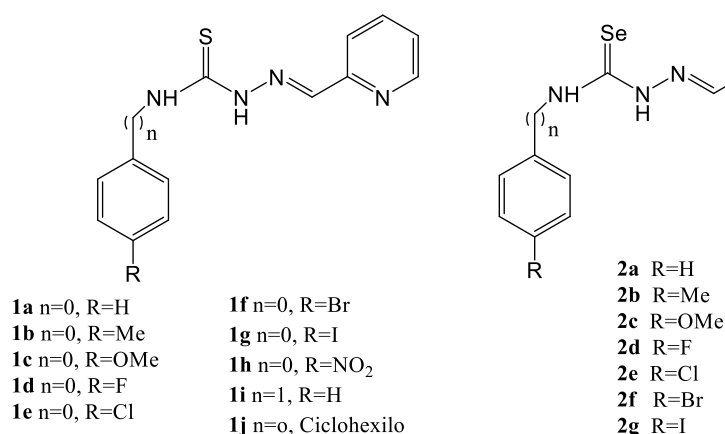


Figura 7.4. Tio(seleno)semicarbazonas **1**, **2** evaluadas frente a CAs.

Por ese motivo, se incorporó el grupo sulfonamido en diversas posiciones del anillo aromático, originando las tiosemicarbazonas **3** y **4** (Figura 7.5).

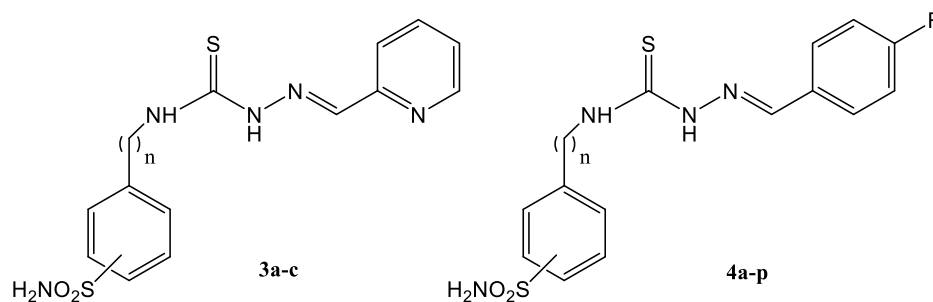


Figura 7.5. Tiosemicarbazonas de tipo arilsulfonamida **3** y **4** evaluadas frente a CAs.

Los valores de actividad inhibitoria de los compuestos **3** y **4**, expresados en forma de constante de inhibición (K_i , nM) se muestran en la **Tabla 7.19**. Todas las tiosemicarbazonas sintetizadas mostraron actividad inhibitoria frente a las CAs transmembrana (IX y XII), que tal, y como se ha mencionado en la introducción, están implicadas en procesos tumorales. Su actividad osciló entre el rango nanomolar bajo y el submicromolar (2.3–499 nM), dependiendo de los sustituyentes, posición del grupo sulfonamido y presencia o ausencia del espaciador de tipo etileno. De esta manera, pueden establecerse una serie de relaciones estructura-actividad interesantes.

En todos los derivados preparados, la actividad frente a la CA XII fue mayor que frente a la CA IX (salvo en **3b**, donde manifiestan virtualmente la misma potencia); esto puede ser de gran interés, ya que, tal y como se ha expresado previamente, se ha descrito que numerosos inhibidores de CA XII son también inhibidores de la glicoproteína Pg-p, y por consiguiente pueden contribuir a reducir la quimiorresistencia en ciertos tumores provocada por la eliminación de xenobióticos a través de la Pg-p.⁶²

Las tiosemicarbazonas que contienen el fragmento de piridina, y carecen del puente de tipo etileno (**3a,b**) se comportan como inhibidores potentes de CA XII (K_i = 4.9, 5.6 nM), con una selectividad análoga o incluso superior a la del fármaco AAZ. El derivado **3b** es además un potente inhibidor de CA II, implicada en el glaucoma. La incorporación del grupo etileno como espaciador (**3c**) permite mantener una potente inhibición de la CA XII, pero con una disminución de la selectividad CA I/XII (**Tabla 7.19**).

El uso del grupo sulfonamido en la posición *meta* del anillo de fenilo conduce a una disminución de la actividad en CA I, lo cual, a su vez, conduce en la mayoría de los casos, a una mejora de la selectividad. Esto resulta importante, con objeto de reducir posibles efectos secundarios. De hecho, el compuesto más activo frente a CA XII (K_i = 2.3 nM), a la par que con la mejor selectividad CA I/XII (K_i = 747.6 nM, CA I) fue el derivado **4h**, con un perfil mejorado con respecto al fármaco de referencia (AAZ, K_i = 250 nM para CA I; K_i = 5.2 nM para CA XII).

Con respecto a los derivados que carecen del fragmento de piridina, la incorporación de un puente de etileno (**4a-f** vs. **4l-p**) permite una mejora de la selectividad en la inhibición de CA XII, particularmente por la importante disminución de la actividad inhibitoria de la CA I, que alcanza el rango micromolar (**4m-p**). En las series de los derivados con el grupo sulfonamido en la posición *para*, resultaron ser más activos frente a CA XII los anillos aromáticos sin sustituir (**4a**, $K_i = 8.38$ nM; **4l**, $K_i = 9.12$ nM), mientras que en la serie con el grupo sulfonamido en posición *meta*, el derivado más potente para la misma isoforma fue el *p*-metoxilado (**4h**, $K_i = 2.3$ nM).

Tabla 7.19. Valores de K_i (nM) de las tiosemicarbazonas **3**, **4** frente a las CAs I, II, IX, XII.

Compuesto	hCA I	hCA II	hCA IX	hCA XII
3a (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂)	206.9	156.6	351.9	4.9
3b (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂)	537.7	2.5	4.9	5.6
3c (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂)	270	83.9	28.5	9.25
4a (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=H)	504	23.7	16.1	8.38
4b (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=OMe)	215	78	91	49
4c (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=F)	196	44.6	147	51.8
4d (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Cl)	485	48.8	27.4	12.1
4e (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Br)	574	46.8	23.3	13.6
4f (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=NO ₂)	845	820	477	288
4g (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=H)	876	60.5	74.3	50.9
4h (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=OMe)	747.6	39.4	387.1	2.3
4i (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=F)	497	97.1	89.3	49.3
4j (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Cl)	5186	312	217	85.4
4k (n=0 <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Br)	5337	531	206	91.3
4l (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=H)	568	70.2	30.8	9.12
4m (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=OMe)	3479	321	164	35
4n (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=F)	2485	590	300	48.5

4o (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Cl)	6217	773	408	143
4p (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Br)	3479	813	499	123
AAZ	250	12.0	25.0	5.7

Con objeto de analizar mejor la selectividad en CA IX y XII, la **Tabla 7.20** muestra los índices de selectividad (S.I.) para la actividad frente a CA IX y XII, en comparación con las enzimas citosólicas CA I y II. Los derivados **3b**, **4a**, **4h**, **4j**, **4k–n** exhiben un I.S. CA I/XII mejorado con respecto al AAZ, destacando muy especialmente **4h** (I.S. = 325).

Tabla 7.20. Índices de selectividad frente de las tiosemicarbazonas **3**, **4**.

Compuesto	I/IX	I/XII	II/IX	II/XII
3a (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂)	0.58	42.2	0.44	31.9
3b (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂)	109.7	96.0	0.51	0.44
3c (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂)	9.5	29.2	2.9	9.0
4a (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=H)	31.3	60.1	1.5	2.8
4b (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=OMe)	2.3	4.3	0.85	1.6
4c (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=F)	1.3	3.8	0.30	0.86
4d (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Cl)	17.7	40.0	1.8	4.0
4e (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Br)	24.6	42.2	2.0	3.4
4f (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=NO ₂)	1.7	2.9	1.7	2.8
4g (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=H)	11.8	17.2	0.81	1.8
4h (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=OMe)	1.9	325.0	0.1	17.1
4i (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=F)	5.5	10.0	1.0	1.9
4j (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Cl)	23.9	60.7	1.4	3.6
4k (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Br)	25.9	58.4	2.5	5.8
4l (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=H)	18.4	62.2	2.2	7.7
4m (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ ,	21.2	99.4	1.9	9.1

R=OMe) 4n (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=F)	8.2	51.2	1.9	12.1
4o (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Cl)	15.2	43.4	1.9	5.4
4p (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Br)	6.9	28.2	1.62	6.6
AAZ	10	43.8	0.4	2.1

7.3.2. Gliconjugados derivados de sulfonamidas y cumarinas

Los híbridos de arilsulfonamidas y carbohidratos **6–8** (Figura 7.6) se han evaluado como inhibidores de las CAs I, II, IX y XII; dichos datos, en forma de constante de inhibición (K_i , nM) se encuentran recogidos en la **Tabla 7.21**. También se han incorporado, a modo de comparación, no sólo el fármaco AAZ, sino también las tioureas derivadas de carbohidratos y sulfonamidas en posiciones C-1 y C-2, descritas previamente por el Prof. Supuran.

De estos datos pueden extraerse una serie de interesantes conclusiones relativas a las relaciones estructura actividad, en función de los aspectos estructurales modificados: configuración del carbohidrato (D-glucó, **6**; D-galacto, **7**; D-mano, **8**), posición del grupo sulfonamido en el anillo aromático (*p*- vs. *m*-), y presencia o no del pequeño espaciador (etileno) entre el grupo tioureido y el anillo aromático.

Referente a la potencia, en la mayor parte de los bicíclicos preparados, se observa una preferencia para la inhibición de la CA XII, en un rango que varía desde el nanomolar bajo, hasta el submicromolar (K_i 2.9-502.5 nM). El orden del perfil inhibitorio de los derivados frente a la CA XII es: Gal > Man > Glu, en el caso de las *p*-sulfonamidas, y Man > Gal > Glu, para el caso de las *m*-sulfonamidas. Destacan todos los derivados de Gal (**7a,b**) y Man (**8a,b**), que se comportaron como muy potentes inhibidores de dicha isoforma (K_i 2.9–5.1 nM), superiores a todos los compuestos mostrados como referencia, tanto las tioureas en posición C-1 (**73a-d**) y C-2 (**81–83**), como el fármaco AAZ. De forma totalmente paralela, el orden de selectividad considerando la CA I es, en ambas familias de regioisómeros: Gal > Man > Glu.

También es destacable que la ubicación del grupo sulfonamido en la posición *meta* conduce en cada uno de los tres tipos de carbohidratos a una mejora sustancial de la selectividad, no sólo por el incremento de actividad frente a la CA XII (que no se produce en todos los casos), sino por la importante pérdida de actividad frente a la CA I, que alcanza el rango submicromolar–micromolar bajo. Destaca muy especialmente el derivado **7b**, con un índice de selectividad (I.S.) de 1530.8 entre ambas isoformas, muy superior al mostrado por el fármaco de referencia AAZ (I.S. = 44.9), y al de todas las tioureas mostradas en la **Tabla 7.21**.

Curiosamente, el comportamiento es sustancialmente distinto en las tioureas mostradas como referencia en la **Tabla 7.21**; así pues, para los derivados en C-1 y C-2 carentes del puente de etileno, el orden en la actividad inhibitoria se invierte: Glu > Gal (**73a**, **73c**), Glu > Man > Gal (**81a** vs. **82a** vs. **83a**). Además, la potencia y selectividad cuando se comparan las parejas de regioisómeros, sólo mejora en el caso de las *m*-sulfonamidas derivadas de D-galactosamina (**82a** vs. **82d**).

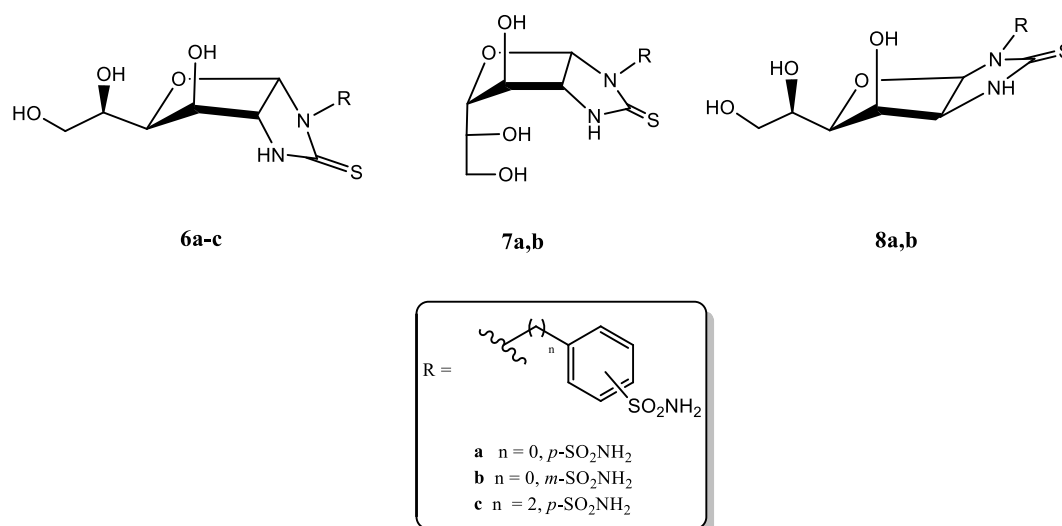
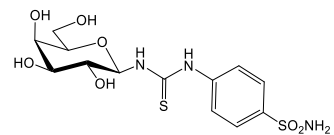
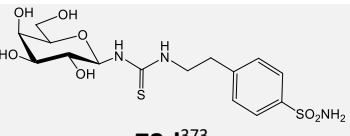
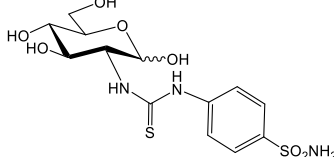
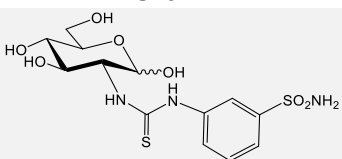
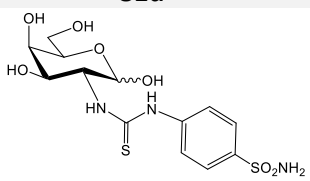
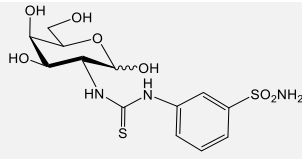
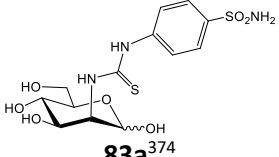
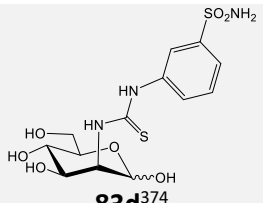


Figura 7.6. Híbridos de arilsulfonamidas y carbohidratos **6–8** evaluados como inhibidores de CAs.

Tabla 7.21. Constantes de inhibición (K_i , nM) de las sulfonamidas derivadas de carbohidratos **6–8**.

Compuesto	hCA I	hCA II	hCA IX	hCA XII
6a	765.5	60.0	175.0	502.5
6b	4578	5053	252.6	216.0
6c	84.7	8.9	61.4	51.4
7a	90.3	116.0	5657	2.9
7b	7807	927.6	9627	5.1
8a	74.6	102.2	624.9	4.1
8b	956.3	806.4	476.0	3.8
 73a ³⁷³	7680	7.0	282	8.2
 73b ³⁷³	9.0	108	8.7	9.7

373. Moeker, J.; Teruya, K.; Rossit, S.; Wilkinson, B.L.; López, M.; Bornaghi, L.F.; Innocenti, A.; Supuran, C.T.; Poulsen, S.-A. Design and synthesis of thiourea compounds that inhibit transmembrane anchored carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2392–2404.

 <p>73c³⁷³</p>	6840	222	7.0	20.1
 <p>73d³⁷³</p>	5790	9.3	2.8	10.2
 <p>81a³⁷⁴</p>	2700	9700	77	7.9
 <p>81d³⁷⁴</p>	100	8600	9.0	207
 <p>82a³⁷⁴</p>	3600	7700	74	104
 <p>82d³⁷⁴</p>	4300	940	42	14
 <p>83a³⁷⁴</p>	120	15700	72	94
 <p>83d³⁷⁴</p>	100	120	64	95
AAZ	250	12.1	25.8	5.7

374. Smaine, F.Z.; Winum, Y.J.; Montero, J.L.; Regainia, Z.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors: Selective inhibition of the extracellular, tumor-associated isoforms IX and XII over isozymes I and II with glycosyl-thioureido-sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5096–5100.

Con respecto a las cumarinas, los únicos derivados que se han evaluado hasta la fecha han sido las tioureas derivadas de ácidos carboxílicos **9a,b**, cuyos datos se encuentran recogidos en la **Tabla 7.22**. De nuevo se observa una preferencia en la inhibición de la CA XII, aunque en estos dos ejemplos, más moderada que en los casos anteriores, ya que en el caso óptimo (**9a**, derivado de β -alanina) se alcanza el rango submicromolar ($K_i = 411$ nM), aunque con buena selectividad (I.S. > 24).

Tabla 7.22. Valores de inhibición K_i (nM) de las tioureas derivadas de cumarina **9a,b**.

Compuesto	hCA I	hCA II	hCA IX	hCA XII
9a (n=0)	>10000	>10000	2578	411
9b (n=4)	>10000	>10000	953.5	897.7
AAZ	250	12.1	25.8	5.7

El resto de derivados de cumarina sintetizados en este capítulo está siendo evaluado en el grupo del Profesor Supuran, y aún no se dispone de datos.

7.4. Ensayos de actividad antiproliferativa *in vitro* e *in vivo*

Los compuestos preparados en esta Tesis Doctoral fueron evaluados como agentes antiproliferativos en el laboratorio del Dr. José Manuel Padrón (Universidad de la Laguna, Tenerife). Los compuestos se evaluaron frente a un panel de seis líneas celulares de cáncer humano: A549 (células de pulmón no pequeñas), HBL-100 (mama), HeLA (cervix), SW1573 (células de pulmón no pequeñas), como ejemplos de líneas sensibles a fármacos, así como T-47D (mama) y WiDr (colon), como líneas resistentes a multifármaco. También se empleó una línea celular no tumoral (BJ-hTert, fibroblastos humanos) que se usó para evaluar la selectividad. Los compuestos cisplatino (CDDP) y 5-fluorouracilo (5-FU), ampliamente utilizados en quimioterapia, se incluyeron como control. Para llevar a cabo este estudio se emplearon pequeñas modificaciones³⁷⁵ del protocolo empleado por el Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU.

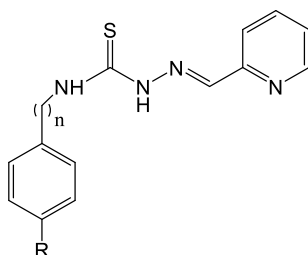
375. Elshafly, H.; Todorović, T.R.; Nikolić, M.; Lolić, A.; Višnjevac, A.; Hagenow, S.; Padrón, J.M.; García-Sosa, A.T.; Djordjević, I.S.; Grubišić, S.; Stark, H.; Filipović, N.R. Selenazolyl-hydrazones as novel selective MAO inhibitors with antiproliferative and antioxidant activities: experimental and in-silico studies. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 247.

Tio- y selenosemicarbazonas

Los datos mostrados en la **Tabla 7.23** (tiosemicarbazonas derivadas de piridin-2-carboxialdehído **1a-j**) permiten obtener una serie de importantes relaciones estructura-actividad (SAR). Todos los compuestos preparados muestran una potente actividad antiproliferativa, que oscila entre el rango micromolar bajo y el nanomolar bajo. El incremento de la distancia entre el grupo tiosemicarbazona y el anillo aromático (**1a** vs. **1i**) conduce a una disminución de la actividad en todas las líneas evaluadas, salvo en T-47D. Por otro lado, la sustitución del anillo aromático por un fragmento de ciclohexilo (**1a** vs. **1j**) permite mejorar la actividad en todas las líneas, salvo en la A549.

La incorporación de un átomo de halógeno en la posición *para* resultó ser especialmente favorable, permitiendo los compuestos más potentes en todas las líneas celulares evaluadas. A modo de ejemplo, los derivados de tipo *p*-bromofenilo (**1f**) y *p*-yodofenilo (**1g**) mostraron valores de GI₅₀ en el rango nanomolar bajo (1.1 y 1.3 nM) para las líneas A549 y T-47D, respectivamente. Esto supone un incremento de actividad de aproximadamente 4450 y 11530 veces con respecto al cisplatino, uno de los compuestos más empleados en quimioterapia.

Además, los derivados **1a**, **1b**, **1e**, **1f** y **1i** fueron también evaluados frente a una línea no tumoral (BJ-hTert), sin mostrar actividad (GI₅₀ > 100 μM). Esto supone un I.S. > 90900 en el mejor de los casos, excepcionalmente superior al de los fármacos CDDP y 5-FU, que en algunos casos son más activos frente a la célula sana que frente a la tumoral, y es aquí donde radican muchos de sus efectos secundarios.

Tabla 7.23. Actividad antiproliferativa (GI₅₀, μM) de las tiosemicarbazonas **1a-j** frente a líneas de tumores sólidos humanos

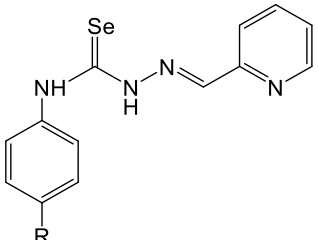
Comp.	A549 (pulmón)	HBL-100 (mama)	HeLa (cérvix)	SW1573 (pulmón)	T-47D (mama)	WiDr (colon)	BJ- hTert
1a (n=0, R=H)	0.085± 0.011	1.5± 0.34	2.7± 0.37	0.043± 0.0058	3.0± 0.06	0.35± 0.04	>100
1b (n=0, R=Me)	0.0044± 0.00033	0.98± 0.035	0.42± 0.072	0.0031± 0.0012	0.27± 0.04	0.058± 0.009	>100
1c (n=0, R=OMe)	1.5±0.18	0.20± 0.041	0.67± 0.14	0.0032	0.28± 0.14	0.026± 0.001	n.t.
1d (n=0, R=F)	0.87±0.29	1.2± 0.33	0.34± 0.055	0.0085	0.07± 0.02	0.043± 0.010	n.t.
1e (n=0, R=Cl)	0.0082± 0.0070	0.35± 0.0670	0.25± 0.0037	0.0029± 0.0003	0.26± 0.08	0.075± 0.008	>100
1f (n=0, R=Br)	0.0011± 0.00022	0.70± 0.029	0.33± 0.031	0.032± 0.021	0.27± 0.04	0.082± 0.019	>100
1g (n=0, R=I)	0.30±0.11	0.037± 0.0058	0.23± 0.046	0.001	0.0013± 0.0003	0.013	n.t.
1h (n=0, R=NO ₂)	0.56±0.10	0.54± 0.34	0.47± 0.10	0.24± 0.09	0.54± 0.02	0.41± 0.04	n.t.
1i (n=1, R=H)	0.55±0.08 3	5.2± 0.10	6.3± 1.6	0.27± 0.09	3.1± 0.7	2.0	>100
1j (n = 0, ciclohexilo)	0.35±0.05 3	0.033± 0.016	0.32± 0.13	0.016	0.36± 0.69	0.018± 0.017	n.t.
CDDP	4.9±0.2	1.9± 0.2	3.4± 0.7	2.0± 0.3	15± 2	26± 1	14± 2
5-FU	n.t.	5.5± 2.3	4.3 ±1.6	15± 4.7	47 ±18	49±6.7	5.5± 0.5

n.t. = no evaluado

En base a los excelentes resultados anteriores, es por lo que se decidió susituir el átomo de calcógeno por Se, originando así los selenoisósteros **2a-g**, de los que no hay antecedentes en la bibliografía. Los resultados incluidos en la Tabla **7.24** para las selenosemicarbazonas son excelentes, con valores de actividad comprendidos entre el rango micromolar bajo y el nanomolar bajo. Puede comprobarse también que existe un cierto paralelismo con las tiosemicarbazonas isósteras **1** en cuanto a la influencia del sustituyente en el anillo aromático. Así pues, por ejemplo, la actividad empeora en el caso del anillo aromático sin sustituir (**2a**), o sustituido en la posición *para* con un grupo fuertemente donador de electrones (metoxilo, **2c**).

Los compuestos más activos de la serie resultaron ser de la familia de los halógenos, exceptuando al F (**2e-g**), donde se alcanzan valores en el rango nanomolar bajo (hasta 1.0 nM) para muchas de las líneas celulares ensayadas. De esta forma, el compuesto **2g**, con un fragmento de *p*-yodofenilo, ha resultado ser 26.000 veces más potente que el cisplatino, y 49.000 veces más potente que el 5-fluorouracilo para la línea WiDr, resistente a multifármaco, lo que pone de manifiesto el gran potencial de estos compuestos frente al cáncer.

Tabla 7.24. Actividad antiproliferativa (GI₅₀, μM) de las selenosemicarbazonas **2a-g** frente a líneas de tumores sólidos humanos



Compuesto	A549 (pulmón)	HBL-100 (mama)	HeLa (cérvix)	SW1573 (pulmón)	T-47D (mama)	WiDr (colon)
2a (R=H)	1.7± 0.20	0.96± 0.3	1.2± 0.19	0.51± 0.01	0.390± 0.005	0.23± 0.17
2b (R=Me)	0.43± 0.99	1.0± 0.46	1.7± 0.85	0.1±0	0.044± 0.016	0.035± 0.007
2c (R=OMe)	2.6± 0.9	3.8± 1.9	2.0± 0.58	0.74± 0.33	0.87± 0.19	0.83± 0.24
2d (R=F)	2.2± 0.2	1.4± 0.2	2.8± 0.9	0.30± 0.01	0.42± 0.10	0.043± 0.011
2e (R=Cl)	1.6± 0.44	0.059± 0.008	1.4± 0.41	0.012± 0.002	0.018± 0.071	0.0035± 0.0015
2f (R=Br)	1.8± 0.63	0.99± 0.22	0.34± 0.16	0.0017± 0.0006	0.0084± 0.0028	0.0085± 0.017
2g (R=I)	0.36± 0.14	0.056± 0.017	0.30± 0.15	3.4± 0	0.0013± 0.0004	0.0010
CDDP	4.9± 0.2	1.9± 0.2	3.4± 0.7	2.0± 0.3	15± 2	26± 1
5-FU	n.t	5.5± 2.3	4.3± 1.6	15± 5	48± 18	49± 7

En la **Tabla 7.25** se muestran los valores de actividad antiproliferativa (GI₅₀, μM) para los dos tipos de tiosemicarbazonas derivadas de sulfonamidas que se han preparado en este capítulo: aquellas que incorporan un residuo de piridina (**3a-c**), y aquellas en las que se ha sustituido el sistema heteroaromático por un anillo de fenilo con sustituyentes con distinto carácter estereoelectrónico (**4a-p**), estas últimas análogas a los compuestos **1**, pero con un grupo sulfonamido en su estructura.

La primera conclusión que puede extraerse, es que para los derivados de piridina, o con el anillo de fenilo sin sustituir en el fragmento imínico, un incremento de la distancia entre el fragmento de bencenosulfonamida y la función tiosemicarbazona ($n=0, 2$, **3a** vs. **3c**; **4a** vs. **4l**) provoca una disminución abrupta de la actividad, pasando de valores de GI_{50} en el rango micromolar bajo, a ser prácticamente inactivo.

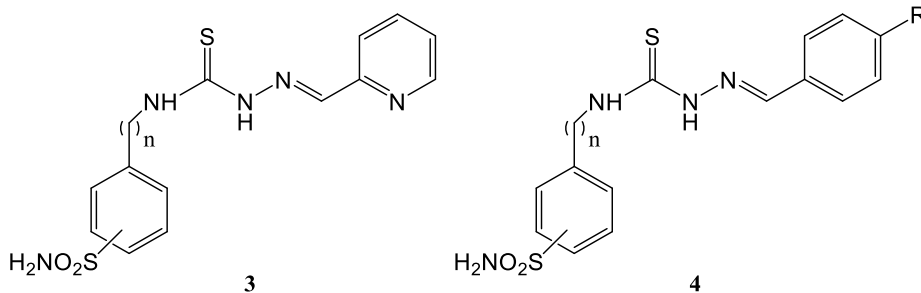
En los derivados con el residuo de piridina, la eliminación del pequeño espaciador de tipo etileno (compuestos **3a,b**) permite mejorar sensiblemente la actividad antiproliferativa, y si bien no se alcanzó la potencia de los compuestos descritos en la sección anterior (**1**), sí mantienen valores de actividad inferiores a $10 \mu\text{M}$ para 5 de las 6 líneas celulares estudiadas. Esto indica que la incorporación de un grupo fuertemente electrón-atrayente como es el grupo sulfonamido, produce una pérdida significativa en la actividad antiproliferativa, aunque permitirá la inhibición de CAs de interés biológico, como se ha discutido en la sección anterior.

También resultó ser un factor importante la posición del grupo sulfonamido en el anillo aromático; así pues, de forma general, los derivados en posición *para* resultaron tener mejores actividades que los regioisómeros en posición *meta*; un caso muy claro de este efecto se encuentra comparando el compuesto **4a**, con actividades en el rango micromolar bajo para todas las líneas celulares evaluadas (GI_{50} 2.3–5.1 μM), por tanto, un potente agente antiproliferativo y el derivado **4g**, que resultó ser bastante moderado o inactivo (GI_{50} 51 – $>100 \mu\text{M}$).

El uso de un sustituyente con un fuerte carácter electrón-donador (OMe) en el fenilo del fragmento imínico tiene también un efecto negativo (**4b,h,m**), conduciendo a derivados inactivos, o con actividad moderada.

Así pues, los derivados con una actividad más potente resultaron ser los que conservan el fragmento de piridina sin el puente de etileno (**3a,b**), así como la *p*-bencenosulfonamida sin sustituyentes en el fenilo del residuo imínico (**4a**); en la mayoría de las líneas tumorales para estos tres compuestos se obtuvieron actividades en el rango micromolar bajo, análogas e incluso superiores a las de los dos fármacos usados como referencia. Es especialmente destacable el incremento de actividad para las dos líneas celulares resistentes a multifármaco (T-47D y WiDr), donde se produjo una mejora de hasta 7-13 veces.

Tabla 7.25. Valores de la actividad antiproliferativa GI₅₀ (μM) de las tiosemicarbonas derivadas de sulfonamidas frente a líneas celulares de cáncer humano.



Compuesto	A549 (pulmón)	HBL-100 (mama)	HeLa (cérvix)	SW1573 (pulmón)	T-47D (mama)	WiDr (colon)
3a (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂)	18± 2.0	5.2± 2.2	5.2± 0.0	4.2±0.0	5.7± 2.1	3.8± 0.3
3b (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂)	10± 2.0	7.8± 2.0	5.8± 0.4	7.1± 0.4	5.3± 0.7	4.5± 0.6
3c (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂)	37± 11	>100	>100	>100	>100	>100
4a (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=H)	5.1± 3.7	3.0± 1.6	2.3± 0.2	2.9± 1.4	2.6± 0.17	4.5± 1.4
4b (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=OMe)	>100	>100	64± 23	>100	>100	>100
4c (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=F)	25± 5	28± 0.5	7.9± 1.1	6.0± 0.4	17± 0.47	24± 4.0
4d (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Cl)	>100	>100	>100	75± 35	>100	>100
4e (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Br)	23± 6	24± 1.6	18± 1.3	22± 1	36± 0.34	62± 12
4f (n=0, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=NO ₂)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
4g (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=H)	51± 10	>100	61± 6.0	70± 1	83± 10	62± 10
4h (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=OMe)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
4i (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=F)	83± 16	>100	>100	>100	>100	79± 29
4j (n=0, <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Cl)	22± 4	42± 15	38± 3	36± 4	59± 16	24± 8
4k (n=0 <i>m</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Br)	19± 6	40± 1	45± 7	46± 1	>100	>100

4l (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=H)	90± 14	>100	>100	99± 1	>100	90± 1
4m (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=OMe)	57	87± 19	76± 34	75± 35	73± 38	77± 33
4n (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=F)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
4o (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Cl)	34	42± 16	24± 13	31	62	62
4p (n=2, <i>p</i> -SO ₂ NH ₂ , R=Br)	21± 4	35± 18	51± 21	83± 25	58± 22	58± 9
CDDP	4.9± 0.2	1.9± 0.2	3.4± 0.7	2.0± 0.3	15± 2	26± 1
5-FU	n.t	5.5± 2.3	4.3± 1.6	15± 5	48± 18	49± 7

Arilsulfonamidas y cumarinas derivadas de carbohidrato

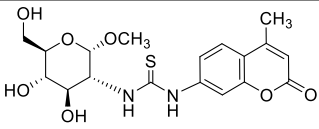
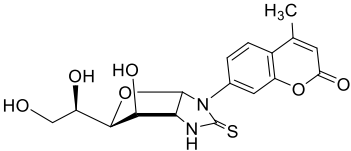
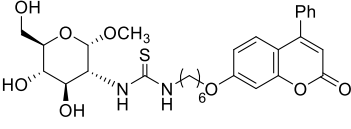
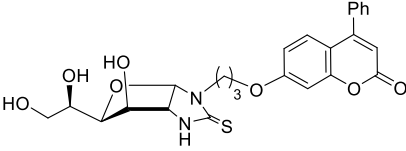
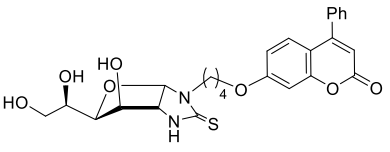
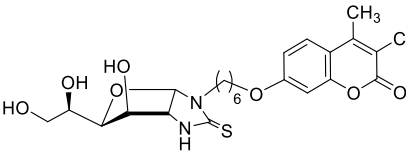
Las arilsulfonamidas derivadas de carbohidrato (**6a-c**, **7a,b**, **8a,b**), así como las cumarinas derivadas de ácidos carboxílicos (**9a,b**) resultaron ser inactivas frente a todas las líneas celulares ensayadas ($GI_{50} > 100 \mu M$).

Una parte importante de las cumarinas derivadas de carbohidrato resultaron ser inactivas en todas las líneas celulares (**11**, **21a,b**, **23a,b**, **25**). La tiourea **10**, si bien bastante débil, sí presentó una leve mejora de actividad con respecto al derivado conformacionalmente rígido **11**, totalmente inactivo (**Tabla 7.26**). Este resultado parece sugerir que, al menos, para espaciadores cortos, la actividad se incrementa con la flexibilidad conformacional.

La cumarina **22a** exhibió sólo actividad moderada frente a la línea SW1573 ($GI_{50} = 34 \pm 9 \mu M$); su homólogo **22b** presentó incremento de actividad en todas las líneas, sugiriendo como aspecto positivo, un aumento en la longitud del espaciador. Es especialmente destacable la actividad frente a la línea SW1573, con actividad en el rango micromolar bajo ($GI_{50} = 5.9 \pm 1.8 \mu M$).

