



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Síntesis de compuestos organoselénicos
derivados del hidroxitirosol. Determinación de
su actividad como antioxidantes.**

Antonio Gómez Carretero

Sevilla, Enero de 2012



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Síntesis de compuestos organoselénicos
derivados del hidroxitirosol. Determinación de
su actividad como antioxidantes.**

Memoria presentada por el Licenciado
Antonio Gómez Carretero para optar al
grado de Doctor en Química.

Sevilla, Enero de 2012



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Vº Bº de los Directores de la Tesis

Fernández-Bolaños
Científico Titular del Departamento
de Química Orgánica de la
Universidad de Sevilla

Castilla,
Científico Titular del
Departamento de
Química Orgánica de la
Universidad de Sevilla

Fdo. Dr. Juan Fernández-Bolaños Guzmán,
Científico Titular del Instituto de la Grasa
de Sevilla

Muchas cosas han pasado y cambiado desde aquél 4 de junio de 2007, día en que comencé esta etapa investigadora, y muchas son las personas que de una u otra forma me han acompañado durante esta odisea. A ellas quiero expresar mi más sentido agradecimiento:

A mis directores de Tesis de la Universidad de Sevilla, los Profesores Dr. José María Fernández-Bolaños Guzmán y Dra. Inés Maya Castilla, por su esfuerzo y dedicación en la realización de este trabajo, porque en su día confiaron en mí para llevarlo a cabo y por todo lo que con ellos he aprendido.

A mi director del Instituto de la Grasa (C.S.I.C) Dr. Juan Fernández-Bolaños Guzmán, por haber dirigido una parte importantísima de esta investigación, pero sobre todo por su cariño, su amistad, y porque además de transmitirme conocimientos me ha enseñado valores tan importantes como la humildad que él mismo desprende y que sin duda, vaya donde vaya, intentaré llevar por norte.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación (“Glicodiversificación de moléculas bioactivas”, CTQ2008-02813) y a la Junta de Andalucía (“Optimización del aislamiento de polifenoles de la aceituna. Complejación con ciclodextrinas, derivatización y evaluación como agentes antioxidantes”, P08-AGR-03751, FQM-134, AGR-132), por la financiación de los Grupos de Investigación dentro del cual se ha realizado esta Tesis.

A los servicios de Resonancia Magnética Nuclear y Espectroscopía de Masas de la Universidad de Sevilla por la labor realizada en el registro de espectros de RMN y masas.

Al Profesor Dr. Enrico Marcantoni de la Universidad de Camerino (Italia), por acogerme durante mi estancia de dos meses, y a los compañeros que allí tuve la oportunidad de conocer, especialmente Daniele, Mauro, Serena, Silvia, Simone y Roberto.

A los Profesores Dr. Garry Duthie y Baukje de Roos del Insituto Rowett de la Universidad de Aberdeen (Escocia, RU) por acogerme durante dos meses y permitirme disfrutar y aprender con ellos y su grupo. Gracias también a Eva, Luisa, Phillip y Sharon por hacerme aquellos fríos días mucho más llevaderos.

A los doctores Amancio Carnero y M^a Ángeles López por la magnífica labor desempeñada en los ensayos de actividad anticancerígena en el Instituto de Biomedicina de Sevilla.

Al Director del Departamento de Química Orgánica Dr. Manuel Gómez Guillén, por su ayuda con los trámites administrativos durante todo este tiempo.

A Guillermo Rodríguez por la inestimable ayuda y por los conocimientos que me ha ofrecido durante este tiempo, por su optimismo y su fortaleza para ver siempre el vaso medio lleno, y porque en definitiva es un director más de esta Tesis.

A Óscar López, por tener siempre respuestas para todas mis dudas y por ofrecer la mejor de las versiones de lo que con esfuerzo y trabajo duro se puede llegar a ser en la vida.

A los componentes del grupo de Pared Celular del Instituto de la Grasa (CSIC): Ana, Rafael, Rocío y Sara J., por el compañerismo, amistad y cariño demostrados.

A Blanca Vioque por su colaboración y ayuda con las medidas colorimétricas de pardeamiento en manzanas.

A Elisa y M^a Ángeles, porque no habría palabras, besos ni abrazos que compensasen lo que en estos más de cuatro años me han ofrecido. Por tantas y tantas charlas, dentro y fuera del laboratorio, por haber compartido tantos momentos y experiencias, y por haber traspasado con creces la barrera del compañerismo, convirtiéndose en mis grandes (y espero que eternas) amigas.

A todos los compañeros que han pasado por el laboratorio 3, especialmente Ana, Azucena, Chema, Irene, Javi, Nader, Penélope, Rocío, Sergio y Susana.

Al resto de becarios (ya casi todos doctores) del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla, especialmente Antonio B., Antonio F., Aurora, Bea, Elena M., Elena S., Javi I., Paqui, Rocío C., etc., porque ellos también tienen su importante papel en el desarrollo y progreso de la Química.

A mis compañeros de laboratorio en el Instituto de la Grasa (CSIC): Antonio L., Javi, Fátima, Olivia y Sara V., por todo lo que hemos compartido, pero sobre todo por esas risas diarias que conseguían subir el ánimo cuando los resultados no acompañaban.

Al resto de la plantilla del Instituto de la Grasa (CSIC), que por ser tantos me van a permitir no nombrar, por las conversaciones de pasillo, por esas animadas charlas y debates a la hora de la comida, y por estar siempre dispuestos cuando se les ha necesitado.

Al Profesor Dr. Pedro Cintas de la Universidad de Extremadura, con quien inicié mi carrera investigadora, porque todo lo que aprendí con él, durante mi carrera y mi Tesina, que me enorgullece decir que fue muchísimo, ha servido de base y de cimientos para el desarrollo de mi labor investigadora. También a todos los compañeros que allí dejé, en especial a Diego Airado, que aunque nos separen cientos o miles de kilómetros siempre está dispuesto a colaborar.

A mis compañeros de la carrera de Enología, por los vinos tomados y los que nos quedan por tomar.

A todos los buenos amigos, en especial a esos “Burladeros”, porque las batallitas, lejos de ir quedando atrás, van formando el día a día.

A los locos bajitos, en especial Aitana, Esther, Javier, José Antonio, Lucía, Miranda, Rubén, Soraya y sobre todo mi primo Manuel, porque a su corta edad son las personas de las que más aprendo y las que más me motivan cada día.

A mis cuñad@s, suegros y demás familia política por el aprecio que sienten por mí y que intento devolverles.

A mis hermanos, por su apoyo incondicional e imperecedero.

A mis padres, los verdaderos artífices de todo cuanto consigo en la vida, por su fe ciega y confianza absoluta en mí, por todo lo que me dan y que no se puede expresar ni agradecer.

A Eva, por su eterna espera, y porque el destino quiso otorgarle un papel primordial en mi vida. Porque recorreremos un camino común y juntos hemos de escribir la más importante de todas las Tesis: la de nuestra vida, esa que nos pertenece y cuyos capítulos no comienzan por las palabras “síntesis de...”, ni “ensayos de...”, ni terminan en “conclusiones”, sino que empezaron con un beso y sólo la eternidad determinará si tiene fin.

A todos, e incluso los que no he nombrado pero debería, muchas gracias, con el más profundo sentido del reconocimiento que la palabra gracias puede llegar a tener.

A mis padres

A mis hermanos

A Eva

*“Intenta no volverte un hombre de éxito,
sino volverte un hombre de valor”.*

Albert Einstein.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	9
RESUMEN/SUMMARY	17
RELACIÓN DE COMPUESTOS	25
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	31
OBJETIVOS DE LA TESIS	56
2. SÍNTESIS DE DOPAMINA Y GLICOSIL DERIVADOS DE DOPAMINA A PARTIR DE HIDROXITIRO SOL	61
2.1. Introducción y antecedentes	63
2.1.1. Dopamina. Efectos fisiológicos.	63
2.1.2. Síntesis de dopamina	69
2.1.3. Síntesis de glicosil derivados de dopamina	66
2.2. Resultados y discusión	77
2.2.1. Síntesis de dopamina	77
2.2.2. Síntesis de glicosil derivados de dopamina	84
3. SÍNTESIS DE SELENOUREAS, SELENUROS Y DISELENUROS DE HIDROXITIRO SOL.	91
3.1. Introducción y antecedentes	93
3.1.1. Selenoureas. Importancia biológica	93
3.1.2. Síntesis de selenuros y diselenuros	98

3.2. Resultados y discusión	104
3.2.1. Síntesis de selenoureas	104
3.2.2. Síntesis de selenuros y diselenuros derivados de hidroxitirosol	110
4. TIOUREAS DERIVADAS DE HIDROXITIRO SOL. REACCIONES CON DDQ Y FORMACIÓN DE 2-AMINO-1,3-BENZOTIAZEPINAS	121
4.1. Introducción y antecedentes	123
4.1.1. Propiedades de las tioureas	123
4.1.2. Transformación de tioureas en 2-amino-dihidro y 2-imino-tetrahidro-1,3-benzotiazepinas por oxidación con DDQ	128
4.2. Resultados y discusión	132
4.2.1. Tioureas derivadas de dopamina	132
4.2.2. Formación de 2-amino-dihidro y 2-imino-tetrahidro-1,3-benzotiazepinas por oxidación de tioureas con DDQ	133
5. PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	141
5.1. Introducción y antecedentes	143
5.1.1. Medida de la capacidad antioxidante	143
5.1.2. Inhibición de la actividad tirosinasa	151

5.1.3. Ensayos <i>ex vivo</i> . Inhibición de la peroxidación microsomal.	161
5.1.4. Ensayos <i>in vivo</i> . Inhibición de la melanosis en camarones.	165
5.2. Resultados y discusión	168
5.2.1. Ensayos <i>in vitro</i> .	169
5.2.1.1. Poder reductor del hierro.	169
5.2.1.2. Actividad antirradical.	178
5.2.1.3. Inhibición de la oxidación primaria del ácido linoleico en emulsión. Método del tiocianato férrico	189
5.2.1.4. Inhibición de la oxidación secundaria del ácido linoleico en emulsión. Método del ácido tiobarbitúrico (TBA).	196
5.2.1.5. Inhibición de la actividad tirosinasa.de hongos <i>in vitro</i>	205
5.2.2. Ensayos <i>ex vivo</i> .	234
5.2.2.1. Inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas.	234
5.2.2.2. Ensayos de actividad anticancerígena	249
5.2.3. Ensayos <i>in vivo</i> .	251
5.2.3.1. Inhibición del pardeamiento en manzanas.	251

5.2.3.2. Inhibición de la melanosis en camarones	255
6.1.FORMACIÓN DE ISOXAZOLES CON EL CATALIZADOR CeCl₃/NaI	267
6.1. Introducción y antecedentes	269
6.2. Resultados y discusión	280
7. CONCLUSIONES	291
8. PARTE EXPERIMENTAL	301
8.1. Métodos generales	303
8.2. Secado de disolventes y reactivos	306
8.3. Productos comerciales	307
8.4. Métodos para la determinación de la actividad antioxidante	311
8.4.1. Poder reductor del hierro.	311
8.4.2. Actividad antirradical	312
8.4.3. Inhibición de la oxidación primaria del ácido linoleico en emulsión. Método del tiocianato férrico	314
8.4.4. Inhibición de la oxidación secundaria del ácido linoleico en emulsión. Método del ácido tiobarbitúrico (TBA)	315
8.4.5. Inhibición de la peroxidación en microsomas	316

8.4.6. Estudio de la inhibición de la actividad tirosinasa	319
8.4.7. Estudio del pardeamiento en manzanas	320
8.4.8. Estudio de la inhibición de la melanosis en camarones	320
8.5. Materias primas	321
8.6. Nuevas investigaciones	326
8.6.1. Síntesis de dopamina y glicoderivados de dopamina a partir de hidroxitirosol	326
8.6.2. Síntesis de selenoureas, selenuros y diselenuros de hidroxitirosol	350
8.6.3. Tioureas derivadas de dopamina. Reacciones con DDQ y formación de 2-amino-1,3-benzotiazepinas.	376
8.6.4. Formación de isoxazoles con el catalizador $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{NaI}-\text{SiO}_2$	395
9. ESPECTROS REPRESENTATIVOS	399

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

a	Señal ancha
Å	Ångström
ABAP	2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ABTS	2,2'-azinobis-(ácido etilbenzotiazolina-6-sulfúrico) sal de diamonio
Ac	Acetilo
ac.	Acuoso
AcO	Acetoxi
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
^t Bu	<i>tert</i> -Butilo
Bu	Butilo
c	Cuartete
calcd.	Calculado
cat.	Catalítico
c.c.f.	Cromatografía en capa fina
CD	Ciclodextrina
CIMS	<i>Chemical Ionization Mass Spectrometry</i>
cm	Centímetro
col.	Colaboradores

COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
d	Doblete
DA	Dopamina
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DHFG	3,4-Dihidroxifenilglicol
dm	Decímetro
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EIMS	<i>Electron Impact Mass Spectrometry</i>
equiv.	Equivalente
Et	Etilo
eV	Electronvoltio
h	Hora
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRCIMS	<i>High Resolution Chemical Ionization Mass Spectrometry</i>
HREIMS	<i>High Resolution Electron Impact Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
HT	Hidroxitirosol
Hz	Hertzios

IBX	Ácido yodoxibenzoico
ImH	Imidazol
IR	Infrarrojos
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kV	Kilovoltios
L-DOPA	L-Dihidroxifenilalanina
M	Molar
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
mbar	Milibar
Me	Metilo
MHz	Megahertzios
min	Minuto
mL	Mililitro
mmol	Milimol
ms	Milisegundo
MS	Espectrometría de masas
N	Normal
NAC	<i>N</i> -Acetilcisteína
nm	Nanómetro

NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
°C	Grados centígrados
OMW	Olive mill wastewaters
p.f.	Punto de fusión
Ph	Fenilo
POIC	<i>Primary oxidation inhibition capacity</i>
ppm	Partes por millón
ⁱ Pr	Isopropilo
Py	Piridina
QE	<i>Quercetin equivalent</i>
Rto.	Rendimiento
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROESY	<i>Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
s	Singulete
sat.	Saturado
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNC	Sistema nervioso central
t	Tiempo o triplete

T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TBAB	Bromuro de tetrabutilamonio
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TE	<i>Trolox equivalent</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Trimetilsililo
Ty	Tirosol
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
$\Delta\delta$	Diferencia de desplazamiento químico
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
μA	Microamperio
μL	Microlitro
ν_{max}	Número de onda
$[\alpha]$	Rotación específica

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la preparación de derivados funcionales del hidroxitirosol (HT), debido a las importantes propiedades biológicas y farmacológicas exhibidas por el mismo. Se ha empleado como materia prima el compuesto natural HT que se puede aislar del alperujo, subproducto de la industria de extracción del aceite de oliva, contribuyendo así a su revalorización.

A partir del HT se ha llevado a cabo la síntesis del neurotransmisor dopamina a través de una nueva ruta en tres pasos vía el bromuro de hidroxitirosilo y mediante una estrategia de protección-desprotección de los hidroxilos del fragmento de catecol en cuatro pasos. También se ha conseguido la transformación del HT en *O*-glucopiranosil y *O*-galactopiranosil derivados de la dopamina.

Se han obtenido las primeras selenoureas, selenuros, diselenuros y selenonios de HT, con los grupos hidroxilo del fragmento catecol tanto libres como protegidos.

También se han sintetizado tioureas derivadas de hidroxitirosol por reacción directa de dopamina con alquil y aril isotiocianatos comerciales. Estas tioureas se han oxidado con DDQ para dar 2-amino-dihidro y 2-imino-tetrahidro-1,3-benzotiazepinas que siguen conservando el fragmento catecol en su estructura.

Se han evaluado las propiedades antioxidantes de los compuestos sintetizados en esta Tesis, mediante la determinación *in vitro* del poder antioxidante de reducción férrica, actividad antirradical DPPH, actividad antirradical ABTS, inhibición de la oxidación primaria del ácido linoleico por el método el tiocianato férrico, e inhibición de la oxidación secundaria del ácido linoleico por el método del ácido tiobarbitúrico.

También se ha estudiado la inhibición de la actividad monofenolasa y difenolasa de la tirosinasa usando L-tirosina y L-DOPA, respectivamente, como sustratos y HT, 3,4-DHFG y una serie de los compuestos sintetizados como inhibidores.

En ensayos *ex vivo* se ha estudiado la capacidad de nuestros antioxidantes sintéticos para inhibir la peroxidación en microsomas de hígados de ratas, sometidos a una alimentación deficiente en vitamina E, encontrándose resultados muy prometedores para muchos de ellos, superiores a los descritos hasta la fecha para cualquier otro producto natural o sintético. Este apartado se realizó durante una estancia de dos meses en el Rowett Institute of Nutrition and Health, de la Universidad de Aberdeen (Escocia, Reino Unido), bajo la dirección de los doctores Garry Duthie y Baukje de Roos.

Se ha evaluado la capacidad antitumoral de varios de los derivados organoselénicos (selenoureas, un diselenuro y una sal de selenio) sintetizados, como inductores de apoptosis en las líneas celulares A-375 (melanoma), SF-268 (glioblastoma) y NCI-H460 (cáncer de pulmón) resultando ser dichos compuestos mucho más activos que el HT.

Se han estudiado algunos de los antioxidantes preparados en esta Tesis en análisis *in vivo* como retardantes de la melanosis en camarones, con buenos resultados, y como inhibidores del pardeamiento en fruta, con pobres resultados.

Por último, durante una estancia de dos meses en la Universidad de Camerino (Italia), bajo la dirección del Prof. Enrico Marcantoni se llevó a cabo la síntesis de isoxazoles a partir de aldehidos aromáticos o heteroaromáticos y exceso de nitroacetato de etilo, usando el catalizador $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \cdot \text{NaI} / \text{SiO}_2$, mediante reacciones en ausencia de disolvente.

SUMMARY

In this PhD Thesis, we have mainly focused our effort on the preparation of functional derivatives of hydroxytyrosol (HT), due to the remarkable biological and pharmacological properties exhibited by this polyphenol. The natural compound HT, isolated from olive mill wastewaters (OMW), a waste by-product of the olive oil industry, has been used as starting material, thus contributing to add value to this waste.

The synthesis of neurotransmitter dopamine has been performed from HT in three steps via hydroxytyrosyl bromine and in four steps through a catechol hydroxyls protection-deprotection strategy. Furthermore, HT could be transformed into *O*-glucopyranosyl and *O*-galactopuranosyl derivatives of dopamine.

Selenourea, selenide, diselenide and selenonium derivatives of HT have been obtained by the first time, with unprotected and protected catechol moiety.

Furthermore, thioureas have been synthesized from HT by condensation of dopamine with commercial isothiocyanates. These thioureas have been oxidized with DDQ to obtain 2-amino-dihydro and 2-imino-tetrahydro-1,3-benzothiazepines which keep catechol moiety on their structures.

Antioxidant properties of the new synthesized products have been evaluated, using *in vitro* tests like ferric reducing antioxidant power, DPPH antiradical activity, ABTS antiradical activity, primary oxidation inhibition

measured by ferric thiocyanate method, and secondary oxidation inhibition measured by thiobarbituric acid method.

The inhibition of monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase have been assayed using L-tyrosine and L-DOPA, respectively, as substrates and HT, 3,4-DHPG, and a series of the synthesized compounds, as inhibitors.

The capacity of our synthetic antioxidants for avoiding microsome peroxidation in rat livers subjected to a diet deficient in vitamin E has been also studied by *ex vivo* assays, finding very promising results for many of them, better than those described to date for any other natural or synthetic product. This research was carried out in a two-month stay in the Rowett Institute of Nutrition and Health, University of Aberdeen (Scotland, UK), supervised by Dr. Garry Duthie and Dr. Baukje de Roos.

Antitumor activity of several organoselenium derivatives (selenoureas, a diselenide and a selenonium salt) via apoptosis induction has been evaluated in A-375 (melanoma), SF-268 (glioblastome) and NCF-H460 (lung cancer) cell lines, resulting all of them much more active than hydroxytyrosol.

Some of our synthetic antioxidants have been assayed *in vivo* as shrimp melanosis retardant with good results, and as inhibitors of fruit browning with poor results.

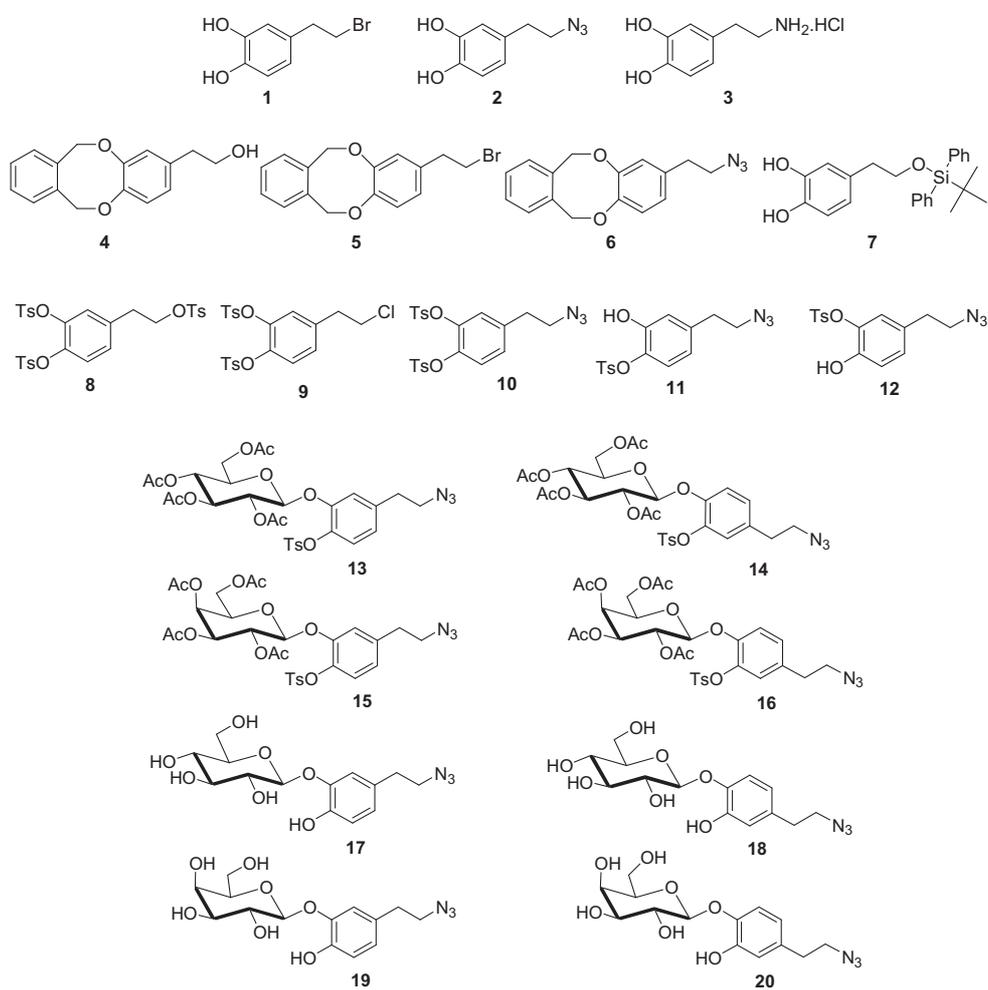
Finally, in a two months stay at the University of Camerino (Italy) supervised by Professor Enrico Marcantoni, we have carried out the synthesis of isoxazoles from aromatic or heteroaromatic aldehydes and

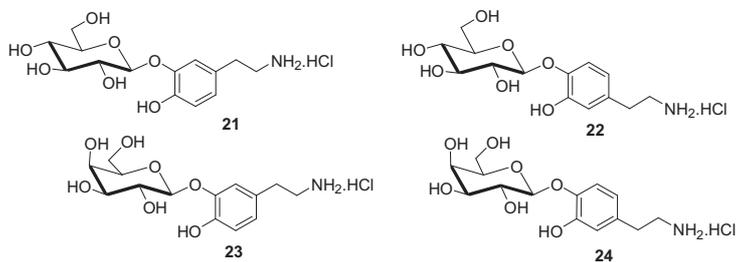
excess of ethyl nitroacetate, using $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – NaI/SiO_2 under solvent-free conditions.