El derivado **23c** exhibió actividades de moderadas a débiles sólo en las líneas HBL-100, HeLa, SW1573 ($GI_{50} = 88 \pm 16$, 48 ± 10 , $21 \pm 1 \mu M$, respectivamente); esto supone un leve incremento de actividad frente a **23a,b**, los derivados con espaciadores más cortos (3 y 4 vs. 6 átomos de carbono). De nuevo, un incremento en el tamaño del espaciador conduce a una cierta mejora de la actividad en algunas de las líneas.

Tabla 7.26. Valores de la actividad antiproliferativa GI_{50} (μM) de una selección de cumarinas derivadas de carbohidrato

Compuesto	A549 (pulmón)	HBL-100 (mama)	HeLa (cérnix)	SW1573 (pulmón)	T-47D (mama)	WiDr (colon)
 10	79± 36	86± 25	83± 30	79± 37	>100	>100
 11	>100					
 20b	34± 4	23± 3	25± 8	9.7	30± 7	36± 16
 22a	>100		34±9		>100	
 22b	64± 31	23± 0	31± 0	5.7± 1.8	70± 23	47± 11
 23c	>100	88± 16	48± 10	21± 1	>100	

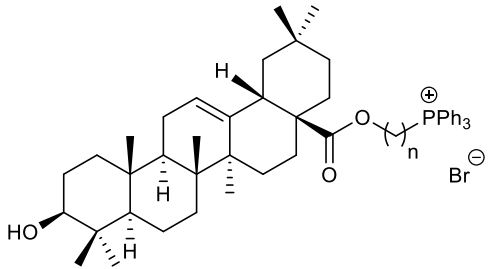
Sales de trifenilfosfonio derivadas del OA

En la **Tabla 7.27** se muestran las actividades de los cuatro agentes mitocondriotrópicos preparados a partir del **OA**. Con objeto de llevar a cabo una comparativa, se incluyen también las actividades del **OA**, así como de los fármacos CDDP y 5-FU.

El **OA** presentó actividades de moderadas a buenas (GI_{50} = 7.2–36 μ M); la incorporación de la sal de trifenilfosfonio con espaciadores de 4–6 carbonos (compuestos **27a-c**) condujo a un aumento espectacular de la actividad biológica, conduciendo a valores de GI_{50} en el rango nM para estos tres compuestos en todas las líneas celulares (13–88 nM). De esta forma, se ha conseguido un incremento de actividad con respecto al CDDP y 5-FU de hasta 2000 y 3769 veces (compuesto **27b**, línea WiDr). Adicionalmente, estos compuestos no mostraron actividad relevante frente a células no tumorales (BJ-hTert, GI_{50} > 100 μ M); como consecuencia, los I.S. estuvieron comprendidos entre > 1136 a > 7692.

Otra consecuencia que puede extraerse de los datos de la **Tabla 7.27** es que el empleo de espaciadores más largos (12 carbonos, compuesto **27d**) conduce a una caída drástica de la actividad; dicho compuesto no mostró actividad en las dos líneas resistente a multifármaco (T-47D y WiDr), mientras que en el resto, la actividad se encuentra en el rango micromolar bajo (5.6–6.8 μ M).

Tabla 7.27. Actividad antiproliferativa (GI_{50} , μ M) de los agentes mitocondriotrópicos **27a-d**.



Compuesto	A549 (pulmón)	HBL-100 (mama)	HeLa (cérvix)	SW1573 (pulmón)	T-47D (mama)	WiDr (colon)	BJ- hTert
OA	7.2± 1.1	24± 17	14± 1	26± 3	36± 7	32± 8	n.t.
27a (n=4)	0.017± 0.002	0.031± 0.13	0.035± 0.011	0.088± 0.043	0.032± 0.008	0.018± 0.009	
27b (n=5)	0.021± 0.002	0.031± 0.007	0.032± 0.007	0.027± 0.002	0.0026± 0.002	0.013± 0.002	>100
27c (n=6)	0.034± 0.013	0.057± 0.011	0.038± 0.010	0.038± 0.008	0.047± 0.008	0.038± 0.009	
27d (n=12)	6.4± 2.8	6.8± 3.9	5.6± 2.0	5.9± 2.0	>100	>100	n.t.
CDDP	4.9± 0.2	1.9± 0.2	3.4± 0.7	2.0± 0.3	15± 2	26± 1	14± 2

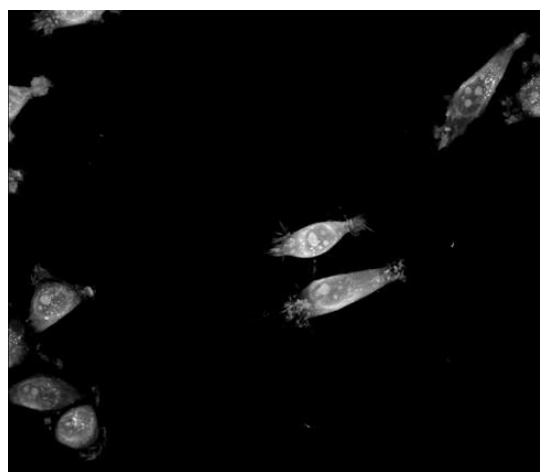
5-FU	n.t	5.5±	4.3±	15±	47±	49±	5.5±
		2.3	1.6	5	18	7	0.5

n.t. = no evaluado

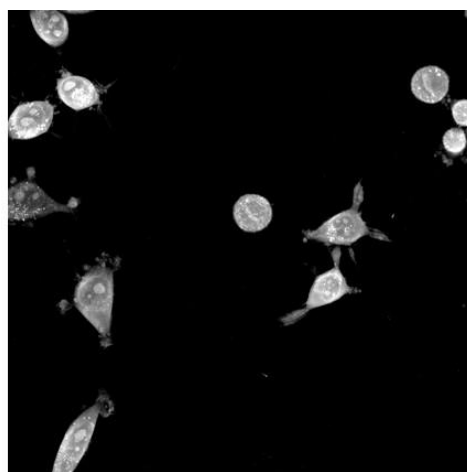
Los compuestos **27a-c** exhiben, por tanto, un gran potencial como posibles agentes antiproliferativos, en base a sus excelentes potencia y selectividad.

Actualmente, en el grupo del Dr. José Manuel Padrón (Universidad de La Laguna, Tenerife, España) se está investigando el modo de acción de dichos compuestos. En particular, se está realizando microscopia de células tumorales vivas empleando el sistema de imágenes de células sin marcaje CX-A; las células se tratan con una concentración 200 nM del compuesto, y se tomas imágenes cada 3 minutos durante 20 h.

A modo de ejemplo, se muestran las imágenes tomadas durante 15 h para los compuestos **27b** (Figura 7.8) y **27c** (Figura 7.9), comparadas con el control (células tumorales no tratadas, Figura 7.7). Con esta técnica de microscopia pueden observarse los ciclos de mitosis en las células (flechas de color azul); también se comprueba la existencia de apoptosis (flechas naranjas, esferas de color blanco). Se demuestra que para ambos compuestos, se incrementa sustancialmente el número de células que entran en apoptosis, siendo este el modo de acción preferido en un agente empleado en quimioterapia, frente a la necrosis.



t = 0



t = 15 h

Figura 7.7. Imágenes de células tumorales vivas no tratadas

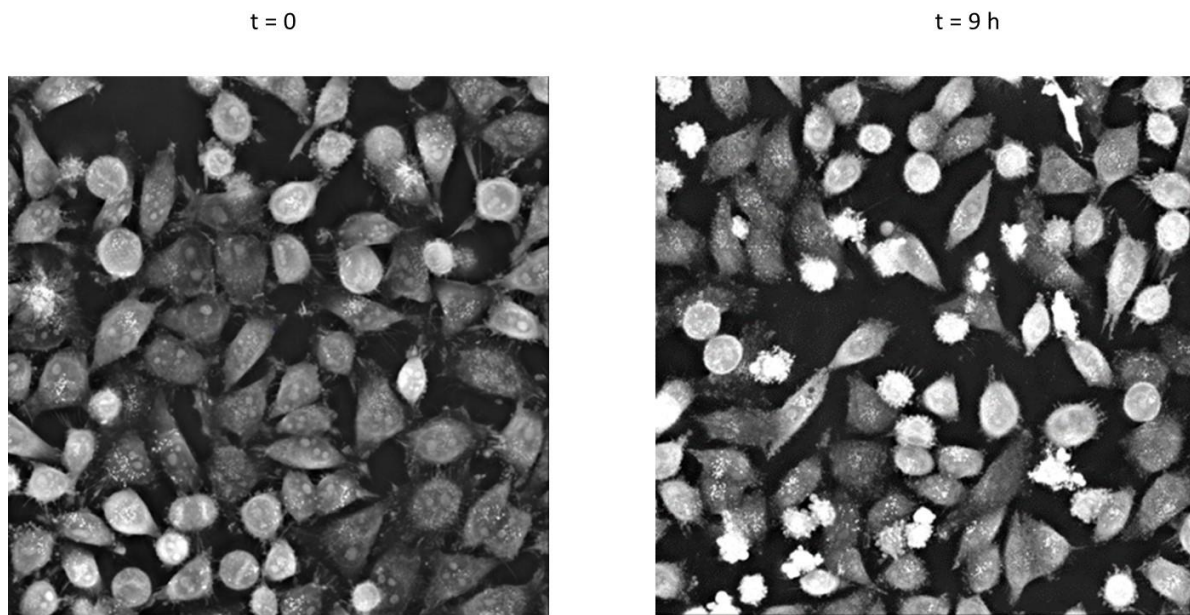


Figura 7.8. Imágenes de células tumorales vivas tratadas con el compuesto **27b**

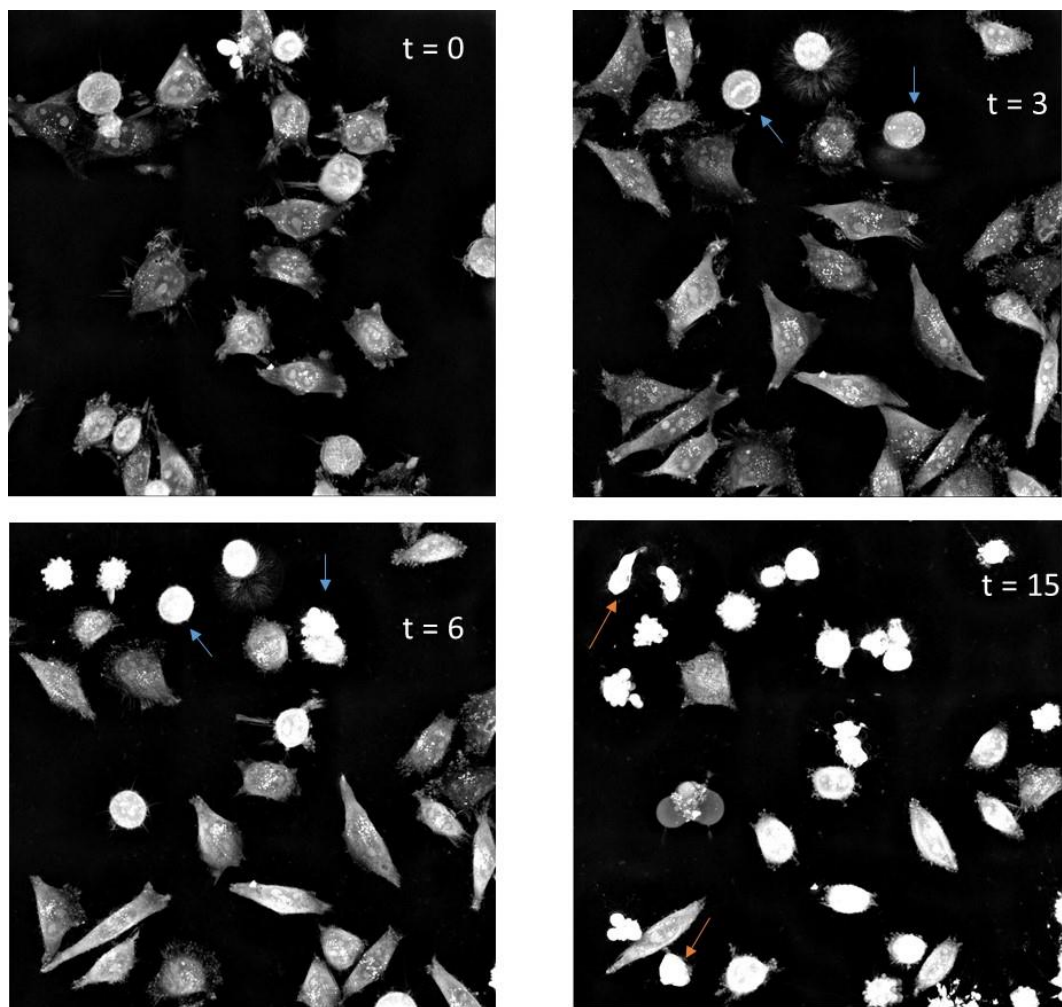


Figura 7.9. Imágenes de células tumorales vivas tratadas con el compuesto **27c**

El compuesto **27b** se seleccionó para ser evaluado *in vivo*; estos experimentos se han realizado en el grupo de la Dra. Raquel Pérez Herrera (Universidad de Zaragoza, España). Para ello se empleó un modelo xenógrafo, en el que las células tumorales de mama de ratón 4T1 que expresan luciferasa se implantaron subcutáneamente. Esto permite la visualización de la evolución del tumor con un método no invasivo (técnica de imagen óptica). Tras evaluar la dosis segura (se ensayaron 17.5–0.55 mg/Kg), se establecieron dos grupos de ratones (9 animales cada uno): control (sin administración del compuesto) y ensayo (0.55 mg/Kg tres veces por semana durante 20 días).

Se puede comprobar que el tratamiento de los ratones con una dosis especialmente baja como la indicada conduce, no a la eliminación del tumor, pero sí a una importante reducción del mismo. Las imágenes por bioluminiscencia demuestran la reducción del volumen del tumor en aproximadamente un 59%. A modo de ejemplo, en la **Figura 7.10** se muestra la situación del tumor en la población control y ensayo en el sexto día de tratamiento.

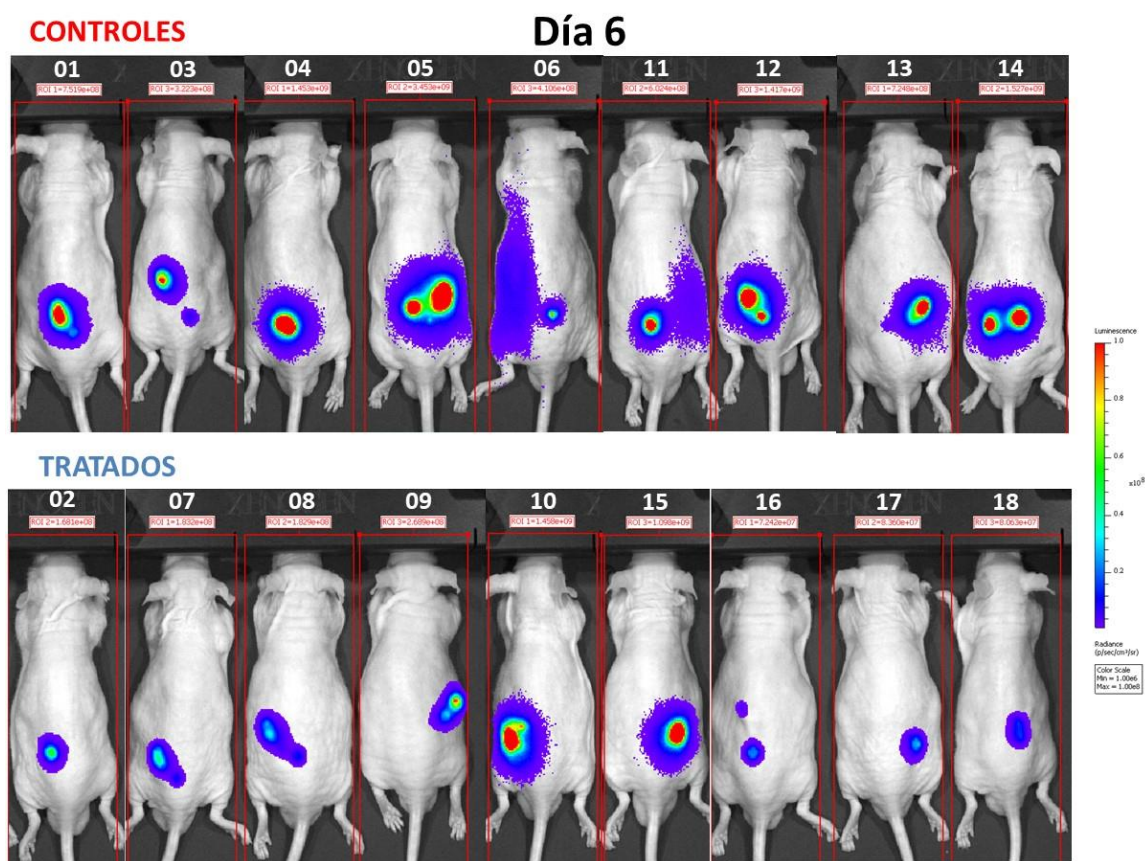


Figura 7.10. Situación del tumor en modelo xenógrafo en ratones tratados con **27b**.

8. CONCLUSIONES

PRIMERA

Se ha accedido de manera eficaz a un amplio panel de tiosemicarbazonas derivadas de 2-piridincarboxaldehído (compuestos **1a-j**), modificándose la naturaleza estereoelectrónica de los sustituyentes en el anillo aromático, y la distancia entre este y el grupo tiosemicarbazona.

SEGUNDA

La transformación de una serie de anilinas aromáticas en las selenosemicarbazonas **2a-g** ha podido llevarse a cabo mediante una metodología sintética en 5 etapas de manera adecuada: *N*-formilación, deshidratación promovida por trifosgeno, acoplamiento con Se elemental, reacción con hidrazina y condensación catalizada por ácido con piridin-2-carboxialdehído.

TERCERA

A pesar de que los grupos tiosemicarbazona y su selenoisómero son excelentes agentes quelatantes de metales, ninguno de los compuestos **1, 2** fue capaz de coordinar al Zn²⁺ del centro activo de las CAs, no actuando ningún derivado como inhibidor de las mismas.

CUARTA

Las tio- y selenosemicarbazonas **1** y **2** resultaron ser excelentes agentes antiproliferativos *in vitro* frente a un panel de 6 líneas de tumores sólidos humanos: A549 (células de pulmón no pequeñas), HBL-100 (mama), HeLA (cérvix), SW1573 (células de pulmón no pequeñas), como ejemplos de líneas sensibles a fármacos, así como T-47D (mama) y WiDr (colon), como líneas resistentes a multifármaco. En muchos casos, los valores de actividad estuvieron comprendidos entre el rango submicromolar y el nanomolar bajo, especialmente cuando se incorporan los halógenos Cl, Br, I, lo que supone un incremento de la potencia de hasta varios miles de veces con respecto a fármacos comúnmente usados en quimioterapia, como el CDDP y el 5-FU.

QUINTA

Las tiosemicarbazonas exhibieron una extraordinaria selectividad hacia las células tumorales, careciendo de actividad relevante (compuestos **1a, 1b, 1e, 1f** y **1i**) frente a células no tumorales (BJ-hTert, fibroblastos humanos) a la máxima concentración ensayada (100 μM); esto supone, en el caso óptimo, un I.S. > 90900, excepcionalmente mejor que los fármacos empleados como referencia.

SEXTA

Las predicciones realizadas mediante cálculos de quimioinformática sugieren que las propiedades físico-químicas de las selenosemicarbazonas **2** y las tiosemicarbazonas derivadas de arilsulfonamidas **4** se encuentran en el rango adecuado como para poder ser empleados como fármacos.

SÉPTIMA

La incorporación de un grupo sulfonamido en la posición N-4 de la función tiosemicarbazona, bien manteniendo el anillo de piridin-2-carboxialdehído (**3a-c**) en la posición N-1, o susituyéndolo por un anillo de fenilo (**4a-p**) condujo a excelentes inhibidores de las isoformas de CAs relacionadas con procesos tumorales (IX, XII), en especial de la CA XII.

En los derivados que conservan el fragmento de piridina y carecen del puente de etileno (**3a,b**) se consiguen potencias del rango nanomolar bajo frente a CA XII ($K_i = 4.9, 5.6$ nM), con selectividades análogas o superiores a las del fármaco de referencia (AAZ).

El empleo del grupo sulfonamido en posición *meta* consiguió mejorar en la mayoría de los casos, la selectividad. En este contexto, el derivado óptimo fue la *p*-metoxifenil tiosemicarbazona **4h** ($K_i = 2.3$ nM, S.I. CA I/XII = 325), mejorando al fármaco AAZ.

OCTAVA

La preparación de glicoconjugados en forma de imidazolidina-2-tionas bicíclicas, derivados de arilsulfonamidas ha resultado ser una excelente estrategia para la obtención de potentes inhibidores de CAs, especialmente de la isoforma XII. Se observó una clara influencia de la configuración del carbohidrato de partida, siendo los derivados de configuración *D-galacto* (**7a,b**) y *D-mano* (**8a,b**) los más potentes (K_i 2.9–5.1 nM); adicionalmente, la ubicación del grupo sulfonamido en posición *meta* del anillo aromático conduce a una sustancial mejora de la selectividad. En este contexto, destaca especialmente el derivado **7b**, con un índice de selectividad de 1530.8 entre las isoformas de CA I y XII.

NOVENA

Entre las glicocumarinas que mostraron actividad antiproliferativa *in vitro*, la línea más sensible fue la SW1573, destacando especialmente la tiourea **20a** y la imidazolidina-2-tiona **22a**, con valores de GI_{50} de 9.7 y 5.7 μ M, respectivamente. En

algunas de las familias, el aumento del tamaño del espaciador provoca un cierto efecto positivo en la actividad.

DÉCIMA

La transformación del **OA** en las sales de trifenilfosfonio **27a-c** permitió incrementar excepcionalmente la actividad antiproliferativa, pasando a estar en el rango nanomolar para todas las líneas en estos tres compuestos (13-88 nM). En el caso óptimo, se ha observado un incremento de actividad de 2000 y 3769 veces con respecto a CDDP y 5-FU(compuesto **27b**, línea WiDr).

Además, se consiguieron selectividades muy destacables, al no mostrar actividad relevante a la máxima concentración ensayada (100 μ M) en células no tumorales.

Se comprobó, además, que un incremento de la longitud del espaciador (12 carbonos, **27d**) provoca una caída abrupta en la actividad.

UNDÉCIMA

El uso de microscopia de imagen de células vivas permitió detectar apoptosis en el modo de acción **27a-c** como agentes antiproliferativos.

DUODÉCIMA

Los ensayos antitumorales *in vivo* (modelo xenógrafo, ratones) confirman que la administración oral de tan sólo 0.55 mg/Kg de **27b** tres veces a la semana, y durante 20 días, permite reducir en torno a un 59% el volumen del tumor usado como modelo (cáncer de mama de ratón 4T1). El seguimiento pudo hacerse mediante bioluminiscencia como método no invasivo.

9. PARTE EXPERIMENTAL

9.1. Métodos generales

Para la **cromatografía en capa fina** (c.c.f.) con fines cualitativos se emplearon placas cromatográficas de gel de sílice sobre aluminio (E. Merck Sílica gel 60 F₂₅₄) con un espesor de 0.25 nm. La visualización de los compuestos se llevó a cabo mediante exposición a luz UV ($\lambda = 254$ nm) e inmersión en distintos reveladores, seguido de calentamiento: ninhidrina etanólica (0.1%), vainillina (10% en EtOH con H₂SO₄ al 1%).

Para la **cromatografía en columna** se empleó como relleno gel de sílice (E. Merck Sílica gel 60; tamaño de partícula 40–63 μm), usando la fase móvil indicadas en cada caso. La elución se efectuó por gravedad o con una pequeña presión ejercida por una bomba de aire.

Los **puntos de fusión** se han medido en un aparato analógico *Electrothermal* y no están corregidos.

Los **espectros de RMN** se han registrado en espectrómetros *Bruker Avance-300* (300.1 MHz para ¹H y 75.5 MHz ¹³C); *Bruker Avance-500* y *Bruker Ascend 500* (500.13 MHz para ¹H y 125.77 MHz para ¹³C). Como disolventes deuterados se han empleado CDCl₃, CD₃OD, (CD₃)₂CO, (CD₃)₂SO; los espectros se han calibrado usando las señales del disolvente como referencias internas.³⁷⁶ Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm, y las constantes de acoplamiento (*J*), en Hz. La asignación de las señales de los espectros de ¹H se ha realizado usando tanto experimentos monodimensionales (¹H, ¹³C), como bidimensionales: COSY (¹H-¹H, Correlated Spectroscopy), HSQC (¹H-¹³C, *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) y HMBC (¹H-¹³C, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Las abreviaturas empleadas en la descripción de la multiplicidad de las señales son: s (singulete), d (doblete), t (triplete), c (cuartete), quint (quintete), m (multiplete) dd (doble doblete), ddd (doble doblete de doblete), dt (doblete de triplete), td (triplete de doblete), sa (singulete ancho), da (doblete ancho), ta (triplete ancho).

Los **espectros de masas** se han realizado en un espectrómetro Qexactive, usando como fuente de ionización el electrospray (ESI). La inyección de la muestra (MeOH) se llevó a cabo usando UHPLC sin columna (50 μL , tiempo de adquisición de 3 min. a 0.200 mL/min); la adquisición efectuó con una resolución de 60,000. La temperatura del capilar fue de 350 C°, y el voltaje, de 3.5 kV. Los espectros se registraron en modo positivo, y calibrados con la disolución de calibración de ion positivo ESI (Pierce™ LTO Velos).

376. Fulmer, G.R.; Miller, A.J.M.; Sherden, N.H.; Gottlieb, H.E.; Nudelman, A.; Stoltz, B.M.; Bercaw, J.E.; Goldberg, K.I. NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* **2010**, *29*, 2176–2179.

9.1.1. Medida de la inhibición de CAs

Las actividades de inhibición de CAs se determinaron usando el método de flujo detenido (*stopped-flow*) [41] para la hidratación del CO₂, con rojo de fenol como indicador (557 nm). Todas las enzimas empleadas fueron recombinantes, y obtenidas como se describe en artículos previos, con un rango de concentraciones de 5–12 nM [41].

9.1.2. Medidas de antiproliferación *in vitro*

Las medidas de antiproliferación *in vitro* se llevaron a cabo en el grupo del Dr. José Manuel Padrón (Universidad de la Laguna, España). Para ello se emplearon pequeñas modificaciones³⁷⁷ sobre el protocolo original del Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. (NCI, *National Cancer Institute*), mediante el método de la sulforrodamina B (SBR).³⁷⁸

Los compuestos puros se disolvieron en DMSO, empleando una disolución madre de 40.0 mM, y una concentración inicial en el pocillo de 100 µM, con un tiempo de incubación de 48 h. Las células se inocularon en una placa de 96 pocillos, con una densidad de 2500 (A549, HBL-100, HeLa y SW1573), 5000 (T-47D y WiDr) o 7000 (Bj-hTERT) células/pocillo. Las células de control se expusieron a una concentración equivalente de DMSO (0.25% V/V, control negativo). Para aquellos compuestos que exhibieron una actividad superior al 50% en la inhibición del crecimiento celular, se calculó el valor de GI₅₀ (Growth Inhibition 50%), con un rango de concentraciones de hasta 0.001 – 100 µM, según la actividad exhibida. Las medidas se expresan como el promedio ± SD.

Para evaluar los cambios fenotípicos inducidos por los compuestos en estudio y relacionarlos con mecanismos de acción, se realizó microscopía de células vivas utilizando el sistema de imágenes de células sin marcaje CX-A (Nanolive S.A., Suiza). En primer lugar, las células tumorales se tripsinizaron y, después de contar, se sembraron 100.000 células en una placa con fondo de vidrio de 35 mm de diámetro (IBIDI, Alemania). Después de 24 h, se cambió el medio por RPMI 1640 sin rojo fenol y las células se trataron con los diferentes compuestos a una concentración de 200 nM. Inmediatamente después, las placas se colocaron en el CX-A y se tomaron imágenes de un área de 236 µm x 236 µm cada 3 minutos durante 20 h.

377. Elshafly, H.; Todorović, T.R.; Nikolić, M.; Lolić, A.; Višnjevac, A.; Hagenow, S.; Padrón, J.M.; García-Sosa, A.T.; Djordjević, L.S.; Grubišić, S.; Stark, H.; Filipović, NR. Selenazolyl-hydrazones as novel selective MAO inhibitors with antiproliferative and antioxidant activities: experimental and In-silico studies, *Front. Chem.* **2018**, *6*, 247.

378. Miranda, P.O.; Padrón, J.M.; Padrón, J.I.; Martín, V.S. Prins-type synthesis and SAR study of cytotoxic alkyl chloro dihydropyrans. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 323–329.

9.1.3. Ensayos antitumorales *in vivo*

Los ensayos antitumorales *in vivo* del compuesto **27b** se realizaron en el grupo de la Dra. Raquel Pérez Herrera (Universidad de Zaragoza, España). Dichos experimentos siguieron el protocolo PI87/20 aprobado por el comité de ética para ensayos con animales aprobado por la Universidad de Zaragoza. El cuidado y manipulación de los animales se llevó a cabo de acuerdo con la política de protección animal de España (RD53/2013) y bajo la directriz de la Unión Europea (2010/63).

Se llevó a cabo un estudio inicial de toxicología, empleando 11 ratones machos RjOrl:SWISS. Para el estudio oncológico se emplearon 18 ratones adultos (15 semanas) hembras Rj:ATHYM-Foxn1^{nu/nu}. Los animales fueron adquiridos. Los ratones se dispusieron en cajas de 30 x 20 x 15 cm (máximo 5 especímenes), con acceso a agua osmotizada y autoclavada y alimentación irradiada (2914 Teklad Global). La temperatura de la habitación se mantuvo a 23 ± 1 °C, con un ciclo de luz de 12 h (comienzo a las 8:00 a.m.).

Antes de llevar a cabo el estudio antitumoral, se estudió la posible toxicidad *in vivo* de **27b**. Para ello se llevó a cabo un test de toxicidad oral aguda (PO) e intraperitoneal (IP), usando el test OECD No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure.³⁷⁹ Se empleó un rango de concentraciones de 0.55–17.5 mg/Kg.

El estudio antitumoral *in vivo* de **27b** fue llevado a cabo empleando un modelo de cáncer de ratón con la línea celular 4T1-luc2 (CRL-2539-LUC2™ / ATCC). Dichas células tumorales, que expresan luciferasa, se implantaron en el ratón de manera subcutánea, y visualizadas con imagen óptica (IVIS LUMINA 100) para monitorizar el crecimiento del tumor. Se emplearon dos grupos de ratones: control y tratados, cada uno de ellos constituidos por 9 animales hembra (Rj:ATHYM-Foxn1^{nu/nu}), con una edad de 15 semanas y un peso promedio de 38.36 ± 2.46 g. El tratamiento con **27b** se efectuó de manera oral los días 2, 6, 8, 10, 13, 15, 17 y 20, con una dosis de 0.55 mg/Kg (3 veces/semana).

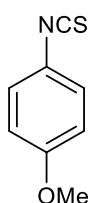
379. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. <https://www.oecd.org/env/test-no-425-acute-oral-toxicity-up-and-down-procedure-9789264071049-en.htm>, 2022 (Último acceso 18 de Junio de 2022).

9.2. Materias primas

9.1.4. Método general para la preparación de los isotiocianatos **53c,d,g,h**

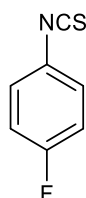
En una mezcla 1:1 de H₂O–CH₂Cl₂ (24 mL) se agregó CaCO₃ (3.0 equiv.) y las correspondientes aminas **52c,d,g,h** (1.0 equiv.). Posteriormente el se añade tiofosgeno (1.5 equiv.) gota a gota, y la correspondiente mezcla se mantuvo con agitación vigorosa a t.a. durante 4 h. A continuación, se separan las fases, y la fase orgánica se lava con H₂O (3x60 mL), se seca sobre NaSO₄ anhidro, y se filtra. El filtrado se purifica mediante cromatografía en columna (ciclohexano–AcOEt 2:1).

9.1.4.1. Isotiocianato de 4-metoxifenilo (**53c**)



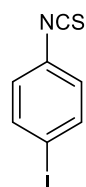
Se emplea CaCO₃ (720 mg, 7.2 mmol, 3.0 equiv.), *p*-anisidina **52c** (300 mg, 2.4 mmol, 1.0 equiv.), tiofosgeno (0.30 mL, 3.6 mmol, 1.5 equiv.). Se obtuvo **53c** como un sólido blanco. Rendimiento: 316 mg (80%).

Isotiocianato de 4-Fluorofenilo (**53d**)



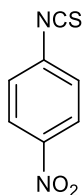
Se emplea CaCO₃ (810 mg, 8.09 mmol, 3.0 equiv.), 4-fluouranilina **52d** (300 mg, 2.7 mmol, 1.0 equiv.), tiofosgeno (0.31 mL, 4.0 mmol, 1.5 equiv.). Se obtuvo **53d** como un sólido blanco. Rendimiento: 333 mg (81%).

9.1.4.2. Isotiocianato de 4-yodofenilo (**53g**)



Se emplea CaCO₃ (411 mg, 4.1 mmol, 3.0 equiv.), 4-yodoanilina **52g** (300 mg, 1.3 mmol, 1.0 equiv.), tiofosgeno (0.15 mL, 2.0 mmol 1.5 equiv.). Se obtuvo **53g** como un sólido rosa. Rendimiento: 303 mg (86%).

9.1.4.3. Isotiocianato de 4-nitrofenilo (53h)

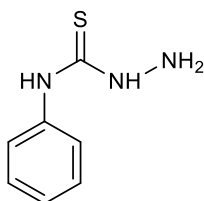


Se emplea CaCO_3 (1.08 g, 10.9 mmol, 3.0 equiv.), *p*-nitroanilina **52h** (500 mg, 3.6 mmol, 1.0 equiv.), tiofosgeno (0.41 mL, 5.4 mmol, 1.5 equiv.). Se obtuvo **53h** como un sólido amarillo. Rendimiento: 502 mg (77%).

9.1.5. Método general para la preparación de las tiosemicarbazidas 54a-i

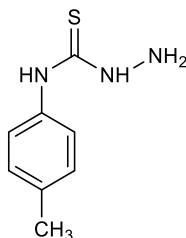
A una disolución de los isotiocianatos **53a-i** (1.0 equiv.) en MeOH se añade gota a gota una disolución de hidracina monohidratada (1 eq.) en MeOH. Finalizada la adición, la mezcla resultante se mantiene agitando a t.a. durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, se forma un precipitado, que se filtra y se lava con MeOH frío. El producto se emplea sin purificación adicional para la siguiente reacción.

9.1.5.1. 4-*N*-Fenil-3-tiosemicarbazida (54a)



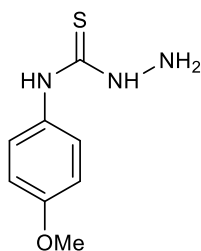
Se emplea isotiocianato de fenilo **53a** (0.71 mL 6.0 mmol, 1.0 equiv.), MeOH (2 mL), hidracina monohidratada (0.29 mL, 6.0 mmol 1.0 equiv.) en 2 mL de MeOH. Se obtuvo **54a** como un sólido blanco. Rendimiento: 882 mg (88%).

9.1.5.2. 4-*N*-(*p*-Tolil)-3-tiosemicarbazida (54b)



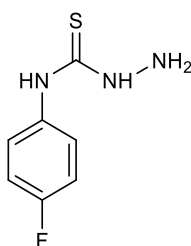
Se emplea isotiocianato de *p*-tolilo **53b** (890 mg, 6.0 mmol, 1.0 equiv.), MeOH (5 mL), hidracina monohidratada (0.29 mL, 6.0 mmol 1.0 equiv.) en 2 mL de MeOH. Rendimiento: 996 mg (94%).

9.1.5.3. 4-N-(*p*-Metoxifenil)-3-tiosemicarbazida (54c)



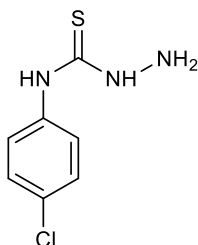
Se emplea isotiocianato de 4-metoxifenilo **53c** (250 mg, 1.5 mmol, 1.0 equiv.), MeOH (2 mL), hidracina monohidratada (70 μ L, 1.5 mmol, 1.0 equiv.) en 2 mL de MeOH. Se obtuvo **54c** como un sólido gris. Rendimiento: 265 mg (89%).

9.1.5.4. 4-N-(*p*-Fluorofenil)-3-tiosemicarbazida (54d)



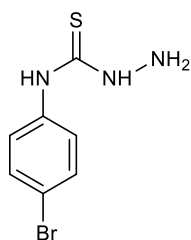
Se emplea isotiocianato de 4-fluorofenilo **53d** (300 mg, 6.0 mmol, 1.0 equiv.), MeOH (2 mL), hidracina monohidratada (0.29 mL, 6.0 mmol 1.0 eq.) en 2 mL de MeOH. Se obtuvo **54d** como un sólido blanco. Rendimiento: 337 mg (93%).

9.1.5.5. 4-N-(*p*-Clorofenil)-3-tiosemicarbazida (54e)



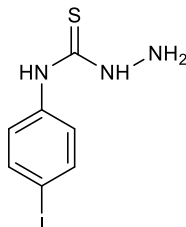
Se emplea isotiocianato de 4-clorofenilo **53e** (1.01 g, 6.0 mmol, 1.0 equiv.), MeOH (5 mL), hidracina monohidratada (0.29 mL, 6.0 mmol 1.0 equiv.) en 2 mL de MeOH. Se obtuvo **54e** como un sólido blanco. Rendimiento: 1.10 g (91%).

9.1.5.6. 4-N-(*p*-Bromofenil)-3-tiosemicarbazida (54f)



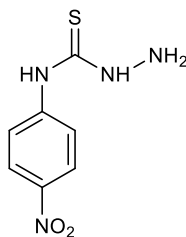
Se emplea isotiocianato de 4-bromofenilo **53f** (1.28 g, 6.0 mmol, 1.0 equiv.), MeOH (5 mL), hidracina monohidratada (0.29 mL, 6.0 mmol, 1.0 equiv.) en 2 mL de MeOH. Se obtuvo **54f** como un sólido blanco. Rendimiento: 1.35 g (92%).

9.1.5.7. 4-N-(*p*-Yodofenil)-3-tiosemicarbazida (54g)



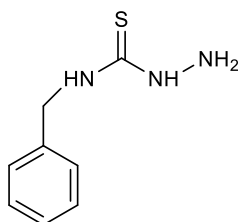
Se emplea isotiocianato de 4-yodofenilo **53g** (100 mg, 0.38 mmol, 1.0 equiv.), MeOH (1 mL), hidracina monohidratada (20 μ L, 0.38 mmol, 1.0 equiv.) en 1 mL de MeOH. Se obtuvo **54g** como un sólido blanco. Rendimiento: 105 mg (95%).

9.1.5.8. 4-N-(*p*-Nitrofenil)-3-tiosemicarbazida (54h)



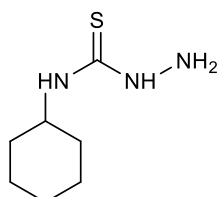
Se emplea isotiocianato de 4-nitrofenilo **53h** (150 mg, 0.83 mmol, 1.0 equiv.), MeOH (2 mL), hidracina monohidratada (40 μ L, 0.83 mmol, 1.0 equiv.) en 1 mL de MeOH. Se obtuvo **54h** como un sólido amarillo. Rendimiento: 159 mg (90%).

9.1.5.9. 4-N-Bencil-3-tiosemicarbazida (54i)



Se emplea isotiocianato de bencilo **53i** (0.71 mL, 5.3 mmol, 1.0 equiv.), MeOH (2 mL), hidracina monohidratada (0.26 mL, 5.3 mmol, 1.0 equiv.) en 2 mL de MeOH. Se obtuvo **54i** como un sólido blanco. Rendimiento: 860 mg (86%).

9.1.5.10. 4-N-Ciclohexil-3-tiosemicarbazida (54j)

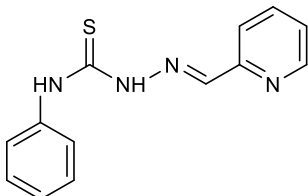


Se emplea isotiocianato de ciclohexilo **53j** (0.71 mL, 5.3 mmol, 1.0 equiv.), MeOH (2 mL), hidracina monohidratada (0.26 mL, 5.3 mmol, 1.0 equiv.) en 2 ml MeOH. Se obtuvo **54j** como un sólido blanco. Rendimiento: 834 mg (91%).

9.1.6. Procedimiento general para la preparación de las tiosemicarbazonas 1a-j.

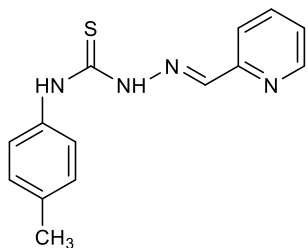
A una solución de las tiosemicarbazidas **54a-j** (1.0 equiv.) en EtOH se añade el 2-piridincarboxialdehído (1.05 equiv.) y AcOH (1.0 equiv.). La mezcla correspondiente se calienta a reflujo durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, se forma un precipitado, que se filtra a vacío y se lava con EtOH frío.

9.1.6.1. 4-*N*-Fenil-1-(piridin-2'-ilmetileno)-3-tiosemicarbazona (1a)



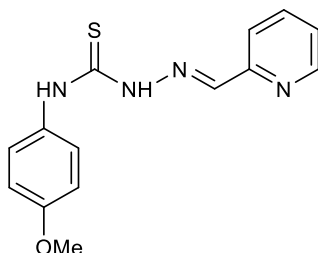
Se utiliza la 4-*N*-feniltiosemicarbazida **54a** (100 mg, 0.59 mmol, 1.0 equiv.), EtOH (2 mL), 2-piridincarboxialdehído (0.6 mL, 0.62 mmol, 1.05 equiv.) y AcOH (30 μ L, 0.59 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **1a** como un sólido blanco. Rendimiento: 130 mg (85%).

9.1.6.2. 1-(Piridin-2'-ilmetileno)- 4-*N*-(4''-tolil)-3-tiosemicarbazona (1b)



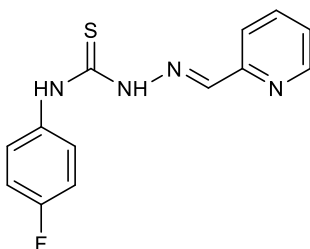
Se emplea la 4-*N*-(*p*-tolil)tiosemicarbazida **54b** (100 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), EtOH (2 mL), 2-piridincarboxialdehído (0.6 mL, 0.57 mmol, 1.05 equiv.) y AcOH (30 μ L, 0.55 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **1b** como un sólido blanco. Rendimiento: 133 mg (90%). mg).

9.1.6.3. 4-*N*-(4'-Metoxifenil)-1-(piridin-2''-ilmetileno)-3-tiosemicarbazona (1c)



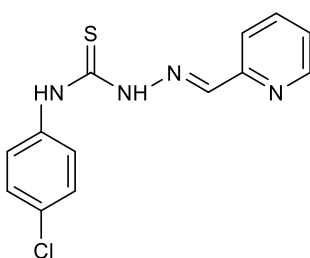
Se emplea la *N*-(4-metoxifenil)-3-tiosemicarbazida **54c** (150 mg, 0.76 mmol, 1.0 equiv.), EtOH (3 mL), 2-piridincarboxialdehído (0.07 mL, 0.79 mmol, 1.05 equiv.) y AcOH (0.40 μ L, 0.76 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **1c** como un sólido blanco. Rendimiento: 191 mg (88%).

9.1.6.4. 4-*N*-(4'-Fluorofenil)-1-(piridin-2''-ilmetileno)-3-tiosemicarbazona (1d)



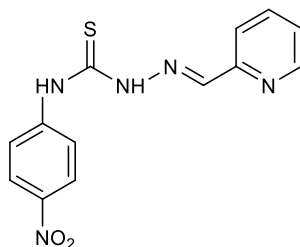
Se emplea la 4-*N*-(4-fluorofenil)-3-tiosemicarbazida **54d** (200 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.), EtOH (2 mL), 2-piridincarboxialdehído (0.10 mL, 1.13 mmol, 1.05 equiv.) y AcOH (60 μ L, 1.0 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **1d** como un sólido blanco. Rendimiento: 267 mg (91%).

9.1.6.5. 4-*N*-(4'-Clorofenil)-1-(piridin-2''-ilmetileno)-3-tiosemicarbazona (1e)



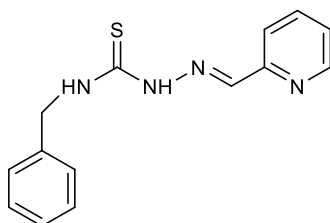
Se emplea la 4-*N*-(4-clorofenil)-3-tiosemicarbazida **54e** (300 mg, 1.4 mmol, 1.0 equiv.), EtOH (3 mL), 2-piridincarboxialdehído (0.14 mL, 1.56 mmol, 1.05 equiv.) y AcOH (80 μ L, 1.4 mmol, 1 equiv.). Se obtuvo **1e** como un sólido blanco. Rendimiento: 374 mg (87%).

9.1.6.6. 4-*N*-(4'-Nitrofenil)-1-(piridin-2''-ilmetileno)-3-tiosemicarbazona (1h)



Se emplea la 4-*N*-(4-nitrofenil)-3-tiosemicarbazida **54h** (100 mg, 0.34 mmol, 1.0 equiv.), EtOH (2 ml), 2-piridincarboxialdehído (0.03 mL, 0.35 mmol, 1.05 equiv.) y AcOH (20 μ L, 0.34 mmol, 1.0 equiv). Se obtuvo **1h** como un sólido blanco. Rendimiento: 90 mg (88%).

9.1.6.7. 4-*N*-Bencil-1-(piridin-2''-ilmetileno)-3-tiosemicarbazona (1i)



Se emplea la 4-*N*-bencil-3-tiosemicarbazida **54i** (100 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.), EtOH (2 mL), 2-piridincarboxialdehído (0.05 mL, 0.57 mmol, 1.05 equiv.) y AcOH (30 μ L, 0.55 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **1i** como un sólido blanco. Rendimiento: 132 mg (89%).

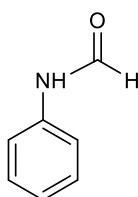
9.1.6.8. 4-*N*-Ciclohexil-1-(piridin-2'-ilmetileno)-3-tiosemicarbazona (1j)

Se emplea la 4-*N*-ciclohexil-3-tiosemicarbazida **54j** (100 mg, 0.38 mmol, 1.0 equiv.), EtOH (2 mL), 2-piridincarboxialdehído (0.03 mL, 0.40 mmol, 1.05 equiv.) y AcOH (30 μ L, 0.55 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **1j** como un sólido blanco. Rendimiento: 113 mg (75%).

9.1.7. Procedimiento general para la síntesis de las *N*-arilformamidas 55a-f

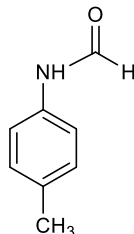
Una disolución de las correspondientes anilinas **52a-g** (1.0 equiv.) en HCOOEt (10 mL) y AcOH (1.0 equiv.) se reflujoó durante 24 h. Posteriormente se concentra a sequedad y el producto se emplea sin purificación adicional para la siguiente reacción.

9.1.7.1. *N*-Fenilformamida (55a)



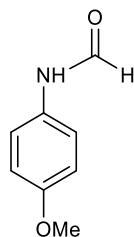
Se emplea anilina **52a** (0.49 mL, 5.3 mmol, 1.0 equiv.), HCOOEt (5 mL), AcOH (0.30 mL, 5.3 mol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **55a** como un sólido blanco. Rendimiento: 520 mg (80%).

9.1.7.2. *N-p*-Tolilformamida (**55b**)



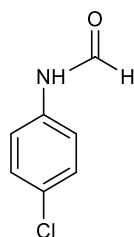
Se emplea *p*-toluidina **52b** (1.0 g, 9.3 mmol, 1.0 equiv.), HCOOEt (10 mL), AcOH (0.53 mL, 9.3 mmol, 1eq). Se obtuvo **55b** como un sólido blanco. Rendimiento: 1.0 g (82%).

9.1.7.3. *N-(p*-Metoxifenil)formamida (**55c**)



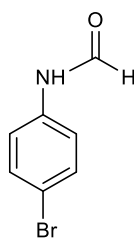
Se emplea *p*-anisidina **52c** (0.93 mL, 8.1 mmol, 1.0 equiv.), HCOOEt (10 mL), AcOH (0.46 mL, 8.1 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **55c** como un sólido blanco. Rendimiento: 1.08 g (89%).

9.2.4.5. *N-(p*-Clorofenil)formamida (**55e**)



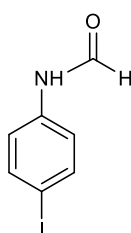
Se emplea *p*-cloroanilina **52e** (1.0 mL, 9.48 mmol, 1.0 equiv.), HCOOEt (10 mL), AcOH (0.55 mL, 9.48 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **55e** como un sólido blanco. Rendimiento: 1.3 g (88%).

9.2.4.6. *N*-(*p*-Bromofenil)formamida (**55f**)



Se emplea *p*-bromoanilina **52f** (1.2 g, 9.48 mmol, 1.0 equiv.), HCOOEt (10 mL), AcOH (0.55 mL, 9.48 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **55f** como un sólido blanco. Rendimiento: 1.3 g (88%).

9.2.4.7. *N*-(*p*-yodofenil)formamida (**55g**)

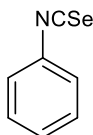


Se emplea *p*-yodoanilina **52g** (1.0 g, 4.5 mmol, 1.0 equiv.), HCOOEt (10 mL), AcOH (0.26 mL, 4.5 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **55g** como un sólido blanco. Rendimiento: 958 mg (85%).

9.1.8. Procedimiento general para la síntesis de los arilisoselenocianatos **56a-g**

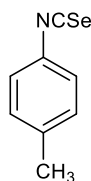
A una mezcla de las formamidas **55a-g** (1.0 equiv.), Et₃N (4.2 equiv.) y tamiz molecular de 4 Å en CH₂Cl₂ anhidro a reflujo se añadió gota a gota una solución de trifosgeno (0.53 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro, bajo atmosfera de Ar, durante una 1 h. Después de la adición, la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 2.5 h y a continuación se añadió selenio negro (2.0 equiv.), refluándose durante 4h. Posteriormente, se filtra sobre un lecho de Celita® y el filtrado se concentra a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna, empleando una mezcla de ciclohexano–AcOEt 2:1.

9.1.8.1. Isoselenocianato de fenilo (**56a**)



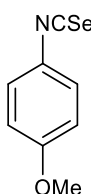
Se emplea *N*-fenilformamida **55a** (500 mg, 2.02 mmol, 1.0 equiv.), Et₃N (2.46 mL, 17.7 mmol, 4.3 equiv.), trifosgeno (635 mg, 2.14 mmol 0.53 equiv.), CH₂Cl₂ anhidro (5 mL), selenio negro (651 mg, 8.25 mmol, 2.0 equiv.). Se obtuvo **56a** como un sólido blanco. Rendimiento: 620 mg (83%).

9.1.8.2. Isoselenocianato de *p*-tolilo (**56b**)



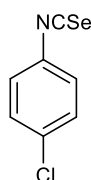
Se emplea *N-p*-tolilformamida **55b** (500 mg, 3.6 mmol, 1.0 equiv.), Et₃N (2.23 mL, 15.5 mmol, 4.3 equiv.), trifosgeno (510 mg, 1.7 mmol 0.52 equiv.), CH₂Cl₂ anhidro (5 mL), selenio negro (581 mg, 7.3 mmol, 2.0 equiv.). Se obtuvo **56b** como un sólido naranja. Rendimiento: 369 mg (67%).

9.1.8.3. Isoselenocianato de *p*-metoxifenilo (**56c**)



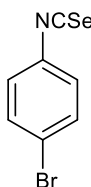
Se emplea *N-(p*-metoxifenil)formamida **55c** (500 mg, 3.3 mmol, 1.0 equiv.), Et₃N (2.06 mL, 14.8 mmol, 4.3 equiv.) trifosgeno (510 mg, 1.7 mmol 0.52 equiv.), CH₂Cl₂ anhidro (5 mL), selenio negro (521 mg, 6.6 mmol, 2.0 equiv.). Se obtuvo **56c** como un sólido naranja. Rendimiento: 502 mg (72%).

9.2.5.5. Isoselenocianato de *p*-clorofenilo (**56e**)



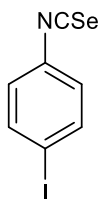
Se emplea *N-(p*-clorofenil)formamida **55e** (500 mg, 3.2 mmol, 1.0 equiv.), Et₃N (1.92 mL, 13.8 mmol, 4.3 equiv.), trifosgeno (495 mg, 1.6 mmol 0.52 equiv.), CH₂Cl₂ anhidro (5 mL), selenio negro (506 mg, 6.3 mmol, 2.0 equiv.). Se obtuvo **56** como un sólido verde. Rendimiento: 495 mg (91%).

9.2.5.6. Isoselenocianato de *p*-bromofenilo (**56f**)



Se emplea *N-(p*-bromofenil)formamida **55f** (500 mg, 2.4 mmol, 1.0 equiv.), Et₃N (1.49 mL, 10.7 mmol, 4.3 equiv.), trifosgeno (382 mg, 1.29 mmol 0.52 equiv.), CH₂Cl₂ anhidro (5 mL), selenio negro (394 mg, 5.0 mmol, 2.0 eq). Se obtuvo **56f** como un sólido naranja. Rendimiento: 505 mg (73%).

9.2.5.7. Isoselenocianato de *p*-yodofenilo (**56g**)

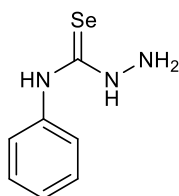


Se emplea *N*-(*p*-clorofenil)formamida **55g** (500 mg, 2.02 mmol, 1.0 equiv.), Et₃N (1.21 ml, 8.7 mmol, 4.3 equiv.), trifosgeno (311 mg, 1.05 mmol 0.52 equiv.), CH₂Cl₂ anhidro (5 mL), selenio negro (318 mg, 4.04 mmol, 2.0 equiv.). Se obtuvo **56g** como un sólido naranja. Rendimiento: 342 mg (65%).

9.1.9. Procedimiento general para la síntesis de las selenosemicarbazidas **57a-g**

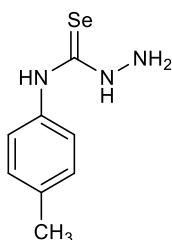
A una disolución de los isoselenocianatos **56a-g** (1.0 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro (2 mL) se añade gota a gota una disolución de hidracina monohidratada (1.2 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro (2 mL). Finalizada la adición, la mezcla resultante se mantiene agitando a t.a. durante 4 h en atmosfera de Ar. Transcurrido ese tiempo, se forma un precipitado, que se filtra y se lava con CH₂Cl₂ frío. El producto se emplea sin ninguna purificación adicional para la siguiente reacción.

9.1.9.1. 4-*N*-Fenil-3-selenosemicarbazida (**57a**)



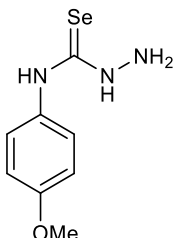
Se emplea isoselenocianato de fenilo **56a** (200 mg, 1.09 mmol, 1.0 equiv.), hidracina (0.06 mL, 1.3 mmol 1.2 equiv.). Se obtuvo **57a** un sólido color gris. Rendimiento: 62% (145 mg).

9.1.9.2. 4-*N*-(*p*-Tolil)-3-selenosemicarbazida (**57b**)



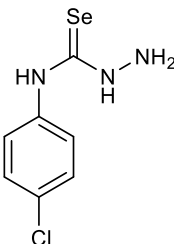
Se emplea isoselenocianato de *p*-tolilo **56b** (100 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv.), hidracina (0.03 mL, 0.6 mmol, 1.2 equiv.). Se obtuvo **57b** como un sólido color naranja. Rendimiento: 64 mg (56%).

9.1.9.3. 4-*N*-(4-Metoxifenil)-3-selenosemicarbazida (**57c**)



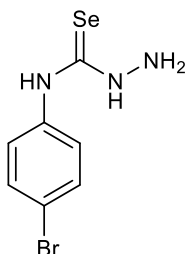
Se emplea isoselenocianato de *p*-metoxifenilo **56c** (200 mg, 1.21 mmol, 1.0 equiv.), hidracina (0.07 mL, 1.45 mmol, 1.2 equiv.). Se obtuvo **58c** como un sólido naranja. Rendimiento: 209 mg (71%).

9.2.6.5. 4-*N*-(4-Clorofenil)-3-selenosemicarbazida (**57e**)



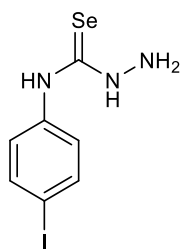
Se emplea isoselenocianato de *p*-clorofenilo **56e** (200 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.), hidracina (0.06 mL, 1.2 mmol, 1.2 equiv.). Se obtuvo **57e** como un sólido naranja. Rendimiento: 191 mg (83%).

9.2.6.6. 4-*N*-(4-Bromofenil)-3-selenosemicarbazida (**57f**)



Se emplea isoselenocianato de *p*-bromofenilo **56f** (200 mg, 0.52 mmol, 1.0 equiv.), hidracina (0.03 mL, 0.62 mmol, 1.2 equiv.). Se obtuvo **57f** como un sólido naranja. Rendimiento: 114 mg (75%).

9.2.6.7. 4-N-(4-Yodofenil)-3-selenosemicarbazida (**57g**)

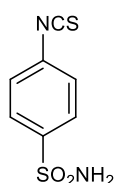


Se emplea isoselenocianato de *p*-yodofenilo (200 mg, 0.76 mmol, 1.0 equiv.), hidracina (0.04 mL, 0.90 mmol, 1.2 equiv.). Se obtuvo **57g** como un sólido naranja. Rendimiento: 166 mg (64%).

9.1.10. Procedimiento general para la síntesis de los isoselenocianatos **59a,b**

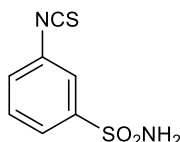
A una disolución de la aminobencenosulfonamida correspondiente **58a,b** (1.0 equiv.) en H₂O (50 mL) y HCl concentrado (12 mL) se añadió tiofosgeno (0.20 mL, 3.0 mmol, 1.0 equiv.), y la mezcla se mantiene en agitación hasta el color rojizo de la disolución desaparezca. Se forma un precipitado que se filtra y se lava con agua fría. El filtrado se recristaliza de agua/acetona.

9.2.7.1. Isotiocianato de 4-sulfonamidofenilo (**59a**)



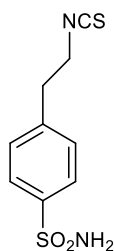
Se empleó 4-aminobencenosulfonamida **58a** (500 mg 3.0 mmol). Rendimiento: 585 mg (91%).

9.2.7.2. Isotiocianato de 3-sulfonamidofenilo (**59b**)



Se empleó 3-aminobencenosulfonamida **58b** (500 mg 3.0 mmol). Rendimiento: 617 mg (96%).

9.2.8. 4-(2'-Isotiocianatoetil)bencenosulfonamida (59c)

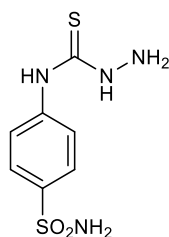


A una disolución de 4-(2'-aminoetil)bencenosulfonamida **58c** (500 mg, 2.5 mmol) y DCC (500 mg, 2.4 mmol) en Py (1 mL) enfriada entre 0-10 °C se añadió CS₂ (2 mL, 33 mmol) con piridina (1ml) y DCC (500 mg). La solución resultante se agitó durante 12 h a t.a. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se eliminó a vacío y el residuo se recrystalizó de acetona. Rendimiento: 415 mg (83%).

9.2.9. Procedimiento general para la preparación de tiosemicarbazidas derivadas de arilsulfonamidas (60a,c)

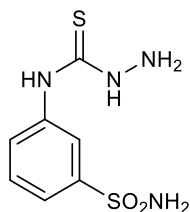
A una disolución del isotiocianato correspondiente **59a-c** (1.0 equiv.) en MeOH (2 mL) se añade gota a gota una disolución de hidracina monohidratada (1.2 equiv.) en MeOH (2 mL). Finalizada la adición, la mezcla resultante se mantiene con agitación a t.a. durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, se forma un precipitado, que se filtra y se lava con MeOH frío. El producto se emplea sin purificación adicional para la siguiente reacción.

9.2.9.1. 4-N-(4'-Sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazida (60a)



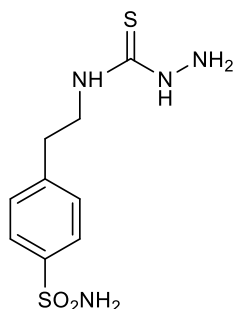
Se emplea el isotiocianato **59a** (100 mg, 0.46 mmol, 1.0 equiv.) e hidracina (26 µL, 0.55 mmol, 1.2 eq.). Se obtiene **60a** como un sólido blanco. Rendimiento: 83 mg (72%).

9.2.9.2. 4-N-(3'-Sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazida (60b)



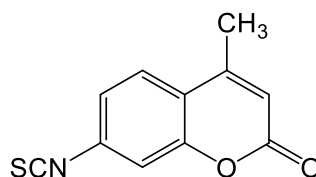
Se emplea el isotiocianato **59b** (100 mg, 0.46 mmol, 1.0 equiv.) e hidracina (26 μ L, 0.55 mmol, 1.2 equiv.). Se obtiene **60b** como un sólido blanco. Rendimiento: 87 mg (75%).

9.2.9.3. 4-N-[2'-(4''-Sulfonamido)fenil]etil-3-tiosemicarbazida (60c)



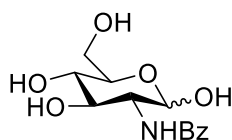
Se emplea el isotiocianato **59c** (100 mg, 0.41 mmol, 1.0 equiv.) e hidracina (24 μ L, 0.49 mmol, 1.2 equiv.). Se obtiene **60c** como un sólido blanco. Rendimiento: 47 mg (42%).

9.2.10. 7-Isotiocianato-4-metilcumarina (91)



A una solución de 7-amino-4-metilcumarina **90** (500 mg, 2.85 mmol) en CH_2Cl_2 (6 mL) se añadió trietilamina (0.8 mL, 5.7 mmol) y se calentó a 35 °C durante 10 min. A continuación, se enfría a temperatura ambiente y se añade el tiofosgeno (0.76 mL, 9.97 mmol) gota a gota y la mezcla resultante se calentó a 35 °C durante 20 min. A continuación, se concentra a sequedad y el precipitado naranja formado se filtra usando un lecho de silica y se lava con CH_2Cl_2 . Rendimiento: 595 mg (96%).

9.2.11. 2-Benzamido-2-desoxi-D-glucopiranososa (93)

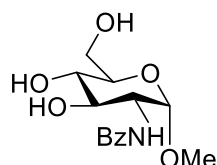


Se emplea el método descrito por Inouye *et al.*³⁸⁰ A una suspensión del hidrocloreuro de D-glucosamina (5 g, 23.2 mmol) y NaHCO_3 (4.3 g, 51.0 mmol) en H_2O (20 mL) se añade gota a gota cloruro de benzoílo (3.1 mL, 26 mmol). Se observa la aparición

380. Inouye, Y.; Onodera, K.; Kitaoka, S.; Hinaro, S. Some fatty acid derivatives of D-glucosamine. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *70*, 4722–4724.

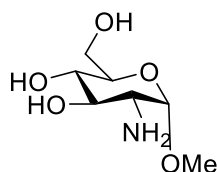
de un precipitado, y la mezcla se mantiene a 4 °C durante varias horas hasta cristalización total. El producto se filtra, se lava con agua fría hasta pH neutro y Et₂O. Rendimiento: 3.35 g (51%).

9.2.12. Metil 2-benzamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**94**)



Se emplea el método descrito por Gibbs *et al.*³⁸¹ A una disolución de **93** (3.0 g, 10.6 mmol) en MeOH (35 mL) se añade resina Amberlita IR-120(H⁺) (6.5 g). La mezcla se refluxe durante 20 h, filtrándose la resina; el filtrado se concentra hasta mitad de volumen, cristalizando **94**. Las aguas madres se tratan de nuevo con la misma resina (20 h), originando una segunda cosecha. Rendimiento: 2.52 g (80%).

9.2.13. Metil 2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**95**)



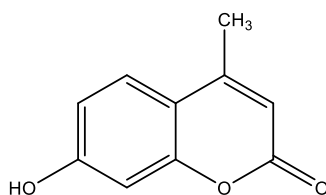
Una suspensión de **94** (1.0 g, 3.4 mmol) en NaOH(aq.) 3 M (9 mL) se refluje durante 10 h. A continuación, se neutraliza con HCl hasta pH 8 y se concentra a sequedad; el residuo se usa directamente para la siguiente etapa, sin ningún tipo de purificación.

9.2.14. Procedimiento general para la preparación de las cumarinas 100a-c

Una mezcla de H₂SO₄ al 60% (23 mL) y resorcinol (1.0 g, 9.08 mmol, 1.0 equiv.) se mantuvo en agitación a 0 °C durante 5 min; a continuación, se añade el β -cetoéster correspondiente (1.1 equiv.) lentamente a esa temperatura. Transcurrida la adición la mezcla se mantiene con agitación a t.a. durante 4 h; posteriormente se vertió sobre una mezcla de agua/hielo, y el precipitado se filtró y se lavó con agua fría. El producto se purifica mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 7:3).

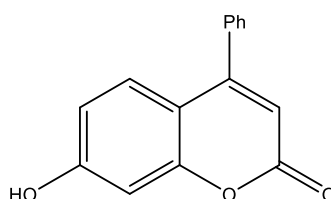
381. Gibbs, C.F.; Hough, L.; Richardson, A.C. A new synthesis of a 2,3-epimino- α -D-allopyranoside. *Carbohydr. Res.* **1965**, *1*, 290–296.

9.2.14.1. 7-Hidroxi-4-metilcumarina (100a)



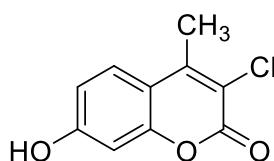
Se empleó acetoacetato de etilo (1.27 mL, 9.98 mmol, 1.1 equiv.). Se obtuvo **100a** como un sólido blanco. Rendimiento: 1.14 g (71%). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.³⁸²

9.2.14.2. 7-Hidroxi-4-fenilcumarina (100b)



Se empleó benzoilacetoacetato de etilo (1.72 mL, 9.98 mmol, 1.1 equiv.). Se obtuvo **100b** en forma de cristales blancos. Rendimiento: 1.94 g (90%). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.³⁸³

9.2.14.3. 3-Cloro-7-hidroxi-4-metilcumarina (100c)



Se empleó cloroacetato de etilo (1.29 mL, 9.98 mmol). La agitación se mantuvo durante 48 h. Se obtuvo **100c** en forma de cristales blancos. Rendimiento: 1.60 g (84%). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.³⁸³

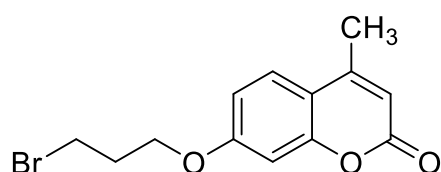
382. Samanta, P.; Kapat, K.; Maiti, S.; Biswas, G.; Dhara, S.; Dhara, D. pH-labile and photochemically cross-linkable polymer vesicles from coumarin based random copolymer for cancer therapy. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *555*, 132–144.

383. He, Q.; Liu, J.; Lan, J.-S.; Ding, J.; Sun, Y.; Fang, Y.; Jiang, N.; Yang, Z.; Sun, L.; Jin, Y.; Xie, S.S. Coumarin-dithiocarbamate hybrids as novel multitarget AChE and MAO-inhibitors against Alzheimer's disease: Design, synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Chem.* **2018**, *81*, 512–528.

9.2.15. Procedimiento general para la preparación de las cumarinas *O*-alquiladas **101a-i**

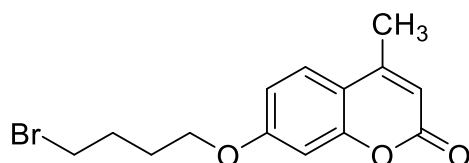
A una disolución de la cumarina (**100a-c**, 1.0 equiv.) en MeCN seco (7 mL) se agregó K₂CO₃ anhidro (1.5 equiv.) y el correspondiente α,ω -dibromoalcano (10.0 equiv.); la reacción se mantuvo bajo Ar a 65 °C durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, se concentró a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano→hexano-AcOEt 9:1).