RELACIÓN DE COMPUESTOS

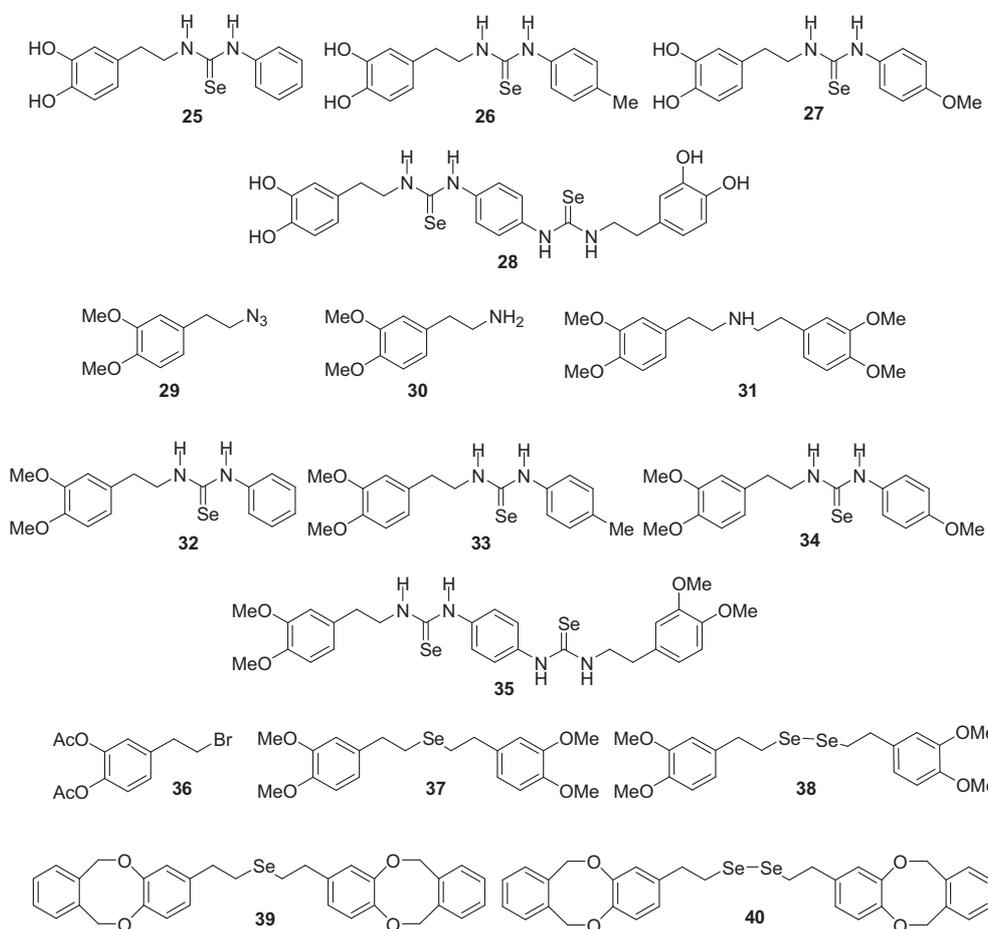
RELACIÓN DE COMPUESTOS

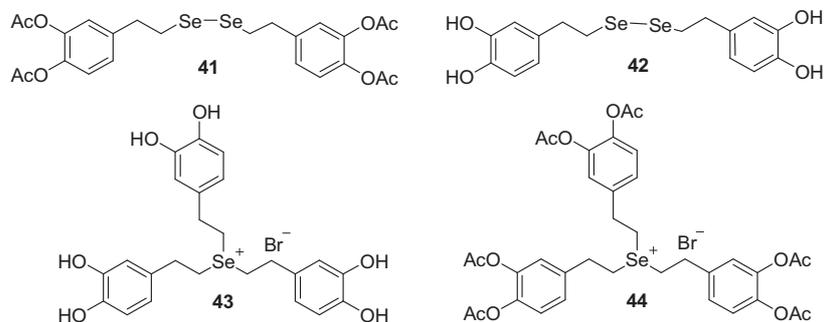
A continuación se indican los productos caracterizados en cada uno de los capítulos de esta Tesis:

SÍNTESIS DE DOPAMINA Y GLICOSIL DERIVADOS DE DOPAMINA A PARTIR DE HIDROXITIROSO

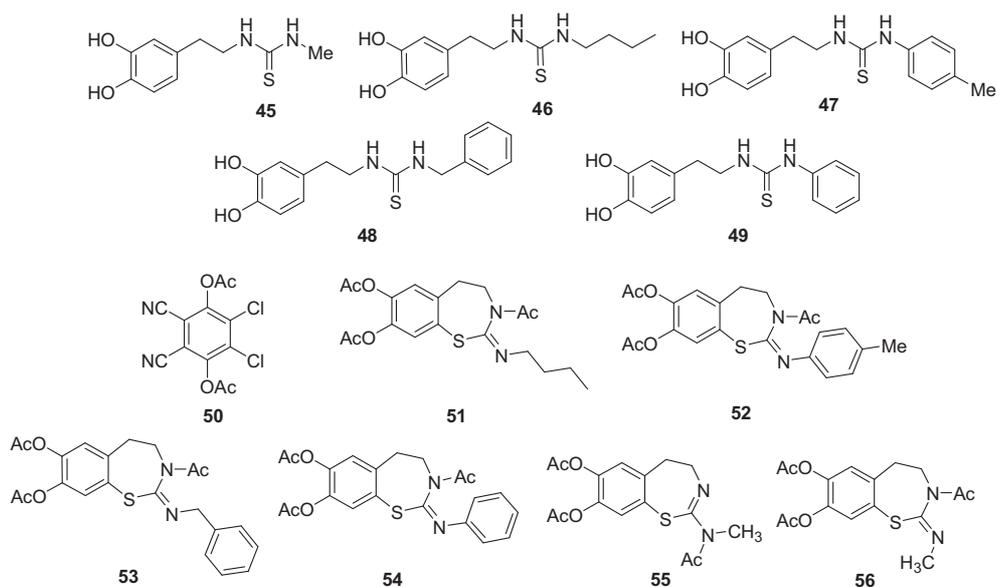


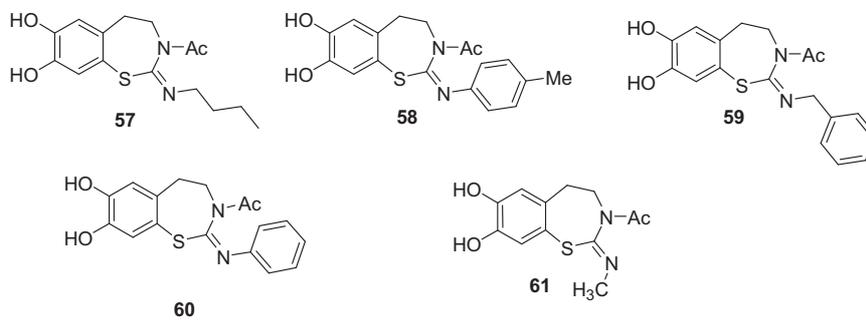
SÍNTESIS DE SELENOUREAS, SELENUROS Y DISELENUROS DE HIDROXITIROSOLO



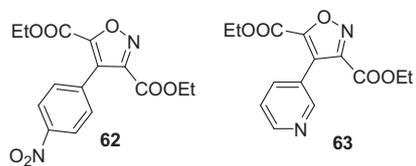


TIOUREAS DERIVADAS DE HIDROXITIRO SOL. REACCIONES CON DDQ Y FORMACIÓN DE 2-AMINO-1,3-BENZOTIAZEPINAS





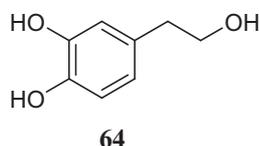
FORMACIÓN DE ISOXAZOLES CON EL CATALIZADOR CeCl₃/NaI



1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La presente Tesis Doctoral se encuadra dentro del campo de los polifenoles sintéticos, concretamente de los derivados del hidroxitirosol (**64**) y de la dopamina, con especial énfasis en sus selenoderivados y en el estudio de las propiedades antioxidantes de los mismos.



Esta Tesis Doctoral se inició dentro del proyecto “*Valorización del alperujo tratado térmicamente: síntesis de derivados de hidroxitirosol, producción de biodiesel y de fertilizantes biológicos*” P06-AGR-01906 que se desarrolló desde 2007 hasta 2009, y se ha concluido dentro del proyecto “*Optimización del aislamiento de polifenoles de la aceituna. Complejación con ciclodextrinas, derivatización y evaluación como agentes antioxidantes*” P08-AGR-03751, que se está desarrollando en la actualidad. Ambos se encuadran en los proyectos de Excelencia de la Junta de Andalucía.

En la primera parte de esta Tesis Doctoral se han desarrollado una serie de procedimientos sintéticos conducentes a la obtención de derivados del hidroxitirosol, 4-(2-hidroxiethyl)benzeno-1,2-diol (**64**), con el objetivo fundamental de potenciar su ya marcada actividad como antioxidante y

atrapador de radicales libres.¹ En una segunda parte se ha realizado un amplio estudio analítico de las propiedades antioxidantes *in vitro* y *ex vivo* de los nuevos productos, utilizando procedimientos previamente descritos en nuestro grupo de investigación y otros procedimientos puestos a punto por nosotros en esta Tesis.

El hidroxitirosol (HT) es un polifenol simple que predomina en el olivo (*Olea europea*), aunque se puede encontrar en otras plantas.^{2,3} Los polifenoles⁴ son una amplia familia de compuestos que se encuentran, entre otros alimentos, en la fruta, la verdura, el vino, el té, el cacao y el aceite de oliva virgen extra, y que muestran una marcada actividad antioxidante y antirradicalaria,⁵ lo que se traduce en una contrastada actividad en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, osteoporosis,⁶ actividad antioxidante en plasma⁷, incremento en la concentración de colesterol HDL,⁸ e inhibición de agregación plaquetaria.⁹ Se han realizado estudios en humanos para determinar la concentración de HT en plasma y orina después de su

¹ Rietjens, S.J.; Bast, A.; Haenen, G.R.M.M. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*, 7609-7614.

² Fadel, F.; Fattouch, S.; Tahrouch, S.; Lahmar, R.; Benddou, A.; Hatimi, A. *J. Mater. Environ. Sci.* **2011**, *2*, 285-292

³ Mucaji, P.; Nagy, M.; Zahradnikova, A.; Holkova, I.; Bezakova, L.; Svajdlenka, E.; Liptaj, T.; Pronayova, N. *Chem. Papers*, **2011**, *65*, 367-372.

⁴ Cheynier, V. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, *81*, 223-229.

⁵ Fernández-Bolaños, J. G.; López, O.; Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez-Gutiérrez, G. *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 442-463.

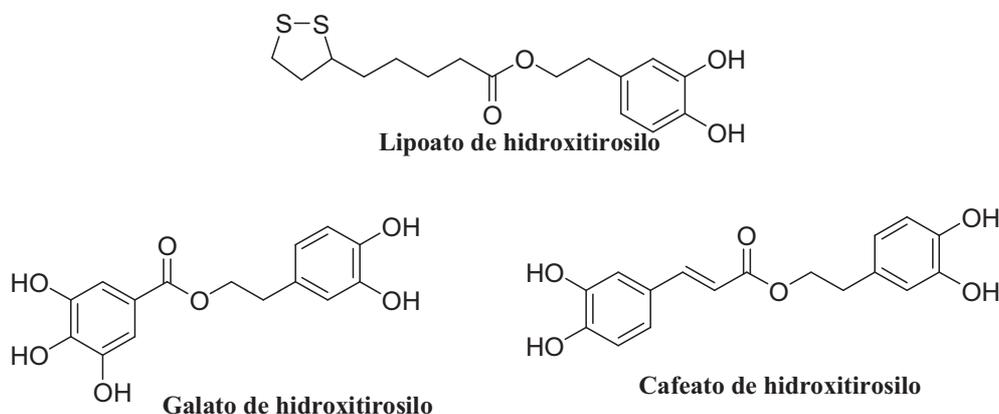
⁶ Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2005**, *45*, 287-306.

⁷ Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, et al. *Eur. J. Nut.* **2004**, *6*, 1-7.

⁸ Edeas, M *Phytotherapy*, **2010**, *8*, 16-20.

⁹ Ostertag, L. M.; O’Kennedy, N.; Kroon, P. A.; Duthie, G.; de Roos, B.; *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, *54*, 60-81.

administración en disoluciones acuosas, observándose una unión transitoria entre hidroxitirosol y colesterol LDL, que podría suponer grandes avances en la fisiopatología de la aterosclerosis.¹⁰ Derivados sintéticos del hidroxitirosol, como su éster con el ácido lipoico,¹¹ poseen un marcado carácter antiproliferativo en determinados tumores. Galato y cafeato de hidroxitirosol son también obtenidos por vía sintética, y sus propiedades como antiagregante plaquetario son claramente superiores a las de los productos de partida.¹²



Los agentes pro-oxidantes inducen estrés oxidativo mediante la formación de especies de oxígeno reactivo (*ROS, Reactive Oxygen Species*) tales como iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos, inhibiendo las proteínas antioxidantes. Por el contrario, los antioxidantes naturales protegen al organismo del estrés oxidativo, implicado en enfermedades

¹⁰ González-Santiago, M.; Fonollá, J.; Lopez-Huertas, E. *Pharm. Res.* **2010**, *61*, 364–370.

¹¹ Bernini R.; Crisante, F.; Merendino, N.; Molinari, R.; Soldatelli M.C.; Velotti, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 439-446.

¹² Chapado, L.; Linares-Palomino, P.; Salido, S.; Altarejos, J.; Rosado, J.A.; Salido G.M. *Bioorg. Chem.* **2010**, *38*, 108–114.

como el cáncer o la aterosclerosis.^{13,14} También previenen la degradación y enranciamiento de alimentos por inhibición de la oxidación lipídica. Además, la adición de antioxidantes naturales podría ser una vía para desarrollar alimentos funcionales, de forma que estos aditivos naturales incrementen, al mismo tiempo, los efectos saludables y el periodo de almacenamiento de los productos alimentarios.

Existen pruebas fehacientes que relacionan el modelo de dieta Mediterránea, con la prevención de enfermedades coronarias, a pesar del elevado consumo de grasas. Este hecho pone de manifiesto que el tipo de grasa consumida es más importante que la cantidad ingerida.¹⁵ La principal fuente de ácidos grasos monoinsaturados de esta dieta es el aceite de oliva,¹⁶ cuyo contenido en ácidos grasos monoinsaturados, junto con el contenido polifenólico del aceite influye en el desarrollo de dichas propiedades preventivas.¹⁷

La aceituna contiene, además de hidroxitirosol, una amplia variedad de compuestos polifenólicos^{18,19} que juegan un importante papel en las propiedades químicas, organolépticas y nutricionales del aceite de oliva virgen y de la aceituna de mesa, habiendo puesto de manifiesto mediante estudios epidemiológicos las propiedades beneficiosas para la salud que

¹³ Aruoma, O.I. *Mut. Res.*, **2003**, 523, 9-20.

¹⁴ López-Miranda, J. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2010**, 20, 284-294.

¹⁵ Owen, R.W.; Giacosa, A.; Hull, W.E. *Eur. J. Cancer Prev.*, **2004**, 13, 319-326.

¹⁶ Keys, A. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, 61, 1321-1323.

¹⁷ Waterman, E.; Lockwood, B. *Alt. Med. Rev.* **2007**, 12, 331-342.

¹⁸ Malheiro, R.; Sousa, A.; Casal, S.; Bento, A.; Pereira, J. A. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, 49, 450-457.

¹⁹ Bertin, L.; Ferri, F.; Scoma, A.; Marchetti, L.; Fava, F. *Chem. Engin. J.* **2011**, 171, 1287-1293.

supone la ingesta de dicho aceite.^{20,21} Ya en la antigüedad el aceite de oliva era utilizado como medicamento en determinados casos de intoxicación, dolores de cabeza, problemas estomacales, picaduras de insectos y para la desinfección de cualquier parte del cuerpo y cuidado de la piel.²²

La aceituna tiene una composición fenólica característica, que depende de la variedad de la aceituna, estado de madurez, estación del año y condiciones climatológicas.²³ La oleuropeína (**65**) es el principal monoterpene secoiridoide de las aceitunas inmaduras y su concentración disminuye con el proceso de maduración, mientras que la desmetiloleuropeína (**66**), el aglicón de la oleuropeína (**67**), y el 3,4-DHPEA-EDA (**68**) (forma dialdehídica del elenoato de hidroxitirosilo) se incrementan con la maduración. El 4- β -glucósido de hidroxitirosol (**69**) es el fenol predominante en aceitunas maduras.²⁴ (**Figura 1.1**)

²⁰ Owen, R.W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Haubner, R.; Spiegelhalter, B.; Bartsch, H. *Eur. J. Cancer*, **2000**, *36*, 1235-1247.

²¹ Perez-Martinez, P.; Lopez-Miranda, J.; Blanco-Colio, L.; Bellido, C.; Jimenez, Y.; Moreno, J.A.; Delgado-Lista, J.; Egido J.; Perez-Jimenez, F. *Atherosclerosis*, **2007**, *194*, 141–146.

²² Wiesman, Z. *Adv. Biotechnol.* **2009**. 303-327. Ed. Academic Press, Oxford (UK).

²³ Romero, C.; Brenes, M.; Yousfi, K.; Garcia, P.; García, A.; Garrido, A. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 479.

²⁴ Romero, C.; Brenes, M.; García, P.; Garrido, A. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 3835.

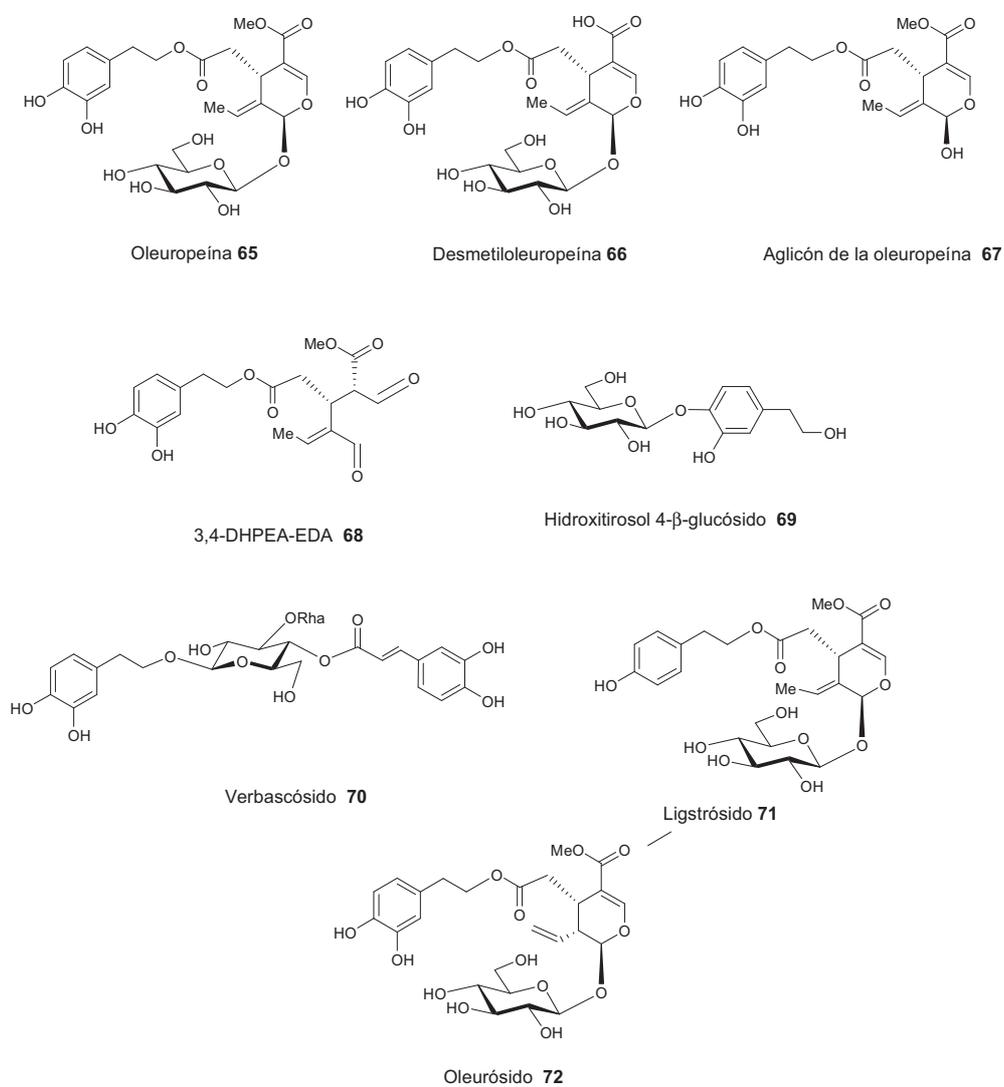


Figura 1.1. Principales glicoconjugados del hidroxitirosol presentes en la aceituna.

Por otra parte, la aceituna contiene verbascósido (**70**) y otros secoiridoides como el ligstrósido (**71**) y el oleurósido (**72**), isómero de la oleuropeína (**65**). Otros grupos de compuestos fenólicos son derivados de

los ácidos fenilacético (ácido 3,4-dihidroxifenilacético), benzoico (ácido 4-hidroxibenzoico), y ácidos cinámicos (*p*-cumárico, ferúlico y cafeico).

Otros fenoles encontrados en la pulpa de la aceituna son el catecol, metilcatecol, tirosol, hidroxitirosol (HT), y concentraciones relativamente altas de flavonoides (luteolina-7-glucósico, apigenina-7-glucósido, rutina y quercetina), y varios pigmentos del grupo de las antocianinas (cianidina-3-glucósido y cianidina-3-rutinósido o antirrinina), que proporcionan el intenso color púrpura oscuro a las aceitunas maduras.²⁵ El oleurósido **72** ha sido aislado de las hojas del olivo²⁶ y de los residuos de las almazaras.²⁷ Otros glicósidos del hidroxitirosol como **73**²⁸ y **74**²⁹ han sido aislados de la planta medicinal coreana *Clematis mandshurica*, y del tallo de la planta medicinal china *Sargentodoxa cuneata*, respectivamente. (**Figura 1.2**)

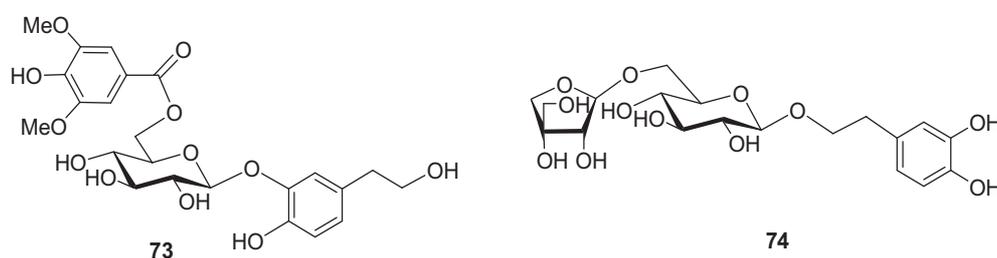


Figura 1.2. Otros glicoconjugados del HT.

²⁵ Romero, C.; García, P.; Brenes, M.; Garcia, A.; Garrido, A. *Eur. Technol. Food Res.* **2002**, 215, 482.

²⁶ Kuwajima, H.; Uemura, T.; Takaishi, K.; Inoue, K.; Inouye, H. *Phytochemistry*, **1988**, 27, 1757.

²⁷ Obied, H. K.; Allen, M.S.; Bedgood, D.R., Jr.; Prenzler, P.D.; Robards, K., *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 9911.

²⁸ Shi, S.-P.; Jiang, D.; Dong, C.-X.; Tu, P.-F. *Helvetica Chim. Acta*, **2006**, 89, 1023.

²⁹ Chang, J; Case, R. *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2752.

Los principales compuestos fenólicos presentes en aceite de oliva virgen son el tirosol, hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosilo, las agliconas (o aglicones) de la oleuropeína y del ligstrósido, el verbascósido, y los lignanos pinorresinol y 1-acetoxipinorresinol.³⁰ La cantidad de estos compuestos en el aceite depende de la variedad del olivo, de la maduración de la aceituna, el tipo de prensado y el procedimiento de extracción del aceite. Así por ejemplo, la concentración del acetato de hidroxitirosol es similar a la del HT en la variedad Arbequina y es más del doble en la variedad Picual, y entre un tercio y un cuarto en los aceites de tipo Manzanilla y Hojiblanca.³¹

Durante el procesado mecánico de la aceituna para la obtención del aceite de oliva, la mayor proporción de la fracción fenólica se encuentra en la fase acuosa, mientras que sólo una proporción minoritaria (< 1%) se halla en el aceite.³² Esto explica la abundante proporción de polifenoles en las aguas residuales de las almazaras (alpechín),³³ procedentes del proceso tradicional de extracción en tres fases. El uso de un procedimiento moderno en dos fases conduce a aceite de oliva virgen con una mayor concentración de compuestos polifenólicos que en el caso del proceso en tres fases, aunque la mayor parte de los fenoles (en torno al 98 %), permanece en el residuo

³⁰ Brenes, M.; García, A.; Ríos, J.J.; García, P.; Garrido, A. *Inter. J. Food Sci. Technol.*, **2002**, *37*, 615.

³¹ Romero, C.; Medina, E.; Vargas, J.; Brenes, M., de Castro, A.; *J. Agric. Food. Chem.*, **2007**, *55*, 680-686.

³² Vierhuis, E.; Servili, M.; Baldioli, M.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J.; Montedoro, G.F. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 1218.

³³ Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Guillén, R.; Jiménez, A. *Grasas Aceites*, **2006**, *57*, 95.

líquido-sólido llamado *alperujo*,³⁴ Así pues, ambos residuos *alperchín* y *alperujo* parecen ser una fuente abundante e inagotable de antioxidantes naturales.

La tecnología para la extracción del aceite de oliva en España ha progresado significativamente desde principios de los años setenta cuando, haciendo obsoleto el antiquísimo procedimiento de prensado, apareció el sistema de centrifugación de tres fases. La producción de aceite de oliva mediante este sistema genera dos subproductos: el primero, un residuo líquido o “alpechín”, muy contaminante, mezcla del agua de vegetación de las aceitunas más el agua añadida en las diferentes etapas del proceso de extracción. El segundo subproducto es un residuo sólido u “orujo”. Es una combinación de pulpa, huesos de aceituna y un resto graso. El uso de un nuevo y moderno sistema de procesamiento de dos fases, desarrollado durante la década de los noventa,³⁵ ha reducido enormemente el volumen de residuos, y con ello su carga contaminante (sólidos en suspensión, alta concentración de compuestos orgánicos y sales minerales), aunque genera un nuevo subproducto, denominado “alperujo” semisólido, con un contenido de agua que oscila entre el 65-70 %. Es una mezcla del residuo líquido (alpechín) y sólido (orujo). Se estima una producción anual de alperujo de entre 3,5 y 6 millones de toneladas por campaña.³⁶

³⁴ Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Heredia, A.; Guillén, R.; Jiménez, A. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 6804.

³⁵ Alba, J.; Hidalgo, F.; Ruiz, M.A.; Martínez, F.; Moyano, M.J.; Cert, A.; Pérez, M.C.; Ruiz, M.V. *Grasas y aceites*, **1996**, *47*, 163-181.

³⁶ Aragón, J.M.; Palancar, M.C. *Present and future of alpeorujo*. **2000**. 242-300. Ed. Complutense.

La sensibilidad de la población a los problemas medioambientales y la legislación vigente sobre vertidos ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar sistemas para el tratamiento y aprovechamiento de los subproductos del aceite de oliva. Los usos potenciales de estos subproductos están relacionados con la salud (cosméticos, productos farmacéuticos, aditivos alimentarios, etc.), biofertilizantes y/o compost, alimentación animal, y con la producción de energía alternativa (biodiesel, gasificación, producción de metano, etc.).³⁷

El elevado contenido fenólico de alpechín y alperujo convierte a estos residuos en una buena fuente de antioxidantes naturales. Así pues, la industria del aceite de oliva genera grandes cantidades de residuos en los que quedan una gran cantidad de productos valiosos, por lo que en la última década han aparecido numerosos artículos y patentes sobre la extracción de compuestos fenólicos de dichos residuos.^{19,38,39}

Entre los compuestos polifenólicos más abundantes en los residuos de la industria de extracción del aceite de oliva se encuentra el hidroxitirosol. El aislamiento del mismo con un alto grado de pureza ha facilitado considerablemente el estudio de su estabilidad, bioactividad, biodisponibilidad, y toxicología. El acceso a hidroxitirosol puro y a precio asequible también está permitiendo la preparación de derivados aún más

³⁷ Wiesman, Z.; *Advances biotechnologies*. **2009**. 243-255. Ed. Academic Press, Oxford (UK).

³⁸ Setti, L.; Pifferi, P.; Bordado, J. Plant for the treatment of waste waters. PCT WO 2003004419 A1 20030116

³⁹ Khoufi, S.; Aloui, F.; Sayadi, S. *J. Hazard. Mat.* **2008**, *151*, 531-539.

potentes, con acciones biológicas y farmacológicas beneficiosas para la salud, y de mayor biodisponibilidad.

Los polifenoles se pueden extraer del alpechín mediante:^{40,41}

- Extracción sólido-líquido del alpechín seco o centrifugado.

- Técnicas de adsorción-desorción usando una resina adsorbente, como la resina Amberlite[®] XAD o resinas de intercambio aniónico fuertemente básica en forma de cloruro como la Duolite[®].⁴²

Otros métodos empleados implican la adsorción con lechos fluidizados con materiales poliméricos seguida de la desorción de los antioxidantes mediante el empleo de disolventes orgánicos polares.³⁹ También se han llevado a cabo extracciones de compuestos fenólicos utilizando fluidos supercríticos (CO₂) como disolvente, con resultados similares a las llevadas a cabo con disolventes polares.⁴³

Se han publicado numerosos artículos sobre la producción de hidroxitirosol (de alta pureza) a partir de los desechos de la aceituna⁴⁴⁻⁴⁸

⁴⁰ Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Heredia, A.; Guillen, R.; Jiménez, A. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 6804-6811.

⁴¹ Romero, C.; Brenes, M.; Garcia, P.; Garrido, A. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3835–3839.

⁴² Bostyn, S.; Cagnon, B.; Fauduet, H. *Talanta*, **2009**, *80*, 1-7.

⁴³ Lafka, T.I.; Lazou, A.E.; Sinanoglou, V.J.; Lazos, E.S. *Food Chem.* **2011**, *125*, 92-98.

⁴⁴ Brenes, A.; Balbuena, M.; De Castro, A.; Gómez-Millán, A. Production of antioxidant substances (hydroxytyrosol and elenolic acid glucoside) from process solutions in the manufacture of olives. **2003**, ES 2,186,467, A1 20030501.

⁴⁵ Visioli, F.; Galli, C. *Curr. Top. Nutraceutical Res.*, **2003**, *1*, 85-88.

⁴⁶ Calero Barcoj, J.; Martínez Nieto, L.; García-Granados López de Hierro, A. Countercurrent extraction process for recovering acids, phenols, alcohols, and their derivatives, from olives-pressing waste. **1994**, ES 2,051,238, A1 19940601

procedentes de la industria del aceite o de la aceituna de mesa. Algunos procesos parecen no ser efectivos; otros son métodos prácticos a escala de laboratorio pero no adecuados para el escalado industrial.

En nuestro grupo de Biotecnología de los Alimentos (Instituto de la Grasa, CSIC) se ha conseguido una importante recuperación de productos de alto valor añadido^{40,49-51} del alperujo mediante sistema de autohidrólisis por tratamiento al vapor, también conocido como “steam explosion”. Este método se basa en un tratamiento térmico con vapor a alta presión y temperatura, realizado a escala piloto, que consigue la separación de sus principales componentes (celulosa, hemicelulosa, sustancias pécticas, pseudolignina y polifenoles). El tratamiento térmico facilita la separación del alperujo en dos fases, sólida y líquida, y permite la recuperación de hidroxitirosol, 3,4-dihidroxifenilglicol y de otros productos de alto valor añadido tales como manitol, oligosacáridos, azúcares fermentables, otros compuestos fenólicos, etc.

Entre los productos recuperados destaca el hidroxitirosol, uno de los principales compuestos fenólicos presentes, de forma libre o conjugada, en el alpechín y el alperujo, y que también está presente en el aceite de oliva y

⁴⁷ Allouche, N.; Fki, I.; Sayadi, S. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 267-273.

⁴⁸ Fernández-Bolaños, J.; Heredia, A.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Guillén, R.; Jiménez, A. Method for obtaining purified hydroxytyrosol from products and by-products derived from the olive tree. **2002**, WO 064,537; A1 20020822.

⁴⁹ Felizón, B.; Fernández-Bolaños, J.; Heredia, A.; Guillén, A. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2000**, *77*, 15-22.

⁵⁰ Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Brenes, M., Guillén, R.; Heredia, A. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **1998**, *75*, 1643-1649.

⁵¹ Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Gómez, E; Guillen, R; Jiménez, A; Heredia, A; Rodríguez, R. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 5849-5855.

en la aceituna de mesa, y que ha sido señalado como compuesto natural de elevado interés, debido a su remarcada actividad antioxidante y farmacológica.^{52,53} Se ha desarrollado bajo patente un sistema para la purificación a escala semi-industrial del HT.⁵⁴ Uno de los pasos claves del sistema implica el uso de la resina intercambiadora de iones no activada aniónica fuerte (Amberjet 4200-Cl) para atrapar los polifenoles de la fracción acuosa, seguida de una elución con agua. Esta resina muestra una buena separación y alto rendimiento de recuperación; permite obtener fracciones de aproximadamente el 50% de pureza en peso de hidroxitirosol. A continuación, se utiliza una resina adsorbente no iónica XAD (Amberlita) en la que la matriz se lava con una mezcla de metanol o etanol y agua (30-33%), lo que permitió obtener una fracción de hidroxitirosol del 95% de pureza además de fracciones de hasta el 99.6% de pureza.⁴⁰ De esta manera se recupera al menos el 75% del hidroxitirosol presente en los subproductos de la aceituna.

El hidroxitirosol aislado con purezas del 50 ó 95-99% se obtiene así en grandes cantidades, y de manera práctica y sencilla, con unos costes comparables a los antioxidantes sintéticos comerciales derivados del petróleo. El precio aproximado es de 0.03 € el gramo con pureza del 50% y de 0.12 € el gramo con 99% de pureza, precios que contrastan con el

⁵² Hamdena, K.; Alloucheb, N.; Damakb, M.; Elfekia, A. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *180*, 421–432.

⁵³ Zhua,,L.; Liua, Z.; Fenga, Z.; Haoa, J.; Shena, W.; Lia,,X.; Sunc, L.; Sharmand, E.; Wange, Y.; Wertze, K.; Webere, P.; Shif, X.; Liuf, J. *J.Nutr. Biochem.* **2010**, *21*, 1089–1098.

⁵⁴ Fernández-Bolaños, J; Rodríguez, G; Rodríguez, R; Heredia, A; Guillen, R; Jiménez, A. (2002). Patente Internacional N° PCT/ESO2/00058.

producto comercial suministrado por las empresas Cayman Chemical, Michigan (USA), y la Extrasynthese (Francia) que están comercializando un hidroxitirosol de síntesis a un precio extremadamente alto, del orden de 141 y 202 €, respectivamente, los 100 mg (catálogo 2011); o incluso con el producto suministrado por TCI Europe 161 € el gramo (catálogo 2011).

Uno de los principales objetivos de esta Tesis doctoral ha sido el de sintetizar selenoderivados del HT, para aunar en las nuevas moléculas las propiedades del HT con las importantes propiedades biológicas y farmacológicas exhibidas por numerosos compuestos orgánicos que contienen selenio en su estructura.

La implicación biológica del selenio fue reconocida por primera vez en los años 30, al ser identificado como el responsable de la muerte de ganado que había consumido plantas acumuladoras de selenio de los géneros *Astragalus*, *Xylorrhiza*, *Oonopsis* y *Stanleya* en ciertas zonas de Dakota del Sur y Wyoming.⁵⁵

En la segunda mitad del siglo XX cambió la percepción sobre la importancia biológica del selenio, siendo descrito por primera vez como nutriente esencial por Schwarz y Foltz.⁵⁶ Posteriormente, se descubrió el papel primordial del selenio como constituyente de la glutatión peroxidasa,⁵⁷ de la tioredoxín reductasa^{58,59} y de otras enzimas que protegen del estrés oxidativo. También forma parte de la yodotironina

⁵⁵ Franke, K. W. *J. Nutr.* **1934**, *8*, 597-608

⁵⁶ Schwarz, K.; Foltz, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3292-3293.

⁵⁷ Bhabak, K. P.; Mughesh, G. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4594-4601.

⁵⁸ Arner, E. S. J.; Holmgren, A. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6102-6109.

⁵⁹ Mustacich, D.; Powis, G. *Biochem. J.* **2000**, *346*, 1-8.

desyodinasas, siendo por tanto clave en el metabolismo de las hormonas del tiroides,⁵⁷ y se ha detectado su presencia en otras selenoproteínas de mamíferos, animales inferiores y células procariotas.⁶⁰

Estudios epidemiológicos en humanos, así como ensayos de laboratorio, apoyan el papel protector del selenio frente al desarrollo del cáncer.^{61,62} Los resultados han demostrado que un suplemento de selenio en la dieta de 200 µg/día inhibe la proliferación de células cancerígenas, induce la apoptosis de células tumorales, suprime la metástasis en animales⁶³ y reduce el riesgo de cáncer de próstata (en un 63 %),⁶⁴ de pulmón, de pecho y colorrectal en humanos.^{58,65,66} También se ha demostrado un carácter preventivo sobre algunas patologías relacionadas con la edad debido a su carácter antioxidante, antiinflamatorio y descontaminante de metales pesados.⁶⁷

Se ha comprobado mediante ensayos *in vitro* que tanto la dosis, como la forma química en la que se administre el selenio, son factores

⁶⁰ Birringer, M.; Pilawa, S.; Flohé, L. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 693-718.

⁶¹ Thomson, C. D. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2004**, *58*, 391-402.

⁶² Terazawa, R.; Garud, D.R.; Hamada, N.; Fujita, Y.; Itoh, T.; Nozawa, Y.; Nakan, e K.; Deguchi, T.; Koketsu, M.; Ito, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7001-7008.

⁶³ Ibáñez, E.; Plano, D.; Font, M.; Calvo, A.; Prior, C.; Palop, J.A.; Sanmartín, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 265-274.

⁶⁴ Clark, L. C.; Combs, G. F., Jr.; Turnbull, B. W.; Slate, E. H.; Chalker, D. K.; Chow, J. *et al. J. Am. Med. Assoc.* **1996**, *276*, 1957-1963.

⁶⁵ Yan, L.; Yee, J. A.; Li, D.; McGuire, M. H.; Graef, G. L. *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 1337-1342.

⁶⁶ Tanaka, T.; Kohno, H.; Murakami, M.; Kagami, S.; El-Bayoumy, K. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3713-3716.

⁶⁷ Akbaraly, N. T.; Arnaud, J.; Hininger-Favier, I.; Gourlet, V.; Roussel, A.-M.; Berr, C. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 2117-2123.

críticos en la respuesta celular.⁶⁸ A bajas concentraciones, los compuestos de selenio pueden actuar como agentes anticarcinogénicos,^{69,70} mientras que a altas concentraciones pueden ser genotóxicos y carcinogénicos.⁷¹ Algunos estudios indican que la toxicidad de los compuestos de selenio está relacionada con la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS)⁷² y, dependiendo de la concentración y forma química en la que se encuentren, pueden actuar como agentes tóxicos prooxidantes que inducen daño del ADN.⁷³ Así, se ha demostrado que el selenito sódico induce roturas en la cadena de ADN en cultivos celulares.⁷⁴ Por el contrario, existen sólidas evidencias de que muchos de los diferentes papeles que juega el selenio en los sistemas biológicos se deben a su capacidad de actuar como antioxidante, previniendo enfermedades, especialmente como quimiopreventivo frente a la carcinogénesis.⁷⁵⁻⁷⁸ Compuestos organoselénicos como el ebselén⁷⁹ (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3[2H]-ona)

⁶⁸ Ip, C. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 1845-1854.

⁶⁹ Zheng, H.; Combs, G. F. *J. Nutr. Biochem.*, **2008**, *19*, 1-7.

⁷⁰ Li, F.; Wang, F.; Yu, F.; Fang, Y.; Xin, Z.; Yang, F.; Xu, J.; Zhao, J.; Hu, Q. *Food Chem.* **2008**, 165-170.

⁷¹ Santos, D. B.; Schiar, V. P. P.; Paixao, M. W.; Meinerz, D. F.; Nogueira, C. W.; Aschenr, M, Rocha, J. B. T., Barbosa, N. B. V. *Toxicol. In Vitro*, **2009**, *23*, 1195-1204.

⁷² Spallholz, J. E.; Palace, V. P.; Reid, T. W. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 547-554.

⁷³ Letavayová, L.; Vlčková, V.; Brozmanová, J. *Toxicology* **2006**, *227*, 1-14.

⁷⁴ Zhou, N.; Xiao, H.; Li, T-K.; Nur-E-Kamal, A.; Liu, L. F. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29532-29537.

⁷⁵ Rayman, M. P. *Proc. Nutr. Soc.* **2005**, *64*, 527-542.

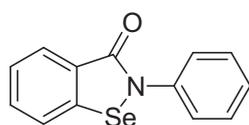
⁷⁶ El-Bayoumy, K.; Sinha, R. *Mutat. Res.* **2005**, *591*, 224-236.

⁷⁷ El-Sayed, W. M.; Aboul-Fadl, T.; Roberts, J. C.; Lamb, J. G.; Franklin, M. R. *Toxicol. In Vitro*, **2007**, *21*, 157-164.

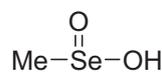
⁷⁸ Das, A.; Bortner, B.; Desai, D.; Amin, S.; El-Bayoumy, K. *Chem-Biol. Interact.* **2009**, *180*, 158-164.

⁷⁹ Jacob, C.; Maret, W.; Vallee, B. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *248*, 569-573.

y el ácido metilselenínico (MSA)^{80,81} son considerados potenciales agentes anticancerígenos. El ebselén ha mostrado, además, citoprotección del corazón⁸² y cerebro,⁸³ y utilidad en el tratamiento de la apoplejía isquémica.⁸⁴ Se ha demostrado que el ebselén actúa como mimético de las enzimas glutatión peroxidasa y de la fosfolípido-hidroperóxido-glutatión peroxidasa^{85,86} eliminando hidroperóxidos y lipoperóxidos.



Ebselén



MSA

La cantidad diaria recomendada de selenio es de 55 µg diarios,⁸⁷ con un límite máximo sin efectos adversos de 400 µg/día. A partir de 1540 µg/día aparecen síntomas de toxicidad, aunque no se considera selenosis (envenenamiento por selenio) hasta que la cantidad supera los 3200 µg/día.⁸⁸ La cantidad mínima requerida en la dieta es de 40 µg/día,

⁸⁰ Yamaguchi, K.; Uzzo, R. G.; Pimkina, J.; Makhov, P.; Golovine, K.; Crispen, P.; Kolenko, V. M. *Oncogenesis* **2005**, *24*, 5868-5877.

⁸¹ Abdulah, R.; Miyazaki, K.; Nakazawa, M.; Koyama, H. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2005**, *19*, 141-150.

⁸² Maulik, N.; Yoshida, T.; Das, D. K. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *24*, 869-875.

⁸³ Takasago, T.; Peters, E. E.; Graham, D. I.; Masayasu, H.; Macrae, I. M. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 1251-1256.

⁸⁴ Seo, J. Y.; Lee, C. H.; Cho, J. H.; Choi, J. H.; Yoo, K. Y.; Kim, D. W.; Park, O. K.; Li, H.; Choi, S. Y.; Hwang, I. K.; Won, M. H.; *J. Neurol. Sci.* **2009**, *285*, 88-94.

⁸⁵ Müller, A.; Cadenas, E.; Graf, P.; Sies, H. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 3235-3239.

⁸⁶ Maiorino, M.; Roveri, A.; Coassin, M.; Ursini, F. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 2267-2271.

⁸⁷ Dietary Reference Intakes (DRI). *National Research Council.* **2000**, 284-319. Washington: National Academy Press.

⁸⁸ Reid, M. E.; Stratton, M. S.; Lillico, A. J.; Fakih, M.; Natarajan, R.; Clark, L. C.; Marshall, J. R. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2004**, *18*, 69-74.

apareciendo trastornos de la salud con una ingesta inferior a 11 µg/día,⁷⁷ como por ejemplo la cardiomiopatía juvenil endémica (enfermedad de Keshan) y la artritis deformante (enfermedad de Kashin-Beck), detectadas en algunas regiones de China.⁸⁹ Ciertos estudios sugieren que la deficiencia de selenio está asociada a pérdida de inmunocompetencia,^{90,91} favoreciendo el desarrollo y virulencia de algunas infecciones víricas, como por ejemplo el paso de la infección por VIH al SIDA.⁹² La falta de selenio también aumenta del riesgo de aborto en mujeres,⁹³ la disminución de la movilidad del espermatozoides y la consiguiente disminución de la fertilidad en hombres.⁹⁴ En personas mayores, está asociada a la senilidad, la depresión y la enfermedad de Alzheimer.⁹⁵

Deficiencias de selenio podrían estar asociadas con anomalías en el feto,⁹⁶ es por ello que aunque no está estipulado un suplemento durante el embarazo, se recomienda que la ingesta durante el periodo de gestación sea de al menos 100 µg diarios.⁹⁷ Recientemente se ha demostrado una menor concentración de selenio en el plasma sanguíneo de mujeres embarazadas

⁸⁹ Rayman, M. P. *Lancet* **2000**, 356, 233-241

⁹⁰ Eskew, M. L.; Scholz, R. W.; Reddy, C. C.; Todhunter, D. A.; Zarkower, A. *Immunology* **1985**, 54, 173-180.

⁹¹ Spallholz, J. E.; Boylan, L. M.; Larsen, H. S. *Ann. NY Acad. Sci.* **1990**, 587, 123-139.

⁹² Baum, M. K.; Miguez-Burbano, M. J.; Campa, A.; Shor-Posner, G. *J. Infect. Dis.* **2000**, 182, S69-S73.

⁹³ Barrington, J. W.; Lindsay, P.; James, D.; Smith, S.; Roberts, A. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **1996**, 103, 130-132.

⁹⁴ Scott, R.; Macpherson, A.; Yates, R. W. S.; Hussain, B.; Dixon, J. *Br. J. Urol.* **1998**, 82, 76-80.

⁹⁵ Hawkes, W. C.; Hornbostel, L. *Biol. Psychiatry* **1996**, 39, 121-128.

⁹⁶ Dobrzynska, W.; Trafikowskab, U.; Trafikowskab, A.; Pileckib, A.; Szymanska, W.; Zachara, B.A. *Analyst*, **1998**, 123, 93-97.

⁹⁷ Guvenc, H.; Karatas, F.; Guvenc, M.; Kunc, S.; Aygun, A.D.; Bektas, S. *Pediatrics*, **1995**, 95, 879-882.

frente a controles de no embarazadas⁹⁸ También se ha demostrado que la cantidad de selenio hallado en pelo está directamente relacionado con la cantidad ingerida por la dieta.⁹⁹

La respuesta general al estrés oxidativo está claramente influenciada por el selenio en la dieta y los niveles de las selenoproteínas que lo contienen, por lo que enfermedades asociadas al aumento del estrés oxidativo, como la artritis reumatoide,¹⁰⁰ la pancreatitis y el asma,¹⁰¹ están también influenciadas por los niveles de selenio.¹⁰²

Las diferencias de biodisponibilidad, toxicidad y mecanismos de acción contra el cáncer¹⁰³ del selenio dependen de que éste se encuentre en forma orgánica o inorgánica. En los alimentos se encuentra principalmente como selenometionina (SeMet), selenocisteína (SeCys) y metilselenocisteína (MeSeCys), que forman parte de proteínas, mientras que las formas inorgánicas selenito (Na_2SeO_3) o selenato (Na_2SeO_4), se encuentran en cantidades mucho más bajas.^{104,105} El organismo utiliza

⁹⁸ Kilinc, M.; Coskun, A.; Bilge, F.; Imrek, S.S.; Atli, Y. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2010**, *24*, 152-156.

⁹⁹ Gao, J.; Liu, Y.; Huang, Y.; Lin, Z.; Bañuelos, G.S.; Lam, M.H.; Yin, X. *Food Chem.* **2011**, *126*, 1088-1093.

¹⁰⁰ Tarp, U.; Overvad, K.; Hansen, J. C.; Thorling, E. B. *Scand. J. Rheumatol.* **1985**, *14*, 97-101.

¹⁰¹ Gazdik, F.; Kadrabova, J.; Gazdikova, K. *Bratisl. Lek. Listy* **2002**, *103*, 22-25.

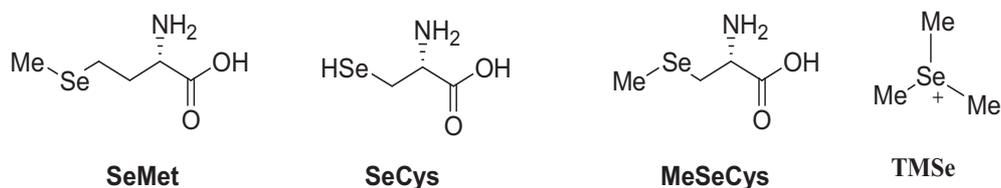
¹⁰² Knekt, P.; Heliövaara, M.; Aho, K.; Alfthan, G.; Marniemi, J.; Aromaa, A. *Epidemiology* **2000**, *11*, 402-405.

¹⁰³ Tinggi, U. *Toxicol. Lett.* **2003**, *137*, 103-110.

¹⁰⁴ Finley, J. W. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 1620-1629.

¹⁰⁵ Suzuki, K. T.; Kurasaki, K.; Ogawa, S.; Suzuki, N. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *215*, 189-197.

ambas formas con la misma eficacia en la biosíntesis de selenoproteínas,¹⁰⁶ pero se incorporan en diferentes puntos de la ruta metabólica.