9.2.15.1. 7-(3'-Bromopropoxi)-4-metilcumarina (**101a**)



Se empleó la cumarina **100a** (0.5 g, 2.8 mmol, 1.0 equiv.), 1,3-dibromopropano (2.8 mL, 28 mmol, 10.0 equiv.), K₂CO₃ (588 mg, 4.2 mmol, 1.5 equiv.). Se obtuvo **101a** como un sólido blanco. Rendimiento: 806 mg (98%).

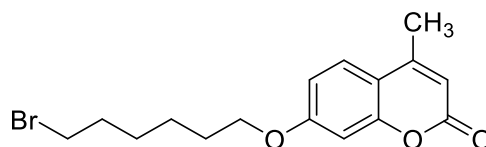
9.2.15.2. 7-(4'-Bromobutoxi)-4-metilcumarina (**101b**)



Se empleó la cumarina **100a** (0.5 g, 2.8 mmol, 1.0 equiv.), 1,4-dibromobutano (3.4 mL, 28 mmol, 10.0 equiv.), K₂CO₃ (588 mg, 4.2 mmol, 1.5 equiv.). Se obtuvo **101b** como un sólido blanco. Rendimiento: 810 mg (94%). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.³⁸⁴

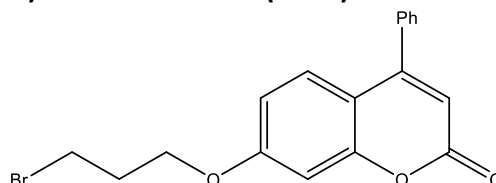
384. Pan, L.; Lei, D.; Jin, L.; He, Y.; Yang, Q. Promising fungicides from allelochemicals: synthesis of umbelliferone derivatives and their structure. Activity relationships. *Molecules* **2018**, *23*, 3002.

9.2.15.3. 7-[(6'-Bromohexil)oxi]-4-metilcumarina (101c)



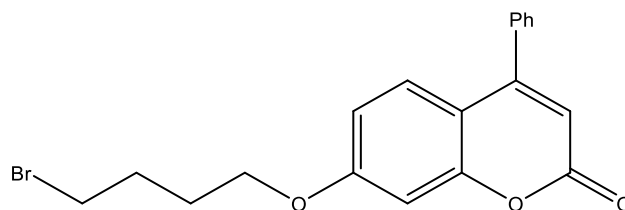
Se empleó la cumarina **100a** (0.5 g, 2.8 mmol, 1.0 equiv.), 1,6-dibromohexano (5.3 mL, 28 mmol, 10.0 equiv.), K_2CO_3 (588 mg, 4.2 mmol, 1.5 equiv.). Se obtuvo **101c** como un sólido blanco. Rendimiento: 875 mg (93%).

9.2.15.4. 7-(3'-Bromopropoxi)-4-fenilcumarina (101d)



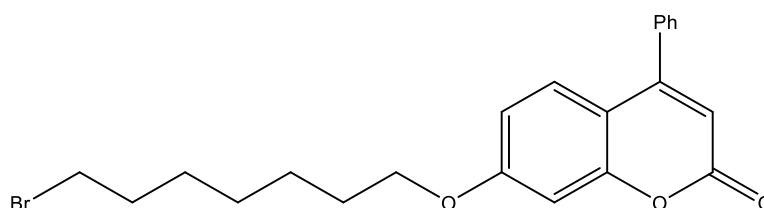
Se empleó la cumarina **100b** (0.5 g, 2.1 mmol, 1.0 equiv.), 1,3-dibromopropano (2.2 mL, 21 mmol, 10.0 equiv.), K_2CO_3 (435 mg, 3.1 mmol, 1.5 equiv.). Se obtuvo **101d** como un sólido blanco. Rendimiento: 715 mg (95%).

9.2.15.5. 7-(4'-Bromobutoxi)-4-fenilcumarina (101e)



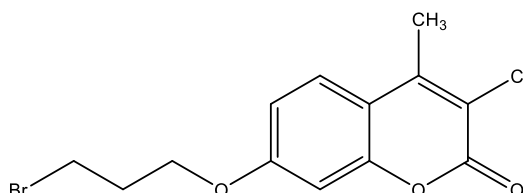
Se empleó la cumarina **100b** (0.5 g, 2.1 mmol, 1.0 equiv.), 1,4-dibromobutano (2.5 mL, 21 mmol, 10.0 equiv.), K_2CO_3 (435 mg, 3.1 mmol, 1.5 equiv.). Se obtuvo **101e** como un sólido blanco. Rendimiento: 756 mg (97%). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.³⁸³

9.2.15.6. 7-[(6'-Bromohexil)oxi]-4-fenilcumarina (101f)



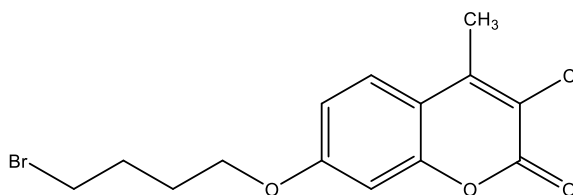
Se empleó la cumarina **100b** (0.5 g, 2.1 mmol, 1.0 equiv.), 1,6-dibromohexano (3.25 mL, 21 mmol, 10.0 equiv.), K_2CO_3 (435 mg, 3.1 mmol, 1.5 equiv.). Se obtuvo **101f** como un sólido blanco. Rendimiento: 767 mg (88%).

9.2.15.7. 7-(3'-Bromopoxi)-3-cloro-4-metilcumarina (101g)



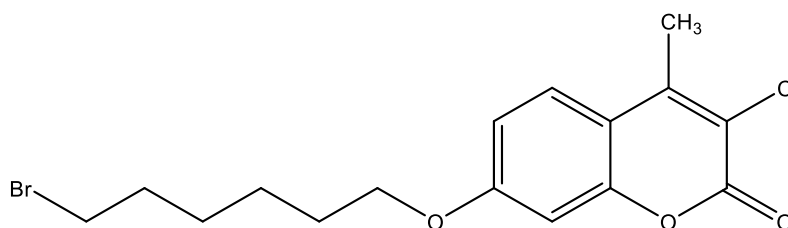
Se empleó la cumarina **100c** (0.5 g, 2.3 mmol, 1.0 equiv.), 1,3-dibromopropano (2.4 mL, 23 mmol, 10.0 equiv.), K_2CO_3 (476 mg, 3.4 mmol, 1.5 equiv.). Se obtuvo **101g** como un sólido blanco. Rendimiento: 670 mg (93%). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.³⁸⁵

9.2.15.8. 7-(4'-Bromobutoxi)-3-cloro-4-metilcumarina (101h)



Se empleó la cumarina **100c** (0.5 g, 2.3 mmol, 1.0 equiv.), 1,4-dibromobutano (2.8 mL, 23 mmol, 10.0 equiv.), K_2CO_3 (476 mg, 3.4 mmol, 1.5 equiv.). Se obtuvo **101h** como un sólido blanco. Rendimiento: 759 mg (95%). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.³⁸³

9.2.15.9. 7-[(6'-Bromohexil)oxi]-3-cloro-4-metilcumarina (101i)



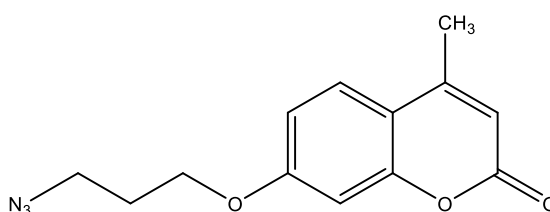
Se empleó la cumarina **100c** (0.5 g, 2.3 mmol, 1.0 equiv.), 1,6-dibromohexano (3.6 mL, 23 mmol, 10.0 equiv.), K_2CO_3 (476 mg, 3.4 mmol, 1.5 equiv.). Se obtuvo **101i** como un sólido blanco. Rendimiento: 810 mg (95%).

385. Tian, Y.; Liang, Z.; Xu, H.; Mou, Y.; Gou, C. Design, synthesis and cytotoxicity of novel dihydroartemisin-coumarin hybrids via click chemistry. *Molecules*. **2016**, *21*, 758.

9.2.16. Procedimiento general para la preparación de los azidoderivados **102**

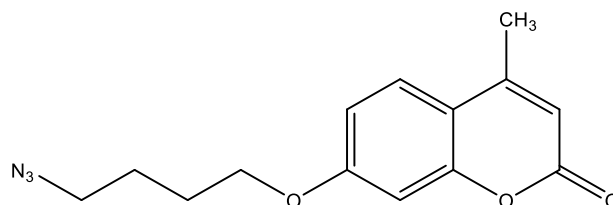
A una disolución de la correspondiente cumarina **101** (500 mg) en DMF (15 mL) se añadió NaN_3 (5.0 equiv.), y se mantuvo a t.a. durante 2 h. Transcurrido ese tiempo se diluyó con AcOEt (20 mL) y se lavó con salmuera (4×15 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano-AcOEt 2:1), originando los azidoderivados **102** como sólidos blancos.

9.2.16.1. 7-(3'-Azidopropoxi)-4-metilcumarina (**102a**)



Se utilizó la cumarina **101a** (500 mg, 1.68 mmol) y NaN_3 (546 mg, 8.44 mmol). Rendimiento: 400 mg (92%).

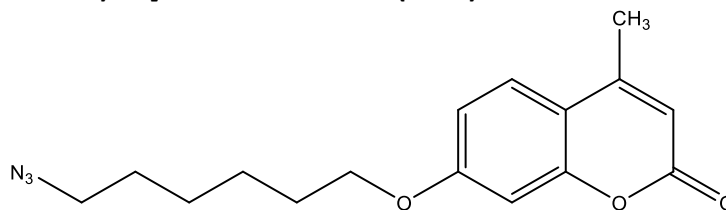
9.2.16.2. 7-(4'-Azidobutoxi)-4-metilcumarina (**102b**)



Se utilizó la cumarina **101b** (500 mg, 1.61 mmol) y NaN_3 (524 mg, 8.06 mmol). Rendimiento: 415 mg (94%). Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.³⁸⁶

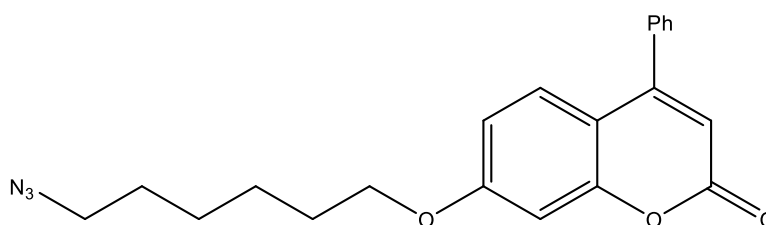
386. Hatano, A.; Kanno, Y.; Kondo, Y.; Sunaga, Y.; Umezawa, H.; Okada, M.; Yamada, H.; Iwaki, R.; Kato, A.; Fukui, K. Synthesis and characterization of novel conjugated, fluorescent DNJ derivatives for α -glucosidase recognition. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 773-778.

9.2.16.3. 7-[(6'-Azidohexil)oxi]-4-metilcumarina (102c)



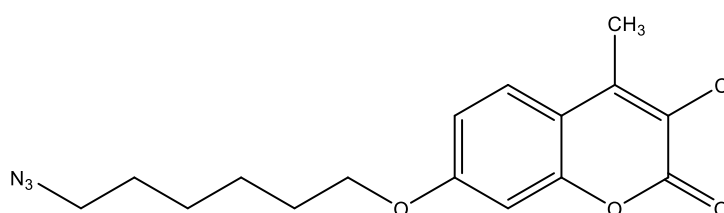
Se utilizó la cumarina **101c** (500 mg, 1.47 mmol) y NaN_3 (480 mg, 7.4 mmol).
Rendimiento: 405 mg (91%).

9.2.16.4. 7-[(6'-Azidohexil)oxi]-4-fenilcumarina (102f)



Se utilizó la cumarina **101f** (500 mg, 1.20 mmol) y NaN_3 (392 mg, 6.0 mmol).
Rendimiento: 430 mg (95%).

9.2.16.5. 7-[(6'-Azidohexil)oxi]-3-cloro-4-metilcumarina (102i)



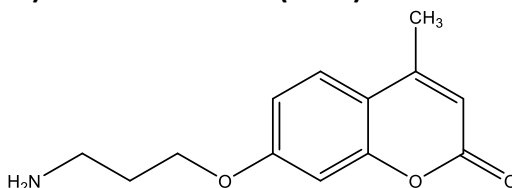
Se utilizó la cumarina **101i** (500 mg, 1.30 mmol) y NaN_3 (436 mg, 6.7 mmol).
Rendimiento: 383 mg (88%).

9.2.17. Procedimiento general para la preparación de las aminocumarinas 103

A una disolución de la correspondiente azida **12-15**, **102a-c,f,i** (500 mg) en una mezcla 1:1 THF/MeOH (10 mL) se añade Pd/C (50 mg) y la mezcla resultante se hidrogena (1 atm) durante 2 h a t.a. A continuación se filtra sobre un lecho de Celita® y

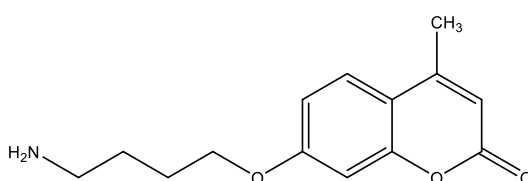
el filtrado se concentra a sequedad y se usa para la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

9.2.17.1. 7-(3'-Aminopropoxi)-4-metilcumarina (103a)



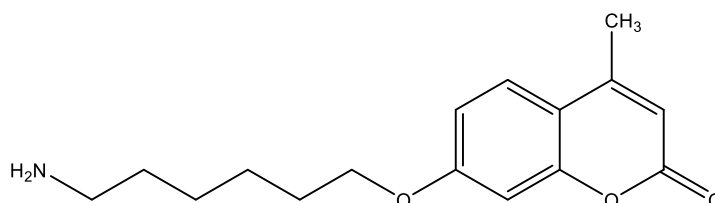
Se empleó la azidocumarina **102a** (500 mg, 1.9 mmol). Rendimiento: 320 mg (74%).

9.2.17.2. 7-(4'-Aminobutoxi)-4-metilcumarina (103b)



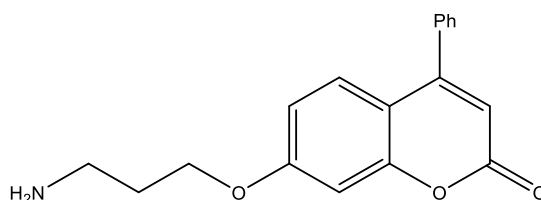
Se empleó la azidocumarina **102b** (500 mg, 1.8 mmol). Rendimiento: 343 mg (76%).

9.2.17.3. 7-[(6'-Aminohexil)oxi]-4-metilcumarina (103c)



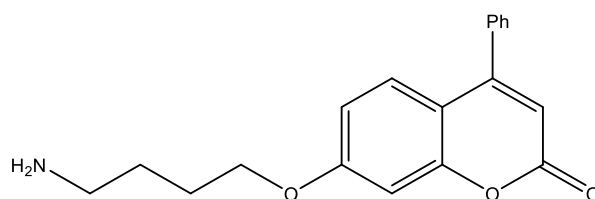
Se empleó la azidocumarina **102c** (500 mg, 1.6 mmol). Rendimiento: 360 mg (79%).

9.2.17.4. 7-(3'-Aminopropoxi)-4-fenilcumarina (103d)



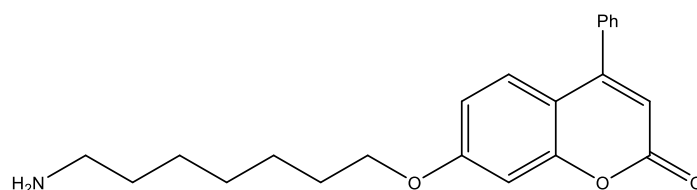
Se empleó la azidocumarina **102d** (500 mg, 1.5 mmol). Rendimiento: 372 mg (81%).

9.2.17.5. 7-(4'-Aminobutoxi)-4-fenilcumarina (103e)



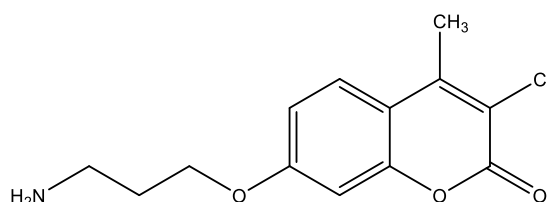
Se empleó la azidocumarina **102e** (500 mg, 1.4 mmol). Rendimiento: 390 mg (85%).

9.2.17.6. 7-[(6'-Aminohexil)oxi]-4-fenilcumarina (103f)



Se empleó la azidocumarina **102f** (500 mg, 1.3 mmol). Rendimiento: 372 mg (80%).

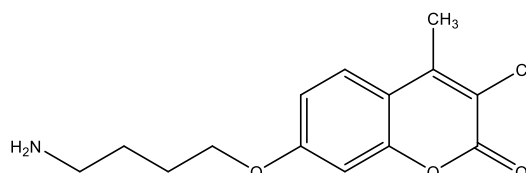
9.2.17.7. 7-(3'-Aminopropoxi)-3-cloro-4-metilcumarina (103g)



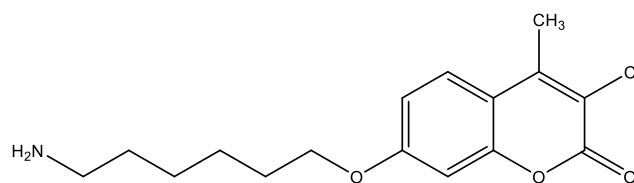
Se empleó la azidocumarina **102g** (500 mg, 1.7 mmol). Rendimiento: 340 mg (75%).

9.2.17.8. 7-(4'-Aminobutoxi)-3-cloro-4-metilcumarina (103h)

Se empleó la azidocumarina **102h** (500 mg, 1.6 mmol). Rendimiento: 360 mg (79%).



9.2.17.9. 7-[(6'-Aminohexil)oxi]-3-cloro-4-metilcumarina (103i)

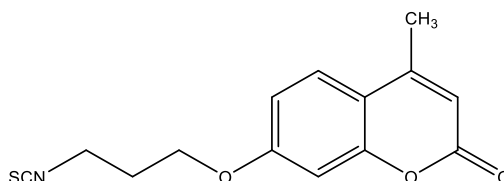


Se empleó la azidocumarina **102i** (500 mg, 1.5 mmol). Rendimiento: 400 mg (86%).

9.2.18. Procedimiento general para la preparación de los isotiocianatos **104**

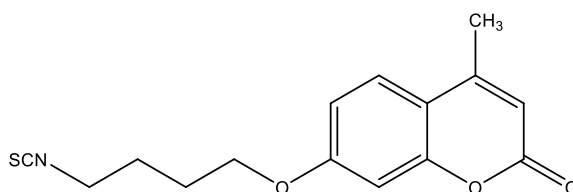
A una solución de la aminocumarina **103a-i** (500 mg, 1.0 equiv.) en CH_2Cl_2 (6 mL) se añadió Et_3N (2.0 equiv.) y la solución resultante se agitó a 35 °C durante 10 min. A continuación, se enfría a t.a. y se añade tiofosgeno (3.5 equiv.) gota a gota a la mezcla y se agitó a 35 °C durante 20 min. adicionales. Finalmente, se elimina parte del volumen, precipitando un sólido naranja, que se desea mediante filtración a través de un lecho de Celita® y lavado con CH_2Cl_2 . El filtrado se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano–AcOEt 8:2).

9.2.18.1. 7-(3'-Isotiocianatopropoxi)-4-metilcumarina (104a)



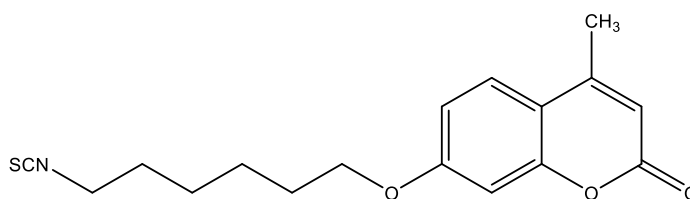
Se empleó la aminocumarina **103a** (500 mg, 2.1 mmol), Et_3N (0.60 mL, 4.2 mmol), tiofosgeno (0.56 mL, 7.3 mmol). Rendimiento: 500 mg (86%).

9.2.18.2. 7-(4'-Isotiocianatobutoxi)-4-metilcumarina (104b)



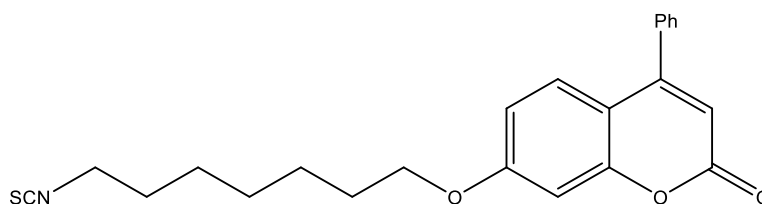
Se empleó la aminocumarina **103b** (500 mg, 2.0 mmol), Et_3N (0.56 mL, 4.0 mmol), tiofosgeno (0.54 mL, 7.0 mmol). Rendimiento: 420 mg (73%).

9.2.18.3. 7-[(6'-Isotiocianatohexil)oxi]-4-metilcumarina (104c)



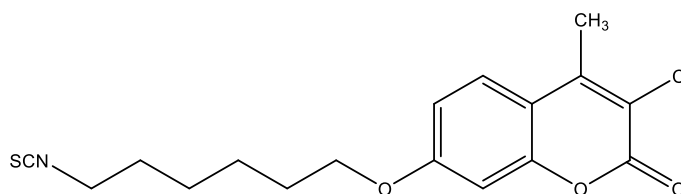
Se empleó la aminocumarina **103c** (500 mg, 1.8 mmol), Et₃N (0.51 mL, 3.6 mmol), tiofosgeno (0.48 mL, 6.3 mmol). Rendimiento: 430 mg (75%).

9.2.18.4. 4-Fenil -7-[(6'-isotiocianatohexil)oxi]cumarina (104f)



Se empleó la aminocumarina **103f** (500 mg, 1.4 mmol), Et₃N (0.40 mL, 2.9 mmol), tiofosgeno (0.38 mL, 5.0 mmol). Rendimiento: 430 mg (78%).

9.2.18.5. 3-Cloro-4-fenil -7-[(6'-isotiocianatohexil)oxi]cumarina (104i)

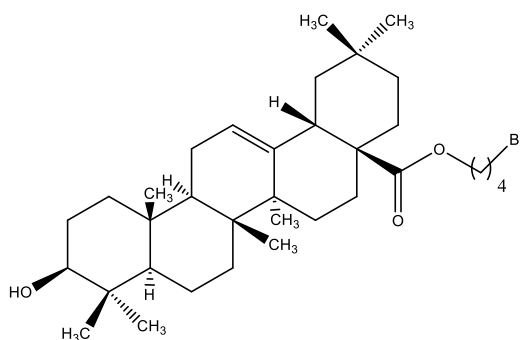


Se empleó la aminocumarina **103i** (500 mg, 1.6 mmol), Et₃N (0.45 mL, 3.2 mmol), tiofosgeno (0.43 mL, 5.6 mmol). Rendimiento: 350 mg (62%).

9.2.19. Procedimiento general para la preparación de los bromoalquil derivados de ácido oleanólico (125a,c,d)

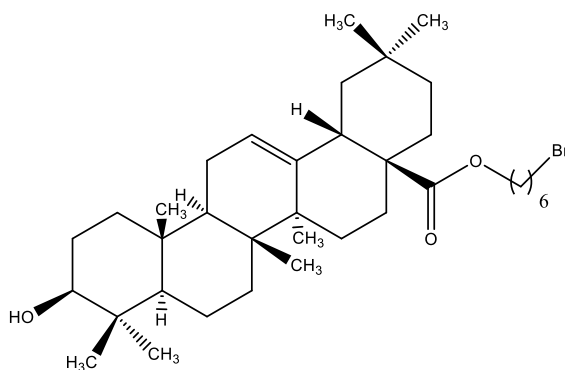
A una disolución de OA en DMF, se añade el α,ω -dibromoalcano correspondiente (5.0 equiv.) y K₂CO₃ (1.0 equiv.). La mezcla se agita a t.a. durante 12 h. Transcurrido ese tiempo, se diluye con H₂O (30 mL) y el producto se extrae con AcOEt (2x15 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con HCl 1 M (20 mL), NaHCO₃ aq. sat. (20 mL) y salmuera (20 mL), se seca sobre NaSO₄ y se filtra. El filtrado se concentra a sequeda y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (ciclohexano–AcOEt 98:2→95:5).

9.2.19.1. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 4'-bromobutilo (125a)



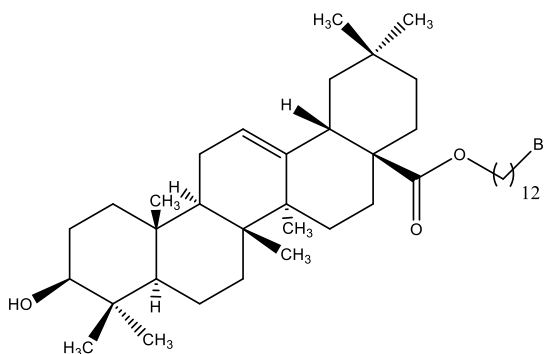
Se empleó OA (300 mg, 0.66 mmol), 1,4-dibromobutano (400 μ L, 3.28 mmol), K_2CO_3 (90.8 mg, 0.66 mmol) y DMF (5 mL). La purificación mediante cromatografía en columna (ciclohexano–AcOEt 98:2 \rightarrow 95:5) condujo a **125a** como un aceite amarillo. Rendimiento: 210 mg (54%).

9.2.19.2. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 6'-bromohexilo (125c)



Se empleó OA (300 mg, 0.66 mmol), 1,6-dibromohexano (504 μ L, 3.28 mmol), K_2CO_3 (90.8 mg, 0.66 mmol) y DMF (5 mL). La purificación mediante cromatografía en columna condujo a **125c** como un aceite amarillo. Rendimiento: 188 mg (46%).

9.2.19.3. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 12'-bromododecilo (125d)

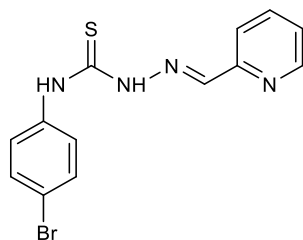


Se empleó OA (120 mg, 0.26 mmol), 1,12-dibromododecano (530 mg, 1.31 mmol), K_2CO_3 (36 mg, 0.26 mmol) y DMF (8 mL). La purificación mediante cromatografía en columna condujo a **125d** como un aceite amarillo. Rendimiento: 189 mg (97%).

9.3. Nuevas investigaciones

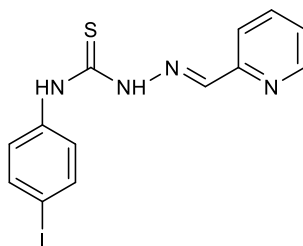
9.1.11. Tiosemicarbazonas derivadas de 2-piridincarboxialdehído

9.1.11.1. 4-*N*-(4'-Bromofenil)-1-(piridin-2''-ilmetileno)-3-tiosemicarbazona (**1f**)



Se sigue el método general descrito en la **Sección 9.2.3**. Se emplea la 4-*N*-(4-bromofenil)-3-tiosemicarbazida **54f** (200 mg, 0.8 mmol, 1.0 equiv.), EtOH (2 mL), 2-piridincarboxialdehído (0.08 mL, 0.85 mmol, 1.05 eq.) y AcOH (50 μ L, 0.8 mmol, 1.0 equiv). Se obtuvo **1f** como un sólido blanco. Rendimiento: 245 mg (90%). P.f.: 199 °C; ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.08 (s, 1H, NH), 10.25 (s, 1H, Ar-NH), 8.58 (ddd, 1H, $J_{3'',6''}$ = 1.0 Hz, $J_{4'',6''}$ = 1.7 Hz, $J_{5'',6''}$ = 4.9 Hz, H-6''), 8.44 (dt, 1H, $J_{3'',5''}$ = 1.1 Hz, $J_{3'',4''}$ = 8.0 Hz, H-3''), 8.20 (s, 1H, N=CH), 7.85 (td, 1H, $J_{4'',5''}$ = 7.9 Hz, H-4''), 7.56 (s, 4H, Ar-Ho, Ar-Hm, Ph), 7.40 (ddd, 1H, H-5'') ppm; ^{13}C -RMN (125.7 MHz, DMSO- d_6) δ 176.5 (CS), 153.2 (C-2''), 149.5 (C-6''), 143.5 (C=N), 138.5 (C-1'), 136.6 (C-4''), 131.0, 128.0 (C-2'/C-6', C-3'/C-5'), 124.4 (C-5''), 120.8 (C-3''), 117.9 (C-4') ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}^{79}\text{BrN}_4\text{S}$ ([M+H] $^+$): 334.9961, encontrado: 334.9956; m/z calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}^{81}\text{BrN}_4\text{S}$ ([M+H] $^+$): 336.9940, encontrado: 336.9935.

9.3.1.2. 1-(Piridin-2'-ilmetileno)-4-*N*-(4''-yodofenil)-3-tiosemicarbazona (**1g**)



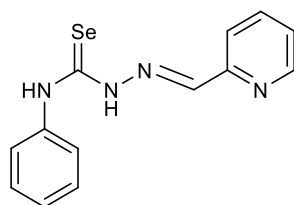
Se sigue el método general descrito en la **Sección 9.2.3**. Se emplea la 4-*N*-(4-yodofenil)-3-tiosemicarbazida **54g** (100 mg, 0.34 mmol, 1.0 equiv.), EtOH (2 ml), 2-piridincarboxialdehído (0.03 mL, 0.35 mmol, 1.05 eq.) y AcOH (20 μ L, 0.34 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **1g** como un sólido blanco. Rendimiento: 118 mg (88%). P.f.: 208 °C; ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.08 (s, 1H, NH), 10.24 (s, 1H, Ar-NH), 8.57 (da, 1H, $J_{5',6'}$ = 4.6 Hz, H-6'), 8.39 (da, 1H, , $J_{3',4'}$ = 8.0 Hz, H-3'), 8.18 (s, 1H, N=CH), 7.87 (td, 1H, $J_{4',6'}$ = 1.2 Hz, $J_{4',5'}$ = 7.9 Hz, H-4'), 7.71 (m, 2H, Ar-H), 7.40 (m, 3H, Ar-H, H-5') ppm; ^{13}C -RMN (125.7 MHz, DMSO- d_6) δ 176.2 (CS), 153.0 (), 149.4 (C-6'), 143.4 (C=N), 138.9, 136.8 (C-2''/C6'', C-3''/C5''), 136.5 (C-4'') 128.1 (C-1''), 124.3 (C-5'), 120.7 (C-3'), 90.2 (C-4''); HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{IN}_4\text{S}$ ([M+H] $^+$): 382.9822, encontrado: 382.9816.

9.3.2. Selenosemicarbazonas derivadas de 2-piridincarboxaldehído

9.3.2.1. Procedimiento general para la preparación de selenosemicarbazonas derivadas de 2-piridincarboxialdehído 2a-g

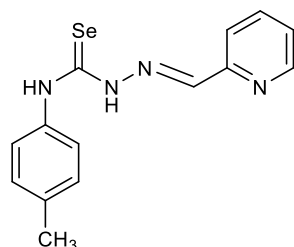
A una solución de las selenosemicarbazidas **57a-g** (1.0 equiv.) en EtOH (5 mL) se añade el 2-piridincarboxialdehído (1.0 equiv.) y AcOH (1.0 equiv.). La mezcla correspondiente se refluxe durante 4 h. Transcurrido se tiempo se forma un precipitado, que se filtra a vacío y se lava con EtOH frío.

9.3.2.1.1. 4-*N*-Fenil-1-(piridin-2'-ilmetileno)-3-selenosemicarbazona (2a)



Se emplea la 4-*N*-fenilselenosemicarbazida **57a** (200 mg, 0.93 mmol 1 equiv.), 2-piridincarboxialdehído (90 μ L, 0.93 mmol, 1.0 equiv.), AcOH (55 μ L, 0.93 mmol, 1.0 equiv). Se obtiene **2^a** como un sólido gris. Rendimiento: 200 mg (71%). P.f.: 178–180 °C (des.); ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.27 (s, 1H, NH), 10.57 (s, 1H, Ar-NH), 8.56 (ddd, 1H, $J_{3',6'} = 1.0$ Hz, $J_{4',6'} = 1.6$ Hz, $J_{5',6'} = 5.0$ Hz, H-6'), 8.46 (da, $J_{3',4'} = 8.0$ Hz, H-3'), 8.28 (s, 1H, N=C), 7.82 (td, 1H, $J_{4',5'} = 8.0$ Hz, H-4'), 7.48 (d, 2H, Ar-H_m), 7.38 (m, 3H, H-5', Ar-H_o), 7.24 (tt, 1H, $J_{m,p} = 7.2$ Hz, $J_{o,p} = 2.0$ Hz, Ar-H_p) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.3 (CSe), 153.2 (C-2'), 149.6 (C-6'), 144.5 (C=N), 139.9 (Ar-C_{ipso}), 136.7 (C-4'), 128.2 (Ar-C_m, Ph), 127.0 (Ar-C_o, Ph), 126.27 (Ar-C_p, Ph), 124.6 (C-5'), 120.9 (C-3') ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₁₃H₁₃N₄⁸⁰Se ([M+H]⁺): 305.0300, encontrado: 305.0295.

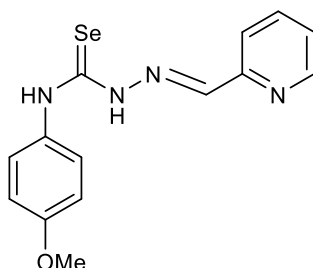
9.3.2.1.2. 4-*N*-(4'-Metilfenil)-1-(piridin-2''-ilmetileno)-3-selenosemicarbazona (2b)



Se emplea la 4-*N*-(*p*-metilfenil)selenosemicarbazida **57b** (200 mg, 0.87 mmol 1.0 equiv.), 2-piridincarboxialdehído (83 μ L, 0.87 mmol, 1.0 equiv.), AcOH (50 μ L, 0.87 mmol, 1.0 equiv). Se obtiene **2b** como un sólido gris. Rendimiento: 225 mg (81%). P.f.: 182–183 °C (des.); ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.27 (s, 1H, NH), 10.70 (s, 1H, Ar-NH), 8.58 (ddd, 1H, $J_{3'',6''} = 0.8$ Hz, $J_{4'',6''} = 1.6$ Hz, $J_{5'',6''} = 4.9$ Hz, H-6''), 8.45 (da, 1H, $J_{3'',4''} = 8.0$ Hz, H-

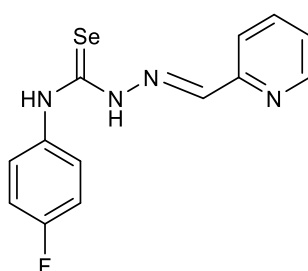
3''), 8.29 (s, 1H, N=CH), 7.83 (td, 1H, $J_{4'',5''}=7.9$ Hz, H- 4''), 7.48 (ddd, 1H, $J_{3'',5''}=1.1$ Hz, H-5''), 7.36 (m, 2H, Ar-Hm), 7.18 (d, 2H, Ar-Ho) 2.31 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 175.3 (CSe), 153.3 (C-2''), 149.6 (C-6''), 144.4 (C=N), 137.4 (C-1'), 136.7 (C-4'), 135.5 (C-4') 128.8 (C-3', C-5'), 126.98 (C-2', C-6'), 124.6 (C-5''), 120.9 (C-3''), 20.8 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₁₄H₁₅N₄⁸⁰Se ([M+H]⁺): 319.0456, encontrado: 319.0451.