El selenio absorbido por el organismo se excreta principalmente por la orina.¹⁰⁷ El metil 2-acetamido-2-desoxi-1-seleno-β-D-galactopiranosido (selenoazúcar-B) es el principal metabolito detectado en la orina cuando se ingiere en la dieta la cantidad de selenio recomendada. Sin embargo, si la ingesta de selenio es muy alta, se detecta un aumento de la cantidad de trimetilselenonio (TMSel)^{107,108} en la orina. Recientemente se ha desarrollado un sistema en el cual los compuestos de selenio Na₂SeO₃ y ácido metilselenínico quedan encapsulados en nanopartículas de quitosano, un polisacárido derivado de la quitina, liberándose de forma mucho más eficiente en las células y aumentando su biodisponibilidad, con lo cual se facilita la expresión de selenoproteínas cuando los niveles de selenio son bajos.¹⁰⁹

¹⁰⁶ Shiobara, Y.; Yoshida, T.; Suzuki, K. T. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1998**, *152*, 309-314.

¹⁰⁷ Kobayashi, Y.; Ogra, Y.; Ishiwata, K.; Takayama, H.; Aimi, N.; Suzuki, K. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15932-15936.

¹⁰⁸ Suzuki, K. T.; Kurasaki, K.; Okazaki, N.; Ogra, Y. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *206*, 1-8.

¹⁰⁹ Zhang, S.; Luo, Y.; Zeng, H.; Wang, Q.; Tian, Fei.; Song, J.; Cheng, W.H. *J. Nutr. Biochem.* **2011**, *22*, 71-78.

El selenio presenta cierta analogía química con el azufre.¹¹⁰ Tiene mayor carácter metálico, mayor tamaño que el azufre (1.17 Å frente a 1.04 Å de radio covalente) y menos carácter electronegativo que el azufre. El selenuro es menos básico, pero más nucleófilo, a la vez que más polarizable que el azufre. Existen seis isótopos del selenio¹¹¹, lo que permite una fácil detección por espectrometría de masas, al mostrar un patrón de picos característico.

El selenio no recibió especial atención hasta principios del siglo XX en el campo de la química orgánica sintética ya que, en general, la estabilidad de los compuestos es menor a la de los isómeros de azufre, siendo característico en muchos de ellos el depósito de selenio rojo por exposición a la luz. Sin embargo, en la década de los 70, se empieza a emplear en un amplio número de transformaciones dentro de la química de los alcaloides, esteroides, terpenoides, antibióticos y carbohidratos.¹¹⁰

El primer selenoazúcar sintetizado data de 1945¹¹² y el primer selenoazúcar natural descrito se aisló de la planta acumuladora de selenio¹¹³ *Astragalus racemosus* en 1997.¹¹⁰ Un amplio grupo de compuestos organoselénicos se ha empleado como intermedios en la preparación de derivados de azúcar,¹¹⁰ selenoazúcares^{114,115} y selenonucleósidos.¹¹⁶

¹¹⁰ Witczak, Z. J.; Czernecki, S. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1998**, *53*, 143-199.

¹¹¹ Lide, D. R. *Handbook of Chemistry and Physics*, 76th Ed., Ed. CRC Press, 1995.

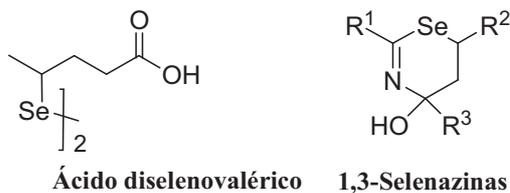
¹¹² Raymond, A. L. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1945**, *1*, 129-145.

¹¹³ Terry, N.; Zayed, A. M.; de Souza, M. P.; Tarun, A. S. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **2000**, *51*, 401-432.

¹¹⁴ Tiwari, P.; Misra, A. K. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2345-2348.

¹¹⁵ Braga, H. C.; Stefani, H. A.; Paisao, M. W.; Santos, F. W.; Ludtke, D. S. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 3441-3446.

Existen numerosos ejemplos que confirman las interesantes propiedades biológicas de los compuestos organoselénicos. Además del ebselén y el ácido metilselenínico, ya comentados, podemos mencionar el ácido γ,γ' -diselenodivalérico, usado en el tratamiento del Kwashiorkor¹¹⁷ (enfermedad tropical asociada a una gran malnutrición y a la consiguiente deficiencia en la cantidad y calidad de las proteínas), y las 1,3-selenazinas, efectivas contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina,¹¹⁸ además de poseer actividad anticancerígena.¹¹⁹ Por otro lado, Pinto y col. han descrito la síntesis de selenoazúcares^{120,121} análogos del salacinol, un inhibidor natural de glicosidasas aislado de la planta *Salacia reticulata*, usada en la medicina tradicional ayurvédica. Entre estos análogos destaca el blintol,¹²² con utilidad en el tratamiento de la diabetes tipo 2.¹²³



¹¹⁶ Jeong, L. S.; Tosh, D. K.; Kim, H. O.; Wang, T.; Hon, X.; Yun, H. S.; Kwon, Y.; Lee, S. K.; Choi, J.; Zhao, L. X. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 209-212.

¹¹⁷ Schwarz, K. *Fed. Proc.* **1961**, 666-673.

¹¹⁸ Koketsu, M.; Ishihara, H.; Hatsu, M. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **1998**, *101*, 179-186.

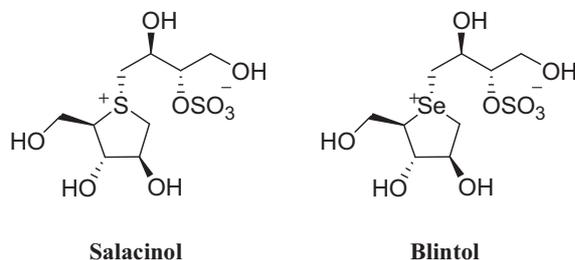
¹¹⁹ Cho, S. I.; Koketsu, M.; Ishihara, H.; Matsushita, M.; Nairn, A. C.; Fukazawa, H.; Uehara, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1475*, 207-215.

¹²⁰ Nasi, R.; Sim, L.; Rose, D. R.; Pinto, B. M. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 180-186

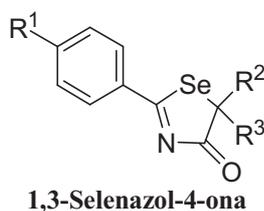
¹²¹ Liu, H.; Pinto, B. M. *Can. J. Chem.* **2006**, *84*, 1351-1362.

¹²² Liu, H.; Pinto, B. M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 753-755.

¹²³ Pinto, B. M.; Johnston, B. D.; Ghavami, A.; Szczepina, M. G.; Liu, H.; Sadalapure, K. PCT WO 20040625, 2004



Se ha demostrado que algunas selenazol-4-onas y selenoureas poseen actividad inhibitoria similar a la del ácido kójico frente a la actividad difenolasa (conversión de *o*-difenoles en *o*-quinonas) de la tirosinasa de hongos.¹²⁴⁻¹²⁶ Sin embargo, la mayoría de estos selenoderivados aplicados en ensayos de inhibición sobre células melanómicas, mostraron tanto citotoxicidad como efectos despigmentantes, por lo que su uso está restringido en la industria cosmética y alimentaria.¹²⁷



¹²⁴ Koketsu, M.; Choi, S. Y.; Ishihara, H.; Lim, B. O.; Kim, H.; Kim, S. Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1594-1596.

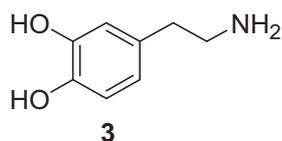
¹²⁵ Khan, M. T. H. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 2277-2295.

¹²⁶ Ahn, S. J.; Koketsu, M.; Ishihara, H.; Lee, S. M.; Ha, S. K.; Lee, K. H.; Hang, T. H.; Kim, S. Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 281-286.

¹²⁷ Chang T. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 2440-2475.

OBJETIVOS DE LA TESIS

Pudiendo disponer de HT a reducido coste se busca transformarlo químicamente en derivados en los cuales se potencien sus propiedades antioxidantes y sus actividades biológicas. Así, en el segundo capítulo de esta Tesis Doctoral se plantea como objetivo la obtención de dopamina (**3**), un neurotransmisor implicado en enfermedades como la esquizofrenia,¹²⁸ depresión¹²⁹ y Parkinson,¹³⁰ partiendo de HT mediante reacciones químicas sencillas. No existe descrita ninguna transformación de hidroxitirosol en dopamina, a excepción de un trabajo reciente en nuestro grupo de investigación.¹³¹



También se plantea la síntesis de derivados *O*-glicosilados de la dopamina a partir del hidroxitirosol. El interés de estos compuestos radica en su posible capacidad de para superar los inconvenientes que presenta el uso de L-DOPA, el principal fármaco utilizado en el tratamiento del Parkinson, que es capaz de penetrar en el sistema nervioso central, donde rápidamente se transforma en dopamina. Los derivados glicosilados de la

¹²⁸ Matthisse S.. *J. Psychiat. Res.*, **1974**, *11*, 107-113.

¹²⁹ Willner, P. *Brain Res. Rev.* **1983**, *6*, 21 1-224.

¹³⁰ Stocchi, F. *Parkinsonism and Related Disorders.* **2009**, *15*, 54–57.

¹³¹ López-García, M. A. *Tio y aza derivados de hidroxitirosol. Síntesis y actividad biológica.* Tesis Doctoral. **2011**.

dopamina pudieran traspasar la barrera hematoencefálica¹³² debido a la intervención de los transportadores de glucosa, fundamentalmente el GLUT1,¹³³ que hacen que estos derivados puedan ser absorbidos desde el flujo sanguíneo al sistema nervioso central, para una vez en el cerebro ser hidrolizados enzimáticamente y liberar dopamina.¹³⁴

En el tercer capítulo se plantea como objetivo la síntesis de selenoureas derivadas de HT que combinen el potencial antioxidante de las selenoureas con el del hidroxitirosol, mediante reacciones sencillas de dopamina con arilisoselenocianatos descritos por nuestro grupo de investigación.^{135,136} También se propone la síntesis de nuevos selenuros y diselenuros simétricos de hidroxitirosol, con objeto de analizar cómo influyen en la capacidad antioxidante de los nuevos compuestos la presencia de un segundo grupo catecol y las funciones de selenuro y diselenuro.

En el cuarto capítulo se propone, partiendo de isotiocianatos comerciales, la síntesis de tioureas isósteras de las selenoureas anteriormente descritas, que mantengan el fragmento de catecol en su estructura. Tioureas e isotiocianatos se pueden aislar de extractos de plantas conteniendo glicosinolatos como el *Tropaelum tuberosum*,¹³⁷ y son

¹³² Dalpiaz, A.; Filosa R.; De Caprariis, P.; Conte, G.; Bortolotti F.; Biondi F.C.; Scatturin A.; Prasad, P.D.; Pavanc, B. *Int. J. Pharm.* **2007**, *336*, 133–139.

¹³³ Mueckler, M. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 713–725.

¹³⁴ Fernandez, C.; Nieto, O.; Fontenla, J.A.; Rivas, E.; De Ceballos, M.L.; Fernández-Mayoralas A. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 767–71.

¹³⁵ Fernández-Bolaños, J.G.; López, O.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fuentes, J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4081–4084.

¹³⁶ López, O.; Maza, S.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J.G.; *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 2556–2566.

¹³⁷ Johns, T.; Neil Towers, G.H. *Phytochemistry*, **1981**, *20*, 2687–2689.

conocidas sus propiedades antioxidantes,¹³⁸ antituberculosas,¹³⁹ supresoras de apetito,¹⁴⁰ antitumorales,¹⁴¹ antimaláricas,¹⁴² antifúngicas¹⁴³ y antivirales^{144,145} en general y anti-VIH en particular.^{146,147}

También se propone la oxidación de las tioureas sintetizadas con DDQ (2,3-dicloro- 5,6-diciano-1,4-quinona), según el método propuesto por Land¹⁴⁸, con objeto de obtener una serie de 2-amino-tetrahidro-1,3-benzotiazepina-7,8-dioles que sigan conservando el fragmento de catecol.

Otros objetivos fundamentales en esta tesis son:

a) El estudio *in vitro* de las propiedades antioxidantes de los compuestos previamente sintetizados, basándonos en métodos conocidos y en modificaciones de los mismos puestos a punto en nuestro grupo de

¹³⁸ Abbott T.P.; Wohlman A.; Isbell T.; Momany F.A.; Cantrell C.;, Garlotta D.V.; Weisleder D. *Industrial Crops and Products*, **2002**, *16*, 43–57.

¹³⁹ Liav, A.; Angala S.K.; Brennan, P.J.; Jackson. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2649–2651.

¹⁴⁰ Bhandari, K.; Srivastava, S.; Shankar, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4189–4196.

¹⁴¹ Shusheng, Z.; Tianrong, Z.; Kun, C.; Youfeng, X.; Bo, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2778–2783.

¹⁴² Ekoue-Kovi K.; Yearick, K.; Iwaniuk D.P.; Natarajan J.K.; Alumasa, De Dios J.A.; Roepe, P.D.; Wolf, C. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 270–283.

¹⁴³ Krishnamurthy R.; Govindaraghavan S.; Narayanasamy J.; *Pestic. Sci.* **1999**, *52*, 145–151.

¹⁴⁴ Todouloul, O.G.; Papadaki-Valiraki I A.E.; Filippatos, E.C.; Ikeda S.; De Clercq, E.; *Eur J Med Chem*, **1994**, *29*, 127-131.

¹⁴⁵ Di Grandi, M.J.; Curran, K.J.; Feigelson, G.; Prashad, A.; Ross, A.A.; Visalli, R.; Fairhurst, J.; Feld, B.; Bloom J.D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 4157–4160.

¹⁴⁶ Venkatachalam T.K.; Mao C.; Uckun F.M. *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 4275–4284.

¹⁴⁷ Zhang H.; Vrang L.; Bäckbro K.; Lind P.; Sahlberg C.; Unge T.; Öberg B.; *Antivir. Res.* **1995**, *28*, 331–342.

¹⁴⁸ Land, E.J.; Perona, A.; Ramsden, C.A.; Riley, P.A. *Org. Biom. Chem.* **2009**, *7*, 944-950.

investigación,¹⁴⁹ y el estudio de sus propiedades anti-ennegrecimiento, medidas por su capacidad para inhibir la actividad mono y difenoloxidasa de la tirosinasa, responsable del oscurecimiento del marisco y de vegetales.

b) El estudio *ex vivo* de la inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos de ratas alimentadas con una dieta deficiente en vitamina E, utilizando los antioxidantes previamente sintetizados, según el protocolo descrito por Mitchell y col.¹⁵⁰ Este trabajo se realizó durante una estancia de dos meses en el Rowett Institute of Nutrition and Health de la Universidad de Aberdeen (Escocia, Reino Unido), bajo la dirección de los doctores Garry Duthie y Baukje de Roos

c) Estudio de la actividad antitumoral de algunos de los selenoderivados preparados frente a diversas líneas celulares. Este estudio se ha llevado a cabo en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), en colaboración con el Dr. Amancio Carnero y la Dra. M^a Ángeles López.

Por último, en el sexto capítulo se propone llevar a cabo reacciones químicas sencillas en sistemas “sin disolvente” y catalizadas por $\text{CeCl}_3/\text{NaI}/\text{SiO}_2$,¹⁵¹ que presentan como principales ventajas el más fácil aislamiento de los productos de reacción y la menor contaminación medioambiental debido a la ausencia de disolvente.¹⁵² Esta investigación

¹⁴⁹ Jiménez, A.; Rodríguez, R.; Jaramillo, S.; Rodríguez, G.; Espejo, J.A.; Guillén, R.; Fernández-Bolaños J., Heredia, A. *J. Agric. And Food Chem.*, **2005**, *53*, 5212-5217.

¹⁵⁰ Mitchell, J.H.; Gardner, P.T.; McPhail, C.B.; Morrice, P. C.; Collins, A.R.; Duthie, G.G. *Archiv. Biochem. Biophys.*, **1998**, *360*, 142-148.

¹⁵¹ Bartoli, G.; Bosco, M.; Marcantoni, E.; Petrini, M.; Sambri, L.; Torregiani E. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 9052-9055.

¹⁵² Bartoli, G.; Marcantoni E.; Marcolini, M.; Sambri, L.; *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6104–6143.

capítulo se realizó en la Universidad de Camerino (Italia) en una estancia de de dos meses bajo la dirección del profesor Enrico Marcantoni.

2. SÍNTESIS DE DOPAMINA Y GLICOSIL DERIVADOS DE DOPAMINA A PARTIR DE HIDROXITIRO SOL

2. SÍNTESIS DE DOPAMINA Y GLICOSIL DERIVADOS DE DOPAMINA A PARTIR DE HIDROXITIRO SOL

2.1. Introducción y antecedentes

2.1.1. Dopamina. Efectos fisiológicos.

Debido a su implicación en desórdenes neurológicos y mentales, la dopamina es uno de los neurotransmisores más ampliamente estudiados.¹⁵³ Los hechos más significativos que condujeron al reconocimiento de la importancia de la dopamina como neurotransmisor fueron: (1) la disminución de la dopamina en el cuerpo estriado del cerebro resultó ser la causa de la enfermedad del Parkinson,¹⁵⁴ (2) se comprobó que la dopamina estriatal y la límbica se originan en las neuronas dopaminérgicas mesoencefálicas,¹⁵⁵ y (3) el haloperidol, antagonista de la dopamina, mostró su eficacia en el tratamiento de los síntomas psicóticos en pacientes esquizofrénicos.¹⁵⁶ A la vista de su implicación en el control de los movimientos, y en un amplio rango de procesos asociados al comportamiento, como los estados de ánimo, estrés, y adicciones, no es de extrañar que las neuronas dopaminérgicas hayan sido uno de los principales objetivos de la neurofarmacología en los últimos 50 años.

Las dramáticas consecuencias de la degeneración de los sistemas de secreción de dopamina en los enfermos de Parkinson confirmaron la función

¹⁵³ Smidt, M. P.; Smits, S. M.; Burbach, J. P. H. *Eur. J. Pharmacol.*, **2003**, *480*, 75-88

¹⁵⁴ Carlsson, A. *Pharmacol., Rev.* **1959**, *11*, 490–493.

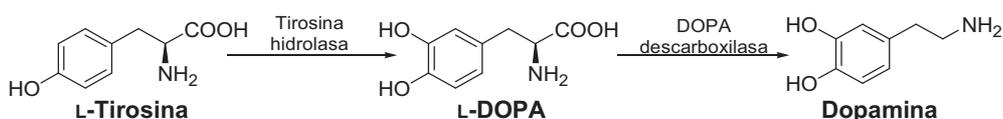
¹⁵⁵ Andén, N.E.; Fuxe, K.; Hamberger, B.; Hokfelt, T. *Acta Physiol. Scand.* **1966**, *67*, 306–312.

¹⁵⁶ Granger, B.; Albu, S. *Ann. Clin. Psychiatry*, **2005**, *17*, 137-140.

de la dopamina en el control del movimiento.¹⁵⁷ Los síntomas primarios de la enfermedad del Parkinson se deben a una excesiva contracción del músculo, estimulada por la acetilcolina, mientras que la dopamina la inhibe. La enfermedad del Parkinson ocurre cuando el efecto de la dopamina es menor que el de la acetilcolina, siendo esto normalmente producido por la deficiencia de la primera y no por el exceso de la segunda.¹⁵⁸

Los síntomas suelen aparecer cuando los niveles de actividad de las neuronas dopaminérgicas son el 25%¹⁵⁹ de la actividad normal, yendo estos en descenso progresivo y dando lugar a un agravamiento de los síntomas.

La dopamina es sintetizada en las neuronas dopaminérgicas siguiendo la secuencia siguiente:



En el primer paso de la síntesis interviene la enzima tirosina hidroxilasa, en el segundo paso la reacción está catalizada por la enzima llamada DOPA descarboxilasa, la cual para su correcta función necesita la presencia de fosfato de piridoxal (vitamina B6).¹⁶⁰ Mediante el uso de la L-DOPA se pueden paliar los efectos del Parkinson, al transformarse en dopamina en el sistema nervioso central y estimular los receptores de la

¹⁵⁷ Smidt, M. P.; Smits, S. M.; Burbach, J. P. H. *Eur. J. Pharmacol.*, **2003**, 480, 75-88.

¹⁵⁸ Aosaki, T.; Mina, S.; Suzuki, T.; Nishimura, K.; Masuda, M. *Geriatr. Gerontol. Int.* **2010**, 10, 5148-5157.

¹⁵⁹ <http://viartis.net/parkinsons.disease/biochemistry.htm>, consultado el 09/08/2011.

¹⁶⁰ Nagy, L.; Hiripi, L. *Neurochem. Internat.*, **2002**, 41, 9-16

misma¹⁶¹. No obstante, conforme avanza la enfermedad, el índice terapéutico (relación entre los efectos terapéuticos y los efectos secundarios) disminuye, y su efecto anti-parkinsoniano está a menudo asociado con efectos adversos incluyendo disminución progresiva de los beneficios sintomáticos y aparición de disquinesia.¹⁶²

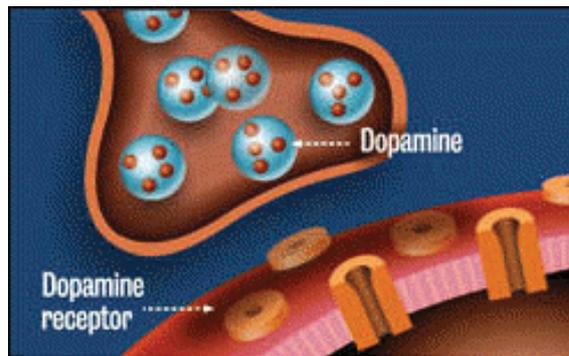


Figura 2.1. *Receptores de dopamina*

En los años 60 se descubrió la implicación de la dopamina en la depresión,^{163,164} enfermedad que según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2030 afectará a más personas que ningún otro problema de salud.¹⁶⁵ Numerosos estudios correlacionan algunos de sus síntomas con alteraciones en la neurotransmisión de dopamina,¹⁶⁶ relacionadas bien con defectos en la liberación de dopamina en las neuronas presinápticas, o bien con defectos en el catabolismo de la misma producidos por proteínas

¹⁶¹ Dutta, A.K.; Le, W. *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2006**, *16*,1613-1625.

¹⁶² Agnati L.F.; Leo, G.; Vergoni A.V.; Martínez, E.; Hockemeyer, J.; Lluís, C.; Franco, R.; Fuxe, K.; Ferré, S. *Brain Res. Bull.* **2004**, *64*, 155–164.

¹⁶³ Schildkraut, J.J. *Am. J. Psychiatry*, **1965**, *122*, 509–522.

¹⁶⁴ Schildkraut, J.J. *Annu. Rev. Med.* **1974**, *25*, 333–348.

¹⁶⁵ <http://news.bbc.co.uk/2/ni/8230549.stm>, consultado el 10/08/2011.

¹⁶⁶ Dunlop, B.W., Nemeroff, C.B. *Arch. Gen. Psychiatry*, **2007**, *64*, 327–337.

implicadas en su metabolismo, que a su vez presentan un claro componente genético.¹⁶⁷

La esquizofrenia es una de las enfermedades mentales más severas y de efectos más desestabilizantes, afectando al 1% de la población mundial.¹⁶⁸ Sus síntomas más característicos son alucinaciones, delirios y trastornos del comportamiento causados por sobreestimulación de los receptores de dopamina, jugando un papel primordial en la patogénesis de la esquizofrenia la disfunción de la neurotransmisión de dopamina.¹⁶⁹ El desorden dopaminérgico está presente al inicio de la enfermedad y en los estados de exacerbación, no siendo observable en los periodos de remisión.¹⁷⁰

El síndrome de Tourette es un trastorno neurológico que se caracteriza por tics y otros movimientos involuntarios, rápidos y repetidos.¹⁷¹ La causa no ha sido definitivamente establecida, pero se sabe que está asociada a un tipo especial de hiperactividad en el cerebro. Teorías apuntan a una sobreabundancia de la dopamina, estando involucrados también otros neurotransmisores como la serotonina.

¹⁶⁷ Opmeer E.M., KorteKaas R.; Aleman A. *Progress in Neurobiology*, **2010**, *92*, 112–133.

¹⁶⁸ Sullivan, P.F.; Neale, M.C.; Kendler, K.S. *Am. J. Psychiatry*, **2000**, *157*, 1552–1562.