9.3.2.1.3. 4-*N*-(4'-Metoxifenil)-1-(piridin-2''-ilmetileno)-3-selenosemicarbazona (2c)



Se emplea la 4-*N*-(*p*-metoxifenil)selenosemicarbazida **2c** (200 mg, 0.83 mmol 1 eq), 2-piridincarboxialdehído (78 μL, 0.82 mmol, 1.0 equiv.), AcOH (50 μL, 0.82 mmol, 1.0 equiv.). Se obtiene **2c** como un sólido rosa. Rendimiento: 223 mg (80%). P.f 160–162 °C (des.); ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.26 (s, 1H, NH), 10.53 (s, 1H, Ar-NH), 8.59 (da, 1H, $J_{5'',6''}=4.7$ Hz, H-6''), 8.46 (da, 1H, $J_{3'',4''}=8.0$ Hz, H-3''), 8.30 (s, 1H, N=CH), 7.80 (td, 1H, $J_{4'',6''}=1.6$ Hz, $J_{4'',5''}=7.8$ Hz, H- 4''), 7.42 (ddd, 1H, $J_{3'',5''}=0.9$ Hz, H-5''), 7.37 (m, 2H, Ar-Hm), 6.96 (d, 2H, Ar-Ho), 3.79 (s, 3H, OCH₃) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.8 (CSe), 157.9 (C-4'), 153.6 (C-2''), 149.8 (C-6''), 144.6 (C=N), 137.0 (C-4''), 133.1 (C-1'), 128.8 (C-3', C-5'), 124.8 (C-5''), 121.2 (C-3''), 113.7 (C-2', C-6'), 55.7 (OCH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₁₄H₁₅N₄O⁸⁰Se ([M+H]⁺): 335.0406, encontrado: 335.0400.

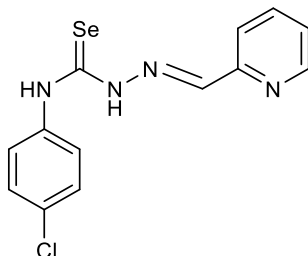
9.3.2.1.4. 4-*N*-(4'-Fluorofenil)-1-(piridin-2''-ilmetileno)-3-selenosemicarbazona (2d)



Se emplea la *N*-(4-fluorofenil)selenosemicarbazida **57d** (200 mg, 0.86 mmol 1.0 equiv.), 2-piridincarboxialdehído (82 μL, 0.86 mmol, 1.0 equiv.), AcOH (49 μL, 0.87 mmol, 1.0 equiv.). Se obtiene **2d** como un sólido amarillo. Rendimiento: 88 mg (32%); ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.36 (s, 1H, NH), 10.60 (s, 1H, Ar-NH), 8.59 (ddd, 1H, $J_{3'',6''}=0.9$ Hz, $J_{4'',6''}=1.7$ Hz, $J_{5'',6''}=4.8$ Hz, H-6''), 8.45 (da, 1H, $J_{3'',4''}=8.0$ Hz, H-3''), 8.31 (s, 1H, N=CH), 7.85 (td, 1H, $J_{4'',5''}=7.8$ Hz, H- 4''), 7.51 (m, 2H, Ar-H), 7.41 (ddd, 1H, $J_{3'',5''}=1.1$ Hz, H-5''), 7.23 (m, 2H, Ar-H) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.5 (CSe), 160.1 (d, ¹*J*_{C,F}= 239.9 Hz, C-4'), 153.1 (C-2''), 149.4 (C-6''), 144.5 (C=N), 136.5 (C-4''), 136.1 (d, ⁴*J*_{C,F}= 2.9 Hz, C-1'), 129.1 (d, ³*J*_{C,F}= 8.5 Hz, C-2'), 124.4 (C-5''), 120.7 (C-3''), 114.8 (d, ²*J*_{C,F}= 22.6

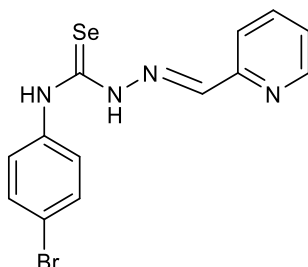
Hz, C-3') ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $C_{13}H_{12}FN_4^{80}Se$ ($[M+H]^+$): 323.0206, encontrado: 323.0203.

9.3.2.1.5. 4-*N*-(4'-Clorofenil)-1-(piridin-2''-ilmetileno)-3-selenosemicarbazona (2e)



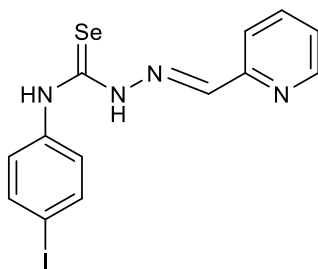
Se emplea la *N*-(4-clorofenil)selenosemicarbazida **57e** (200 mg, 0.80 mmol, 1.0 equiv.), 2-piridincarboxialdehído (85 μ L, 0.80 mmol, 1.0 equiv.), AcOH (48 μ L, 0.80 mmol, 1.0 equiv.). Se obtiene **2e** como un sólido naranja. Rendimiento: 183 mg (67%). P.f 186–188 °C (des.); 1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.35 (s, 1H, NH), 10.58 (s, 1H, Ar-NH), 8.55 (ddd, 1H, $J_{3'',6''}=0.9$ Hz, $J_{4'',6''}=1.6$ Hz, $J_{5'',6''}=4.9$ Hz, H-6''), 8.39 (dta, 1H, $J_{3'',5''}=1.1$ Hz, $J_{3'',4''}=8.0$ Hz, H-3''), 8.28 (s, 1H, N=CH), 7.84 (td, 1H, $J_{4'',5''}=7.9$ Hz, H-4''), 7.54 (m, 2H, Ar-H), 7.41 (m, 2H, Ar-H), 7.42 (ddd, 1H, H-5'') ppm; ^{13}C -RMN (125.7 MHz, DMSO- d_6) δ 175.1 (CSe), 152.8 (C-2''), 149.3 (C-6''), 144.5 (C=N), 138.5, 136.4 (C-1', C-4'') 128.4, 127.8 (C-2'/C-6', C-3'/C-5'), 124.3 (C-5''), 120.6 (C-3'') ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $C_{13}H_{12}ClN_4^{80}Se$ ($[M+H]^+$): 338.9910, encontrado: 338.9903.

9.3.2.1.6. 4-*N*-(4'-bromofenil)-1-(piridin-2''-ilmetileno)-3-selenosemicarbazona (2f)



Se emplea la 4-*N*-(bromofenil)selenosemicarbazida **57f** (200 mg, 0.81 mmol 1.0 equiv.), 2-piridincarboxialdehído (86 μ L, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), AcOH (48 μ L, 0.87 mmol, 1.0 equiv.). Se obtiene **2f** como un sólido naranja. Rendimiento: 203 mg (74%). P.f 190–192 °C (des.); 1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.38 (s, 1H, NH), 10.59 (s, 1H, Ar-NH), 8.58 (ddd, 1H, $J_{3'',6''}=0.9$ Hz, $J_{4'',6''}=1.6$ Hz, $J_{5'',6''}=4.9$ Hz, H-6''), 8.41 (dta, 1H, $J_{3'',5''}=1.0$ Hz, $J_{3'',4''}=8.0$ Hz, H-3''), 8.30 (s, 1H, N=CH), 7.84 (td, 1H, $J_{4'',5''}=7.9$ Hz, H-4''), 7.56 (m, 2H, Ar-H), 7.50 (m, 2H, Ar-H), 7.43 (ddd, 1H, H-5'') ppm; ^{13}C -RMN (125.7 MHz, DMSO- d_6) δ 175.3 (CSe), 153.1 (C-2''), 149.6 (C-6''), 144.8 (C=N), 139.2 (C-1'), 136.7 (C-4''), 131.1, 129.0 (C-3'/C-5', C-2'/C-6'), 124.6 (C-5''), 121.0 (C-3''), 118.7 (C-4') ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $C_{13}H_{12}^{79}BrN_4^{80}Se$ ($[M+H]^+$): 382.9405, encontrado: 382.9397; m/z calcd. para $C_{13}H_{12}^{81}BrN_4^{80}Se$ ($[M+H]^+$): 384.9385, encontrado: 384.9384.

9.3.2.1.7. 1-(Piridin-2'-ilmetileno)- 4-N-(4''-yodofenil)-3-selenosemicarbazona (2g)



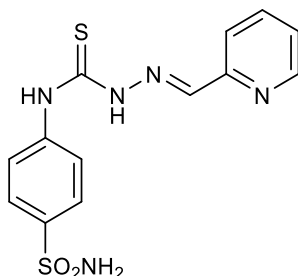
Se emplea la 4-N-(*p*-metilfenil)selenosemicarbazida **57g** (200 mg, 0.58 mmol, 1.0 equiv.), 2-piridincarboxialdehído (55 μ L, 0.58 mmol, 1.0 equiv.), AcOH (34 μ L, 0.58 mmol, 1.0 equiv.). Se obtiene **2g** como un sólido verde. Rendimiento: 200 mg (79%). P.f.: 182–184 °C (des.); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.41 (s, 1H, NH), 10.53 (s, 1H, Ar-NH), 8.62 (da, 1H, $J_{5',6'} = 4.6$ Hz, H-6'), 8.44 (da, 1H, $J_{3',4'} = 8.0$ Hz, H-3'), 8.31 (s, 1H, N=CH), 7.86 (td, 1H, $J_{4',6'} = 1.6$ Hz, $J_{4',5'} = 7.9$ Hz, H-4'), 7.75 (m, 2H, Ar-H), 7.43 (ddd, 1H, $J_{3'',5''} = 0.9$ Hz, H-5'), 7.37 (m, 2H, Ar-H) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, DMSO- d_6) δ 175.4 (CSe), 153.2 (C-2'), 149.6 (C-6'), 144.8 (C=N), 138.9 (C-1''), 136.7 (C-4'), 128.8 (C-3, C-5), 128.2 (C-2, C-6), 124.7 (C-5'), 121.0 (C-3'), 90.4 (C-4'') ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{IN}_4^{80}\text{Se}$ ([M+H] $^+$): 430.9266, encontrado: 430.9262.

9.3.3. Tiosemicarbazonas derivadas de arilsulfonamidas

9.3.3.1. Procedimiento general para la preparación de tiosemicarbazonas derivadas de arilsulfonamidas y 2-piridincarboxialdehído (3a-c)

A una solución de la correspondiente tiosemicarbazida **60a-c** (1.0 equiv.) en EtOH (5 mL) se añade el 2-piridincarboxialdehído (1.0 equiv.) y H_2SO_4 concentrado (1 gota). La mezcla resultante se refluxe durante 4 h. Transcurrido ese tiempo se forma un precipitado, que se filtra a vacío y se lava con EtOH frío.

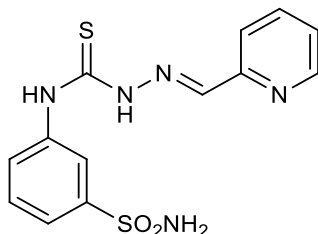
9.3.3.1.1. 1-(Piridin-2'-ilmetileno)-4-N-(4''-sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazona (3a)



Se emplea la tiosemicarbazida **60a** (200 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), 2-piridincarboxialdehído (74 μ L, 0.81 mmol, 1.0 equiv.) Se obtiene **3a** como un sólido amarillo. Rendimiento: 84 mg (31%). P.f.: 178 °C; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.48 (s, 1H, NH), 10.52 (s, 1H, Ar-NH), 8.76 (da, 1H, $J_{5',6'} = 5.1$ Hz, H-6'), 8.47 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8.4$ Hz, H-3'), 8.23 (s, 1H, N=CH), 8.18 (m, 1H, H-4'), 7.82 (s, 4H, Ar-Ho, Ar-Hm), 7.67 (m, 1H, H-5'), 7.36 (s, 2H, NH $_2$) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, DMSO- d_6) δ 176.7 (CS), 150.2 (C-2'),

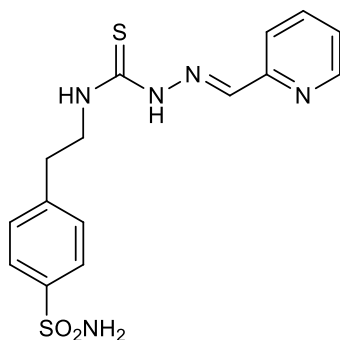
146.7 (C-3'), 141.9 (C-1), 140.9 (C-5') 139.2 (C=N), 126.0 (C-3, C-5), 125.8 (C-2, C-6), 125.6 (C-4') 123.3 (C-4'), 123.3 (C-6) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $C_{13}H_{13}N_5NaO_2S_2$ ($[M+Na]^+$): 358.0403, encontrado: 358.0402.

9.3.3.1.2. 1-(Piridin-2'-ilmetileno)-N-(3''-sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazona (3b)



Se emplea la tiosemicarbazida **60b** (200 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), 2-piridincarboxialdehído (74 μ L, 0.81 mmol, 1.0 equiv.). Se obtiene **3b** como un sólido amarillo. Rendimiento: 111 mg (41%). P.f.: 186 °C (des.); 1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.34 (s, 1H, NH), 10.51 (s, 1H, Ar-NH), 8.68 (da, 1H, $J_{5',6'}= 5.1$ Hz, H-6''), 8.47 (d, 1H, $J_{3',4'}= 8.3$ Hz, H-3'), 8.21 (s, 1H, N=CH), 8.07 (t, 1H, $J_{H,H}= 7.7$ Hz, Ar-H), 8.04 (ta, 1H, $J_{2'',4''}= J_{2'',6''}= 1.8$ Hz, H-2''), 7.82 (da, 1H, $J_{H,H}= 7.8$ Hz, Ar-H), 7.68 (dt, 1H, $J_{H,H}= 1.3$ Hz, $J_{H,H}= 7.8$ Hz, Ar-H), 7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.41 (s, 2H, NH₂) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $C_{13}H_{13}N_5NaO_2S_2$ ($[M+Na]^+$): 358.0403, encontrado: 358.0399.

9.3.3.1.3. 1-(Piridin-2'-ilmetileno)-N-[2''-(4'''-sulfonamidofenil)]etil-3-tiosemicarbazona (3c)

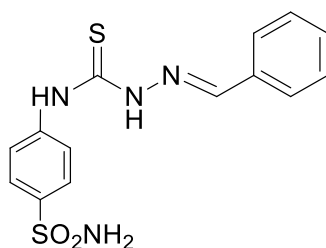


Se emplea la tiosemicarbazida **60c** (200 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), 2-piridincarboxialdehído (74 μ L, 0.81 mmol, 1.0 equiv.). Se obtiene **3c** como un sólido amarillo. Rendimiento: 111 mg (41%). P.f.: 225 °C; 1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.11 (s, 1H, NH), 8.99 (t, 1H, $J_{H,H}= 6.0$ Hz, NH-CH₂), 8.77 (da, 1H, $J_{5',6'}= 5.1$ Hz, H-6'), 8.35 (da, 1H, $J_{3',4'}= 8.4$ Hz, H-3'), 8.26 (tda, 1H, $J_{4',6'}= 1.4$ Hz, $J_{4',5'}= 7.8$ Hz, H-4'), 8.13 (s, 1H, N=CH), 7.77 (m, 2H, Ar-H), 7.72 (m, 1H, H-5'), 7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.28 (sa, 2H, NH₂), 3.84 (c, 2H, $J_{H,H}= 6.5$ Hz, NH-CH₂), 3.03 (t, 1H, CH₂-Ar) ppm; ^{13}C -RMN (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ 178.0 (CS), 155.1 (C-2'), 148.3 (C-6'), 144.4 (C=N), 143.7, 143.3, 143.3, 142.2 (C-1'', C-4''), 134.4 (C-4'), 129.2, 125.8 (C-2''/C-6'', C-3''/C-5''), 124.3 (Ar-C) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $C_{15}H_{17}N_5NaO_2S_2$ ($[M+Na]^+$): 386.0716, encontrado: 386.0720.

9.3.3.2. Procedimiento general para la preparación de tiosemicarbazonas derivadas de arilsulfonamidas y derivados del benzaldehído (4a-p)

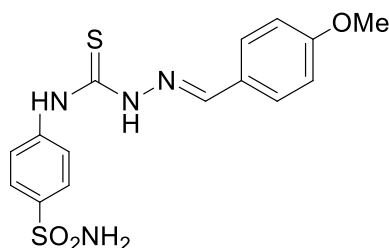
A una solución de las tiosemicarbazidas **60a-c** (1.0 equiv.) en EtOH (5 mL) se agrega el aldehído correspondiente (1.0 equiv.) y H₂SO₄ (1 gota). La mezcla resultante se refluxe durante 4h. Transcurrido ese tiempo, se forma un precipitado, que se filtra a vacío y se lava con EtOH frío.

9.3.3.2.1. 1-Fenilmetileno-4-*N*-(4'-sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazona (4a)



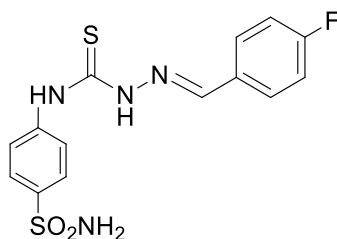
Se empleó la tiosemicarbazida **60a** (200 mg, 0.81 mmol, 1 eq), benzaldehído (84 μ L, 0.81 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4a** como un sólido blanco. Rendimiento: 192 mg (71%). P.f: 219-220 °C; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.99 (s, 1H, NH), 10.26 (s, 1H, Ar-NH), 8.19 (s, 1H, N=CH), 7.91 (m, 2H, Ar-H) 7.82 (m, 4H, Ar-H), 7.44 (m, 3H, Ar-H, H-4'), 7.25 (s, 2H, NH₂) ppm; 175.8 (C=S), 143.6, 142.1, 140.3 (CH=N, NH-Ar-Cipso, SO₂NH₂-Ar-Cp), 133.9 (NH=CH-Ar-Cipso), 130.3, 128.7, 127.8, 125.7, 125.4 (Ar-C) ppm; HRESI-MS ,*m/z* calcd. para C₁₄H₁₅N₄O₂S₂ ([M+H]⁺): 335.0631, encontrado: 335.0628.

9.3.3.2.2. 1-(4'-Metoxifenilmetileno)-4-*N*-(4''-sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazona (4b)



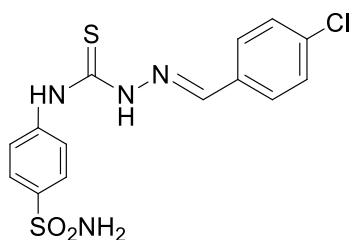
Se empleó la tiosemicarbazida **60a** (200 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), 4-metoxibenzaldehído (98 μ L, 0,81 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4b** como un sólido blanco. Rendimiento: 138 mg (47%). P.f: 211 °C; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.92 (s, 1H, NH), 10.23 (s, 1H, Ar-NH), 8.16 (s, 1H, N=CH) 7.85 (m, 6H, Ar-H), 7.36 (s, 2H, NH₂) 7.03 (m, 2H, Ar-H), 3.86 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.5 (CS), 161.2 (C-4'), 143.7 (C=N), 142.3 (C-4), 140.5 (C-1), 140.3 (C-1) 129.6 (C-2, C-6), 126.5 (C-1') 125.8 (, C-3', C-5'), 125.3 (C-2', C-6') 114.40 (C-3, C-5), 55.5 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. C₁₅H₁₇N₄O₃S₂ ([M+H]⁺): 365.0737, encontrado: 364.4380.

9.3.3.2.3. 1-(4'-Fluorofenilmetileno)-4-N-(4''-sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazona (4c)



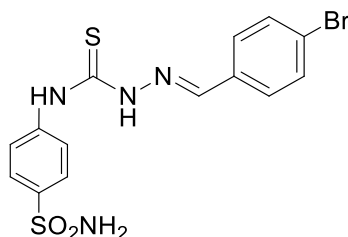
Se empleó la tiosemicarbazida **60a** (200 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), 4-fluorobenzaldehído (87 μ L, 0.81 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4c** como un sólido blanco. Rendimiento: 215 mg (76%). P.f: 220-222 $^{\circ}$ C; 1 H-RMN (300MHz, DMSO- d_6) δ 11.99 (s, 1H, NH), 10.29 (s, 1H, Ar-NH), 8.18 (s, 1H, N=CH) 7.98 (m, 2H, Ar-H) 7.84 (m, 4H, Ar-H), 7.32 (m, 4H, Ar-H, NH₂) ppm. 13 C-RMN (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ 176.0 (C=S), 163.2 (d, $^1J_{C,H}$ = 247.6 Hz, C-4''), 144.4, 142.1, 140.3 (CH=N, SO₂NH₂-Ar-Cp, NH-Ar-Cipso), 130.5 (d, $^4J_{C,H}$ = 2.9, Hz, C-1''), 130.0 (d, $^3J_{C,H}$ = 8.6 Hz, C-2''/C-6''), 125.6, 125.3 (Ar-C), 115.7 (d, $^2J_{C,H}$ = 21.9 Hz, C-3''/C-5'') ppm; HRESI-MS m/z calcd. para C₁₄H₁₃FN₄O₃S₂ ([M+H]⁺): 353.0537, encontrado: 353.0536.

9.3.3.2.4. 1-(4'-Clorofenilmetileno)-4-N-(4''-sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazona (4d)



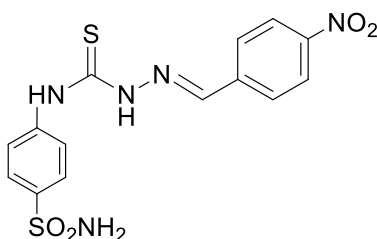
Se empleó la tiosemicarbazida **60a** (200 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), 4-clorobenzaldehído (114 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4d** como un sólido blanco. Rendimiento: 223 mg (75%). P.f: 226-228 $^{\circ}$ C; 1 H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.01 (s, 1H, NH), 10.29 (s, 1H, Ar-NH), 8.15 (s, 1H, N=CH), 7.94 (m, 2H, Ar-H), 7.19 (s, 4H, Ar-H), 7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.31 (s, 2H, NH₂) ppm; 13 C-RMN (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ 176.4 (CS), 142.2, 142.0 (Ar-C, C=N), 140.4, 134.7, 132.8, 129.4, 128.7, 125.7, 125.4 (Ar-C) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para C₁₄H₁₃ClN₄NaO₂S₂ ([M+Na]⁺): 391.0061, encontrado: 391.0058.

9.3.3.2.5. 1-(4'-Bromofenilmetileno)-4-N-(4''-sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazona (4e)



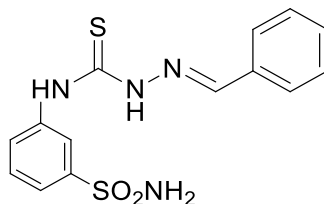
Se empleó la tiosemicarbazida **60a** (200 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), 4-bromobenzaldehído (87 μ L, 0.81 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4e** como un sólido blanco. Rendimiento: 236 mg (71%). P.f: 230 $^{\circ}$ C; 1 H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.02 (s, 1H, NH), 10.30 (s, 1H, Ar-NH), 8.14 (s, 1H, N=CH), 7.87 (m, 2H, Ar-H), 7.80 (m, 4H, Ar-H), 7.63 (m, 2H, Ar-H), 7.32 (s, 2H, NH₂) ppm; 13 C-RMN (125.7 MHz, DMSO- d_6) δ 175.9 (CS), 142.3, 142.0, 140.4 (CH=N, C-1'', C-4''), 133.1 (C-1'), 131.6, 129.6, 125.6, 125.4, 123.5 (Ar-C) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para C₁₄H₁₄BrN₄O₂S₂ ([M+H]⁺): 412.9736, encontrado: 412.9733.

9.3.3.2.6. 1-(4'-Nitrofenilmetileno)-4-N-(4''-sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazona (4f)



Se empleó la tiosemicarbazida **60a** (200 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), 4-nitrobenzaldehído (128 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4f** como un sólido amarillo. Rendimiento: 218 mg (72%). P.f: 238 $^{\circ}$ C; 1 H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.27 (s, 1H, NH), 10.46 (s, 1H, Ar-NH), 8.26 (m, 2H, Ar-H), 8.26 (s, 1H, N=CH), 8.20 (m, 2H, Ar-H), 7.80 (m, 4H, Ar-H), 7.35 (sa, 2H, NH₂) ppm. 13 C-RMN (125.7 MHz, DMSO- d_6) δ 176.3 (CS), 147.7 (C-4''), 141.8 (C=N), 140.8, 140.5, 140.2, 128.5, 125.6, 123.7 (Ar-C) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para C₁₄H₁₃N₅NaO₄S₂ ([M+Na]⁺): 402.0301, encontrado: 402.0296.

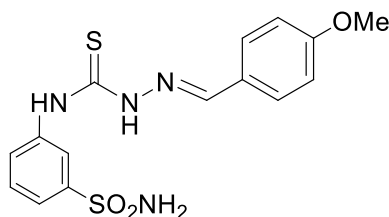
9.3.3.2.7. 1-Fenilmetileno-4-N-(3''-sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazona (4g)



Se empleó la tiosemicarbazida **60b** (200 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), benzaldehído (84 μ L, 0,81 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4g** como un sólido blanco. Rendimiento: 197 mg (68%). p.f: 200 $^{\circ}$ C; 1 H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.94 (s, 1H, NH), 10.30 (s, 1H, Ar-

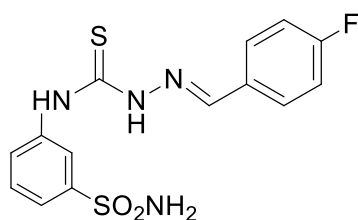
NH), 8.19 (s, 1H, N=CH) 8.06 (ta, $J_{H,H} = 2.1$ Hz, H-2''), 7.94-7.91 (m, 2H, Ar-H), 7.83 (da, $J_{H,H} = 7.9$ Hz, Ar-H), 7.66 (m, 1H, Ar-H), 7.55 (t, 1H, $J_{H,H} = 7.8$ Hz, Ar-H), 7.45-7.43 (m, 3H, Ar-H), 7.32 (sa, 2H, NH₂) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, DMSO-*d*₆) δ 176.2 (CS), 144.0, 143.4, 139.5 (CH=N, C-3'', C-1''), 133.9 (C-1'), 130.1, 129.2, 128.6, 128.5, 122.3 (Ar-C) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₁₄H₁₅N₄O₂S₂ ([M+H]⁺): 335.0631, encontrado: 335.0631.

9.3.3.2.8. 1-(4'-Metoxifenilmetileno)-4-N-(3''-sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazona (4h)



Se empleó la tiosemicarbazida **60b** (200 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), 4-metoxibenzaldehído (98 μL, 0.81 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4h** como un sólido blanco. Rendimiento: 140 mg (48%). P.f: 184 °C; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.84 (s, 1H, NH), 10.2 (s, 1H, Ar-NH), 8.12 (s, 1H, N=CH), 8.05 (ta, 1H, $J_{H,H} = 1.9$ Hz, H-2''), 7.86 (m, 2H, H-2', H-6'), 7.84 (m, 1H, Ar-H), 7.64 (dt, 1H, $J_{H,H} = 1.4$ Hz, $J_{H,H} = 8.4$ Hz, Ar-H), 7.54 (t, 1H, Ar-H), 7.40 (s, 2H, NH₂), 6.99 (m, 2H, H-3', H-5'), 3.81 (s, 1H, OMe) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, DMSO-*d*₆) δ 176.1 (CS), 161.1 (C-4'), 144.4 (C=N), 143.8 (C-3''), 140.0 (C-1''), 129.8 (C-2'/C-6'), 129.6, 128.9, 126.9, 123.2, 122.6 (Ar-C), 114.64 (C-3'/C-5'), 55.8 (OMe) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₁₅H₁₆N₄NaO₃S₂ ([M+Na]⁺): 387.0556, encontrado: 387.0547.

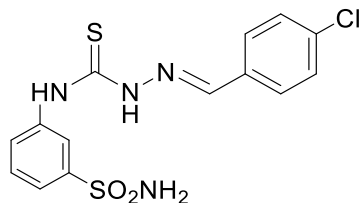
9.3.3.2.9. 1-(4'-Fluorofenilmetileno)-4-N-(3''-sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazona (4i)



Se empleó la tiosemicarbazida **60b** (200 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), 4-fluorobenzaldehído (87 μL, 0.81 mmol, 1.0 eq.). Se obtuvo **4i** como un sólido blanco. Rendimiento: 198 mg (70%). P.f: 204 °C; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.94 (s, 1H, NH), 10.32 (s, 1H, Ar-NH), 8.17 (s, 1H, N=CH), 8.04-7.97 (m, 3H, Ar-H), 7.83 (da, 1H, $J_{H,H} = 7.7$ Hz, Ar-H), 7.66 (da, 1H, $J_{H,H} = 8.0$ Hz, Ar-H), 7.55 (t, 1H, $J_{H,H} = 8.0$ Hz, Ar-H), 7.38 (s, 2H, NH₂), 7.28 (t, 1H, $J_{H,H} = 8.8$ Hz, Ar-H) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 176.2 (CS), 163.2 (d, ¹ $J_{H,H} = 248.2$ Hz, C-4'), 144.0, 142.2, 139.5 (CH=N, C-1'', C-3''), 130.5 (d, ⁴ $J_{H,H} = 2.9$ Hz, C-1'), 129.9 (d, ³ $J_{H,H} = 8.6$ Hz, C-2', C-6'), 129.3, 128.5, 122.8, 122.3 (Ar-C), 115.7

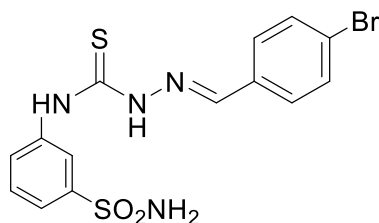
(d, $^2J_{H,H} = 21.9$ Hz, C-3', C-5') ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $C_{14}H_{13}FN_4NaO_2S_2$ ($[M+Na]^+$): 375.0356, encontrado: 375.0350.

9.3.3.2.10. 1-(4'-Clorofenilmetileno)-4- N-(3''-sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazona (4j)



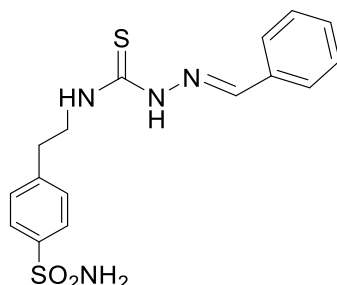
Se empleó la tiosemicarbazida **60b** (200 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), 4-clorobenzaldehído (114 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4j** como un sólido blanco. Rendimiento: 225 mg (76%). P.f: 229 °C.; 1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.99 (s, 1H, NH), 10.35 (s, 1H, Ar-NH), 8.15 (s, 1H, N=CH), 8.04 (brt, 1H, $J_{H,H} = 1.8$ Hz, H-2''), 7.97 (m, 2H, H-2', H-6'), 7.81 (da, 1H, $J_{H,H} = 8.0$ Hz, Ar-H), 7.65 (da, 1H, $J_{H,H} = 7.9$ Hz, Ar-H), 7.60-7.49 (m, 3H, Ar-H), 7.38 (brs, 2H, NH₂) ppm; ^{13}C -RMN (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ 176.2 (CS), 144.0, 142.0, 139.5 (CH=N, C-1'', C-3''), 134.6 (C-1'), 132.9, 129.3, 128.7, 128.5, 122.9, 122.4 (Ar-C) ppm; HRESI-MS calcd. for $C_{14}H_{13}ClN_4NaO_2S_2$ ($[M+Na]^+$): 391.0061, found: 391.0057.

9.3.3.2.11. 1-(4'-Bromofenilmetileno)-4- N-(3''-sulfonamidofenil)-3-tiosemicarbazona (4k)



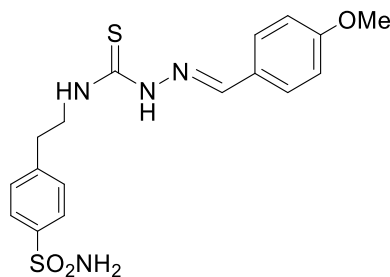
Se empleó la tiosemicarbazida **60b** (200 mg, 0.81 mmol, 1.0 equiv.), 4-bromobenzaldehído (87 μ L, 0.81 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4k** como un sólido blanco. Rendimiento: 250 mg (76%). P.f: 203 °C; 1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.99 (s, 1H, NH), 10.35 (s, 1H, Ar-NH), 8.15 (s, 1H, N=CH), 8.04 (ta, 1H, $J_{H,H} = 1.9$ Hz, H-2''), 7.90 (m, 2H, H-2', H-6'), 7.83 (da, 1H, $J_{H,H} = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.68-7.62 (m, 3H, Ar-H), 7.56 (t, 1H, $J_{H,H} = 7.7$ Hz, Ar-H), 7.39 (s, 2H, NH₂) ppm; ^{13}C -RMN (125.7 MHz, DMSO- d_6) δ 176.3 (CS), 144.0, 142.1, 139.5 (CH=N, C-1'', C-3''), 133.3 (C-1'), 131.7, 129.6, 129.5, 128.6, 123.5, 123.0, 122.5 (Ar-C) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $C_{14}H_{14}^{79}BrN_4O_2S_2$ ($[M+H]^+$): 434.9556, encontrado: 434.9557; m/z calcd. para $C_{14}H_{14}^{81}BrN_4O_2S_2$ ($[M+H]^+$): 436.9535, encontrado: 436.9534.

9.3.3.2.12. 1-Fenilmetileno-4-*N*-[2'-(4''-sulfonamido)fenil]etil-3-tiosemicarbazona (**4l**)



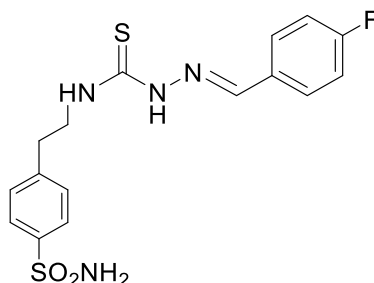
Se empleó la tiosemicarbazida **60c** (200 mg, 0.82 mmol, 1.0 equiv.), benzaldehído (85 μ L, 0.82 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4l** como un sólido blanco. Rendimiento: 133 mg (45%). P.f: 228 °C; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.56 (s, 1H, NH), 8.59 (t, 1H, $J_{\text{H,H}}=6.3$ Hz, NH-CH_2), 8.10 (s, 1H, N=CH), 7.80 (m, 4H, Ar-H), 7.45 (m, 5H, Ar-H), 7.28 (s, 2H, NH_2), 3.81 (ca, 2H, NH-CH_2), 3.02 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 177.1 (CS), 143.5, 142.2, 142.1, (CH=N, C-4'', C-1''), 134.2 (C-1, Ph), 129.9, 129.1, 128.7, 127.2, 125,9 (Ar-C), 44.6 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 34.6 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{NaO}_2\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 385.0763, encontrado: 385.0761.

9.3.3.2.13. 1-(4'-Metoxifenilmetileno)-4-*N*-[2'-(4'''-sulfonamido)fenil]etil-3-tiosemicarbazona (**4m**)



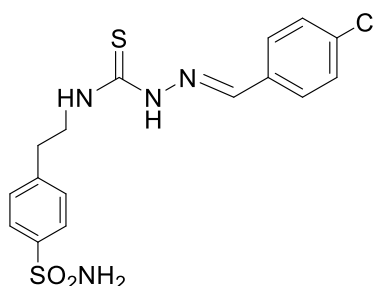
Se empleó la tiosemicarbazida **60c** (200 mg, 0.82 mmol, 1.0 equiv.), 4-metoxibenzaldehído (100 μ L, 0,82 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4l** como un sólido blanco. Rendimiento: 186 mg (58%). P.f: 174 °C ; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.38 (s, 1H, NH), 8.47 (t, 1H, $J_{\text{H,H}}=6.0$ Hz, NH-CH_2), 8.00 (s, 1H, N=C) 7.77 (m, 2H, Ar-H), 7.70 (m, 2H, Ar-H), 7.45 (m, 2H, Ar-H), 7.27 (s, NH_2) 6.98 (m, 2H,Ar-H), 3.80 (s, 3H, OMe), 3.80 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.00 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=8.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ar}$) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 176.8 (CS), 160.7 (C-4'), 143.5, 142.1, 142.0 (N=CH, C-4''', C-1'''), 129.1, 128.8, 126.7, 125.8, 114.2 (Ar-C), 55.3 (OMe), 44.4 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 34.8 (Ar-CH_2) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{NaO}_3\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 415.0869, found: 415.0862.

9.3.3.2.14. 1-(4'-Fluorofenilmetileno)-4-N-[2''-(4'''-sulfonamido)fenil]etil-3-tiosemicarbazona (4n)



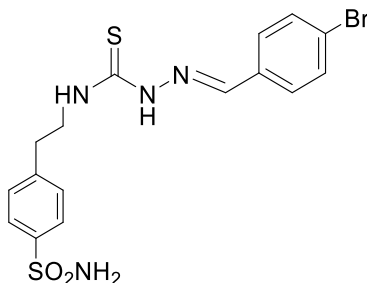
Se empleó la tiosemicarbazida **60c** (200 mg, 0.82 mmol, 1.0 equiv.), 4-fluorobenzaldehído (88 μ L, 0.81 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4n** como un sólido blanco. Rendimiento: 205 mg (66%). P.f: 242 °C; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.52 (s, 1H, NH), 8.61 (t, 1H, $J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, NH-CH_2), 8.05 (s, 1H, N=CH), 7.84 (m, 2H, Ar-H), 7.78 (m, 2H, Ar-H), 7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.28 (m, 4H, Ar-H, NH_2), 3.80 (c, 2H, $J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.01 (t, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$); $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 177.1 (C=S), 163.0 (d, $^1J_{\text{H,H}} = 247.1$ Hz, C-4'), 143.5, 142.2, 140.9, (CH=N, C-4''', C-1'''), 130.8 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 3.7$ Hz, C-1'), 129.4 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, C-2'/C-6'), 129.1, 125.9 (Ar-C), 115.8 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 21.7$ Hz, C-3'/C-5'), 44.6 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 34.6 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$), ppm; HRESI-MS calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{FN}_4\text{NaO}_2\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 403.0669, encontrado: 403.0670.

9.3.3.2.15. 1-(4'-Clorofenilmetileno)-4-N-[2''-(4'''-sulfonamido)fenil]etil-3-tiosemicarbazona (4o)



Se empleó la tiosemicarbazida **60c** (200 mg, 0.82 mmol, 1.0 equiv.), 4-clorobenzaldehído (115 mg, 0.82 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4o** como un sólido blanco. Rendimiento: 150 mg (46%). P.f: 235 °C; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.57 (s, 1H, NH), 8.65 (t, 1H, $J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, NH-CH_2), 8.05 (s, 1H, N=C) 7.80 (m, 4H, Ar-H), 7.48 (m, 4H, Ar-H), 7.29 (s, 2H, NH_2), 3.81 (c, 2H, $J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.02 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$); $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 177.1 (CS), 143.5, 142.2, 140.7, (CH=N, C-4''', C-1'''), 134.3, 133.2, 129.1, 128.9, 128.8, 125.9 (Ar-C), 44.6 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 34.6 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$) ppm; HRESI-MS calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{NaO}_2\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 419.0374, encontrado: 419.0367.

9.3.3.2.16. 1-(4'-Bromofenilmetileno)-4-N-[2''-(4'''-sulfonamido)fenil]etil-3-tiosemicarbazona (4p)



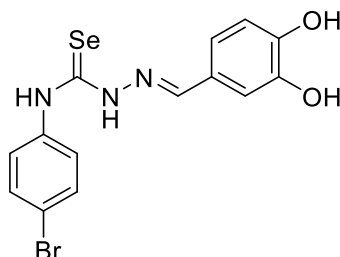
Se empleó la tiosemicarbazida **60c** (200 mg, 0.82 mmol, 1.0 equiv.), 4-bromobenzaldehído (88 μ L, 0.82 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **4p** como un sólido blanco. Rendimiento: 187 mg (52%). P.f: 244 °C; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.57 (s, 1H, NH), 8.64 (t, 1H, $J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, NH-CH_2), 8.03 (s, 1H, N=CH), 7.76 (m, 4H, Ar-H), 7.63 (m, 2H, Ar-H'), 7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.28 (s, 2H, NH_2), 3.80 (c, 2H, $J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.02 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$). $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 177.6 (CS), 143.5, 142.2, 140.8 (N=CH , C-4''', C-1'''), 133.9, 132.1, 129.5, 126.3, 123.5 (Ar-C), 44.6 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 34.6 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$); HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}^{79}\text{BrN}_4\text{O}_2\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 441.0049, encontrado: 441.0049; m/z calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}^{81}\text{BrN}_4\text{O}_2\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 443.0029, encontrado: 443.0026.

9.3.4. Selenosemicarbazonas fenólicas

9.3.4.1. Procedimiento general para la preparación de las selenosemicarbazonas 5a,b

Una disolución de las selenosemicarbazidas **57f,g** (150 mg), los correspondientes aldehídos aromáticos (1.0 equiv.) y AcOH (1.0 equiv.) en EtOH (5 mL) se reflujoó durante 4 h. Después de enfriar a t.a., los productos precipitaron, se filtraron y se lavaron con EtOH frío.

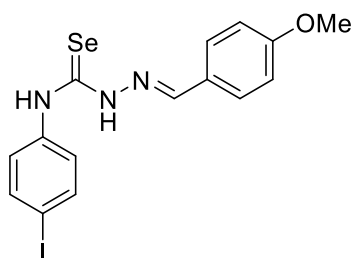
9.3.4.1.1. 4-(4'-Bromofenil)-1-(3'',4''-Dihidroxibencilideno)-3-selenosemicarbazona (5a)



Se empleó la selenosemicarbazida **57f** (150 mg, 0.52 mmol), 3,4-dihidroxibenzaldehído (70 mg, 0.52 mmol, 1.0 equiv.) y AcOH (30 μ L, 0.52 mmol).

Rendimiento: 88 mg (42%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 11.98 (s, 1H, NH), 10.30 (s, 1H, Ar-NH), 9.33 (s, 1H, OH), 8.98 (s, 1H, OH) 8.13 (s, 1H, N=CH), 7.48 (m, 4H, Ar-Ho, Ar-Hm, H-2', H-6'), 7.34 (d, 1H, $J_{2'',6''}= 2.2$ Hz, H-2''), 7.12 (dd, 1H, $J_{2'',6''}= 2.2$ Hz, H-2'', $J_{5'',6''}= 8.2$ Hz, H-6''), 6.77 (d, 1H, $J_{5'',6''}= 8.2$ Hz, H-5'') ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.7 (CSe), 148.8 (C-4'), 146.1 (C-3'), 139.8 (C=N), 131.3 (C-1), 128.9 (C-4), 125.66 (C-2, C-6), 121.5 (C-1'), 120.9 (C-6'), 118.5 (C-3, C-5), 116.0 (C-5'), 114.8 (C-3') ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}^{79}\text{BrN}_3\text{O}_2^{80}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 413.9351, encontrado: 413.9345; m/z calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}^{81}\text{BrN}_3\text{O}_2^{80}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 415.9329, encontrado: 415.9330.

9.3.4.1.2. 1-(4'-Metoxibencilideno)-4-(4''-yodofenil)-3-selenosemicarbazona (5b)



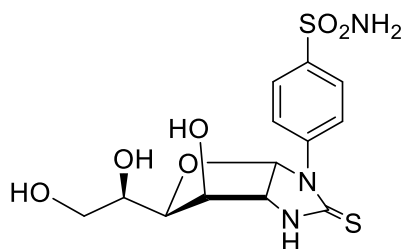
Se empleó la selenosemicarbazida **57g** (150 mg, 0.30 mmol), *p*-anisaldehído (53 μL , 0.30 mmol, 1.0 equiv.) y AcOH (25 μL , 0.30 mmol). Rendimiento: 33 mg (16%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.10 (s, 1H, NH), 10.37 (s, 1H, Ar-NH), 8.23 (s, 1H, N=CH), 7.87 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.72 (m, 2H, Ar-Ho), 7.38 (m, 2H, Ar-Hm), 6.99 (m, 2H, H-3'', H-5''), 3.81 (s, 3H, CH_3) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.5 (CSe), 161.1 (C-4'), 144.6 (C=N), 139.8 (C-1''), 136.7 (C-2'', C-6''), 129.6 (C-2', C-6'), 128.8 (C-3'', C-5''), 126.3 (C-1'), 114.2 (C-3', C-5'), 90.7 (C-4''), 55.3 (OMe) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{IN}_3\text{NaO}^{80}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 481.9239, encontrado: 481.9230.

9.3.5. Imidazolidina-2-tionas derivadas de arilsulfonamidas

9.3.5.1. Método general para la preparación de las imidazolidinas 6-8

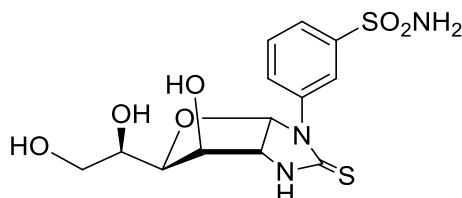
Una mezcla del hidrocloreto de *D*-glucosamina/galactosamina/manosamina comercial (1.0 equiv.), NaHCO_3 (1.0 equiv.), y el isotiocianato correspondiente (1.2 equiv.) en una mezcla $\text{H}_2\text{O-EtOH}$ 2:1 (6 mL) se calienta a 60 °C durante 4 h. A continuación, una vez desaparecida la materia prima en c.c.f., se añade AcOH (1.5 mL), y la disolución resultante se refluje durante 2 h; transcurrido ese tiempo, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 10:1).

9.3.5.1.1. 1-(4'-Sulfonamidofenil)-(1,2-didesoxi- α -D-glucofurano)[2,1-d]imidazolidina-2-tiona (6a)



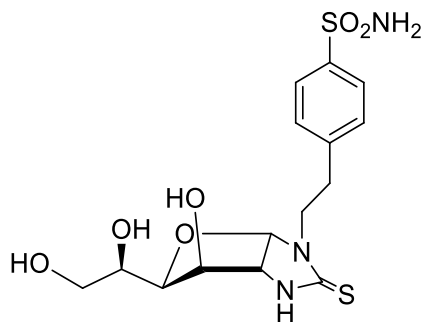
Se empleó el isotiocianato **59a** (119 mg, 0.56 mmol, 1.1 equiv.), clorhidrato de D-glucosamina (100 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.), NaHCO₃ (38 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **6a** como un aceite amarillo. Rendimiento: 118 mg (72%); [α]_D²³ +54 (c 0.11, MeOH); ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 7.91 (m, 2H, Ar-H), 7.80 (m, 2H, Ar-H), 6.10 (d, 1H, $J_{1'',2''}$ = 6.3 Hz, H-1''), 4.35 (d, 1H, $J_{2'',3''}$ = 0, H-2''), 4.34 (d, 1H, $J_{3'',4''}$ = 2.7 Hz, H-3''), 3.98 (ddd, 1H, $J_{4'',5''}$ = 8.2 Hz, $J_{5'',6a''}$ = 2.7 Hz, $J_{5'',6b''}$ = 5.5 Hz, H-5''), 3.80 (dd, 1H, $J_{6a'',6b''}$ = 11.4 Hz, H-6a''), 3.64 (dd, 1H, H-6b'') ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, CD₃OD) δ 183.1 (CS), 143.6, 142.6 (C-1', C-4'), 127.9 (C-2', C-6'), 127.6 (C-3', C-5'), 96.4 (C-1''), 81.1 (C-4''), 75.9 (C-3''), 70.1 (C-5''), 67.0 (C-2''), 65.1 (C-6'') ppm; ESI-MS *m/z* calcd. para C₁₃H₁₇N₃NaO₆S₂ ([M+Na]⁺): 398.05, encontrado: 398.05.

9.3.5.1.2. 1-(3'-Sulfonamidofenil)-(1,2-didesoxi- α -D-glucofurano)[2,1-d]imidazolidina-2-tiona (6b)



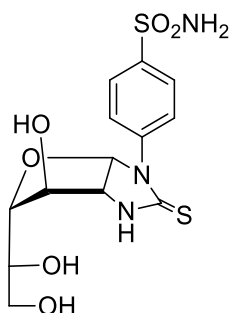
Se empleó el isotiocianato **59b** (119 mg, 0.56 mmol, 1.1 equiv.), clorhidrato de D-glucosamina (100 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.), NaHCO₃ (38 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **6b** como un aceite amarillo. Rendimiento: 106 mg (65%); [α]_D²³ +35 (c 0.15, MeOH); ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 8.11 (t, 1H, $J_{2',4'}=J_{2',6'}$ = 1.8 Hz, H-2'), 7.83 (ddd, 1H, $J_{H,H}$ = 1.0 Hz, $J_{H,H}$ = 1.6 Hz, $J_{H,H}$ = 7.8 Hz, Ar-H), 7.78 (ddd, 1H, $J_{H,H}$ = 1.0 Hz, $J_{H,H}$ = 1.9 Hz, $J_{H,H}$ = 8.1 Hz, Ar-H), 7.57 (t, 1H, H-5'), 6.08 (d, 1H, $J_{1'',2''}$ = 6.3 Hz, H-1''), 4.34 (d, 1H, $J_{2'',3''}$ = 0, H-2''), 4.33 (d, 1H, $J_{3'',4''}$ = 2.5 Hz, H-3''), 4.00-3.91 (m, 2H, H-4'', H-5''), 3.82 (dd, 1H, $J_{5'',6''a}$ = 2.5 Hz, $J_{6a'',6b''}$ = 11.4 Hz, H-6a''), 3.66 (dd, 1H, $J_{5'',6b''}$ = 4.9 Hz, H-6''b) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, CD₃OD) δ 181.9 (CS), 143.6, 139.1 (C-1', C-3'), 131.0 (C-6'), 129.3 (C-5'), 124.8 (C-2'), 124.4 (C-4'), 95.1 (C-1''), 87.9 (C-4''), 74.7 (C-3''), 68.7 (C-5''), 65.7 (C-2''), 63.8 (C-6'') ppm; ESI-MS *m/z* calcd. para C₁₃H₁₇N₃NaO₆S₂ ([M+Na]⁺): 398.05, encontrado: 398.04.

9.3.5.1.3. 1-[2'-(4''-Sulfonamido)fenil]etil-(1,2-didesoxi- α -D-glucofurano)[2,1-d]imidazolidina-2-tiona (6c)



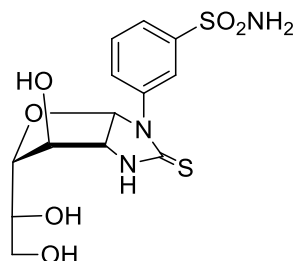
Se empleó el isotiocianato **59c** (200 mg, 0.82 mmol, 1.1 equiv.), clorhidrato de D-glucosamina (148 mg, 0.68 mmol, 1.0 equiv.), NaHCO_3 (57 mg, 0.68 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **6b** como un sólido blanco. Rendimiento: 160 mg (58%); $[\alpha]_D^{23} +12$ (c 0.62, MeOH); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 7.84 (m, 2H, Ar-H), 7.46 (m, 2H, Ar-H), 5.71 (d, 1H, $J_{1''',2'''} = 6.7$ Hz, H-1'''), 4.20 (d, 1H, $J_{2''',3'''} = 0$, $J_{3''',4'''} = 2.5$ Hz, H-3'''), 4.09 (d, 1H, H-2'''), 3.92 (ddd, 1H, $J_{4''',5'''} = 3.1$ Hz, $J_{5''',6'''}^a = 6.1$ Hz, $J_{5''',6'''}^b = 8.7$ Hz, H-5'''), 3.86-3.50 (m, 5H, H-4''', H-6''', a, H-6''', b, CH_2), 3.15 (m, 1H, CH^A), 3.02 (m, 1H, CH^B) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, CD_3OD) δ 183.7 (CS), 145.3, 143.0 (C-1'', C-4''), 130.5, 127.4 (Ar-C), 94.6 (C-1'''), 80.6 (C-4'''), 76.2 (C-3'''), 70.2 (C-5'''), 66.3 (C-2'''), 65.2 (C-6''), 46.7 (N- CH_2), 35.1 (CH_2 -Ar) ppm; ESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{NaO}_6\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 426.08, encontrado: 426.08.

9.3.5.1.4. 1-(4'-Sulfonamidofenil)-(1,2-didesoxi- α -D-galactofurano)[2,1-d]imidazolidina-2-tiona (**7a**)



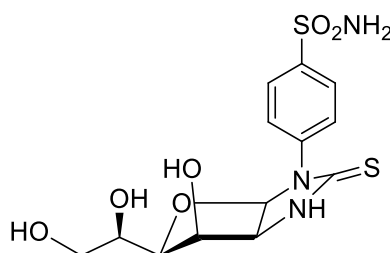
Se empleó el isotiocianato **59a** (119 mg, 0.56 mmol, 1.1 equiv.), clorhidrato de D-galactosamina (100 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.), NaHCO_3 (38 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **7a** como un aceite amarillo. Rendimiento: 110 mg (68%); $[\alpha]_D^{23} +87$ (c 0.88, DMSO); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 7.92 (m, 4H, Ar-H), 6.10 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 6.7$ Hz, H-1''), 4.40 (dd, 1H, $J_{2'',3''} = 1.3$ Hz, $J_{3'',4''} = 2.8$ Hz, H-3''), 4.22 (dd, 1H, H-2''), 4.03 (m, 1H, H-5'), 3.62 (m, 3H, H-4'', H-6a'', H-6b'') ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, CD_3OD) δ 183.1 (CS), 143.6, 142.6 (C-1', C-4'), 127.9 (C-2', C-6'), 127.6 (C-3', C-5'), 96.4 (C-1''), 81.1 (C-4''), 75.9 (C-3''), 70.1 (C-5''), 67.0 (C-2''), 65.1 (C-6'') ppm.

9.3.5.1.5. 1-(3'-Sulfonamidofenil)-(1,2-didesoxi- α -D-galactofurano)[2,1-d]imidazolidina-2-tiona (**7b**)



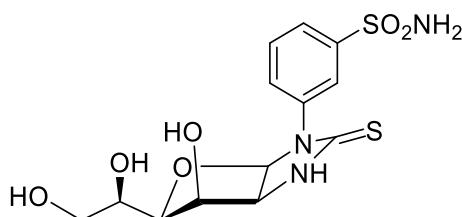
Se empleó el isotiocianato **59b** (119 mg, 0.56 mmol, 1.1 equiv.), clorhidrato de D-galactosamina (100 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.), NaHCO₃ (38 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **7a** como un aceite amarillo. Rendimiento: 101 mg (66%); $[\alpha]_D^{23} +85$ (c 0.65, MeOH); ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 8.25 (t, 1H, $J_{2',4'} = J_{2',6'} = 1.9$ Hz, H-2'), 7.92 (ddd, 1H, $J_{H,H} = 1.0$ Hz, $J_{H,H} = 2.1$ Hz, $J_{H,H} = 7.9$ Hz, Ar-H), 7.81 (ddd, 1H, $J_{H,H} = 1.2$ Hz, $J_{H,H} = 1.9$ Hz, $J_{H,H} = 8.0$ Hz, Ar-H), 7.56 (t, 1H, H-5'), 6.08 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 6.5$ Hz, H-1''), 4.31 (m, 1, H-3'), 4.26 (dd, 1H, H-2'), 4.41 (dd, 1H, $J_{2'',3''} = 1.3$ Hz, $J_{3'',4''} = 2.8$ Hz, H-3''), 4.26 (dd, 1H, H-2'), 4.05 (m, 1H, H-5'), 3.64 (m, 3H, H-4'', H-6a'', H-6b'') ppm; ESI-MS *m/z* calcd. para C₁₃H₁₇N₃NaO₆S₂ ([M+Na]⁺): 398.05, encontrado: 398.05.

9.3.5.1.5. 1-(4'-Sulfonamidofenil)-(1,2-didesoxi-α-D-manofurano)[2,1-d]imidazolidina-2-tiona (**8a**)



Se empleó el isotiocianato **59a** (119 mg, 0.56 mmol, 1.1 equiv.), clorhidrato de D-manosamina (100 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.), NaHCO₃ (38 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.). Se obtuvo **8a** como un aceite amarillo. Rendimiento: 111 mg (73%); $[\alpha]_D^{23} +55$ (c 0.33, MeOH); ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 7.91 (m, 4H, Ar-H), 5.95 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 6.7$ Hz, H-1''), 4.64 (t, 1H, $J_{2'',3''} = 6.0$ Hz, H-3''), 4.46 (t, 1H, H-2''), 4.02-3.53 (m, 4H, H-5'', H-4''', H-6a'', H-6b'') ppm.

9.3.5.1.6. 1-(3'-Sulfonamidofenil)-(1,2-dideoxy-α-D-manofurano)[2,1-d]imidazolidina-2-tiona (**8b**)



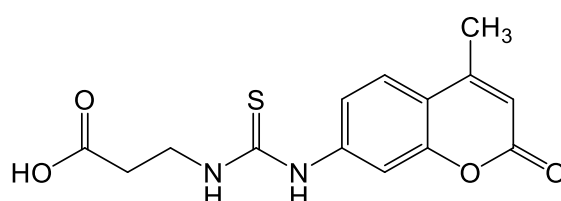
Se empleó el isotiocianato **59b** (119 mg, 0.56 mmol, 1.1 equiv.), clorhidrato de D-manosamina (100 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.), NaHCO₃ (38 mg, 0.44 mmol, 1.0 equiv.).

Se obtuvo **8b** como un aceite amarillo. Rendimiento: 94 mg (62%); $[\alpha]_D^{23} +83$ (c 0.22, MeOH); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 8.22 (m, 1H, Ar-H), 7.88 (m, 1H, Ar-H), 7.78 (m, 1H, Ar-H), 7.55 (m, 1H, Ar-H), 5.92 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 6.6$ Hz, H-1''), 4.65 (t, 1H, $J_{2'',3''} = 5.7$ Hz, H-3''), 4.5 (t, 1H, H-2''), 3.98-3.50 (m, 4H, H-5'', H-4''', H-6a'', H-6b'') ppm.

9.3.6. Método general para la preparación de cumarinas derivadas de aminoácidos.

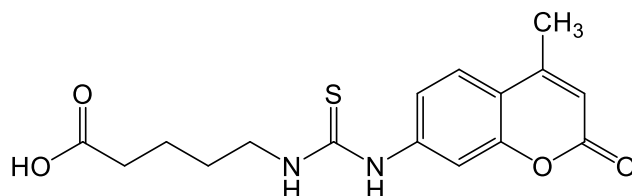
A una solución del isotiocianato **91** (100 mg, 0.45 mmol, 1.0 equiv.) en piridina (5 mL) se agrega el aminoácido (1.0 equiv.) y se deja agitando a 50 °C durante 24 h. Posteriormente se concentra a sequedad y al residuo se le agrega MeOH, formándose un precipitado que se filtra y se seca.

9.3.6.1. *N*-(2'-Carboxietil)-*N'*-(4''-metil-2''-oxo-2''*H*-cromen-7''-il)tiourea (**9a**)



Se empleó β -alanina (40 mg, 0.45 mmol, 1.0 equiv.), obteniéndose **9a** como un sólido de color marrón. Rendimiento: 80 mg (57%). P.f: 164 °C; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.37 (s, 1H, OH), 10.02 (s, 1H, NH-Ph), 8.13 (ta, 1H, $J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, NH-CH₂), 7.81 (da, 1H, $J_{6'',8''} = 1.8$ Hz, H-8''), 7.67 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8.8$ Hz, H-5''), 7.38 (dd, 1H, H-6''), 6.25 (da, 1H, $J_{3'',\text{CH}_3} = 0.8$ Hz, H-3''), 3.69 (c, 2H, $J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, NH-CH₂), 2.57 (t, 2H, CH₂-COOH), 2.39 (da, 3H, CH₃) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 180.1 (CS), 173.4 (COOH), 160.3 (C-2''), 153.5 (C-4''), 153.8 (C-9''), 143.3 (C-7''), 125.7 (C-5''), 117.7 (C-6''), 115.2 (C-10''), 112.4 (C-3''), 107.9 (C-8''), 39.8 (CH₂COOH), 33.1 (CH₂NH), 18.2 (CH₃) HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 307.0747, encontrado: 307.0743.

9.3.6.2. *N*-(4'-Carboxibutil)-*N'*-(4''-metil-2''-oxo-2''*H*-cromen-7''-il)tiourea (**9b**)

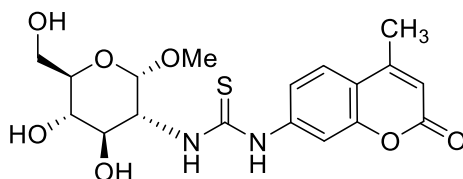


Se empleó ácido 5-aminovalérico (107 mg, 0.45 mmol, 1.0 equiv.), obteniéndose **9b** como un sólido de color marrón. Rendimiento: 105 mg (63%). P.f: 182 °C. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.54 (s, 1H, NH-Ph), 9.14 (s, 1H, NH), 7.85 (sa, 1H, H-8''), 7.63 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8.4$ Hz, H-5''), 7.43 (dd, 1H, $J_{6'',8''} = 1.9$ Hz, H-6''), 6.21 (da, 1H, $J_{3'',\text{CH}_3} = 0.9$ Hz, H-3''), 3.48 (da, 2H, NH-CH₂), 2.36 (da, 3H, CH₃), 2.8 (m, 2H, CH₂), 1.54 (m, 4H, 2CH₂) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 180.4 (CS), 175.6 (COOH), 160.5 (C-2''), 153.7 (C-4''),

153.6 (C-9''), 144.1 (C-7''), 125.7 (C-5''), 117.8 (C-6''), 115.0 (C-10''), 112.3 (C-3''), 107.8 (C-8''), 44.1 (CH₂COOH), 35.1 (CH₂), 28.1 (CH₂), 22.5 (CH₂), 18.4 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₁₆H₁₉N₂O₄S ([M+H]⁺): 335.1060, encontrado: 335.1055.

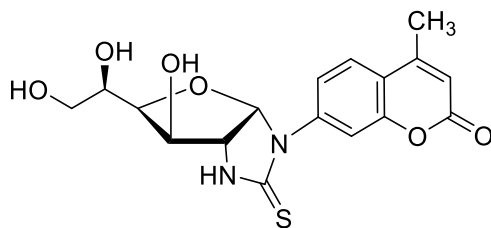
9.3.7. Preparación de glicoconjugados derivados de cumarinas

9.3.7.1. *N*-(Metil 2-desoxi- α -D-glucopiranosid-2-il)-*N'*-(4'-metil-2'-oxo-2'*H*-cromen-7'-il)tiourea (10)



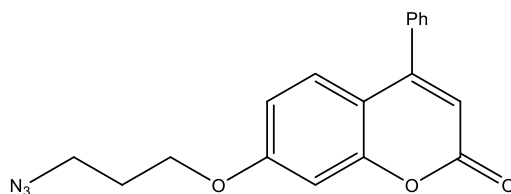
Una disolución del isotiocianato derivado de cumarina **91** (159 mg, 0.73 mmol) y el metil glicósido **95** (141 mg, 0.73 mmol, 1.0 equiv.) en una mezcla EtOH–H₂O 2:1 (5 mL) se calentó a 60 °C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂-MeOH 10:1). Se obtuvo **10** como un sólido de color blanco. Rendimiento: 214 mg (71%). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.08 (s, 1H, NH), 8.01 (d, *J*_{8,6} = 1.8 Hz, 1H, H-8), 7.92 (d, 1H, *J*_{NH,2-Glc} = 7.9 Hz, NH) 7.69 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.7 Hz, H-5), 7.44 (dd, 1H, *J*_{6,5} = 8.7 Hz, *J*_{6,8} = 1.8 Hz, H-6), 6.26 (s, 1H, H-3), 5.12 (d, 1H, *J*_{OH,4} = 5.7 Hz, OH 4-Glc), 5.06 (d, 1H, *J*_{OH,3} = 5.8 Hz, OH 3-Glc), 4.84 (d, 1H, *J*_{1,2} = 3.5 Hz, H-1 Glc), 4.60 (t, 1H, *J*_{OH,6} = 5.9 Hz, OH 6-Glc), 4.33 (m, 1H, H-2 Glc), 3.66 (ddd, 1H, *J*_{6a,6b} = 11.8 Hz, *J*_{6a,OH} = 5.7 Hz, *J*_{6a,5} = 1.9 Hz, H-6a Glc), 3.54 (m, 1H, H-3 Glc), 3.51 (ddd, 1H, *J*_{6b,6a} = 11.8 Hz, *J*_{6b,OH} = *J*_{6b,5} = 5.8 Hz, H-6b Glc), 3.36 (m, 1H, H-5 Glc), 3.29 (s, 3H, OCH₃), 3.22 (ddd, 1H, *J*_{H,H} = 14.5 Hz, *J*_{H,H} = 8.7 Hz, *J*_{4,OH} = 5.7 Hz, H-4 Glc), 2.40 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, DMSO-*d*₆) δ 180.1 (C=S), 160.1 (C-2), 153.3 (C-9), 153.2 (C-4), 143.3 (C-7), 125.5 (C-5), 117.2 (C-6), 115.0 (C-10), 112.2 (C-3), 107.3 (C-8), 97.1 (C-1 Glc), 73.0 (C-5 Glc), 71.0 (C-3 Glc), 70.6 (C-4 Glc), 60.7 (C-6 Glc), 58.1 (C-2 Glc), 54.4 (OCH₃), 18.1 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₁₈H₂₂N₂NaO₇S ([M+Na]⁺): 433.1040, encontrado: 433.1034.

9.3.7.2. 1-(4'-Metil-2'-oxo-2'*H*-cromen-7'-il)-(1,2-didesoxi- α -D-glucofurano)[2,1-*d*]imidazolidina-2-tiona (11)



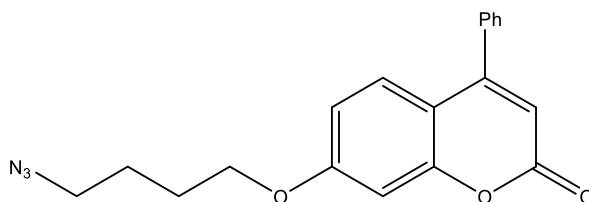
A una solución del isotiocianato derivado de cumarina **91** (1.1 equiv.) en EtOH (5 mL) calentada a 60 °C se añade una disolución del clorhidrato de glucosamina (195 mg, 0.90 mmol, 1.0 equiv.) y NaHCO₃ (77 mg, 0.90 mmol, 1.0 equiv.) en una mezcla EtOH–H₂O 3:1. La mezcla resultante se mantuvo a 60 °C durante 4 h; a continuación se añadió AcOH (150 µL, 2.7 mmol, 3.0 equiv.) y se refluje durante 2 h. A continuación, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂-MeOH 10:1). Rendimiento: 323 mg (95%). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.47 (s, 1H, NH), 7.78 (d, 1H, *J*_{5',6'} = 8.6 Hz, H-5'), 7.69 (d, 1H, *J*_{8',6'} = 2.0 Hz, H-8), 7.64 (dd, 1H, *J*_{6',5'} = 8.6 Hz, *J*_{6',8'} = 2.0 Hz, H-6), 6.87 (d, 1H, *J*_{H,H} = 1.1 Hz, H-3'), 6.14 (d, *J*_{1,2} = 6.2 Hz, 1H, H-1 Glc), 5.47 (d, *J*_{OH,3} = 4.9 Hz, 1H, OH 3-Glc), 4.80 (d, *J*_{OH,5} = 6.1 Hz, 1H, OH 5-Glc), 4.56 (t, *J*_{OH,6} = 5.6 Hz, 1H, OH 6-Glc), 4.21 (d, *J*_{2,1} = 6.3 Hz, 1H, H-2 Glc), 4.14 (dd, *J*_{3,OH} = 4.8 Hz, *J*_{3,4} = 2.2 Hz, 1H, H-3 Glc), 3.74 (m, 1H, H-5 Glc), 3.68 (dd, *J*_{4,5} = 8.6 Hz, *J*_{4,3} = 2.2 Hz, 1H, H-4 Glc), 3.58 (ddd, *J*_{6a,6b} = 11.3 Hz, *J*_{6a,OH} = 5.3 Hz, *J*_{6a,5} = 2.6 Hz, 1H, H-6a Glc), 3.41 (ddd, *J*_{6b,6a} = 11.4 Hz, *J*_{6b,OH} = *J*_{6b,5} = 5.6 Hz, 1H, H-6b Glc), 2.43 (d, *J*_{H,H} = 1.0 Hz, 3H, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, DMSO-*d*₆) δ 180.3 (C=S), 159.9 (C-2), 153.1 (C-4), 152.7 (C-9), 142.2 (C-7), 125.2 (C-5), 121.5 (C-6), 117.3 (C-10), 113.7 (C-3), 112.7 (C-8), 94.3 (C-1 Glc), 79.7 (C-4 Glc), 73.6 (C-3 Glc), 68.1 (C-5 Glc), 65.3 (C-2 Glc), 63.7 (C-6 Glc), 18.1 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₁₇H₁₈N₂NaO₆S ([M+Na]⁺): 401.0778, encontrado: 401.0774.