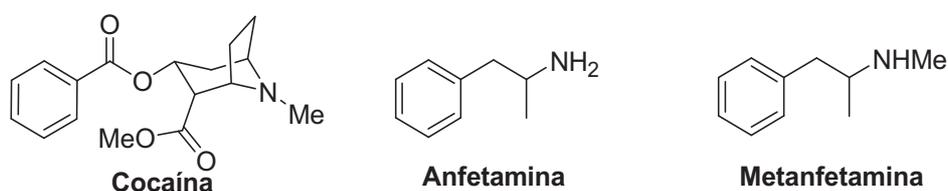
¹⁶⁹ Howes, O.D.; Montgomery, A.J.; Asselin, M.C.; Murray, R.M.; Valli, I.; Tabraham, P.; Bramon-Bosch, E.; Valmaggia, L.; Johns, L.; Broome, M.; McGuire, P.K.; Grasby, P.M. *Arch. Gen. Psychiatry*, **2009**, *66*, 13–20.

¹⁷⁰ Laruelle, M.; Abi-Dargham, A.; Gil, R.; Kegeles, L.; Innis, R. *Biol. Psychiatry*, **1999**, *57*, 56–72.

¹⁷¹ Gilbert, D.L.; Christian, B.T; Gelfand, M.J.; Shi, B.; Mantil, J.; Salle, F.R., *Neurol.*, **2006**, *67*, 1695-1696.

La dopamina también interviene en el comportamiento sexual de los mamíferos, tanto machos como hembras.¹⁷² Estudios en animales demuestran que los receptores de dopamina D-1 en el hipotálamo promueven la erección, y actúan sinérgicamente con los receptores D-2 para aumentar la motivación sexual.¹⁷³

Drogas como la anfetamina, la metanfetamina y la cocaína causan cambios prolongados en el cerebro, asociados con el deterioro de la memoria y la capacidad de aprendizaje.¹⁷⁴ Al incidir en el sistema ortosimpático también causan hipertensión, taquicardia, hiperglucemia y vasodilatación periférica. Se ha descrito que la anfetamina, y la metanfetamina, aún más potente que la anfetamina, causan la degeneración de las neuronas que producen dopamina.^{175,176}



La MDA (3,4-metilenodioxianfetamina) o éxtasis destruye las neuronas productoras de serotonina que regula el estado de ánimo, la actividad sexual,

¹⁷² Melis, R.M.; Argiolas, A. *Neurosci. Biohav. Rev.* **1995**, *19*, 19-38.

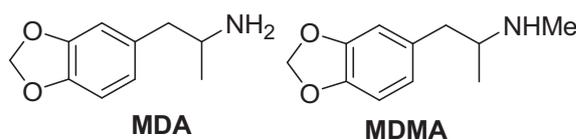
¹⁷³ Moses, J.; Loucks, J.A.; Watson, H.L.; Matuszewich, L.; Hull, E.M.; *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1995**, *51*, 681-686.

¹⁷⁴ Hadjiefthyvoulou, F.; Fisk J. E.; Montgomery, C.; Bridge, N.; *J. Psychopharmacol.*, **2010**, *25*, 453-464.

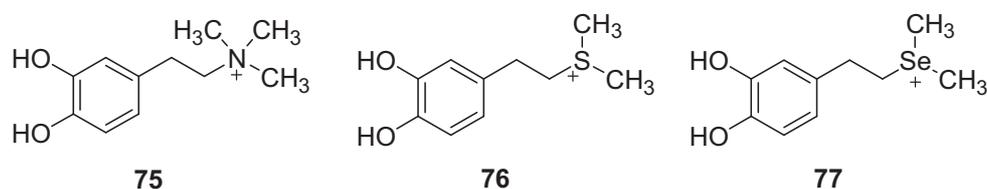
¹⁷⁵ Yuan, J.; Callahan, B.T.; McCann, U.D.; Ricaurte, G.A., *J. Neurochem.*, **2001**, *77*, 1338-1347.

¹⁷⁶ Ricaurte, G. A.; Mehan, A. O.; Yuan, J.; Hatzidimitrion, G.; Xie, T.; Mayne, A. H.; McCann, U. D.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 91-98.

el sueño y la sensibilidad al dolor.¹⁷⁷ La MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina) se caracteriza por sus efectos empatógenos y porque presentan efectos estimulantes más potentes que la propia metanfetamina.¹⁷⁸



A pH fisiológico la dopamina se encuentra tanto en forma neutra como sal de amonio. Se ha comprobado como la presencia de carga en el grupo amino (**75**), o en análogos en los que el grupo nitrogenado se sustituye por azufre (**76**) o por selenio (**77**), es fundamental para activar los receptores dopaminérgicos D-2, e inhibir la liberación de acetilcolina.^{179,180}



¹⁷⁷ McNamara, R.; Kerans, A.; O'Neill, B.; Harkin, A., *Neuropharmacol.* **2006**, *50*, 69-80.

¹⁷⁸ Bernschneider-Reif, S.; Oexler, F.; Freudemann, R.W., *Pharmazie*, **2006**, *61*, 966-972.

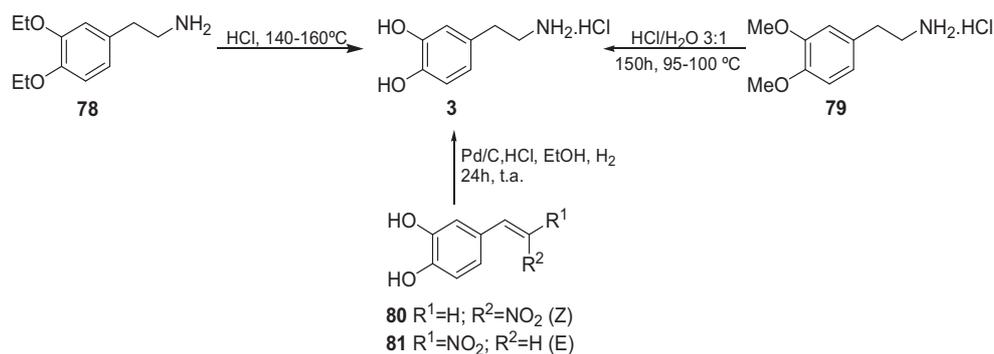
¹⁷⁹ Wallace, R.A.; Wallace, L.; Harrold; Miller, D.D.; Uretsky, N. *Biochem. Pharm.* **1989**, *38*, 2019-2025.

¹⁸⁰ Sabol., B.; Boldry, R.; Farooqui, T.; Chang, Y.A.; Miller.D.; Uretsky, N. *Biochem. Pharm.* **1981**, *36*, 1679-1685.

2.1.2. Síntesis de dopamina.

Existen numerosos métodos para la síntesis de dopamina, incluyendo algunas patentes.

Belyakov y col.¹⁸¹ sintetizaron hidrocloreto de dopamina por hidrólisis ácida de 2-(3,4-dietoxifenil)etilamina (**78**). Budnik¹⁸² obtuvo el clorhidrato de dopamina mediante la desmetilación del hidrocloreto de homoveratrilamina (**79**), en HCl acuoso, con un rendimiento del 92%. Murahashi y Kono¹⁸³ obtuvieron dopamina y otras fenetilaminas por hidrogenación catalítica de (*Z*) y (*E*) β-nitrostirenos (**80** y **81**), utilizando paladio sobre carbón activo y ácido clorhídrico concentrado en medio etanólico (Esquema 2.1).



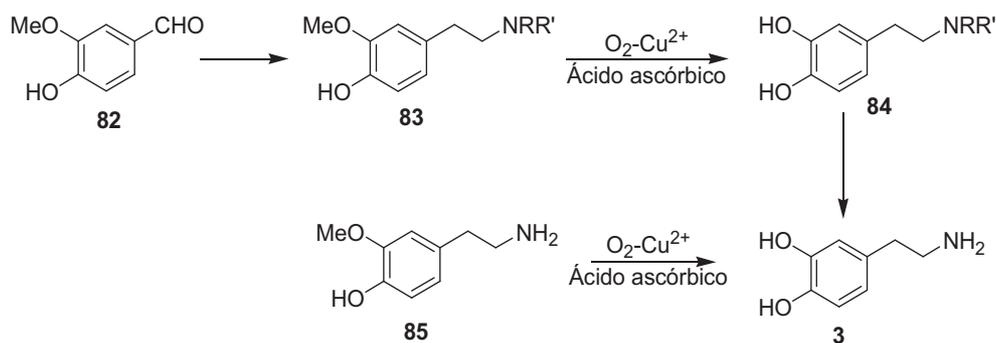
Esquema 2.1

¹⁸¹ Belyakov, N. G.; Lomzakova, V. I.; Kosmynina, G. V. Hydrolytic method for the preparation of 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethylamine hydrochloride from hydrochloric acid and 2-(3,4-dietoxyphenyl)ethylamine hydrochloride or its free base. **2001** RU 2164223, C2 2001 0320.

¹⁸² Budnik, J. 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethylamine hydrochloride. **1986** CS 227998 19840514.

¹⁸³ Murahashi, S.; Kono, M. Preparation of phenethylamines from β-nitrostyrenes. **1991** JP 03027345, A 19910205.

Aihara y col. optimizaron la hidrólisis de la *O*-metildopamina **85** con el sistema O_2-Cu^{2+} -ácido ascórbico¹⁸⁴ y también obtuvieron dopamina a partir de vainillina **82** como se muestra en el **Esquema 2.2**:



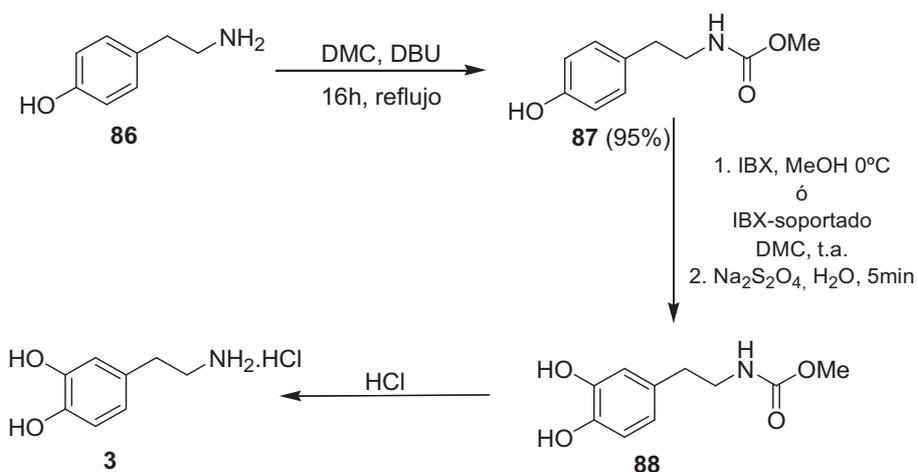
Bernini y col.¹⁸⁵ obtuvieron dopamina a partir de tiramina (4-hidroxifeniletilamina) **86**. En primer lugar protegieron el grupo amino con carbonato de dimetilo (DMC) en presencia de DBU. La introducción del segundo grupo hidroxilo es llevada a cabo utilizando ácido 2-yodoxibenzoico (IBX), o IBX soportado sobre polímero, capaz de convertir fenoles¹⁸⁶ y metil aril éteres¹⁸⁷ en *o*-quinonas con alta regioselectividad. La reducción con ditionito sódico ($Na_2S_2O_4$) y posterior *N*-desprotección dio lugar a la dopamina **3** (**Esquema 2.3**).

¹⁸⁴ Aihara, K.; Iguchi, T.; Hirobe, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, 38, 842-844.

¹⁸⁵ Bernini, R.; Crisante, F.; Barontini, M.; Fabrizi, G. *Synthesis*, **2009**, 22, 3838-3842.

¹⁸⁶ Magdziak, D.; Rodriguez, A. A.; Van De Water, R. W.; Pettus, T. R. R. *Org. Lett.* **2002**, 4, 285-288.

¹⁸⁷ Ozanne, A.; Pouységou, L.; Depernet, D.; Francois, B.; Quideau, S. *Org. Lett.* **2003**, 5, 2903-2906.



Esquema 2.3

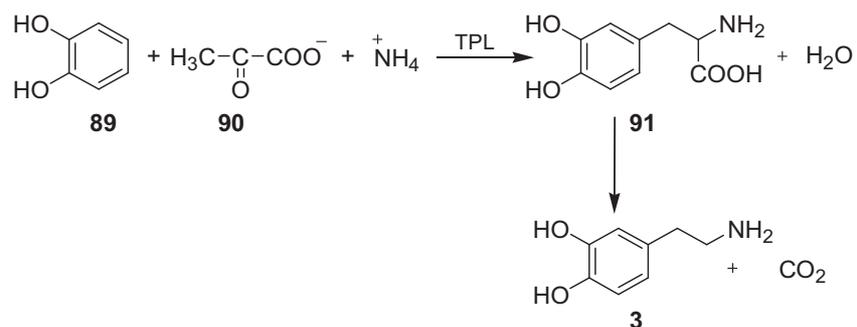
Las drásticas condiciones necesarias para eliminar el grupo protector y ello proporcionó rendimientos muy bajos de **3**, por lo que los mismos autores propusieron un método alternativo sustituyendo la protección con DMC por dicarbonato de di-*terc*-butilo, que permitió la desprotección del grupo *N*-Boc bajo condiciones más suaves, utilizando cloruro de trimetilsililo (TMSCl) en metanol, y la obtención de dopamina con buen rendimiento.

Existen también métodos enzimáticos para la síntesis de dopamina. Loeffler y Zenk¹⁸⁸ describen la obtención de dopamina a partir de tiramina catalizado por tirosinasa obtenida de la planta *Berberis stolonifera*. Sung y col.¹⁸⁹ llevaron a cabo la síntesis enzimática de dopamina en dos etapas: obtención de L-DOPA (**91**), catalizada por una tirosina fenol-liasa (TPL) de bacterias del género *Symbiobacterium*, a partir de catecol (**89**) y piruvato de

¹⁸⁸ Loeffler, S.; Zenk, M.H. *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 3499-3503.

¹⁸⁹ Lee, S.G.; Hong, S.P.; Sung, M.H. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 298-302.

amonio (**90**), seguido de la conversión de L-DOPA a dopamina mediante la actuación de la L-DOPA descarboxilasa (DDC) extraída de hígados de rata (**Esquema 2.4**).



Esquema 2.4

La descarboxilación de L-DOPA también fue llevada a cabo por Weissova y col.,¹⁹⁰ utilizando cultivos de células inmovilizadas en lugar de extractos puros de enzimas.

2.1.3. Síntesis de glicosil derivados de dopamina.

El uso de L-DOPA en tratamientos crónicos para paliar los efectos del Parkinson conlleva a la aparición de numerosos problemas.¹⁶² El transporte de L-DOPA a través de la barrera hematoencefálica es mediado por el sistema 1, un transportador muy efectivo de aminoácidos neutros. Desafortunadamente, la conversión de L-DOPA en dopamina ocurre también en el sistema nervioso periférico por la enzima L-DOPA

¹⁹⁰ Weissova, K.; Stano, J.; Nemeč, P.; Kovács, P.; Kakoniová, D.; Liskov, D. *Phytochemistry*, **1995**, 38, 859-860,

descarboxilasa, lo que se traduce en problemas de disquinesia.¹⁹¹ Estas limitaciones han estimulado la búsqueda de nuevas estrategias.^{192,193} Una de ellas consiste en la búsqueda de derivados de dopamina capaces de penetrar la barrera hematoencefálica haciendo uso de transportadores específicos. La glucosa, fuente de energía del cerebro, y otras hexosas son transportadas a través de la barrera hematoencefálica por medio de los transportadores de glucosa GLUT1.^{194,195} Este transportador proteico se localiza en la membrana de las células endoteliales de los capilares del cerebro que componen la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, se podría prever el transporte de dopamina hacia el sistema nervioso central (SNC) uniendo el neurotransmisor a una molécula de azúcar de modo que el glicoconjugado resultante pueda atravesar la barrera utilizando estos transportadores.¹⁹⁶ Al llegar al SNC, el profármaco debe ser liberado enzimáticamente con glicosidasas para convertirse en el compuesto activo. Sin embargo, investigaciones con los glucosil derivados **21** y **22** han demostrado la baja afinidad de estos compuestos por los transportadores GLUT-1.¹⁹⁷

El glucoderivado de la dopamina **21** ha sido hallado de forma natural en las semillas de la planta leguminosa tropical *Entada pursaetha* (“hierba

¹⁹¹ Dalpiaz, A.; Filosa, R.; De Caprariis, P.; Conte, G.; Bortolotti, F.; Biondi, C.; Scatturin, A.; Prasad, P.D.; Pavan, B. *Int. J. Phram.*, **2007**, *336*, 133-139.

¹⁹² Madrid, Y.; Langer, L.F.; Brem, H.; Laner, R. *Adv. Pharmacol.*, **1991**, *22*, 199-321.

¹⁹³ Audus, K.L.; Chikhale, P.J.; Miller, W.D.; Thompson, S.E.; Borchardt, R.T., *Adv. Drug. Res.*, **1992**, *23*, 713-725.

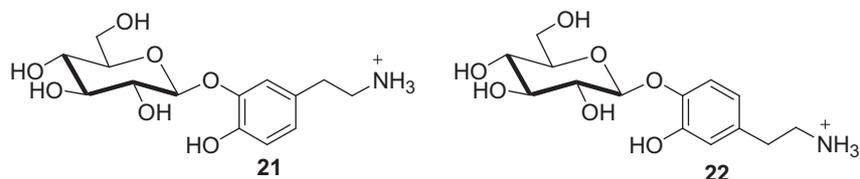
¹⁹⁴ Oldendorf, W.H.; *Am. J. Physiol.*, **1994**, *221*, 7114-7118.

¹⁹⁵ Mueckler, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 713-725.

¹⁹⁶ Prokai, L.; *Prog. Drug. Res.* **1998**, *51*, 95-131.

¹⁹⁷ Fernández, C.; Nieto, O.; Fontenla, J. A.; Rivas, E.; de Ceballos, M. L.; Fernández-Mayoralas, A. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 767-771.

de los sueños de África”)¹⁹⁸ y en la hemolinfa del gusano del tabaco (*Manduca sexta*).¹⁹⁹



Andrews y col.²⁰⁰ demostraron la presencia de glucósidos de dopamina en habas (*Vicia faba*), sin poder elucidar si se trataba del 3-*O*-glucósido de dopamina **21**, o el 4-*O*-glucósido **22**.

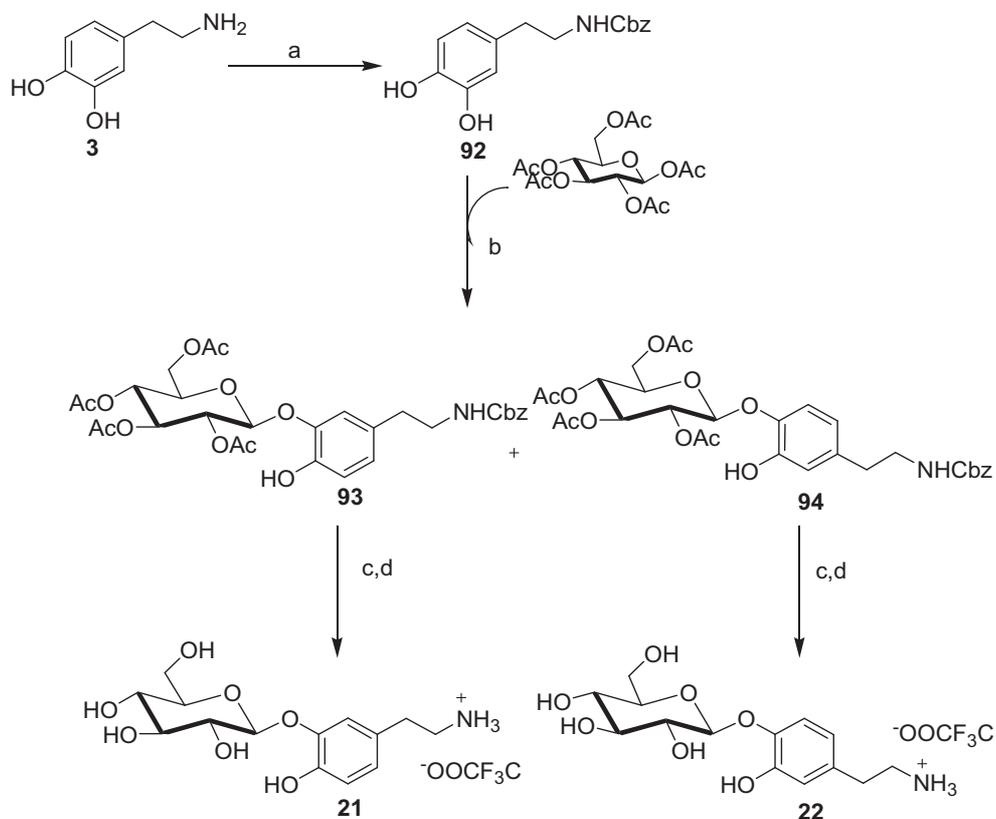
Se han propuesto rutas sintéticas para la obtención de los *O*-glicósidos de la dopamina. Fernández y col.²⁰¹ partieron de dopamina, cuyo grupo amino protegieron con bencilcloroformato para dar *N*-benciloxycarbonil dopamina, que tras la glicosilación con β-D-glucosa pentaacetilada y posterior desprotección dio lugar a los derivados **21** y **22** como sales de trifluoroacetato (**Esquema 2.5**).

¹⁹⁸ Larsen, P.O.; Pedersen, E.; Sorensen, H.; Sorup, P. *Phytochemistry*, **1973**, *12*, 2243-2247.

¹⁹⁹ Hopkins, T.L.; Morgan, T.K.; Mueller, D.D.; Tomer, K.B.; Kramer, K.J. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **1995**, *25*, 29-37.

²⁰⁰ Andrews, R.S.; Pridham, J.B. *Nature*, **1965**, *205*, 1213-1214.

²⁰¹ Fernández, C.; Nieto, O.; Rivas, E.; Montenegro, G.; Fontenla, J.A.; Fernández-Mayoralas, A. *Carbohydr. Res.* **2000**, *327*, 353-365.



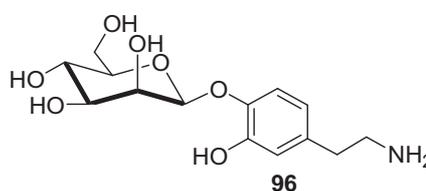
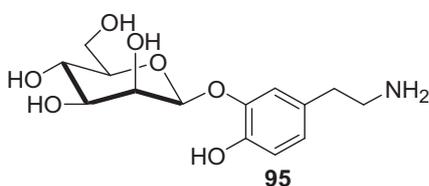
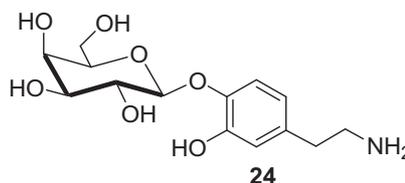
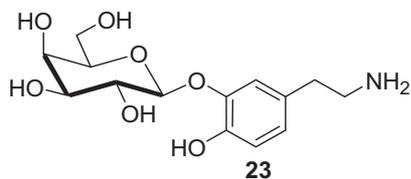
Esquema 2.5. (a) Benclloroformato, MeOH, Et_3N , $0^\circ C$, 2 h (b) $BF_3 \cdot OEt_2$, CH_2Cl_2 , Ar, t.a. 4 h. (c) 0.1 M NaMeO-MeOH, t.a., 1.5 h. (d) H_2 , CF_3COOH (1.6 equiv), MeOH, Pd-C, t.a., 1 h.

Existen también métodos enzimáticos para la preparación de estos derivados glucosilados. Yoon y col.²⁰² emplearon la enzima glucosiltransferasa para obtener **21** y **22**, partiendo de clorhidrato de dopamina y ciclomaltohexosa. Un método más sencillo fue llevado a cabo por Sivakumar y col.,²⁰³ glicosilando la dopamina usando la glucoamilasa de mohos *Rhizopus* y β -glucosidasa soportada sobre perlas de alginato

²⁰² Yoon, S.H; Fulton, D.B.; Robyt, J.F. *Carbohydrate Res.* **2009**, 344, 2349-2356.

²⁰³ Sivakumar, R.; Divakar, S. *Enzyme Microb. Technol.* **2009**, 44, 33-39.

cálcico. Este método permitió además la obtención de los galactoderivados **23** y **24**, y los manoderivados **95** y **96**.



Para determinar la estabilidad y capacidad de liberar dopamina después de alcanzar la corteza cerebral, se incubaron los compuestos **21** y **22** en presencia de enzimas específicas, plasma de ratas, y extractos de cerebro de ratas.²⁰¹ En experimentos *in vitro* la liberación de dopamina a partir de los glicósidos tiene lugar a partir de un mecanismo catalizado por glucosidasa de almendras. Sin embargo, fueron muy estables en plasma, debido a la baja concentración del enzima en sangre.²⁰⁴ En el extracto de tejido cerebral, **21** y **22** fueron lentamente hidrolizados, mostrando diferentes ratios de hidrólisis ($t_{1/2} = 5.6$ días para **21** y 2.8 días para **22** frente a $t_{1/2} = 3$ horas de la dopamina en extractos de tejido cerebral).