9.3.7.3. 7-(3'-Azidopropil)-4-fenilcumarina (12)



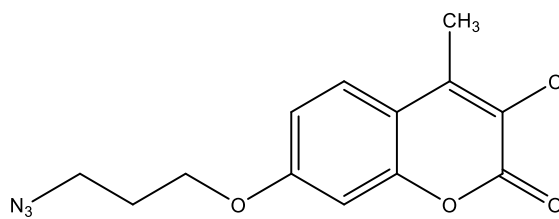
Se utilizó el método general descrito en la **Sección 9.2.16**, empleándose la cumarina **101d** (500 mg, 1.39 mmol) y NaN₃ (453 mg, 6.7 mmol). Rendimiento: 400 mg (90%). P.f.: 67 °C; ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.43 (m, 3H, Ar-H_m, Ar-H_p), 7.36 (m, 2H, Ar-H_o), 7.31 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.9 Hz, H-5), 6.80 (s, 1H, H-8), 6.71 (d, 1H, H-6), 6.14 (s, 1H, H-3), 4.04 (m, 2H, CH₂), 3.72 (m, 2H, CH₂), 1.98 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 160.7 (C-7), 160.2 (C-2), 154.8 (C-9), 154.7 (C-4), 134.41 (Ar-C_{ipso}), 128.6 (Ar-C_p), 127.8 (x2) (Ar-C_m), 127.3 (x2) (Ar-C_o), 127.0 (C-5), 111.6 (C-6), 111.4 (C-10), 110.6 (C-3), 100.6 (C-8), 64.0 (C-1'), 46.9 (C-3'), 27.4 (C-2'); HRESI-MS *m/z* calcd. para C₁₈H₁₅N₃NaO₃ ([M+Na]⁺): 344.1006, encontrado: 344.1003.

9.3.7.4. 7-(4'-Azidobutil)-4-fenilcumarina (13)



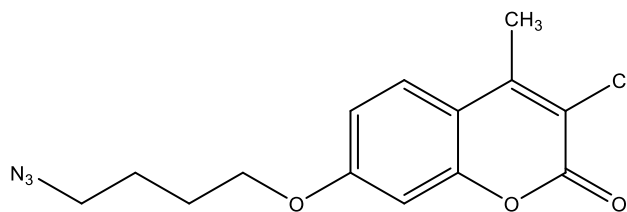
Se utilizó el método general descrito en la **Sección 9.2.16**, empleándose la cumarina **101e** (500 mg, 1.34 mmol) y NaN_3 (436 mg, 6.7 mmol). Rendimiento: 435 mg (97%). P.f.: 35-36 °C; ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7.52 (m, 3H, Ar-Hm, Ar-Hp), 7.44 (m, 2H, Ar-Ho), 7.38 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.9$ Hz, H-5), 6.87 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.5$ Hz, 1H, H-8), 6.79 (dd, 1H, H-6), 6.21 (s, 1H, H-3), 4.07 (t, 2H, $J_{1',2'} = 6.1$ Hz, H-1'), 3.39 (t, 2H, $J_{4',3'} = 6.7$ Hz, H-4'), 1.93 (m, 2H, H-2'), 1.81 (m, 2H, H-3') ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) δ 162.1 (C-7), 161.3 (C-2), 156.1 (C-9), 155.9 (C-4), 135.6 (Ar-Cipso), 129.7 (Ar-Cp), 128.9 (x2) (Ar-Cm), 128.5 (x2) (Ar-Co), 128.1 (C-5), 112.7 (C-6), 112.6 (C-10), 111.9 (C-3), 101.6 (C-8), 67.9 (C-1'), 51.2 (C-4'), 26.4 (C-2'), 25.7 (C-3') ppm.

9.3.7.5. 7-(3'-Azidopropil)-3-cloro-4-metilcumarina (14)



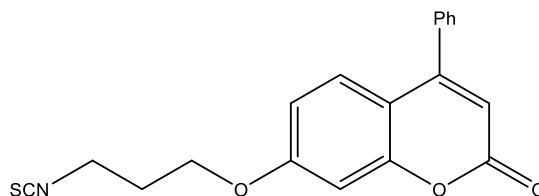
Se utilizó el método general descrito en la **Sección 9.2.16**, empleándose la cumarina **101g** (500 mg, 1.41 mmol) y NaN_3 (492 mg, 7.5 mmol). Rendimiento: 390 mg (89%). P.f.: 62 °C; ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.55 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.9$ Hz, H-5), 6.92 (dd, 1H, $J_{6,8} = 2.5$ Hz, H-6), 6.85 (d, 1H, H-8), 4.14 (t, 2H, $J_{1',2'} = 6.1$ Hz, H-1'), 3.55 (t, 2H, H-3'), 2.12 (s, 3H, CH_3), 1.93 (s, 1H, H-2'), 1.82 (s, 1H, H-2') ppm; ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) δ 161.5 (C-7), 157.3 (C-2), 153.1 (C-9), 147.8 (C-4), 125.9 (C-5), 117.9 (C-3), 113.5 (C-10), 113.1 (C-6), 101.4 (C-8), 65.2 (C-1'), 48.0. (C-3') 30.1 (C-2'), 16.7 (CH_3) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{NaO}_3$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 316.0459, encontrado: 316.0456.

9.3.7.6. 7-(4'-Azidobutil)-3-cloro-4-metilcumarina (15)



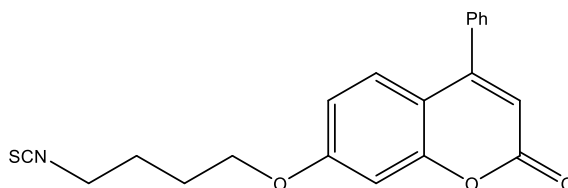
Se utilizó el método general descrito en la **Sección 9.2.16**, empleándose la cumarina **101h** (500 mg, 1.45 mmol) y NaN_3 (472 mg, 7.2 mmol). Rendimiento: 387 mg (87%). P.f.: 50-51 °C; $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.52 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.9$ Hz, H-5), 6.90 (dd, 1H, $J_{6,5} = 8.9$ Hz, $J_{6,8} = 2.4$ Hz, H-6), 6.80 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.4$ Hz, H-8), 4.06 (t, 2H, $J_{1',2'} = 6.1$ Hz, H-1'), 3.39 (t, 2H, $J_{4',3'} = 6.7$ Hz, H-4'), 2.55 (s, 3H, CH_3), 1.93 (m, 2H, H-2'), 1.82 (m, 2H, H-3') ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, CDCl_3) δ 161.9 (C-7), 157.6 (C-2), 153.2 (C-9), 148.1 (C-4), 126.0 (C-5), 117.9 (C-3), 113.4 (C-10), 113.4 (C-6), 101.3 (C-8), 68.0 (C-1'), 51.2 (C-4'), 26.4 (C-2'), 25.7 (C-3'), 16.3 (CH_3) ppm.

9.3.7.7. 4-Fenil-7-(3'-isotiocianatopropoxi)cumarina (16)



Se utilizó el método general descrito en la **Sección 9.2.18**, empleándose la aminocumarina **103d** (500 mg, 1.6 mmol), Et_3N (0.47 mL, 3.3 mmol), tiofosgeno (0.45 mL, 6.0 mol). Se obtiene **16** como un sólido blanco. Rendimiento: 372 mg (69%). P.f.: 127 °C; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.45 (m, 3H, Ar-H_m, Ar-H_p), 7.38 (m, 2H, Ar-H_o), 7.34 (d, 1H, $J_{5,6} = 9.0$ Hz, H-5), 6.81 (d, 1H, $J_{8,6} = 2.5$ Hz, H-8), 6.75 (dd, 1H, H-6), 6.12 (s, 1H, H-3), 4.09 (m, 2H, H-1'), 3.73 (m 2H, H-3'), 2.13 (m, 2H, H-2') ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, CDCl_3) δ 161.9 (C-7), 161.1 (C-2), 160.1 (C-9), 154.6 (C-4), 152.3 (Ar-Cipso), 130.6 (NCS), 129.8 (Ar-C_p), 128.3 (x2) (Ar-C_m), 128.1 (x2) (Ar-C_o), 127.6 (C-5), 113.2 (C-10), 111.8 (C-6), 111.2 (C-3), 100.9 (C-8), 64.5 (C-1'), 41.6 (C-3'), 35.8 (C-2') ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NNaO}_3\text{S}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 360.0665, encontrado: 360.0661.

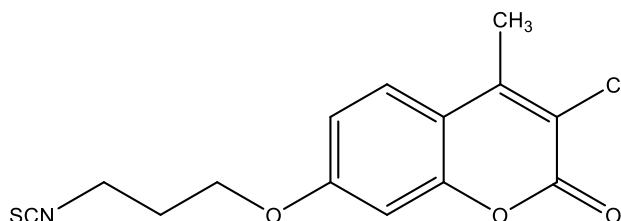
9.3.7.8. 4-Fenil-7-(3'-isotiocianatobutoxi)cumarina (16)



Se utilizó el método general descrito en la **Sección 9.2.18**, empleándose la aminocumarina **103e** (500 mg, 1.6 mmol), Et_3N (0.43 mL, 3.2 mmol), tiofosgeno (0.42 mL, 5.6 mol). Se obtuvo **16** como un sólido blanco. Rendimiento: 400 mg (71%). P.f.:

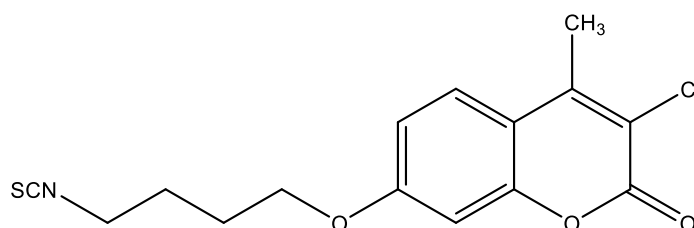
141°C ;¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.52 (m, 3H, Ar-H_m, Ar-H_p), 7.44 (m, 2H, Ar-H_o), 7.39 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.9 Hz, H-5), 6.87 (d, 1H, *J*_{8,6} = 2.5 Hz, H-8), 6.79 (dd, 1H, H-6), 6.21 (s, 1H, H-3), 4.09 (t, 2H, 1H, *J*_{1',2'} = 5.5 Hz, H-1'), 3.64 (t, 2H, *J*_{4',3'} = 6.1 Hz, H-4'), 1.98 (m, 2H, H-2'), 1.94 (m, 2H, H-3') ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 162.0 (C-7), 161.3 (C-2), 156.1 (C-9), 155.9 (C-4), 135.6 (Ar-C_{ipso}), 130.6 (NCS), 129.7 (Ar-C_p), 128.9 (x2) (Ar-C_m), 128.5 (x2) (Ar-C_o), 128.2 (C-5), 112.7 (C-10), 112.6 (C-6), 112.0 (C-3), 101.7 (C-8), 67.6 (C-1'), 44.9 (C-4'), 27.0 (C-3'), 26.3 (C-2') ppm.

9.3.7.9. 3-Cloro-7-(3'-isotiocianatopropoxi)-4-metilcumarina (18)



Se utilizó el método general descrito en la **Sección 9.2.18**, empleándose la aminocumarina **103g** (500 mg, 1.8 mmol), Et₃N (0.52 mL, 3.7 mmol), tiofosgeno (0.50 mL, 7.3 mol). Se obtuvo **18** como un sólido blanco. Rendimiento: 367 mg (66%). P.f.: 67°C; ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.0 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.9 Hz, H-5), 6.38 (d, 1H, *J*_{8,6} = 2.5 Hz, 1H, H-8), 6.30 (dd, 1H, H-6), 2.85 (t, 2H, *J*_{1',2'} = 5.5 Hz, H-1'), 2.27 (s, 3H, CH₃) 1.78 (m, 2H, H-3'), 11.47 (m, 2H, H-2') ppm;. ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 161.1 (C-7), 160.1 (C-2), 154.6 (C-9), 152.3 (C-4), 130.5 (NCS), 125.4 (C-5), 113.2 (C-10), 111.8 (C-6), 111.2.0 (C-3), 100.9 (C-8), 64.5 (C-1'), 20.4 (C-3'), 20.3 (C-2'), 18.0 (CH₃) ppm.

9.3.7.10. 3-Cloro-7-(4'-isotiocianatobutoxi)-4-metilcumarina (19)

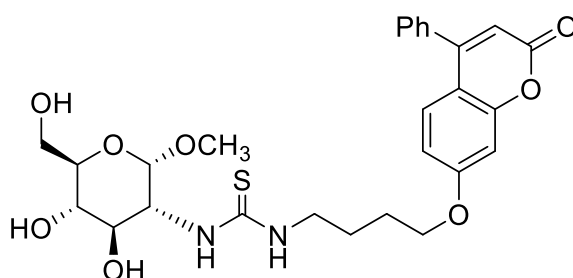


Se utilizó el método general descrito en la **Sección 9.2.18**, empleándose la aminocumarina **103g** (500 mg, 1.7 mmol), Et₃N (0.50 mL, 3.5 mmol), tiofosgeno (0.47 mL, 7.3 mol). Se obtuvo **19** como un sólido blanco. Rendimiento: 373 mg (68%). P.f.: 62 °C; ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.45 (d, 1H, *J*_{5,6} = 8.9 Hz, H-5), 6.83 (dd, 1H, *J*_{6,8} = 2.4 Hz, H-6), 6.73 (d, 1H, H-8), 4.01 (t, 2H, *J*_{1',2'} = 6.1 Hz, H-1'), 3.59 (t, 2H, *J*_{4',3'} = 6.7 Hz, H-4'), 2.10 (s, 3H, CH₃), 1.89 (m, 2H, H-2'), 1.22 (m, 2H, H-3') ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 161.6 (C-7), 157.3 (C-2), 153.0 (C-9), 147.9 (C-4), 125.9 (C-5), 117.9 (C-3), 113.4 (C-10), 113.1 (C-6), 101.3 (C-8), 67.6 (C-1'), 44.8 (C-4'), 26.8 (C-2'), 26.1 (C-3'), 16.1 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₁₅H₁₄ClNNaO₃S ([M+Na]⁺): 346.0275, encontrado: 346.0272.

9.3.8. Método general para la preparación de las glico-tioureas derivadas de cumarinas 20a,b

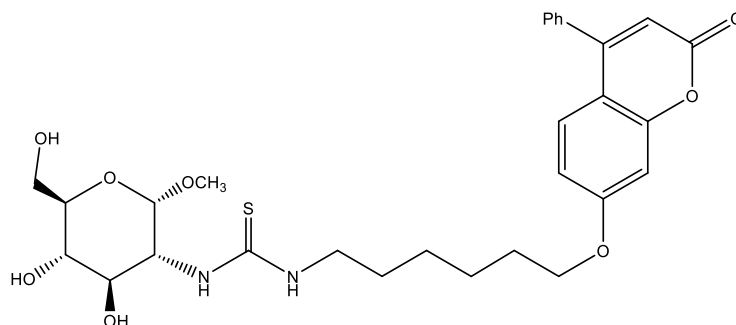
A una disolución del isotiocianato derivado de cumarina **17**, **103f** (1.0 equiv.) en EtOH y calentada a 60 °C, se añadió el metil glicósido **95** (1.0 equiv.) y Et₃N (0.5 mL, 3.6 mmol) disueltos en agua. La mezcla resultante se calentó a 60 °C durante el tiempo indicado en cada caso. A continuación, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 40:1), dando lugar a **20a,b** como espumas blancas.

9.3.8.1. *N*-{4-[7'-(4'-Fenil-2'-oxo-2'-H-cromen-7'-il)oxi]butil}-*N'*-(metil 2-desoxi- α -D-glucopiranosid-2-il)tiourea (**20a**)



Se empleó el isotiocianato **17** (100 mg, 0.29 mmol) en EtOH (15 mL) y el metilglicósido **95** (52 mg, 0.29 mmol) en H₂O (5 mL). La reacción transcurrió durante 8.5 h. Rendimiento: 120 mg (75%). $[\alpha]_D^{23}$: +66 (c 0.15, DMSO); p.f.: 165 °C; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆-(CD₃)₂CO) δ 7.94 (m, 1H, NH), 7.63–7.46 (m, 5H, Ar-H Ph), 7.35 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.9$ Hz, H-5'), 7.16 (sa, 1H, NH), 7.09 (d, 1H, $J_{8',6'} = 2.4$ Hz, H-8'), 6.94 (dd, 1H, H-6'), 6.23 (s, 1H, H-3'), 5.01 (sa, 1H, OH), 4.87 (sa, 1H, OH), 4.75 (da, 1H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, H-1 Glc), 4.52 (t, 1H, $J_{OH,6} = 5.6$ Hz, OH 6-Glc), 4.21 (sa, 1H, H-2 Glc), 4.13 (t, 1H, $J_{H,H} = 6.4$ Hz, CH₂), 3.65 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.6$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.3$ Hz, H-6a Glc), 3.51–3.46 (m, 2H), 3.24 (s, 3H, OMe), 3.17 (t, 1H, $J_{H,H} = 9.1$ Hz, H-3/H-4 Glc), 1.77 (quint, 2H, $J_{H,H} = 6.8$ Hz, CH₂), 1.64 (quint, 2H, $J_{H,H} = 6.5$ Hz, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.9, 160.0 (C-2', C-7'), 155.5, 155.2 (C-4, C-9), 135.0 (Ar-Cipso, Ph) 129.6, 129.2, 128.8, 128.5, 128.4, 127.8 (Ar-C), 112.7, 111.7, 111.2, (C-3', C-6', C-10'), 101.6 (C-8), 97.6 (C-1, Glc), 72.8 (C-5 Glc), 70.7 (C-3, C-4), 68.1 (CH₂O), 60.8 (C-6 Glc), 54.3 (OMe), 25.9, 25.4 (CH₂) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₇H₃₂N₂NaO₈S ([M+Na]⁺): 567.1772, encontrado: 567.1769.

9.3.8.2. N-{6-[7'-(4'-Fenil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il)oxi]hexil}-N'-(metil 2-desoxi- α -D-glucopiranosid-2-il)tiourea (20b)

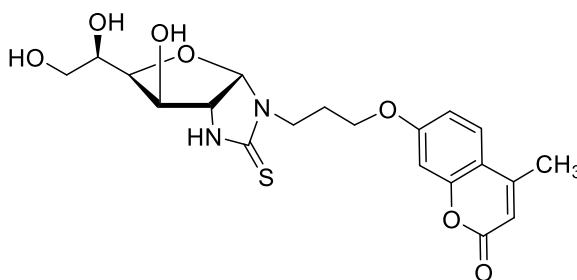


Se empleó el isotiocianato **17** (120 mg, 0.31 mmol) en EtOH (20 mL) y el metilglicósido **95** (55 mg, 0.31 mmol) en H₂O (7 mL). La reacción transcurrió durante 17.5 h. Rendimiento: 160 mg (91%). $[\alpha]_D^{23}$: +58 (c 0.11, DMSO); p.f.: 148°C; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.55 (m, 6H, Ar-H, NH), 7.34 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.9$ Hz, H-5'), 7.12 (sa, 1H, NH), 7.08 (d, 1H, $J_{6',8'} = 2.4$ Hz, H-8'), 6.93 (dd, 1H, H-6'), 6.23 (s, 1H, H-3'), 5.01 (d, 1H, $J_{OH,4} = 5.5$ Hz, OH 4-Glc), 4.85 (sa, OH 3-Glc), 4.74 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, H-1 Glc), 4.54 (t, 1H, $J_{OH,6} = 5.8$ Hz, OH 6-Glc), 4.19 (sa, 1H, H-2), 4.09 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.6$ Hz, OCH₂), 3.64 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 5.2$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.3$ Hz, H-6a), 3.52–3.14 (m, 4H, H-3 Glc, H-4 Glc, H-6b Glc, H-5 Glc), 3.23 (s, 3H, OCH₃), 1.75 (quint, 2H, $J_{H,H} = 6.8$ Hz, CH₂), 1.54–1.34 (m, 6H, 3CH₂) ppm; ¹³C-RMN (MHz, DMSO-*d*₆) δ 183.1 (CS), 162.4 (C-2'), 160.5 (C-7'), 155.9 (C-9'), 155.6 (C-4'), 135.5 (Ar-Cipso, Ph), 130.1 (Ar-Cp, Ph), 129.3 (Ar-C, Ph), 128.9 (Ar-C, Ph). 128.3 (C-5'), 113.3 (C-6') 112.1 (C-10'), 111.6 (C-3'), 102.1 (C-8'), 98.1 (C-1 Glc), 79.7 (C-4 Glc), 73.2 (), 71.8, 71.2, 68.8 (OCH₂), 61.3 (C-6 Glc), 58.5 (C-2 Glc), 54.8 (OMe), 44.2 (N-CH₂), 29.1, 28.9, 26.6, 25.7 (CH₂); HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₉H₃₆N₂NaO₈S ([M+Na]⁺): 595.2085, encontrado: 595.2079.

9.3.9. Método general para la preparación de las imidazolidina-2-tionas derivadas de cumarinas 21–25

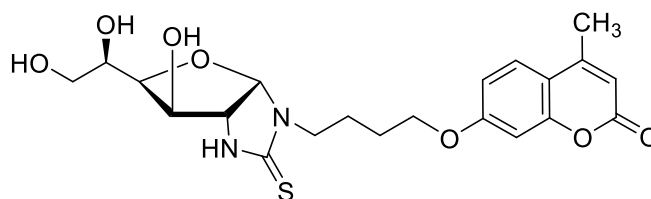
Se emplea el mismo procedimiento descrito en la Sección 9.3.7.2 para el compuesto **11**, utilizándose los isotiocianatos **16–19**, **104**, y los hidrocloruros de D-glucosamina/galactosamina/manosamina.

9.3.9.1. 1-{3'-[7''-(4''-Metil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]propil}-(1,2-didesoxi- α -D-glucofurano)[2,1-*d*]imidazolidina-2-tiona (21a)



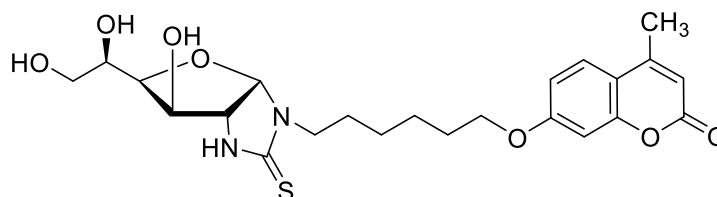
Se empleó hidrocloreuro de D-glucosamina (142 mg, 0.66 mmol), el isotiocianato derivado de cumarina **104a** (200 mg, 0.77 mol), NaHCO₃ (55 mg, 0,66 mmol), AcOH (114 μL, 1.98 mmol). Se obtuvo **21a** como un sólido blanco. Rendimiento: 256 mg (89%). $[\alpha]_D^{23}$: +25 (c 0.52, DMSO); p.f.: 151 °C; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.69 (s, 1H, NH), 7.68 (d, $J_{5'',6''}$ = 8.6 Hz, 1H, H-5''), 6.97 (m, 2H, H-6'', H-8''), 6.20 (d, 1H, J_{3,CH_3} = 1.1 Hz, H-3''), 5.80 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 6.5 Hz, H-1 Glc) 5.3 (d, 1H, $J_{H,H}$ = 4.5 Hz, OH), 4.75 (m, 1H, OH), 4.45 (t, 1H, $J_{H,H}$ = 5.6 Hz), 4.39 (m, 1H), 4.11 (t, 2H, $J_{H,H}$ = 6.7 Hz, OCH₂), 4.02–4.00 (m, 1H, H-3 Glc), 3.99 (d, 1H, H-2 Glc), 3.72-3.62 (m, 3H, H-5 Glc, CH₂), 3.60 (dda, 1H, $J_{5,6a}$ = 4.2 Hz, $J_{6a'',6b''}$ = 11.7 Hz, H-6a'' Glc), 3.38 (dd, 1H, $J_{3'',4''}$ = 2.2 Hz, $J_{4,5}$ = 8.5 Hz, H-4'' Glc), 2.39 (d, 3H, CH₃), 2.08 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 181.7 (CS), 161.7, 160.2 (C-2'', C-7''), 154.7, 153.4 (C-4'', C-9''), 126.4 (C-5''), 113.1, 112.5, 111.1 (C-3'', C-6'', C-10''), 101.2 (C-8''), 92.6 (C-1 Glc), 79.3 (C-4 Glc), 73.9 (C-3 Glc), 68.1 (C-5 Glc), 66.2, 64.6 (C-2 Glc, OCH₂), 63.8 (C-6 Glc), 41.1 (N-CH₂), 29.0 (CH₂), 18.1 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₀H₂₄N₂NaO₇S ([M+Na]⁺): 459.1196, encontrado: 459.1194.

9.3.9.2. 1-{4'-[7''-(4''-Metil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]butil}-(1,2-didesoxi-α-D-glucofurano)[2,1-d]imidazolidina-2-tiona (**21b**)



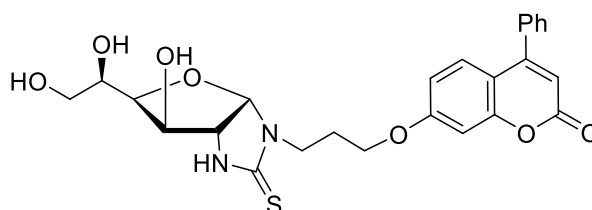
Se empleó hidrocloreuro de D-glucosamina (112 mg, 0.52 mmol), el isotiocianato derivado de cumarina **104b** (200 mg, 0.57 mol), NaHCO₃ (44 mg, 0,52 mmol), AcOH (111 μL, 1.98 mmol). Se obtuvo **21b** como un sólido blanco. Rendimiento: 203 mg (87%). $[\alpha]_D^{23}$: +47 (c 0.35, DMSO); p.f.: 128 °C; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.69 (s, 1H, NH), 7.66 (d, $J_{5'',6''}$ = 9.2 Hz, 1H, H-5''), 7.68 (m, 1H, NH), 6.95 (m, 2H, H-6'', H-8''), 6.20 (d, 1H, J_{3,CH_3} = 1.1 Hz, H-3), 5.78 (d, $J_{1,2}$ = 6.5 Hz, 1H, H-1 Glc), 5.26 (d, 1H, $J_{H,H}$ = 5.1 Hz, OH), 4.69 (d, 1H, $J_{H,H}$ = 6.1 Hz, OH), 4.43 (t, 1H, $J_{H,H}$ = 5.6 Hz, OH 6-Glc), 4.10 (m, 2H, OCH₂), 4.01 (d, 1H, $J_{3,4}$ = 2.5 Hz, H-3 Glc), 3.98 (d, 1H, $J_{2,3}$ = 0 Hz, H-2 Glc), 3.72 (m, 1H, H-5 Glc), 3.58 (m, 3H, H-6a Glc, N-CH₂), 3.39-3.35 (m, 2H, H-4 Glc, H-6b Glc), 2.39 (d, 3H, CH₃), 1.74 (m, 4H, 2CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 181.6 (CS), 161.7 (C-2''), 160.2 (C-7''), 154.7, 153.4 (C-4'', C-9''), 126.4 (C-5''), 113.0 (C-6''), 112.4 (C-10''), 111.0 (C-3''), 101.1 (C-8''), 92.4 (C-1 Glc), 79.3 (C-4 Glc), 74.0 (C-3 Glc), 68.2, 68.0 (C-5 Glc, OCH₂), 64.6 (C-2 Glc), 63.8 (C-6 Glc), 43.5 (N-CH₂), 25.8, 24.3 (CH₂), 18.1 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₁H₂₆N₂NaO₇S ([M+Na]⁺): 473.1353, encontrado: 473.1354.

9.3.9.3. 1-{6'-[7''-(4''-Metil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]hexil}-(1,2-didesoxi- α -D-glucofurano)[2,1-d]imidazolidina-2-tiona (21c)



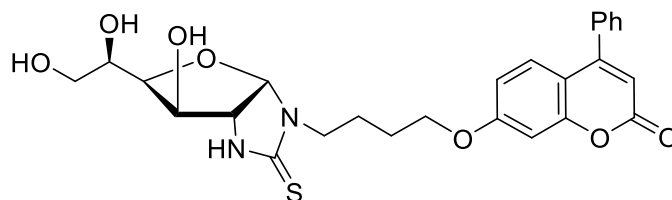
Se empleó hidrocloreuro de D-glucosamina (123 mg, 0.57 mmol), el isotiocianato derivado de cumarina **104c** (200 mg, 0.63 mol), NaHCO₃ (48 mg, 0.57 mmol), AcOH (102 μ L, 1.70 mmol). Se obtuvo **21c** como un sólido blanco. Rendimiento: 250 mg (92%). $[\alpha]_D^{23}$: +77 (c 0.15, DMSO); p.f.: 87 °C; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.67 (s, 1H, NH), 7.58 (m, 1H, H-5''), 6.96 (m, 2H, H-6'', H-8''), 6.21 (d, 1H, $J_{3'',CH_3} = 1.1$ Hz, H-3''), 5.79 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.5$ Hz, H-1 Glc), 5.24 (d, 1H, $J_{H,H} = 4.7$ Hz, OH), 4.68 (d, 1H, $J_{H,H} = 6.5$ Hz, OH), 4.43 (t, 1H, $J_{H,H} = 5.8$ Hz, OH 6-Glc), 4.01 (d, 1H, $J_{3,4} = 2.4$ Hz, H-3 Glc), 3.98 (d, 1H, $J_{2,3} = 0$, H-2 Glc), 3.72 (m, 1H, H-5 Glc), 3.54 (m, 3H, H-6a Glc, N-CH₂), 3.37 (m, 2H, H-4 Glc, H-6b Glc), 2.40 (d, 3H, CH₃), 1.66 (m, 6H, 3CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 181.6 (CS), 161.8 (C-2''), 160.1 (C-7''), 154.7, 153.4 (C-4'', C-9''), 126.4 (C-5''), 113.0 (C-6''), 112.4 (C-10''), 111.0 (C-3''), 101.2 (C-8''), 92.3 (C-1 Glc), 79.3 (C-4 Glc), 74.0 (C-3 Glc), 68.2, 68.0 (C-5 Glc, OCH₂), 64.6 (C-2 Glc), 63.8 (C-6 Glc), 30.7, 25.8, 24.2 (CH₂), 18.1 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₃H₃₀N₂NaO₇S ([M+Na]⁺): 501.1666, encontrado: 501.1658.

9.3.9.4. 1-{3'-[7''-(4''-Fenil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]propil}-(1,2-didesoxi- α -D-glucofurano)[2,1-d]imidazolidina-2-tiona (22a)



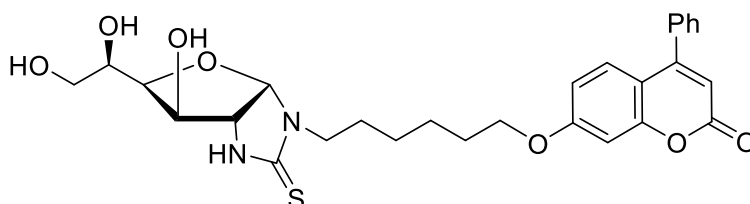
Se empleó hidrocloreuro de D-glucosamina (116 mg, 0.53 mmol), el isotiocianato derivado de cumarina **16** (200 mg, 0.60 mol), NaHCO₃ (45 mg, 0.66 mmol), AcOH (97 μ L, 1.6 mmol). Se obtuvo **21d** como un sólido blanco. Rendimiento: 142 mg (54%). $[\alpha]_D^{23}$: +53 (c 0.125, DMSO); p.f.: 136 °C; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.72 (s, 1H, NH), 7.57 (m, 5H, Ar-H), 7.35 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.7$ Hz, H-5''), 7.08 (d, 1H, $J_{8'',6''} = 2.2$ Hz, H-8), 6.94 (dd, 1H, H-6''), 6.23 (s, 1H, H-3''), 5.79 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.7$ Hz, H-1 Glc), 5.27 (d, 1H, $J_{H,H} = 4.8$ Hz, OH), 4.68 (d, 1H, $J_{H,H} = 6.2$ Hz, OH), 4.43 (m, 1H, OH 6-Glc), 4.13 (m, 2H, OCH₂), 4.00 (m, 2H, H-2 Glc, H-3 Glc), 3.67 (m, 3H, H-5 Glc, H-6a Glc, CH₂), 3.38 (m, 2H, H-6b Glc, H-4 Glc) ppm.

9.3.9.5. 1-{4'-[7''-(4''-Fenil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]butil}-(1,2-didesoxi- α -D-glucofurano)[2,1-d]imidazolidina-2-tiona (22b)



Se empleó hidrocloreuro de D-glucosamina (111 mg, 0.51 mmol), el isotiocianato derivado de cumarina **17** (200 mg, 0.56 mol), NaHCO₃ (48 mg, 0.51 mmol), AcOH (93 μ L, 1.5 mmol). Se obtuvo **21d** como un sólido blanco. Rendimiento: 244 mg (92%). $[\alpha]_D^{23}$: +70 (c 0.21, DMSO); ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.69 (s, 1H, NH), 7.55 (m, 5H, Ar-H, Ph) 7.34 (d, 1H, $J_{5'',6''}$ = 8.6 Hz, H-5''), 7.08 (d, 1H, $J_{8'',6''}$ = 2.4 Hz, H-8''), 6.94 (dd, 1H, H-6''), 6.23 (s, 1H, H-3''), 5.78 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 6.5 Hz, H-1 Glc), 5.24 (d, 1H, $J_{H,H}$ = 5.0 Hz, OH), 4.68 (d, 1H, $J_{H,H}$ = 6.1 Hz, OH), 4.43 (t, 1H, $J_{H,H}$ = 5.7 Hz, OH 6-Glc), 4.13 (ta, 2H, $J_{H,H}$ = 5.4 Hz, OCH₂) 4.01 (d, 1H, $J_{3,4}$ = 2.3 Hz, H-3 Glc), 3.98 (d, $J_{2,3}$ = 0 Hz, H-2 Glc), 3.72 (m, 1H, H-5 Glc), 3.59 (m, 3H, H-6a Glc, N-CH₂), 3.38 (m, 2H, H-6b Glc, H-4 Glc), 1.75 (m, 4H, 2CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 181.7 (CS), 161.9, 160.0 (C-2'', C-7''), 155.5, 155.2 (C-4'', C-9''), 135.0 (Ar-Cipso, Ph), 129.6 (Ar-Cp, Ph), 128.6, 128.4 (Ar-Co, Ar-Cm, Ph), 127.8 (C-5''), 112.8, 111.7, 111.2 (C-3'', C-6'', C-10''), 101.6 (C-8''), 92.3 (C-1 Glc), 79.3 (C-4 Glc), 74.0 (C-3 Glc), 68.2, 68.1 (OCH₂, C-5 Glc), 64.6 (C-2 Glc), 63.8 (C-6 Glc), 43.5 (C-4') 25.8 (C-2'), 24.3 (C-3') ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₆H₂₈N₂NaO₇S ([M+Na]⁺): 535.1509, encontrado: 535.1509.

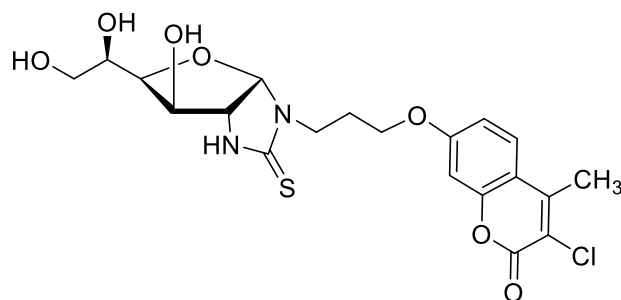
9.3.9.6. 1-{6'-[7''-(4''-Fenil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]hexil}-(1,2-didesoxi- α -D-glucofurano)[2,1-d]imidazolidina-2-tiona (22c)



Se empleó hidrocloreuro de D-glucosamina (100 mg, 0.46 mmol), el isotiocianato derivado de cumarina **104f** (200 mg, 0.50 mol), NaHCO₃ (38 mg, 0.46 mmol), AcOH (83 μ L, 1.3 mmol). Se obtuvo **22c** como un sólido blanco. Rendimiento: 216 mg (87%). $[\alpha]_D^{23}$: +70 (c 0.21, DMSO); ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.63 (s, 1H, NH), 7.56 (m, 5H Ar-H, Ph), 7.34 (d, 1H, $J_{5'',6''}$ = 8.9 Hz, H-5''), 7.08 (d, 1H, $J_{6'',8''}$ = 2.4 Hz, H-8''), 6.94 (dd, 1H, H-6''), 6.22 (s, 1H, H-3''), 5.76 (d, $J_{1,2}$ = 6.5 Hz, 1H, H-1 Glc), 5.25 (d, 1H, $J_{H,H}$ = 4.9 Hz, OH), 4.69 (d, 1H, $J_{H,H}$ = 6.2 Hz, OH), 4.43 (t, 1H, $J_{H,H}$ = 5.7 Hz, OH 6-Glc), 4.08 (ta, 2H, $J_{H,H}$ = 6.4 Hz, OCH₂), 4.00 (d, 1H, $J_{3,4}$ = 2.4 Hz, H-3 Glc), 3.97 (d, 1H, $J_{2,3}$ = 0 Hz, H-2 Glc), 3.72 (m, 1H, H-5 Glc), 3.57 (s, 1H, H-6a Glc), 3.45 (ta, $J_{H,H}$ = 7.1 Hz, N-CH₂), 3.35 (m, 2H, H-4, H-6b), 1.75 (quint, 2H, $J_{H,H}$ = 6.6 Hz, CH₂), 1.66-1.29 (m, 6H, 3CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz,

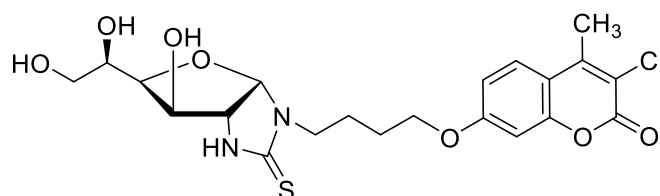
DMSO-*d*₆) δ 181.5 (CS), 161.9, 160.0 (C-2'', C-7''), 155.4, 155.1 (C-4'', C-9''), 135.0 (Ar-Cipso, Ph), 129.5 (Ar-Cp, Ph), 128.8, 128.3 (Ar-Co, Ar-Cm, Ph), 127.7 (C-5''), 112.7, 111.6, 111.1 (C-3'', C-6'', C-10''), 101.6 (C-8''), 92.3 (C-1 Glc), 79.2 (C-4 Glc), 73.9 (C-3 Glc), 68.3, 68.2 (OCH₂, C5 Glc), 64.4 (C-2 Glc), 63.8 (C-6 Glc), 43.7 (N-CH₂), 28.3, 27.4, 25.9, 25.1 (CH₂) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₈H₃₂N₂NaO₇S ([M+Na]⁺): 563.1822, encontrado: 563.1811.

9.3.9.7. 1-{3'-[7''-(3''-Cloro-4''-metil-2''-oxo-2''-H-cromen-7''-il)oxi]propil}-(1,2-didesoxi- α -D-glucofurano)[2,1-*d*]imidazolidina-2-tiona (23a)



Se empleó hidrocloreuro de D-glucosamina (126 mg, 0.58 mmol), el isotiocianato derivado de cumarina **18** (200 mg, 0.64 mol), NaHCO₃ (50 mg, 0.58 mmol), AcOH (105 μ L, 1.7 mmol). Se obtuvo **22c** como un sólido blanco. Rendimiento: 207 mg (76%). $[\alpha]_D^{23}$: +67 (c 0.15, DMSO); p.f: 128 °C; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.72 (s, 1H, NH), 7.68 (d, *J*_{5'',6''} = 8.9 Hz, 1H, H-5''), 6.97 (m, 2H, H-6'', H-8''), 6.20 (d, 1H, *J*_{3'',CH3} = 1.1 Hz, H-3''). 5.80 (d, 1H, *J*_{1,2} = 6.9 Hz, H-1 Glc) 5.30 (d, 1H, *J*_{H,H} = 4.9 Hz, OH), 4.72 (d, 1H, *J*_{H,H} = 5.2 Hz, OH), 4.44 (t, 1H, *J*_{H,H} = 5.3 Hz, OH 6-Glc), 4.11 (t, 2H, *J*_{H,H} = 6.0 Hz, OCH₂), 4.01 (m, 2H, H-2 Glc, H-3 Glc), 3.72-3.62 (m, 3H, H-5 Glc, N-CH₂), 3.56 (m, 1H, H-6a Glc), 3.38 (m, 2H, H-6b Glc, H-4 Glc), 2.40 (d, 3H, CH₃), 2.08 (m, 2H, CH₂); ¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 181.7 (CS), 161.7, 160.1 (C-2'', C-7''), 154.7, 153.4 (C-4'', C-9''), 126.4 (C-5''), 113.0, 112.4, 111.0 (C-3'', C-6'', C-10''), 101.2 (C-8''), 92.6 (C-1 Glc), 79.3 (C-4 Glc), 73.9 (C-3 Glc), 69.8 (OCH₂), 68.1 (C-5 Glc), 66.2, 63.7 (C-2, C-6 Glc), 30.7 (N-CH₂), 18.1 (CH₃) ppm.

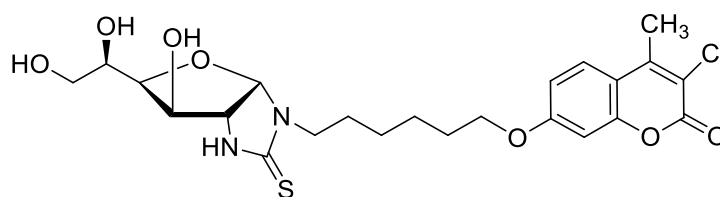
9.3.9.8. 1-{4'-[7''-(3''-Cloro-4''-metil-2''-oxo-2''-H-cromen-7''-il)oxi]butil}-(1,2-didesoxi- α -D-glucofurano)[2,1-*d*]imidazolidina-2-tiona (23b)



Se empleó hidrocloreuro de D-glucosamina (126 mg, 0.58 mmol), el isotiocianato derivado de cumarina **19** (200 mg, 0.62 mol), NaHCO₃ (50 mg, 0.58 mmol), AcOH (105 μ L, 1.7 mmol). Se obtuvo **23b** como un sólido blanco. Rendimiento: 214 mg (76%). $[\alpha]_D^{23}$: +45 (c 0.30, DMSO); p.f: 127 °C; ¹H.RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.58 (s, 1H, NH),

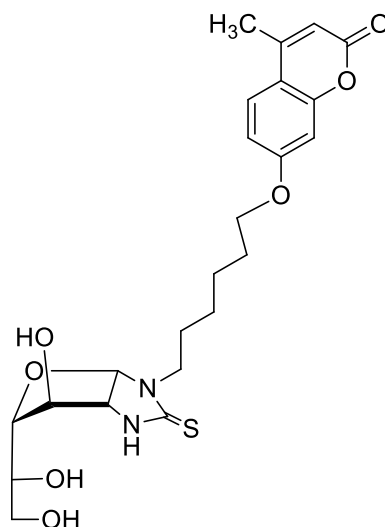
7.73 (m, 1H, H-5''), 7.00 (m, 2H, H-6'', H-8''), 5.78 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.8$ Hz, H-1 Glc), 5.26 (d, 1H, $J_{H,H} = 4.4$ Hz, OH), 4.69 (d, 1H, $J_{H,H} = 6.8$ Hz, OH), 4.43 (t, 1H, $J_{H,H} = 5.7$ Hz, OH 6-Glc), 4.11 (m, 2H, OCH₂), 4.00 (d, 1H, $J_{3,4} = 2.3$ Hz, H-3 Glc), 3.98 (d, 1H, $J_{2,3} = 0$ Hz, H-2 Glc), 3.72 (m, 1H, H-5 Glc), 3.61-3.52 (m, 2H, H-6a Glc, CH₂), 3.39 (m, 2H, H-4, H-6b Glc), 2.52 (s, 3H, CH₃), 1.75 (m, 4H, 2CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 181.6 (CS), 161.7, 156.4, 152.6, 148.8 (C-2'', C-4'', C-7'', C-9''), 126.9 (C-5''), 116.0, 113.0, 112.6 (C-3'', C-6'', C-10''), 101.1 (C-8''), 92.4 (C-1 Glc), 79.3 (C-4 Glc), 74.0 (C-3 Glc), 68.2 (x2) (C-5 Glc, OCH₂), 64.6 (C-2 Glc), 63.8 (C-6 Glc), 43.5 (N-CH₂), 25.8, 24.2 (CH₂), 16.0 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₁H₂₅ClN₂NaO₇S ([M+Na]⁺): 507.0963, encontrado: 507.0958.

9.3.9.9. 1-{6'-[7''-(3''-Cloro-4''-metil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]hexil}-(1,2-didesoxi-α-D-glucofurano)[2,1-*d*]imidazolidina-2-tiona (23c)



Se empleó hidrocloreuro de D-glucosamina (120 mg, 0.56 mmol), el isotiocianato derivado de cumarina **104i** (200 mg, 0.61 mol), NaHCO₃ (47 mg, 0.56 mmol), AcOH (101 μL, 1.6 mmol). Se obtuvo **23c** como un sólido blanco. Rendimiento: 230 mg (82%). $[\alpha]_D^{23}$: +39 (c 0.12, DMSO); p.f.: 167 °C; ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.64 (s, 1H, NH), 7.67 (m, 1H, H-5''), 6.97 (m, 2H, H-6'', H-8''), 6.20 (d, 1H, $J_{H,H} = 1.1$ Hz, H-3''), 5.76 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.5$ Hz, H-1 Glc), 5.25 (d, 1H, $J_{H,H} = 5.0$ Hz, OH), 4.68 (d, 1H, $J_{H,H} = 6.2$ Hz, OH), 4.43 (t, 1H, $J_{H,H} = 5.9$ Hz, OH 6-Glc), 4.08 (ta, 2H, $J_{H,H} = 6.4$ Hz, OCH₂), 3.99 (d, 1H, $J_{3,4} = 2.4$ Hz, H-3 Glc), 3.97 (d, 1H, $J_{2,3} = 0$ Hz, H-2 Glc), 3.70 (m, 1H, H-5), 3.57 (ddd, 1H, $J_{5,6a} = 2.9$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.2$ Hz, H-6a), 3.45 (ta, 2H, $J_{H,H} = 7.4$ Hz, N-CH₂), 3.38-3.29 (m, 2H, H-4, H-6b Glc), 2.39 (d, 1H, CH₃), 1.75 (quint, 2H, $J_{H,H} = 7.4$ Hz, CH₂), 1.59 (m, 2H, CH₂), 1.44 (m, 2H, CH₂), 1.31 (quint, 2H, $J_{H,H} = 6.4$ Hz, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 181.5 (CS), 161.8, 160.2 (C-2'', C-7''), 154.8, 153.4 (C-6'', C-9''), 126.4 (C-5''), 113.0, 112.4, 111.0 (C-3'', C-6'', C-10''), 101.2 (C-8''), 92.4 (C-1 Glc), 79.3 (C-4 Glc), 74.0 (C-3 Glc), 68.3 (x2) (C-5 Glc, OCH₂), 64.5 (C-2 Glc), 63.8 (C-6 Glc), 43.8 (N-CH₂), 28.3, 27.5, 26.0, 25.2 (CH₂), 18.1 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₃H₂₉ClN₂NaO₇S ([M+Na]⁺): 535.1276, encontrado: 535.1269.

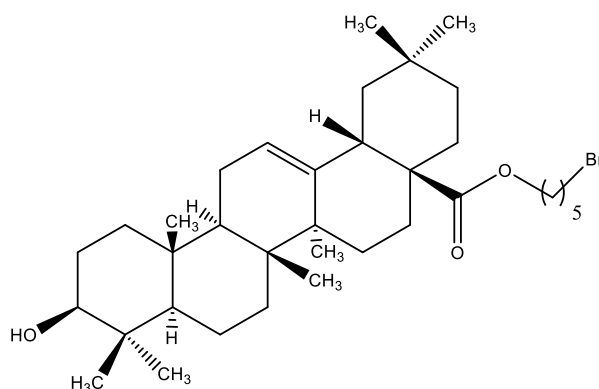
9.3.9.10. 1-{4'-[7''-(4''-metil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]hexil}-(1,2-didesoxi- α -D-glucofurano)[2,1-d]imidazolidina-2-tiona (24)



Se empleó hidrocloreuro de D-galactosamina (123 mg, 0.57 mmol), el isotiocianato derivado de cumarina **104c** (200 mg, 0.63 mol), NaHCO₃ (48 mg, 0.57 mmol), AcOH (102 μ L, 1.7 mmol). Se obtuvo **24** como un sólido blanco. Rendimiento: 223 mg (86%). $[\alpha]_D^{23}$: +46 (c 0.22, DMSO); ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.71 (s, 1H, NH), 7.67 (m, 1H, H-5''), 6.97 (m, 2H, H-6'', H-8'') 6.21 (d, 1H, $J_{H,H} = 1.1$ Hz, H-3''), 5.72 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.9$ Hz, H-1 Glc), 5.40 (m, 1H, OH), 4.57 (m, 1H, OH), 4.39 (m, 1H, OH), 4.08 (ta, 2H, $J_{H,H} = 6.2$ Hz, N-CH₂), 3.97 (d, 1H, $J = 6.9$ Hz), 3.74 (dd, 1H, $J = 2.8$ Hz, $J = 6.9$ Hz), 3.66 (m, 1H), 2.39 (d, 3H, CH₃), 1.75 (quint, 2H, $J_{H,H} = 6.9$ Hz, CH₂), 1.59 (m, 2H, CH₂), 1.42 (m, 2H, CH₂), 1.33 (m, 2H, CH₂) ppm; 180.8 (CS), 161.8, 160.1 (C-2'', C-7''), 154.7, 153.4 (C-4'', C-9''), 126.4 (C-5''), 113.0, 112.4, 111.0 (C-6'', C-10'', C-3''), 92.2 (C-1 Gal), 87.3 (C-4 Gal), 72.4, 70.4 (C-3, C-5 Gal), 65.9 (C-2 Gal), 63.0 (C-6 Gal), 28.3, 26.9, 26.0, 25.1 (CH₂), 18.1 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₃H₃₀N₂NaO₇S ([M+Na]⁺): 501.1666, encontrado: 501.1661.

9.3.10. Sales de trifenil fosfonio derivadas de OA

9.3.10.1. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 5'-bromopentilo (26)



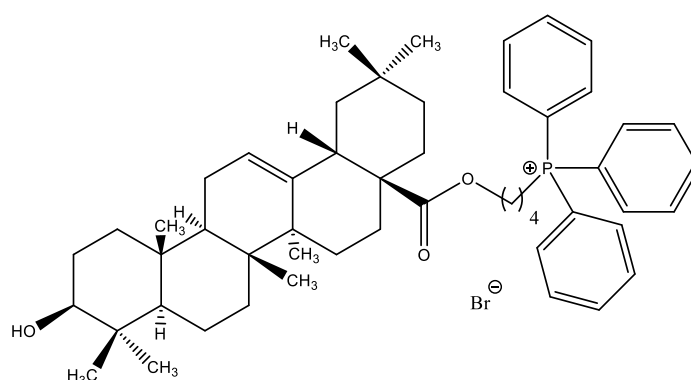
Se utilizó el procedimiento descrito en la **Sección 9.2.19**; para ello se empleó OA (200 mg, 0.44 mmol), 1,5-dibromopentano (300 μ L, 2.19 mmol), K₂CO₃ (60.4 mg, 0.44

mmol) y DMF (5 mL). La purificación mediante cromatografía en columna (ciclohexano–AcOEt 98:2→95:5) condujo a **26** como un aceite amarillo. Rendimiento: 178 mg (67%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 5.25 (t, 1H, $J_{11a,12} = J_{11b,12} = 3.4$ Hz, H-12), 3.97 (m, 2H, CO_2CH_2), 3.39 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.7$ Hz, CH_2Br), 3.18 (dd, 1H, $J_{2\alpha,3} = 5.0$ Hz, $J_{2\beta,3} = 10.5$ Hz, H-3), 2.84, (dd, 1H, $J_{18,19\alpha} = 13.5$ Hz, $J_{18,19\beta} = 4.2$ Hz, H-18), 1.96-1.80 (m, 5H, CH, CH_2 , H-11'), 1.68-1.49 (m, 11H, H-1a, H-2a, H-6a, H-9, H-19a, H-2', H-11', CH), 1.45-1.27 (m, 21H, H-6b, H-21a, CH, 9 CH_2), 1.20-1.16 (m, 1H, H-19b), 1.13 (s, 3H, CH_3), 1.14-1.13 (m, 1H, CH), 1.08-1.03 (m, 1H, CH), 0.98 (s, 3H, CH_3), 0.98-0.89 (m, 1H, H-1b), 0.92 (s, 3H, CH_3), 0.90 (s, 3H, CH_3), 0.89 (s, 3H, CH_3), 0.79-0.70 (m, 1H, H-5), 0.77 (s, 3H, CH_3), 0.73 (s, 3H, CH_3) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ 177.9 (C=O), 144.0 (C-13), 122.4, (C-12), 79.1 (C-3), 64.4 (CO_2CH_2), 55.3 (C-5), 47.7 (C-9), 46.8 (C-17), 46.0 (C-19), 41.8 (C-14), 41.4 (C-18), 39.5 (C-8), 38.9 (C-4), 38.6 (C-1), 37.2, 34.1 (CH_2Br), 34.0 (C-21), 33.2 (CH_3), 33.0, 32.9, 32.6, 30.8 (C-20), 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 28.9, 28.7, 28.3 (CH_3), 28.2, 27.8, 27.3, 26.2, 26.0 (CH_3), 23.7 (CH_3), 23.5, 23.1, 18.5 (C-6), 17.2 (CH_3), 15.7 (CH_3), 15.4 (CH_3) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{35}\text{H}_{57}^{79}\text{BrNaO}_3$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 627.3383, encontrado: 627.3378; m/z calcd. para $\text{C}_{35}\text{H}_{57}^{81}\text{BrNaO}_3$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 629.3363, encontrado: 629.3359.

9.3.10.2. Procedimiento general para la preparación de las sales de trifenilfosfonio **27a-d**

A una disolución del bromuro correspondiente **26**, **125a,c,d** (1.0 equiv.) en acetonitrilo se le añade Ph_3P (5.0 equiv.). La mezcla de reacción se calienta a 115 °C durante 24 horas en un tubo Fischer-Porter. Una vez transcurrido ese tiempo, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna utilizando el eluyente indicado en cada caso.

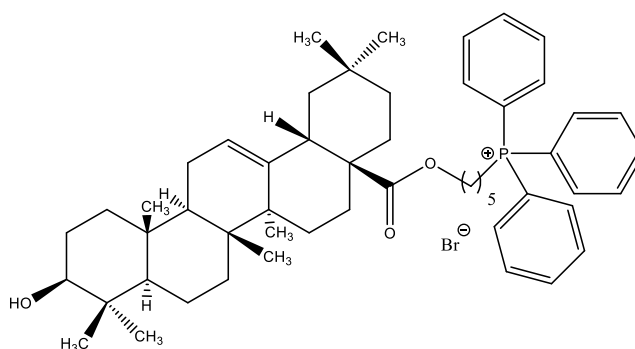
9.3.10.2.1. Bromuro de 4'-(trifenilfosfonio)butil-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oato) (**27a**)



Se empleó el bromuro **125a** (100 mg, 0.17 mmol), Ph_3P (222 mg, 0.85 mmol), MeCN (7.5 mL). La cromatografía en columna (CH_2Cl_2 –MeOH 80:1→10:1) condujo a **27a** como un sólido blanco. Rendimiento: 110 mg (78%). $[\alpha]^{25} +32$ (c 0.85, CH_2Cl_2); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.91-7.67 (m, 15H, 3 Ph), 5.15 (t, 1H, $J_{11a,12} = J_{11b,12} = 3.3$ Hz, H-12), 4.07 (m, 4H, CO_2CH_2 , CH_2Br), 3.21 (m, 1H, H-3), 2.75 (dd, 1H, $J_{18,19\alpha} = 14.0$ Hz, $J_{18,19\beta} = 3.6$ Hz, H-18), 2.17-2.08 (m, 2H), 1.89-1.77 (m, 3H), 1.71-1.41 (m, 7H), 1.37-1.16 (m, 10H),

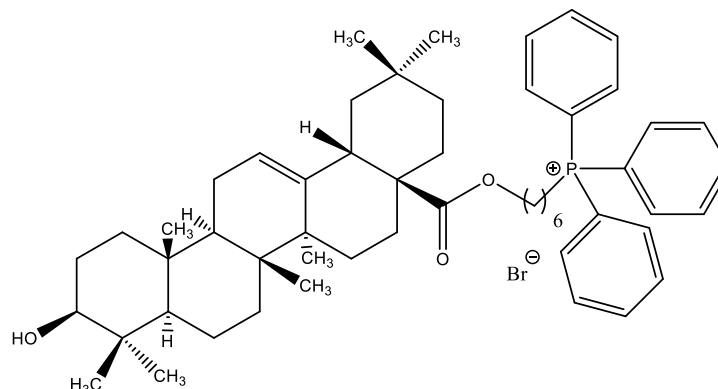
1.12-1.06 (m, 1H), 1.09 (s, 3H, CH₃), 1.0-0.95 (m, 1H), 0.99 (s, 3H, CH₃), 0.91-0.87 (m, 1H), 0.89 (s, 3H, CH₃) 0.87 (s, 3H, CH₃), 0.85 (s, 3H, CH₃), 0.78, (s, 3H, CH₃), 0.70 (d, 1H, $J_{5,6\beta} = 10.2$ Hz, H-5), 0.63 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ 177.7 (C=O), 143.7 (C-13), 135.1 (d, $^4J_{C,P} = 3.0$ Hz, Ar-Cp), 133.8 (d, $^2J_{C,P} = 10.0$ Hz, Ar-Co), 130.6 (d, $^3J_{C,P} = 12.6$ Hz, Ar-Cm), 122.4 (C-12), 118.4 (d, $^1J_{C,P} = 85.9$ Hz, Ar-Cipso), 79.0 (C-3), 63.1 (CO₂CH₂), 55.3 (C-5), 47.6 (C-9), 46.7 (C-19), 45.8, 41.7 (C-14), 41.4 (C-18), 39.3 (C-8), 38.8 (C-4), 38.5 (C-1), 37.1, 33.9 (C-21), 33.2 (CH₃), 32.8, 32.5, 30.7 (C-20), 28.2 (CH₃), 27.7, 27.3, 27.0, 25.9 (CH₃), 23.8 (CH₃), 23.5, 23.1, 22.5 (d, $^1J_{C,P} = 50.5$ Hz, CH₂P), 19.6 (d, $^2J_{C,P} = 3.3$ Hz, CH₂-CH₂P), 18.4 (C-6), 17.1 (CH₃), 15.7 (CH₃), 15.4 (CH₃) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para C₅₂H₇₀O₃P ([M-Br]⁺): 773.5057, encontrado: 773.5051.

9.3.10.2.2. Bromuro de 5'-(trifenilfosfonio)pentil-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oato) (27b)



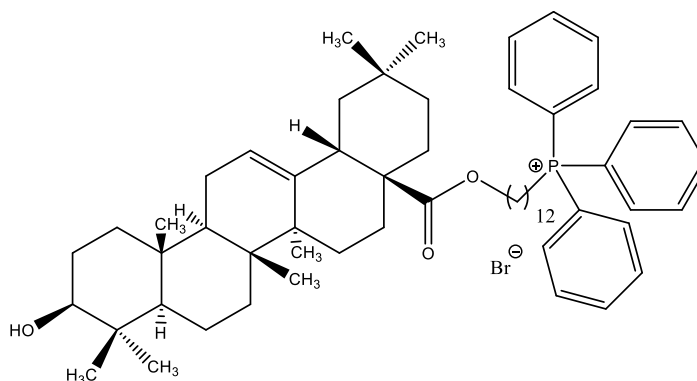
Se empleó el bromuro **125b** (150 mg, 0.25 mmol), Ph₃P (350 mg, 1.48 mmol), MeCN (7.5 mL). La cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 80:1→5:1) condujo a **27b** como un sólido blanco. Rendimiento: 186 mg (86%). $[\alpha]^{25} +33$ (c 0.87, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.88-7.66 (m, 15H, Ar-H), 5.23 (t, 1H, $J_{11a,12} = J_{11b,12} = 3.2$ Hz, H-12), 3.93 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.4$ Hz, CO₂CH₂ ó CH₂P), 3.86 (m, 2H, CO₂CH₂ ó CH₂P), 3.20 (dd, 1H, $J_{2\alpha,3} = 4.9$ Hz, $J_{2\beta,3} = 10.6$ Hz, H-3), 2.79 (dd, 1H, $J_{18,19\alpha} = 13.9$ Hz, $J_{18,19\beta} = 4.1$ Hz, H-18), 1.95-1.20 (m, 25 H), 1.15-1.09 (m, 1H), 1.09 (s, 3H, CH₃), 1.03-0.92 (m, 1H), 0.97 (s, 3H, CH₃), 0.88 (s, 3H, CH₃), 0.87 (s, 3H, CH₃), 0.84 (s, 3H, CH₃), 0.76 (s, 3H, CH₃), 0.70 (d, 1H, $J_{5,6\beta} = 10.4$ Hz, H-5), 0.64 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ 177.8 (C=O), 143.9 (C-13), 135.1 (d, $^4J_{C,P} = 2.9$ Hz, Ar-Cp), 133.9 (d, $^2J_{C,P} = 10.0$ Hz, Ar-Co), 130.6 (d, $^3J_{C,P} = 12.6$ Hz, Ar-Cm), 122.4 (C-12), 118.5 (d, $^1J_{C,P} = 85.8$ Hz, Ar-Cipso), 79.1 (C-3), 63.6 (CO₂CH₂), 55.3 (C-5), 47.7 (C-9), 46.7 (C-19), 46.0, 41.8 (C-14), 41.4 (C-18), 39.4 (C-8), 38.8 (C-4), 38.5 (C-1), 37.1, 34.0 (C-21), 33.2 (CH₃), 32.8, 32.6, 30.8 (C-20), 28.2 (CH₃), 28.1, 27.8, 26.8, 26.6, 25.9 (CH₃), 23.8 (CH₃), 23.5, 23.1, 22.3, 22.2, 18.4 (C-6), 17.2 (CH₃), 15.7 (CH₃), 15.5 (CH₃) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para C₅₃H₇₂O₃P ([M-Br]⁺): 787.5214, encontrado: 787.5210.

9.3.10.2.3. Bromuro de 6'-(trifenilfosfonio)hexil-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oato (27c)



Se empleó el bromuro **125c** (100 mg, 0.16 mmol), Ph_3P (212 mg, 0.81 mmol), MeCN (7.5 mL). La cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 80:1 \rightarrow 10:1) condujo a **27c** como un sólido blanco. Rendimiento: 120 mg (85%). $[\alpha]^{25} +28$ (*c* 0.81, CH_2Cl_2); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.91–7.66 (m, 15 H, Ar-H), 5.23 (t, 1H, $J_{11a,12} = J_{11b,12} = 3.5$ Hz, H-12), 3.93 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.7$ Hz, CO_2CH_2 ó CH_2P), 4.02–3.89 (m, 2H, CO_2CH_2 ó CH_2P), 3.20 (dd, 1H, $J_{2\alpha,3} = 4.8$ Hz, $J_{2\beta,3} = 10.4$ Hz, H-3), 2.82 (dd, 1H, $J_{18,19\alpha} = 14.1$ Hz, $J_{18,19\beta} = 4.5$ Hz, H-18), 1.93–1.21 (m, 26H), 1.17–1.11 (m, 1H), 1.11 (s, 3H, CH_3), 1.04–0.99 (m, 1H), 0.98 (s, 3H, CH_3), 0.97–0.93 (m, 1H), 0.89 (s, 3H, CH_3), 0.88 (s, 3H, CH_3), 0.85 (s, 3H, CH_3), 0.77 (s, 3H, CH_3), 0.71 (d, 1H, $J_{5,6\beta} = 11.6$ Hz, H-5), 0.67 (s, 3H, CH_3) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ 177.8 (C=O), 143.9 (C-13), 135.1 (d, $^4J_{C,P} = 2.9$ Hz, Ar-C p), 133.8 (d, $^2J_{C,P} = 10.0$ Hz, Ar-C o), 130.6 (d, $^3J_{C,P} = 12.5$ Hz, Ar-C m), 122.3 (C-12), 118.5 (d, $^1J_{C,P} = 85.8$ Hz, Ar-C $ipso$), 79.0 (C-3), 64.1 (CO_2CH_2), 55.3 (C-5), 47.6 (C-9), 46.7 (C-19), 45.9, 41.8 (C-14), 41.4 (C-18), 39.4 (C-8), 38.8 (C-4), 38.5 (C-1), 37.1, 33.9 (C-21), 33.2 (CH_3), 32.8, 32.5, 30.8 (C-20), 30.2, 30.0, 28.3, 28.2 (CH_3), 27.7, 27.2, 25.9 (CH_3), 25.8 (CH_3), 23.5 (CH_3), 23.0, 22.8, 22.7, 22.8 (d, $^1J_{C,P} = 49.7$ Hz, CH_2 -P), 22.7, 18.4 (C-6), 17.1 (CH_3), 15.7 (CH_3), 15.4 (CH_3) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para $\text{C}_{54}\text{H}_{74}\text{O}_3\text{P}$ ($[\text{M}-\text{Br}]^+$): 801.5370, encontrado: 801.5357.

9.3.10.2.4. Bromuro de 12'-(trifenilfosfonio)dodecil-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oato (27d)



Se empleó el bromuro **125d** (160 mg, 0.23 mmol), Ph_3P (298 mg, 1.15 mmol),

MeCN (8 mL). La cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 80:1→5:1) condujo a **27d** como un sólido blanco. Rendimiento: 190 mg (85%). $[\alpha]^{25} +42$ (c 0.82, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.84-7.63 (m, 15H, Ar-H), 5.24 (t, 1H, $J_{11a,12} = J_{11b,12} = 3.3$ Hz, H-12), 3.96 (m, 2H, CO₂CH₂), 3.71 (m, 2H, CH₂P), 3.18 (dd, 1H, $J_{2\alpha,3} = 5.1$ Hz, $J_{2\beta,3} = 10.3$ Hz, H-3), 2.83 (dd, 1H, $J_{18,19\alpha} = 13.7$ Hz, $J_{18,19\beta} = 4.4$ Hz, H-18) 1.93-1.81 (m, 4H), 1.66-1.42 (m, 14H), 1.38-1.12 (m, 20H), 1.12-1.05 (m, 1H), 1.10 (s, 3H, CH₃), 1.04-0.98 (m, 1H), 0.95 (s, 3H, CH₃), 0.87 (s, 3H, CH₃), 0.86 (s, 6H, 2CH₃), 0.94-0.82 (m, 1H), 0.74 (s, 3H, CH₃), 0.69 (s, 3H, CH₃), 0.68 (d, $J_{5,6\beta} = 11.2$ Hz, H-5) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ 177.9 (C=O), 143.9 (C-13), 135.1 (d, $^4J_{C,P} = 2.9$ Hz, Ar-Cp), 133.8 (d, $^2J_{C,P} = 9.9$ Hz, Ar-Co), 130.6 (d, $^3J_{C,P} = 12.5$ Hz, Ar-Cm), 122.4 (C-12), 118.5 (d, $^1J_{C,P} = 85.8$ Hz, Ar-Cipso), 79.0 (C-3), 64.4 (CO₂CH₂), 55.3 (C-5), 47.7 (C-9), 46.7 (C-19), 46.0, 41.8 (C-14), 41.4 (C-18), 39.4 (C-8), 38.8, 38.5 (C-1), 37.1, 34.0 (C-21), 33.2 (CH₃), 32.8, 32.6, 30.8 (C-20), 30.6 (d, $^2J_{C,P} = 15.7$ Hz, CH₂-CH₂P), 29.7, 29.4(x2), 29.3, 28.7, 28.2 (CH₃), 27.7, 27.3, 26.2 (CH₃), 26.0, 23.7, 23.5 (CH₃), 23.1, 22.9 (d, $^1J_{C,P} = 49.5$ Hz, CH₂P), 22.8 (d, $^3J_{C,P} = 4.6$ Hz, CH₂-CH₂-CH₂P), 18.4 (C-6), 17.1 (CH₃), 15.7 (CH₃), 15.4 (CH₃) ppm; HRESI-MS: calcd. para C₆₀H₈₆O₃P ([M-Br]⁺): 885.6309, encontrado: 885.6293.