También se estudió la actividad antioxidante por el método del DPPH de los glicósidos derivados de dopamina²⁰³ resultando un IC_{50} de

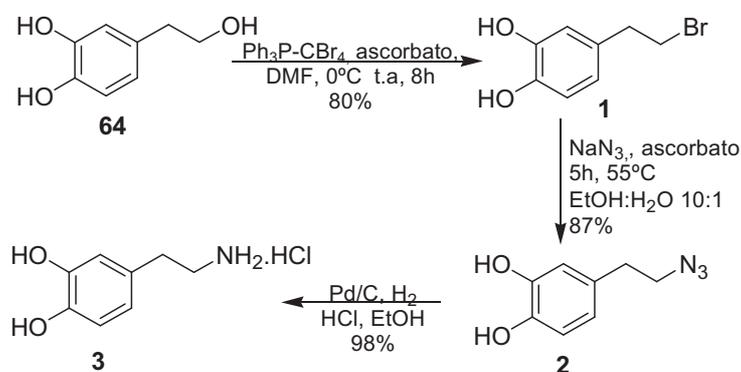
²⁰⁴ De Bont, D.B.A.; Leenders, R.G.G.; Haisma, H.J.; Van der Meulen-Muileman, I.; Schreen, H.W. *Bioor. Med. Chem.*, **1997**, 5, 405-414.

0.98 mM para los glucoderivados **21** y **22**, 0.93 mM para los galactopiranosidos **23** y **24**, y 1,80 mM para los manopiranosidos **95** y **96**. Considerablemente menos activos que la dopamina que presenta valores de IC_{50} de 0.04 mM.²⁰³

2.2. Resultados y discusión.

2.2.1. Síntesis de dopamina

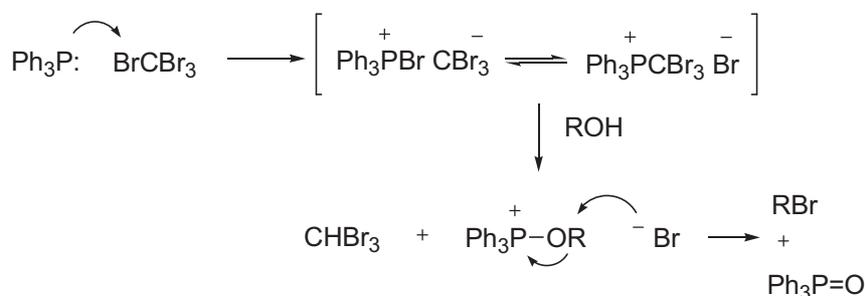
El objetivo del presente capítulo es la obtención de clorhidrato de dopamina partiendo de hidroxitirosol. Este procedimiento se basa en la sustitución del hidroxilo primario del HT por bromo, que es fácilmente desplazable por un grupo azido. La hidrogenación catalítica en medio ácido del azido derivado rindió el clorhidrato de dopamina **3** con un 98% de rendimiento. (**Esquema 2.6**)



Esquema 2.6

La introducción del átomo de bromo en sustitución del hidroxilo alifático se llevó a cabo mediante el sistema trifenilfosfina–tetrabromuro de

carbono ($\text{PPh}_3\text{-CBr}_4$), los llamados reactivos de Appel.²⁰⁵ Se empleó el método descrito por Pluemanupat y col.²⁰⁶ con algunas modificaciones, utilizando dimetilformamida como disolvente, en una relación molar HT: PPh_3 : CBr_4 1:3:2. También se adicionó un equivalente de ascorbato sódico y se empleó atmósfera de argón para evitar la oxidación del grupo catecol del HT. En este paso se obtuvo **1** con un rendimiento del 80%. El mecanismo por el cual el átomo de bromo desplaza al grupo hidroxilo se representa en el **Esquema 2.7**.



Esquema 2.7

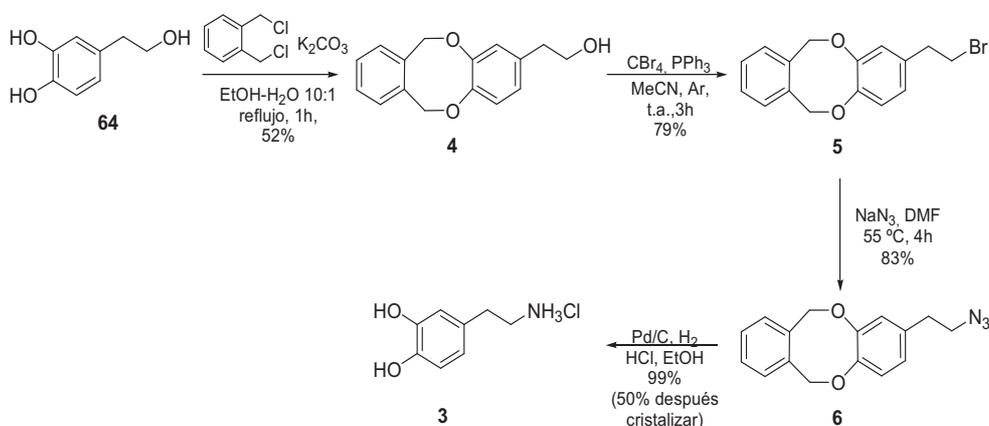
El tratamiento de **1** con azida sódica, en etanol:agua, a 55 °C durante 5 horas, provocó el desplazamiento del átomo de bromo por el grupo azido, obteniéndose **2** con un 87% de rendimiento. En este caso también se empleó un equivalente de ascorbato sódico para evitar oxidaciones indeseables del fragmento catecol. El tratamiento de **2** con el catalizador de paladio/carbono en atmósfera de hidrógeno provocó la reducción del grupo azido a amino. El uso de etanol:HCl acuoso 2N propicia la formación del clorhidrato de

²⁰⁵ Appel, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1975**, *14*, 801–811.

²⁰⁶ Pluemanupat, W.; Chantarasriwong, O.; Taboonpong, P.; Jangb, D.O.; Chavasiria, W. *Tetrahedron Lett*, **2007**, *48*, 223–226.

dopamina. Por el contrario, la reducción en medio neutro da como resultado la amina neutra, mucho más lábil y con tendencia a la fotodescomposición. Por evaporación del disolvente se obtuvo dopamina de elevada pureza con rendimiento casi cuantitativo. El hidrocloreto se pudo recrystalizar en etanol:éter, con un rendimiento del 55 %.

Previamente, abordamos la síntesis de **3** por un procedimiento análogo que incluye un paso adicional en el cual el fragmento catecol del HT es protegido con el grupo *o*-xililenodiilo, con la finalidad de evitar reacciones de oxidación. El resto de pasos conducentes a la obtención de dopamina son equivalentes a los seguidos para los intermedios no protegidos, y comprenden la sustitución del hidroxilo primario por bromo, desplazamiento del bromo por azida e hidrogenación catalítica en medio ácido (Esquema 2.8).



Esquema 2.8

El intermedio *O*-protegido **4** se obtuvo por reacción del HT con α, α' -dichloroxileno en medio básico hidroalcohólico. Las condiciones de reacción

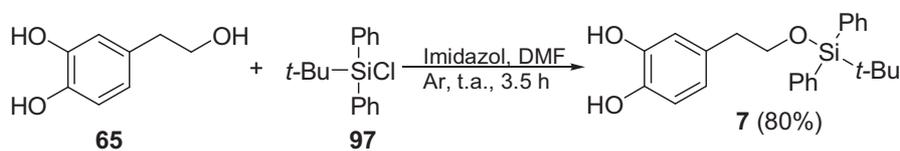
(calentamiento a reflujo, 1h) limitan el rendimiento a un 52 %, lo cual hace de esta ruta sintética un procedimiento menos conveniente para la síntesis de la dopamina **3** a partir de hidroxitirosol. La introducción del sustituyente bromo en lugar del –OH se realizó, al igual que en el caso anterior, con el sistema $\text{PPh}_3\text{-CBr}_4$, disminuyendo el tiempo de reacción a 3h, resultando el bromoderivado **5** con un 79% de rendimiento. El átomo de bromo se sustituyó nuevamente por el grupo azido con azida sódica a temperatura moderada (55 °C) en DMF, para dar **6** con rendimiento del 83%. La hidrogenación catalítica en presencia de HCl, proporcionó el hidrocloreto de dopamina **3** de forma cuantitativa y con elevada pureza.

Las estructuras propuestas para los compuestos **1-6** se confirman mediante datos espectroscópicos. En los espectros IR los intermedios desprotegidos muestran la banda típica de los –OH fenólicos entre 3400 y 3300 cm^{-1} , no presente en los xililenoderivados. A 2100 cm^{-1} se visualiza la banda característica de absorción del grupo azido en **2** y **6**. En los espectros de $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ (Tabla 2.1) se observan diferencias significativas en los grupos metilenos del fragmento de etilideno, especialmente en el CH_2 unido al heteroátomo ($\text{CH}_2\text{-X}$).

Tabla 2.1. Desplazamientos químicos de los grupos metilenos unidos al anillo aromático (CH_2 -Ar) y al heteroátomo (CH_2 -X) de los compuestos intermedios en la síntesis de dopamina 3.

	1H -RMN		^{13}C -RMN	
	δ CH_2 -Ar	δ CH_2 -X	δ CH_2 -Ar	δ CH_2 -X
1	3.04	3.51	33.2	38.7
2	2.72	3.41	35.7	53.9
3	2.81	3.10	33.9	42.2
4	2.67	3.66	39.4	64.1
5	3.03	3.49	32.7	38.7
6	2.76	3.43	34.7	52.5

También hemos preparado el sililderivado **7** en el cual el hidroxilo primario reacciona selectivamente frente a los hidroxilos de catecol, haciendo reaccionar el hidroxitirosol con cloruro de *tert*-butildifenilsililo **97**, utilizando como base imidazol. Tras 3.5 horas de reacción en atmósfera inerte, se obtuvo **7** con un 80% de rendimiento (**Esquema 2.9**).



Esquema 2.9

No hemos encontrado en la bibliografía ningún derivado sililado del hidroxitirosol formando sililéteres ni en su hidroxilo primario ni en los OH del fragmento catecol de la molécula, a pesar de que la obtención de sililéteres es una metodología ampliamente utilizada para la protección de grupos hidroxilos de alcoholes y fenoles.²⁰⁷⁻²¹⁰

La elevada lipofilidad adicional que aporta el grupo *tert*-butildifenilsililo podría incrementar algunas de las propiedades del hidroxitirosol en las que su hidrofilia sea un factor limitante. Estudios recientes de Espartero y col.²¹¹ están siendo enfocados a la obtención de los alquil éteres de hidroxitirosol **100a-h**, potenciando su lipofilia y la consiguiente mejora de su biodisponibilidad y protección de alimentos grasos frente a la oxidación. Sin embargo, la síntesis de estos derivados implica un paso previo de protección del grupo catecol mediante bencilación del mismo, y otro posterior de desprotección (**Esquema 2.10**).

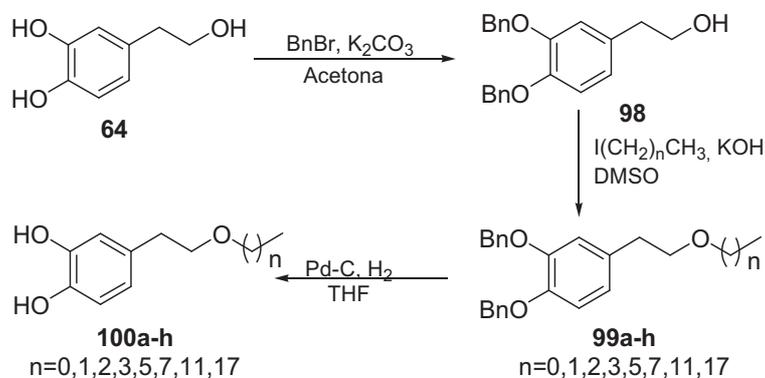
²⁰⁷ Brook, M. A.; Baldozzzi, S.; Moramed, M.; Gotarrdo, C. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 10027-10040.

²⁰⁸ Azizi, N.; Saidi, M. R. *Organometallics*, **2004**, *23*, 1457-1458.

²⁰⁹ Saxena, I.; Deka, N. *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 4005-4011.

²¹⁰ Chen, H. M.; Hosmane, R. S.; *Molecules*, **2000**, *5*, 1187-1193.

²¹¹ Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Rodriguez, G.; Trujillo, M.; Fernández-Bolaños, J.; Espartero, J. L. *Molecules*, **2009**, *14*, 1762-1772.



La regioselectividad mostrada por el nuevo procedimiento descrito en el **Esquema 2.9** permite, en un solo paso, por una parte la protección selectiva del grupo hidroxilo primario, y por otra parte la obtención de sililéteres con cierta analogía con *O*-alquil éteres.

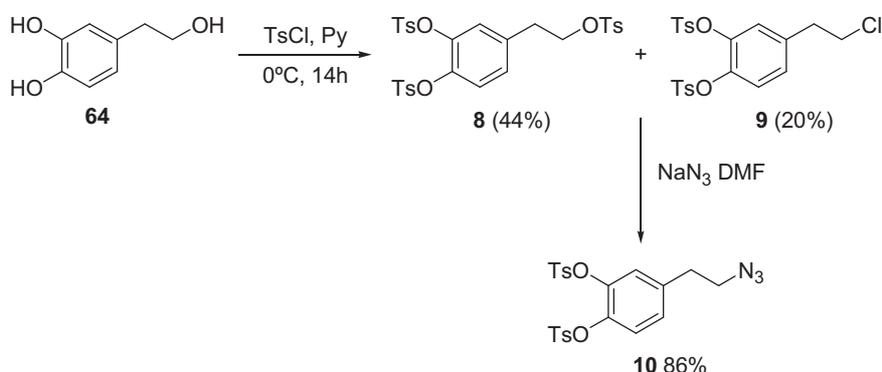
Sustituyendo el imidazol por otras bases débiles como DBU o CaCO_3 en acetonitrilo pueden ser sililados también grupos hidroxilos fenólicos. Se intentó la formación de sililéteres por reacción con los hidroxilos del fragmento de catecol del bromoderivado **1**, utilizando DBU como base en acetonitrilo, pero en estas condiciones de reacción solamente se obtuvieron productos de descomposición de **1**.

En los espectros de ^1H -RMN pueden apreciarse las señales de los protones aromáticos de los fenilos unidos al átomo de silicio, formando dos multipletes a 7.59 ppm para los hidrógenos en posición *orto* y 7.37 para el resto de los protones aromáticos. Los metilos del grupo *t*-butilo aparecen como un singulete a 1.02 ppm. En ^{13}C -RMN el grupo metileno unido al sililéter aparece a 65.3 ppm, a campo más bajo que cuando se encuentra

unido a otros sustituyentes como el amino o bromo. El carbono cuaternario del grupo *terc*-butilo aparece a 19.2 ppm como una señal característica.

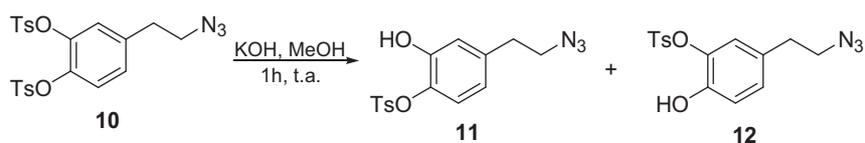
2.2.1. Síntesis de glicosil derivados de dopamina

El objetivo de este capítulo es la obtención de los glucosil y galactosil derivados de hidroxitirosol **21-24**. Como estrategia sintética se propone la síntesis de azido compuestos derivados del hidroxitirosol, como precursores de los derivados glicosilados. Para ello se convirtió el hidroxilo de la cadena alifática en un grupo fácilmente desplazable por el grupo azido. Esta conversión se lleva a cabo mediante tosilación del hidroxitirosol con cloruro de tosilo (3.2 equiv), en piridina a 0 °C, lo que condujo a la obtención de los correspondientes derivados tri- y di-*O*-tosilados **8** y **9**, que se separan por cromatografía en columna con rendimientos del 44 y 20% respectivamente. La formación del derivado clorado **9** se explica mediante desplazamiento del grupo *O*-tosilo en el medio de reacción por el anión cloruro que proviene del cloruro de tosilo. Se obtienen así derivados de HT que contienen grupos en la cadena lateral fácilmente desplazables por el anión azida, quedando protegidos los hidroxilos aromáticos, lo cual puede evitar reacciones secundarias de degradación del fragmento catecol. El azido derivado **10** se obtuvo a partir de la mezcla de los derivados **8** y **9**, por tratamiento con azida sódica en DMF durante 24 horas a temperatura ambiente más una hora adicional con un suave calentamiento a 50 °C, obteniendo así **10** con un 86 % de rendimiento (**Esquema 2.11**) .



Esquema 2.11

La desprotección del azido derivado **10** mediante hidrólisis con potasa metanólica a temperatura ambiente durante una hora, siguiendo el procedimiento descrito por Kampouris,²¹² condujo a la obtención de una mezcla de los derivados monotosilados **11** y **12** en la proporción aproximada 1:1 con un rendimiento del 75 %. Ambos regioisómeros presentan la misma movilidad cromatográfica en distintos eluyentes y no han podido ser separados. Se confirma así que el tratamiento con KOH metanólica sólo hidroliza a uno de los dos grupos *O*-tosilo presentes en la molécula. (Esquema 2.12)

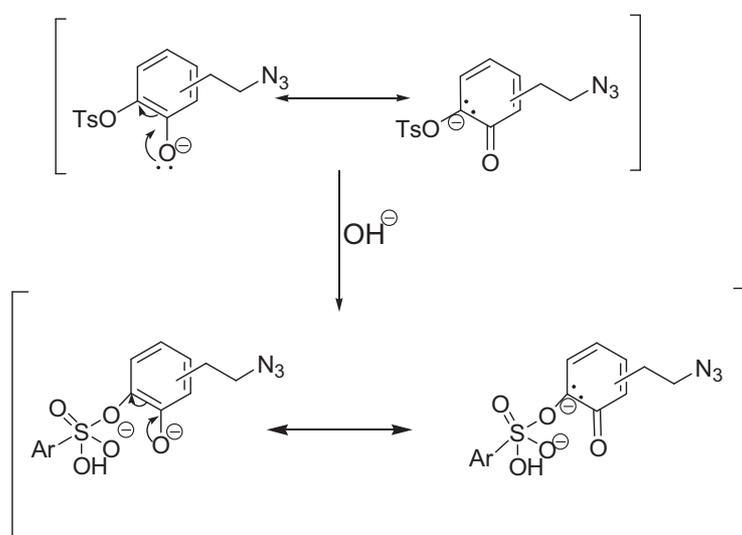


Esquema 2.12

Forzando las condiciones de reacción (KOH metanólica, a reflujo 4 horas), se observa la aparición de una mezcla compleja de productos más

²¹² Kampouris, E.M.; *J. Chem. Soc.*, **1965**, 2651-2654.

polares fruto de la posible descomposición del producto buscado en medio básico a alta temperatura durante tratamiento prolongado. La fácil hidrólisis de uno de los grupos tosiloxi a baja temperatura y la dificultad de hidrolizar el segundo grupo tosiloxi se puede explicar teniendo en cuenta que, en medio básico, la presencia del ion fenóxido genera una cierta densidad de carga negativa sobre el carbono que porta el grupo tosiloxi dificultando así el ataque nucleófilo sobre el azufre unido a dicha posición, ya que el primer intermedio en la reacción de hidrólisis de este segundo tosiloxi implica la presencia de dos cargas negativas próximas. (**Esquema 2.13**)



Esquema 2.13

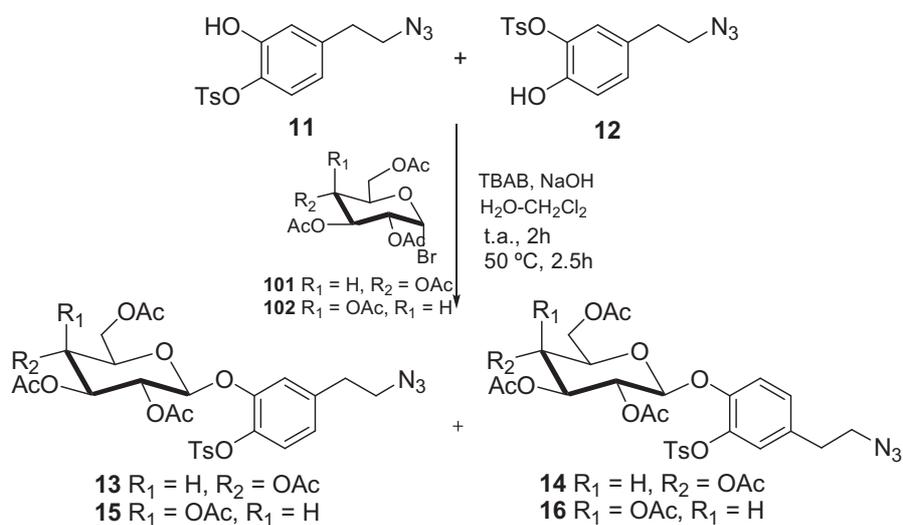
La estructura de **8** se confirma por las señales en el espectro de ^1H -RMN correspondientes a los tres grupos tosilo a 7.66, 7.26 y 2.45 ppm. y mediante análisis elemental. Los protones correspondientes al grupo metileno que porta el átomo de cloro en **9** se encuentran más apantallados

(3.66 ppm) que dichos protones en el producto tri-*O*-tosilado (4.17 ppm). La estructura del azido derivado **10** se confirma mediante ¹H-RMN observándose un apantallamiento de las señales correspondientes a los metilenos que portan el grupo azido (3.48 ppm). El espectro de ¹H-RMN de los monotosilados **11** y **12** en CDCl₃ confirma que se trata de una mezcla de regioisómeros en la proporción 1:1 y muestra a 5.92 ppm un singulete ancho correspondiente a los OH fenólicos de la mezcla de regioisómeros.

Los β-D-glucopiranosil derivados **13** y **14**, y los β-D-galactoderivados **15** y **16** se prepararon mediante glicosilación en un sistema bifásico básico agua/diclorometano usando TBAB como agente de transferencia de fase,²¹³ y α-acetobromoglucosa **101** y α-acetobromogalactosa **102** comerciales como agentes de glicosilación (**Esquema 2.14**).

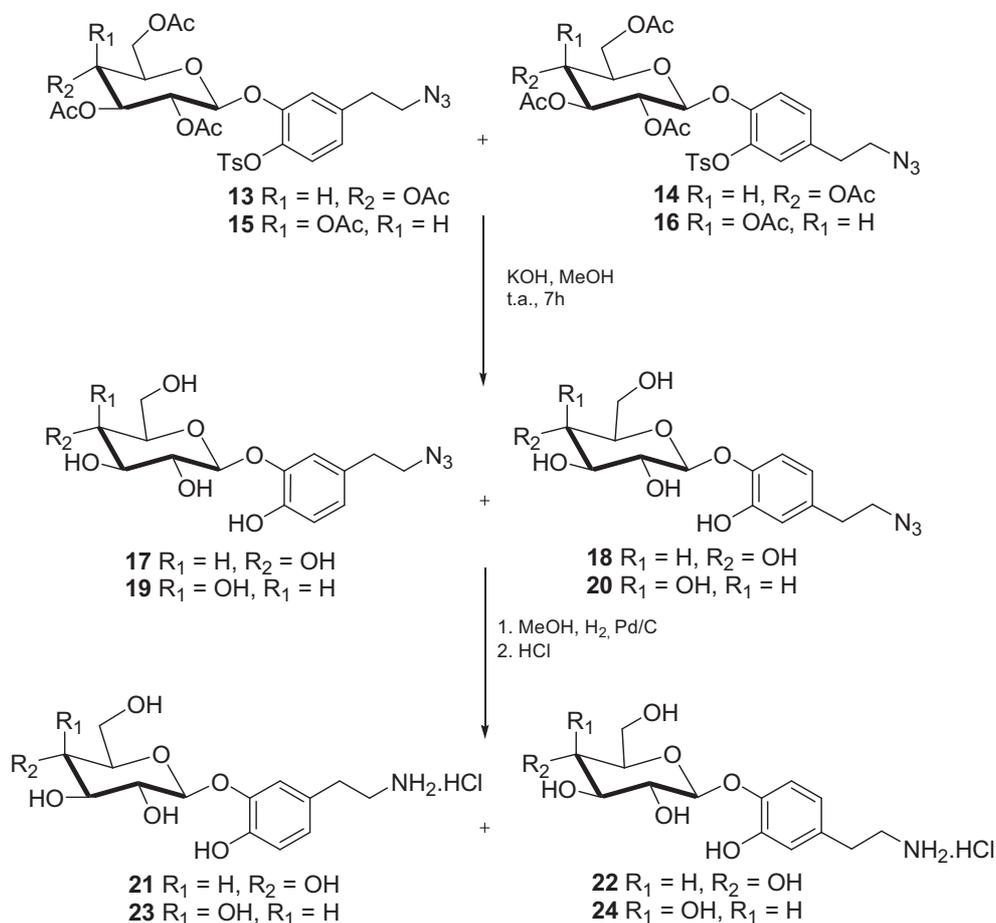
La labilidad de los α-acetobromoazúcares **101** y **102**, y el prolongado tiempo de reacción requerido hacen que sea necesaria su adición en pequeñas porciones durante intervalos de 2 horas (0.45 equivalentes cada vez hasta un total de 1.8 equivalentes). Tras la última adición del α-acetobromoazúcar y el hidróxido sódico se realizó un suave calentamiento a 50 °C durante 2.5 horas para completar la reacción, obteniéndose los glucosil derivados **13**, **14** y los galactosil galactosil derivados **15** y **16**, con un rendimiento del 72 % y 94 % respectivamente (**Esquema 2.14**).

²¹³ Adinolfi, M.; Iadonisi, A.; Pezzella, A.; Rabidà, A., *Synlett*, **2005**, 1848-1852



Esquema 2.14

La desacetilación de las mezclas de **13/14** y **15/16** con potasa metanólica condujo, tras 7 horas a temperatura ambiente, a la eliminación de los grupos acetatos, pero también del tosilo, con lo cual se obtuvieron las azidas desprotegidas **17-20**, con rendimientos del 43 % para los galactósidos **19** y **20**, y del 62 % para los glucósidos **17** y **18**. La reducción catalítica de **17-20** en etanol, utilizando paladio sobre carbón, y la posterior acidificación con un equivalente de HCl condujo a las glicosildopaminas **21-24**, con rendimientos comprendidos entre el 85 y 88 % (**Esquema 2.15**).



Esquema 2.15

Los datos espectroscópicos confirman las estructuras propuestas para los derivados **13-24**. Las señales correspondientes a los protones anoméricos del fragmento de azúcar en los espectros de ¹H-RMN aparecen entre 4.91 y 4.67 ppm. Las constantes de acoplamiento de los protones anoméricos están comprendidas en todos los casos entre 7.5 y 8.0 Hz, lo que indica que el anómero que se obtiene es siempre el β. En los espectros de ¹³C-RMN los carbonos anoméricos aparecen en torno a 105-104 ppm, mientras que el

resto de señales del fragmento de gluco o galactopiranosilo se visualizan entre 80 y 64 ppm. La espectroscopía de masas de alta resolución también confirma las estructuras propuestas.

Estos datos concuerdan con los descritos en la bibliografía para los derivados **21-24**.²⁰³

3. SÍNTESIS DE SELENOUREAS, SELENUROS Y DISELENUROS DE HIDROXITIRO SOL

3. SÍNTESIS DE SELENOUREAS, SELENUROS Y DISELENUROS DE HIDROXITIRO SOL.

3.1. Introducción y antecedentes.

3.1.1. Selenoureas. Importancia biológica.

Los compuestos que incluyen selenio en su estructura han sido objeto de controversia en relación con su toxicidad. Si bien se ha demostrado el envenenamiento de herbívoros por plantas acumuladoras de selenio en suelos seleníferos,²¹⁴ desde de los años 50 el Se es considerado un nutriente esencial ya que se encuentra presente en el centro activo de más de 25 selenoproteínas, algunas tan importantes como la glutatión peroxidasa, la tioredoxin reductasa implicadas en el mecanismo de autodefensa contra el estrés oxidativo,²¹⁵ y la yodotironina desyodinasas, implicada en la activación y desactivación de las hormonas tiroideas.²¹⁶

Entre los compuestos organoselénicos, las selenoureas son de interés tanto desde el punto de vista biológico como sintético. En relación con su actividad biológica, se ha descrito el uso de selenoureas como agentes despigmentantes, debido a su capacidad de inhibición de la tirosinasa,²¹⁷ y como atrapadores del radical superóxido.²¹⁸ Un claro ejemplo del

²¹⁴ Quinn, C. F.; Galeas, M. L.; Freeman, J. L.; Pilon-Smits, E. A. H. *Integr. Environ. Assess. Manag.* **2007**, *3*, 460–462.

²¹⁵ Wessjohann, L. A.; Schneider, A.; Abbas, M.; Brandt, W. *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 997–1006.

²¹⁶ Naithani, R. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 657–668.

²¹⁷ Ha, S. K.; Koketsu, M.; Lee, K.; Choi, S. Y.; Park, J.-H.; Ishihara, H.; Kim, S. Y. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 838–840.

²¹⁸ Takahashi, H.; Nishina, A.; Fukumoto, R.-H.; Kimura, H.; Koketsu, M.; Ishihara, H. *Life Sci.* **2005**, *76*, 2185–2192.

comportamiento de estos compuestos como antioxidantes ha sido descrito por nuestro grupo de investigación,²¹⁹ en la transformación de *N*-glicosil selenoureas en isoureas bicíclicas en presencia de peróxido de hidrógeno, con liberación de selenio elemental. También se ha analizado el comportamiento reductor de selenoureas con el objeto de desarrollar potenciales agentes radioprotectores.²²⁰ Desde el punto de vista sintético, la aplicación más importante de las selenoureas es su empleo como precursores en la síntesis de heterociclos con selenio en su estructura.²²¹⁻²²⁵

Se han descrito numerosos métodos para la preparación de selenoureas:

Zhou y col.²²⁶ describen la preparación de una serie de selenoureas cíclicas y acíclicas por reacción de diaminas o aminas con ortoformiato de trietilo y selenio elemental en una reacción *one-pot* (**Esquema 3.1**).

²¹⁹ Fernández-Bolaños, J. G.; López, O.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fuentes, J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4081-4084.

²²⁰ Mishra, B.; Maity, D. K.; Priyadarsini, K. I.; Mohan, H.; Mittal, J. P. *J. Phys. Chem. A.* **2004**, *108*, 1552-1559.

²²¹ López, O.; Maza, S.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J.G. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 2556-2566.

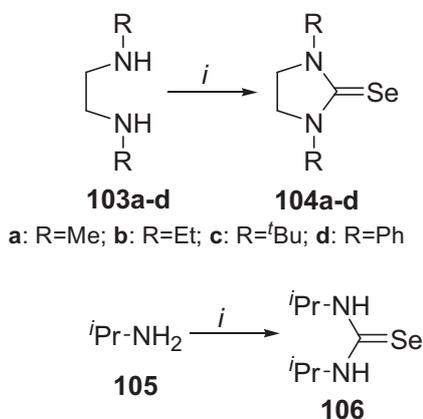
²²² Koketsu, M.; Ishihara, H. *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 175-185.

²²³ Zhou, Y.; Linden, A.; Heimgartner, H. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 1576-1598.

²²⁴ Atanassov, P. K.; Linden, A.; Heimgartner, H. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3235-3243.

²²⁵ Garnd, D. R.; Koketsy, M.; Ishiraha, A. *Molecules*, **2007**, *12*, 504-535.

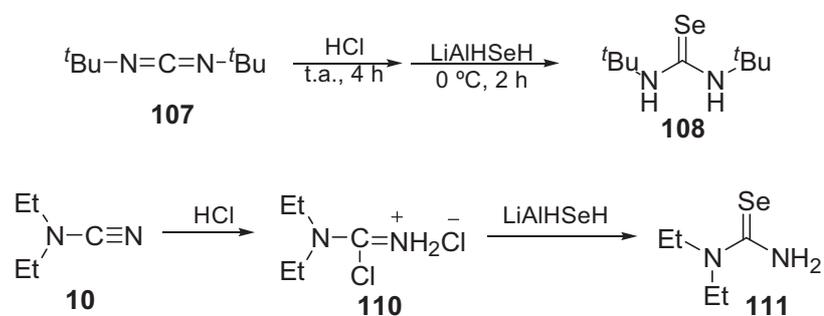
²²⁶ Zhou, Y.; Denk, M. K. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1295-1299.



i: Ortoformiato de trietilo, Se, 190 °C, 8 h.

Esquema 3.1

Ishihara y col.^{227,228} llevaron a cabo la preparación de selenoureas utilizando selenohidruro de aluminio y litio, obtenido por tratamiento de LiAlH_4 con selenio elemental, como agente de selenación de una serie de alquilcarbodiimidas y cianamidas²²⁹ (Esquema 3.2).



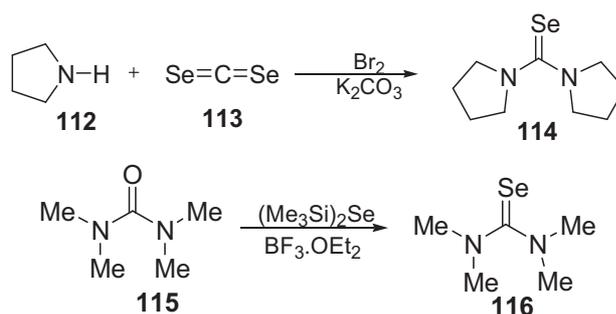
Esquema 3.2

²²⁷ Koketsu, M.; Takakura, N.; Ishihara, H. *Synth. Commun.* **2002**, 32, 3075-3079.

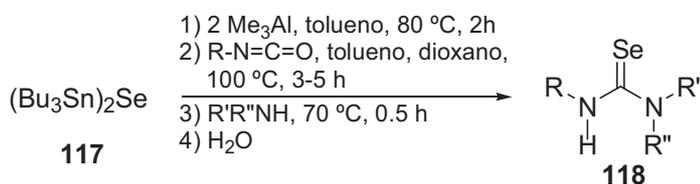
²²⁸ Ishihara, H.; Koketsu, M.; Fukuta, Y.; Nada, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8408-8409.

²²⁹ Koketsu, M.; Fukuta, Y.; Ishihara, H. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 6333-6335.

También ha sido descrita²³⁰ la síntesis de selenoureas simétricas a partir de aminas secundarias y diselenuro de carbono, y de selenoureas simétricas o asimétricas²³¹ por reacción de ureas y selenuro de bis(trimetilsililo) en presencia de trifluoruro de boro eterato (**Esquema 3.3**).



La reacción de isocianatos con selenuro de bis(tributylestaño) ha sido descrita recientemente por Maeda y col.,²³² para la síntesis *one-pot* de selenoureas, en las condiciones que se describen en el **Esquema 3.4**:

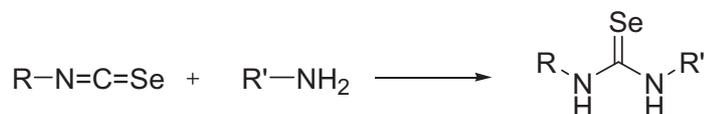


Sin embargo, el método más generalizado para la obtención de selenoureas es la reacción de isoselenocianatos con aminas.^{221,233-235}

²³⁰ Henriksen, L. *Synthesis* **1982**, 773-776.

²³¹ Takikawa, Y.; Watanabe, H.; Sasaki, R.; Shimada, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, 67, 876-878.

²³² Maeda, H.; Takashima, M.; Sakata, K.; Watanabe, T.; Honda, M; Segi, M. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 415-417.



La preparación de isoselenocianatos ha sido abordada desde hace varias décadas. Entre los métodos más conocidos para la preparación de isoselenocianatos se encuentran la reacción de selenación de isocianatos con selenuro de fósforo (V),²³⁶ la isomerización térmica²³⁷ o fotoquímica²³⁸ de selenocianatos y el tratamiento de isonitrilos con selenio elemental, para la obtención de una serie de isoselenocianatos de alquilo y de arilo.²³⁹⁻²⁴⁴

Así, Barton y col.²⁴³ desarrollaron la preparación *one-pot* de estos isoselenocianatos por tratamiento de la formamida correspondiente con fosgeno, para dar el isonitrilo, que reacciona con selenio elemental en presencia de trietilamina. Más recientemente, nuestro grupo de investigación²⁴⁴ ha optimizado este método sustituyendo fosgeno por

²³³ Koketsu, M.; Suzuki, N.; Ishihara, H. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6473-6475.

²³⁴ Garud, D. R.; Koketsu, M.; Ishihara, H. *Molecules* **2007**, *12*, 504-535.

²³⁵ Atanassov, P.K.; Linden, A.; Heimgartner, H. *Helvetica Chimica Acta*, **2004**, *87*, 1873-1887.

²³⁶ Collard-Charon, C.; Renson, M. *Bull. Soc. Chim. Belges* **1962**, *71*, 531.

²³⁷ Fava, A. En *Organic Sulfur Compounds*; Kharasch, N.; Meyers, C. Y.; Pergamon Press, Nueva York, 1966, Vol. 2, p. 73.

²³⁸ Suzuki, H.; Usuki, M.; Hanafusa, T. *Synthesis* **1979**, 705

²³⁹ Franklin, W. J.; Werner, R. L. *Tetrahedron Lett.* **1965**, *6*, 3003-3008.

²⁴⁰ Bulka, E.; Ahlers, K.-D.; Tucek, E. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 1367.

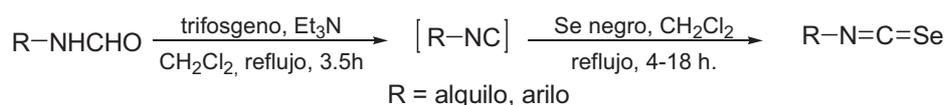
²⁴¹ Sonoda, M.; Yamamoto, G.; Tsutsumi, S. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1972**, *45*, 2937

²⁴² Kristian, P.; Sychar, G. *Collect Czech. Chem. Commun.* **1972**, *37*, 3066.

²⁴³ Barton, D. H. R.; Parekh, S. I.; Tajbakhsh, M.; Theodorakis, E. A.; Tse, C.-L. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 639-654.

²⁴⁴ López, O.; Maza, S.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J.G. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 2556-2566.

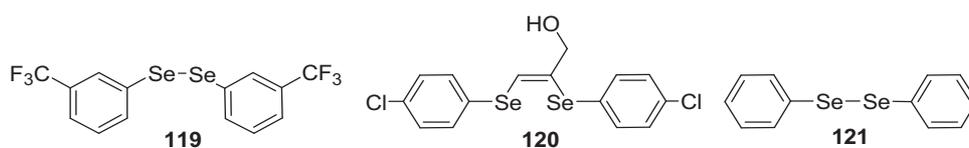
trifosgeno,²⁴⁵ un reactivo sólido más fácilmente manejable y menos peligroso, y diclorometano a reflujo en lugar de tolueno a reflujo, empleando así menores temperaturas de reacción que evitan reacciones secundarias de polimerización (**Esquema 3.5**).



Esquema 3.5

3.1.2. Síntesis de selenuros y diselenuros

Se ha demostrado que la ingesta deficiente de selenio afecta a algunos parámetros fisiológicos, y que un suplemento del mismo se asocia con una mejora en el estado de ánimo en casos de depresión.^{246,247} Recientemente, el diselenuro de bis(*m*-trifluorometilfenilo) (**119**) ha mostrado propiedades antidepresivas en estudios *in vivo* en animales,²⁴⁸ y el (*Z*)-2,3-bis(4-clorofenilselanyl)prop-2-en-1-ol (**120**) también ha revelado actividad antidepresiva, disminuyendo los niveles de nitrato/nitrito en el cerebro.²⁴⁹



²⁴⁵ Krishnaswamy, D. *Synlett*, **2000**, 1860.

²⁴⁶ Benton, D.; Cook, R. *Biol. Psychiatry*, **1991**, 29, 1092–1098.

²⁴⁷ Benton, D.. *Nutr. Neurosci.* **2002**, 5, 363–374.

²⁴⁸ Brüning, C.A.; Guerra-Souza, A.C.; Gai, B.M.; Zeni, G.; Nogueira, C.W. *Eur. J. Pharm.* **2011**, 658, 145–149.

²⁴⁹ Jesse, C.R.; Wilhelm, E.A.; Bortolatto, C.F.; Rocha, J.B.T.; Nogueira C.W. *Eur. J. Pharm.* **2010**, 635, 135–141.

Además, se ha estudiado ampliamente la actividad biológica del diselenuro de difenilo (PhSe)₂ **121**, que actúa como neuroprotector,²⁵⁰ antihiper glucémico,²⁵¹ antiinflamatorio,²⁵² antinociceptivo,²⁵³ antiulceroso,²⁵⁴ ansiolítico,²⁵⁵ antidepresivo^{256,257} e inhibe la peroxidación lipídica,^{258,259} en estudios en animales, lo que hace de **121** un buen candidato como agente terapéutico. Sin embargo, el diselenuro de difenilo y otros compuestos análogos han exhibido actividad hemolítica y genotóxica en células del plasma humano.²⁶⁰

El diselenuro **119** es sintetizado a partir del bromuro de arilmagnesio y selenio elemental, según el método descrito por Reich y col.²⁶¹ El

²⁵⁰ Ghisleine, G.; Porciúncula, L.O.; Cimarosti, H.; Rocha, J.B.T.; Salbego, C.G. Souza, D.O., *Brain Res.* **2003**, *986*, 196–199.

²⁵¹ Barbosa, N.B.V.; Rocha, J.B.T.; Wondracek, D.C.; Perottoni, J.; Zeni, G.; Nogueira, C.W.; *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *163*, 230–238.

²⁵² Savegnago, L.; Jesse, C.R.; Pinto, L.G.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W. *Brain Res.* **2007**, *1175*, 54–59.

²⁵³ Savegnago, L.; Pinto, L.G.; Jesse, C.R.; Alves, D.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Zeni, G., *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *555*, 129–138.

²⁵⁴ Savegnago, L.; Trevisan M.; Alves D.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Zeni, G. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2006**, *21*, 86–92.

²⁵⁵ Savegnago, L.; Pinto, L.G.; Jesse, C.R.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Zeni, G.; *Prog. Neuro-Psychopharmacol.*, **2007**, *31*, 1261–1269.

²⁵⁶ Ghisleni, G.; Kazauckas, V.; Both, F.L.; Pagnussat, N.; Mioranza, S.; Rocha, J.B.T.; Souza, D.O.. *Prog. Neuro-Psychopharmacol.* **2008**, *32*, 1508–1515.

²⁵⁷ Savegnago, L.; Pinto, L.G.; Jesse, C.R.; Barancelli, D.A.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Zeni, G. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2008**, *88*, 418–426.

²⁵⁸ Meotti, F.C.; Borges, V.C.; Zeni, G.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W. *Toxicol. Lett.* **2003**, *143*, 9–16.

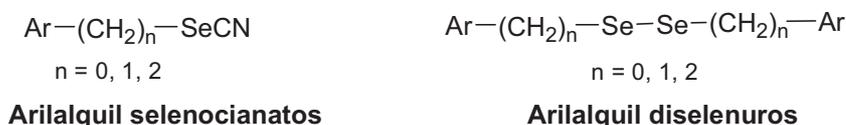
²⁵⁹ Luchese, C.; Brandao, R.; Oliveira de, R.; Nogueira, C.W.; Santos, F.W. *Toxicol. Lett.* **2007**, *173*, 181–190.

²⁶⁰ Santos, D.B.; Schiar, V.P.P.; Paixao, M.W.; Meinerz, D.F.; Nogueira, C.W.; Aschner, M.; Rocha, J.B.T.; Barbosa, N.B.V. *Toxicology in Vitro*, **2009**, *23*, 1195–1204.

²⁶¹ Reich, H. J.; Renga J. M.; Reich, I. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 5434.5447.

diselenuro de difenilo **121** se obtiene por reacción de bromobenceno con nanopulvo de óxido de cobre y selenio.²⁶²

Plano y col.²⁶³ han descrito una serie de arilalquil selenocianatos y bis(arilalquil) diselenuros con potenciales propiedades contra la leishmaniasis, una enfermedad causada por protozoos y que provoca úlceras en la piel y algunos órganos.



Por otra parte, la importancia de la ingesta apropiada de selenio para la salud humana²⁶⁴ y la vinculación aparente de la toma de selenio con la reducción del riesgo de cáncer^{265,266} ha despertado el interés por la síntesis de selenocompuestos, que en general muestran una mayor actividad anticarcinogénica que sus isómeros de azufre.²⁶⁷⁻²⁷¹

²⁶² Singh, D.; Deobald, A.; Camargo, L. R. S.; Tabarelli, G.; Rodrigues, O. E. D.; Braga, A. L. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3288-3291.

²⁶³ Plano, D.; Baquedano, Y.; Moreno-Mateos, D.; Font, M.; Jiménez-Ruiz, A.; Palop, J. A.; Sanmartín, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3315-3323.

²⁶⁴ Rayman, M.P. *Brit. J. Nutr.*, **2008**, *100*, 254-268.

²⁶⁵ Ellis, D.R.; Sors, T.G.; Brunk, D.G.; Albrecht, C.; Orser, C.; Lahner, B.; Wood, K.V.; Harris, H.H.; Pickering, I.J.; Salt, D.E. *BMC Plant Biol.*, **2004**, *4*, 1.

²⁶⁶ McKenzie, M.J.; Hunter, D.A.; Pathirana, R.; Watson, L.M.; Joyce, N.; Rowan, D.D.; Matich, A.J.; Brummell, D.A. *Transgenic Res.*, **2009**, *18*, 407-424.

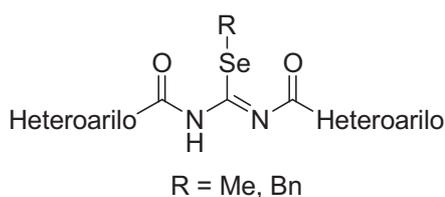
²⁶⁷ El-Bayoumi, K.; Sinha, R.; Pinto, J.T.; Rivlin, R.S. *J. Nutr.*, **2009**, *136*, 864-869.

²⁶⁸ Sharma, A.K.; Sharma, A.; Desai, S.V. Madhunapantula, S.V.; Huh, S.J.; Robertson, G.P.; Amin, S.J. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 7820-7826.

²⁶⁹ Desai, D.; Madhunapantula, S.V.; Gowdahalli, K.; Sharma, A.; Chandagaludoreswamy, R.; El-Bayoumi, E.; Robertson, G.P.; Amin, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 2038-2043

²⁷⁰ Emmert, S.D.; Desai, D.; Amin, S.; Richie, J.P.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 2675-2679.

En este contexto, Ibáñez y col.²⁷¹ han propuesto recientemente una estructura general para organoselenuros con potenciales propiedades terapéuticas en tratamientos contra el cáncer, que presentan simetría molecular.

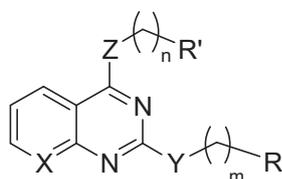


Los compuestos que incluyen en esta estructura el fragmento metilselanil muestran mayor potencial anticarcinogénico que los homólogos con el grupo bencilselanil, aunque ambos presentan mayor actividad que los metilsulfanil análogos.

Investigaciones recientes muestran la actividad citotóxica sobre células tumorales, en ensayos *in vitro*, de tio y selenoderivados de la quinazolina y pirido[2,3-*d*]pirimidinas.²⁷²

²⁷¹ Ibáñez, E.; Plano, D.; Font, M.; Calvo, A.; Prior, C.; Palop, J.A.; Sanmartín, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 265-274.

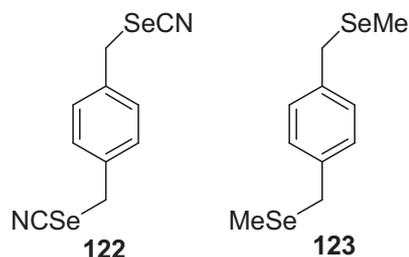
²⁷² Moreno, E.; Plano, D.; Lamberto, I.; Font, M.; Encío, I.; Palop, J. A.; Sanmartín, C. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**.



$n = 0-5$; $m = 0-4$; $X = N, C$
 $Y = S, Se$; $Z = NH, O, Se$; $R = H, CH_3$
 $R' = H, OH, CH_3, Ph, p\text{-MeOC}_6\text{H}_4,$
 $p\text{-MeSC}_6\text{H}_4, p\text{-MeSeC}_6\text{H}_4$

Tio y seleno derivados de quinazolin y pirido[2,3-*d*]pirimidina

El 1,4-fenilenobis(metileno)selenocianato (**122**) y el 1,4-bis((metilselanyl)metil)benceno (**123**) son dos compuestos organoselénicos con propiedades biológicas relevantes, que actúan como reguladores del ciclo celular en procesos de angiogénesis, invasión celular y metástasis.²⁷³

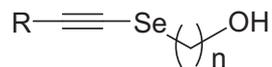


Okoronkwo y col.²⁷⁴ han desarrollado un método para sintetizar alquinilselenoalcoholes a partir de alquinos terminales, selenio y bromoalcoholes, utilizando butillitio como base. Los alquinilselenoalcoholes, como el 4-[(feniletinil)selanyl]butan-1-ol han

²⁷³ Pinto, J.T.; Sinha, R.; Papp, D.; Facompre, N.D.; Desai, D.; El-Bayoumy, K., *Int. J. Cancer*, **2007**, *120*, 1410-1417.

²⁷⁴ Okoronkwo, A.E., Rosário, A.R., Alves, D., Savegnago, L., Nogueira, C.W., Zeni, G., *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 3252-3256.

mostrado un efecto antinocectivo relacionado directamente con su potencial antioxidante.²⁷⁵



Alquinilselenoalcoholes

Se han descrito numerosos métodos para la obtención de familias de monoselenuros,²⁷⁶⁻²⁸⁰ y diselenuros de dialquilo y diarilo.²⁸¹⁻²⁸³

Sonoda y col. demostraron que el selenio elemental puede ser reducido por monóxido de carbono y agua en presencia de base para producir selenuro de hidrógeno, que se aplicó con éxito en la síntesis de diselenuros alifáticos a partir de cloruros de alquilo.²⁸⁴ Tian y col. perfeccionaron este método para la obtención de diselenuros con el sistema Se/CO/H₂O en ausencia de base y a presión atmosférica.²⁸⁵

²⁷⁵ Acker, C.I.; Brandão, R.; Rosário, A.R.; Nogueira, C.W.; *Environ. Toxicol. Pharm.* **2009**, *28*, 280–287.

²⁷⁶ Müller, J.; Terfort, A. *Inorg. Chim. Acta*, **2006**, *359*, 4821-4827.

²⁷⁷ Dunne, S.J.; Summers, L.A.; Von Hagy-Felsobuki, E.I. *J. Het. Chem.* **1995**, *32*, 1671-1677.

²⁷⁸ Haller, W.S.; Irgolic, K.J. *J. Organomet. Chem.*, **1972**, *38*, 97-103.

²⁷⁹ Klayman, D.L.; Griffin, T.S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 197-199.

²⁸⁰ Syper, K.L.; Mlőchowsky, J.; *Synthesis*, **1984**, 439-442.

²⁸¹ Shimada, K.; Oikawa, S.; Nakamura, H.; Moro-oka, A.; Kikuchi, M.; Maruyama, A.; Suzuki, T.; Kogawa, H.; Inoue, Y.; Gong, Y.; Aoyagi, S.; Takikawa, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2005**, *78*, 899-905.

²⁸² Sharpless, K.B.; Lauer, R.F. *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 2697-2699.

²⁸³ Gladysz, J.A.; Hornby, J.L.; Garbe, J.E. *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 1204-1207.

²⁸⁴ Nishiyama, Y.; Katsuura, A.; Negoro, A.; Hamanaka, S.; Miyoshi, N.; Yamana, Y.; Ogawa, A., Sonoda, N. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 3776-3880.

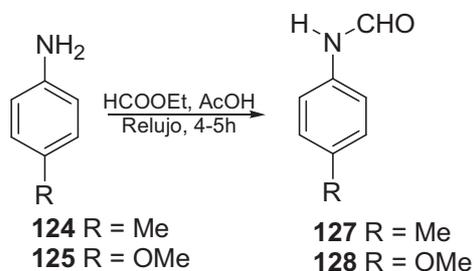
²⁸⁵ Tian, S.; Yu, Z.; Lu, S. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4520-4523.

3.2. Resultados y discusión

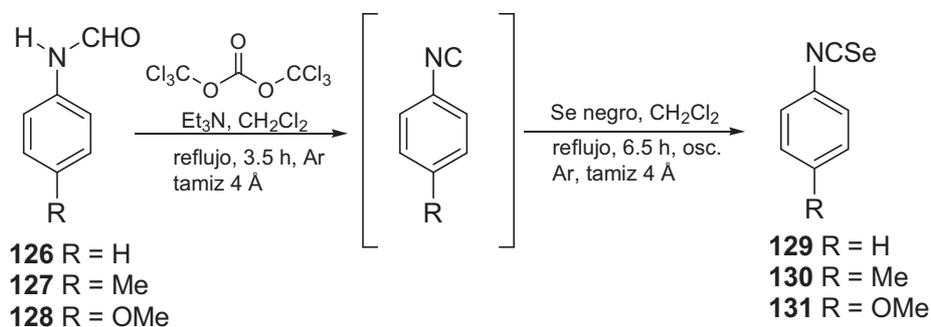
3.2.1. Síntesis de selenoureas

En este apartado se describe la síntesis de nuevas selenoureas derivadas del hidroxitirosol que incluyen en su estructura el fragmento catecol, mediante reacción de isoselenocianatos aromáticos con dopamina.

Los isoselenocianatos aromáticos **129-131** fueron obtenidos por reacción de *p*-toluidina (**124**) o *p*-anisidina (**125**) con formiato de etilo (**Esquema 3.6**), seguido de la deshidratación de las formamidas correspondientes **127** y **128** y de la formamida comercial **126**, por tratamiento con trifosgeno en diclorometano conteniendo Et₃N. Los isocianuros así obtenidos se transformaron en los correspondientes isoselenocianatos por tratamiento *one-pot* con selenio elemental en diclorometano a reflujo (**Esquema 3.7**).

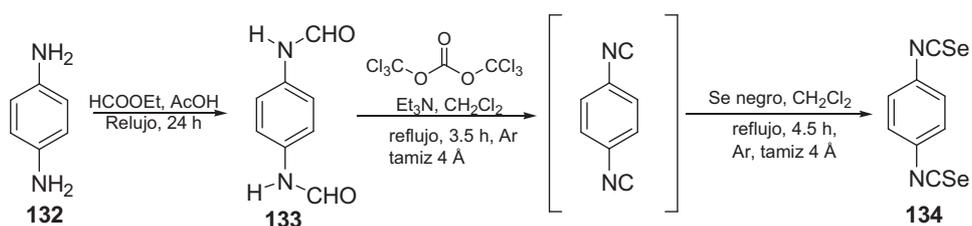


Esquema 3.6



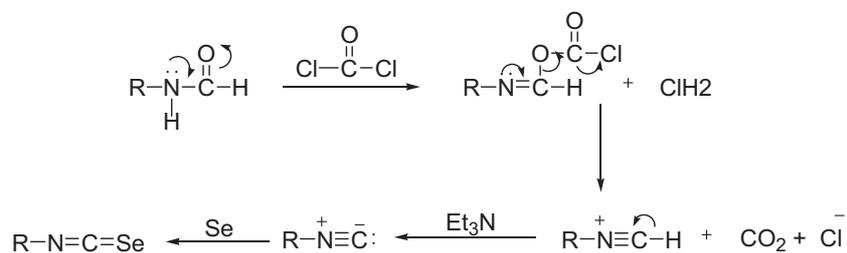
Esquema 3.7

Análogamente, la reacción de la 1,4-fenilenodiamina **132** con formiato de etilo condujo, tras 24 horas de calentamiento a reflujo, a la bisformamida **133**, que fue transformada en el diisoselenocianato **134** por el mismo procedimiento descrito para la obtención de los mono isoselenocianatos (**Esquema 3.8**).



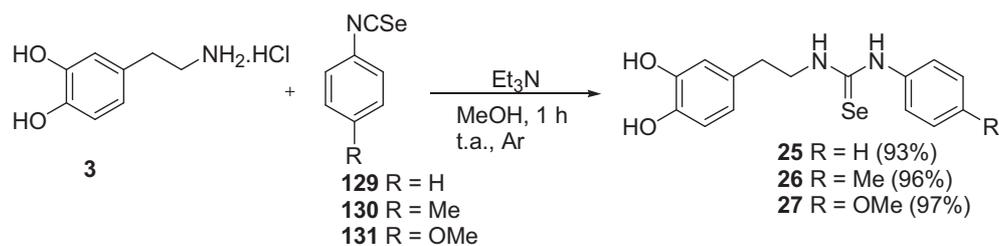
Esquema 3.8

El mecanismo que se propone para la deshidratación de formamidas y formación de isoselenocianatos se recoge en el **Esquema 3.9**



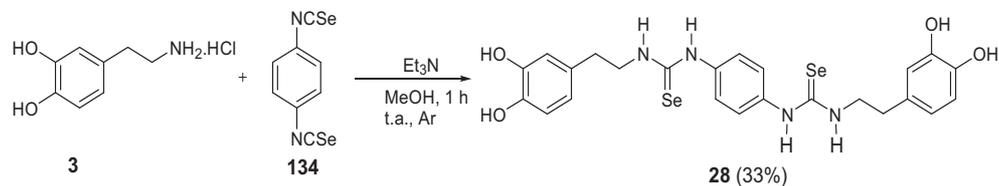
Esquema 3.9

Por reacción de los isoselenocianatos **129-131** con clorhidrato de dopamina en metanol conteniendo Et_3N , atmósfera inerte y en la oscuridad, se obtuvieron las selenoureas **25-27** con rendimientos excelentes (Esquema 3.10).



Esquema 3.10

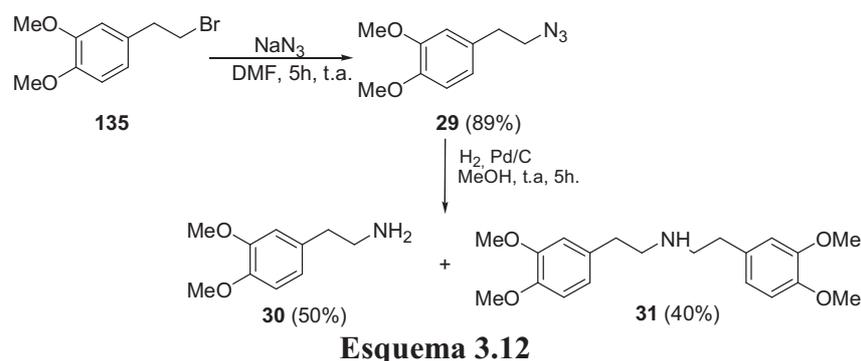
Cuando esta reacción se llevó a cabo utilizando el diisoselenocianato **134** se obtuvo la diselenourea **28** con un 33% de rendimiento, (Esquema 3.11) probablemente debido a la dificultad en la purificación cromatográfica por la elevada polaridad del producto.



Esquema 3.11

Las nuevas selenoureas **25-27** presentan la particularidad de poseer un fragmento de catecol y un fragmento de selenourea, lo que confiere a estas estructuras la capacidad de incorporar simultáneamente las características antioxidantes de ambos tipos de función y el efecto sinérgico que ello pudiera producir.

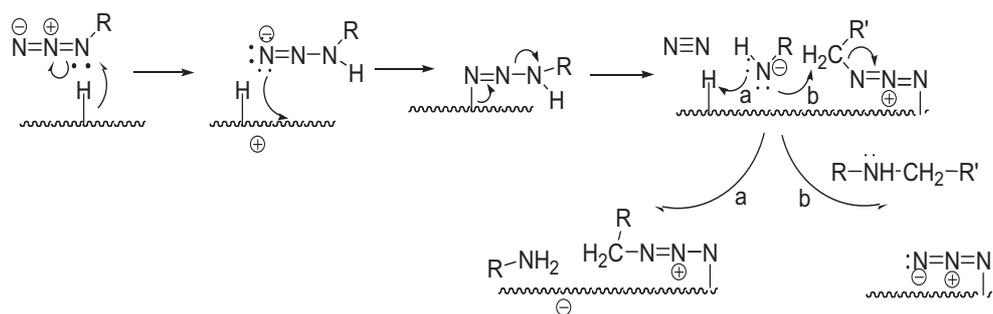
También se ha abordado la síntesis de selenoureas derivadas de la dopamina di-*O*-metiladas. Así, hemos preparado la 3,4-dimetoxifenetilamina (también llamado homoveratrilamina) **30**, por hidrogenación catalítica de la azida **29**, la cual fue obtenida por reacción del bromuro de 3,4-dihidroxifenetilo comercial **135** con azida sódica en DMF (Esquema 3.12).



Esquema 3.12

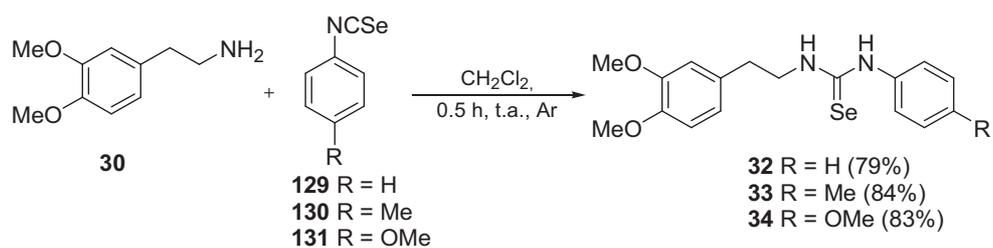
Como producto secundario en esta reacción se obtuvo de manera inesperada la amina secundaria **31** con un rendimiento del 40% y cuya formación puede ser explicada por un mecanismo del que no hemos encontrado antecedentes. Durante la hidrogenación se produce un ión amiduro que o bien capta un protón para dar la amina **30** (camino a), o bien ataca como nucleófilo al metileno unido al grupo azido de una segunda

molécula adsorbido al catalizador, y que actúa como grupo saliente (camino b). Este resultado contrasta con el obtenido en la preparación de dopamina a partir del hidroxitirosol (**Esquema 2.6**, pág. 77), probablemente debido a que los hidroxilos fenólicos protonan al amiduro generado antes de que actúe como nucleófilo. (**Esquema 3.13**)



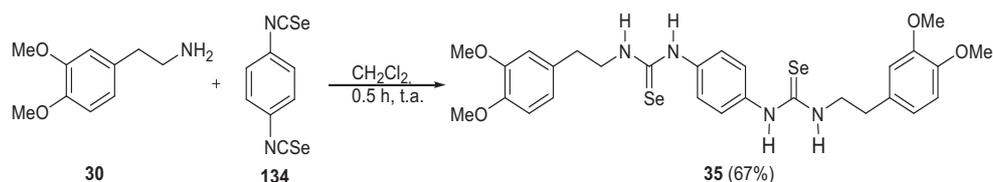
Esquema 3.13

Por reacción de la 3,4-dimetoxifenetilamina **30** con los isoselenocianatos **129-131** se obtuvieron las selenoureas **32-34** con rendimientos del 79-84% después de la purificación cromatográfica (**Esquema 3.14**).



Esquema 3.14

Por otra parte, la reacción de **30** con el diisoselenocianato **134** condujo a la obtención de la diselenourea tetra-*O*-metilada **35** con un 67% de rendimiento (**Esquema 3.15**).



Los datos espectroscópicos confirman las estructuras propuestas. En los espectros de ^1H -RMN, la señal de los grupos metileno tiende a apantallarse ligeramente con el aumento del efecto electrón-donante de los sustituyentes (Me, OMe) sobre el anillo aromático de las *N*-arilselenoureas (**Tabla 3.1**). En los espectros de ^{13}C -RMN se observa la aparición en todos los casos de señales entre 178.9 y 178.2 ppm que confirman la presencia del fragmento selenoureido en las estructuras propuestas.

Tabla 3.1. Desplazamientos químicos en ppm de los protones de los grupos metileno y del carbono enlazado a selenio (C=Se).

Compuesto	¹ H-RMN (δ ppm)		¹³ C-RMN (δ ppm)
	CH ₂ -Ar	CH ₂ -NH-	C=Se
25	2.78	3.81	178.8
26	2.76	3.79	178.5
27	2.75	3.77	178.7
28	2.69	3.67	178.3
32	2.87	3.95	178.7
33	2.82	3.89	178.2
34	2.84	3.84	178.9
35	2.83	3.74	178.5

Estos valores son análogos a los descritos en la bibliografía para diversas selenoureas.^{217,219,226,227}

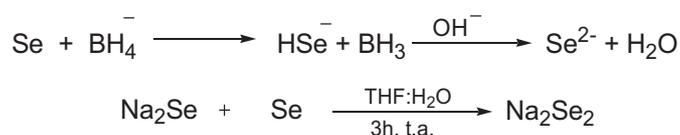
3.2.2. Síntesis de selenuros y diselenuros derivados de hidroxitirosol.

En este apartado se describe la síntesis de selenuros y diselenuros derivados de hidroxitirosol, que pudieran presentar interesantes propiedades biológicas al combinar en su estructura dos fragmentos de catecol y uno o

dos átomos de Se. Para ello se siguió el método descrito por Milton y col.²⁸⁶ con ligeras modificaciones.

Este método consiste en la generación *in situ* de selenuro o diselenuro sódico y posterior reacción con haluros orgánicos para dar lugar a seleno o diseleno derivados, respectivamente.

La generación de la sal de selenio Na₂Se tiene lugar por reducción de selenio elemental con 2.2 equivalentes molares de borohidruro sódico en medio THF/H₂O 100:1, utilizando otros 2.2 equivalentes de NaOH como base para evitar la formación de selenuro de sodio e hidrógeno (NaHSe), desplazando el equilibrio hacia la formación de la sal disódica (**Esquema 3.16**). La adición de un nuevo equivalente de selenio elemental conduce a la formación de diselenuro de disodio Na₂Se₂.

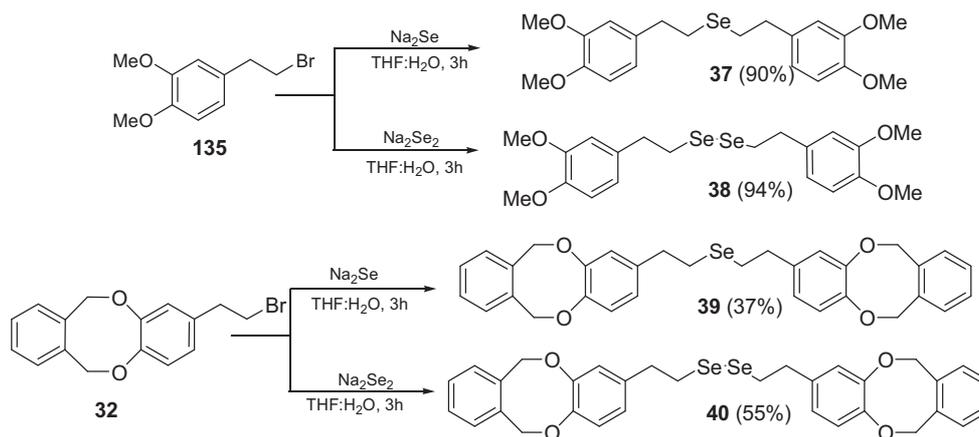


Esquema 3.16

La reacción del bromoderivado **135** con selenuro sódico dio lugar al monoselenuro de dimetoxifenetilo **37**, y con diselenuro sódico condujo a la formación del diselenuro de dimetoxifenetilo **38**, con rendimiento del 90 y 94%, respectivamente. Cuando las reacciones se llevan a cabo a partir del derivado *O*-protegido **32** se obtienen los correspondientes selenuro y

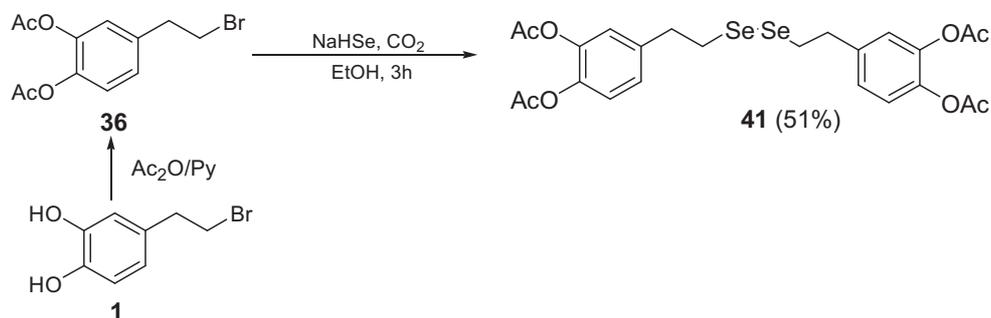
²⁸⁶ Milton, M.D.; Khan, S.; Singh, J.D.; Mishra, V.; Khandelwal, B.L. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 755-758.

deselenuro orgánicos **39** y **40**, pero con peores rendimientos (**Esquema 3.17**).



Esquema 3.17

También hemos llevado a cabo la preparación del diselenuro tetra-*O*-acetilado **41** por reacción de hidrogenoselenuro sódico con el bromuro de diacetoxifenetilo **36**, obtenido a su vez a partir del bromuro de hidroxitirosilo **1** (**Esquema 3.18**). Para preparar el hidrogenoselenuro se ha utilizado el método de Klayman y col.²⁷⁹ (**Esquema 3.19**), que consiste en la reacción de selenio elemental con borohidruro de sodio en etanol. Para evitar la hidrólisis de los grupos acetatos en el bromuro **36** o en **41** se tampona el medio de reacción por adición de CO₂ sólido al medio en el que se prepara el hidrogenoselenuro, previamente a la adición del bromuro **36**.



Esquema 3.18

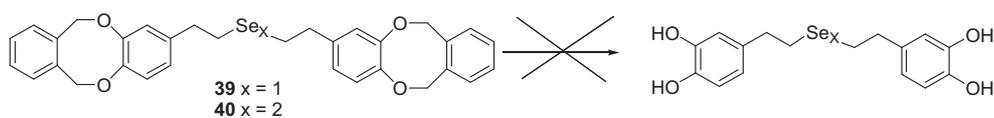


Esquema 3.19

También se ha llevado a cabo la reacción de **36** con el selenuro sódico obtenido por el método de Milton, añadiendo un exceso de CO_2 al medio de reacción. Sin embargo se obtuvo el diselenuro **41** y no el monoselenuro esperado.

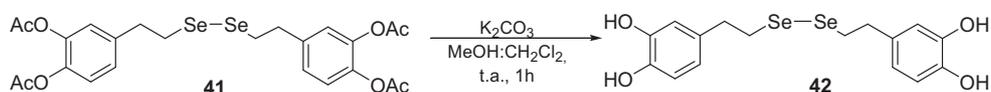
Se intentó la transformación directa del bromuro de hidroxitirosilo **1** en los correspondientes monoselenuro y diselenuro desprotegidos, utilizando hidrogenoselenuro sódico, pero debido a la labilidad de los catecoles en medio básico, la reacción no funciona y se detecta una extensa descomposición. No obstante, utilizando NaHSe y CO_2 sólido para neutralizar el exceso de basicidad del medio, se formó el diselenuro **42** aunque impurificado con otros subproductos, por lo que no es un procedimiento operativo.

Se abordó la desprotección de los xililenderivados **39** y **40** según el método de Poss y col.,²⁸⁷ por hidrogenólisis en HCl 2M en EtOH catalizada por Pd/C (**Esquema 3.20**) obteniéndose los productos de partida inalterados, debido a que el catalizador de paladio se “envenena” por la acción del selenio como era previsible.



Esquema 3.20

La desprotección del diselenuro **41** se realizó siguiendo el método descrito por Roche y col.²⁸⁸ utilizando carbonato potásico en una mezcla 1:1 de diclorometano–metanol, obteniéndose el selenoderivado **42** con un 51% de rendimiento. (**Esquema 3.21**)



Esquema 3.21

La des-*O*-metilación del selenuro **37** y del diselenuro **38** se llevó a cabo utilizando tribromuro de boro, según el método descrito para la hidrólisis de *O*-metil catecoles.²⁸⁹⁻²⁹² El tribromuro de boro se comporta

²⁸⁷ Poss, A. J.; Smyth, M. S. *Synthetic Comm.*, **1989**, *19*, 3363-3366

²⁸⁸ Roche, M.; Dufour, C.; Mora, N.; Dangles, O. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 423-430.

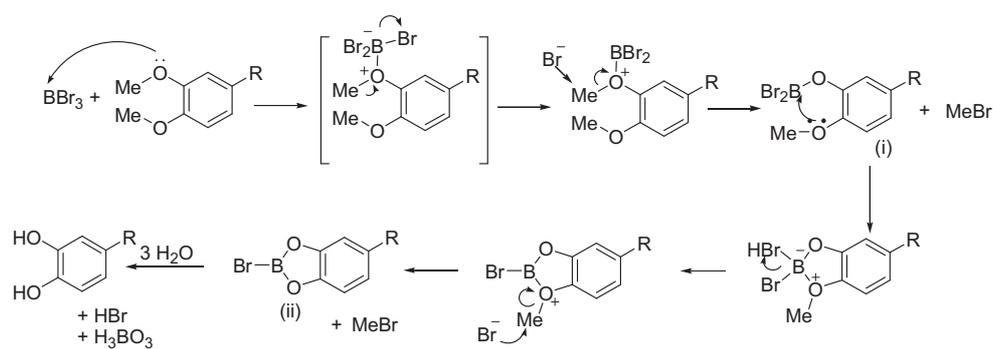
²⁸⁹ McOmie, J.F.W.; Watts, M.L.; West, D.E. *Tetrahedron*, **1968**, *24*, 2289-2292.

²⁹⁰ Vickery, E.H.; Pahler, L.F.; Eisenbraun, E.J. *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 4444-4446.

²⁹¹ Node, M.; Nishide, K.; Fuji, K.; Fujita, E. *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 4275-4277.

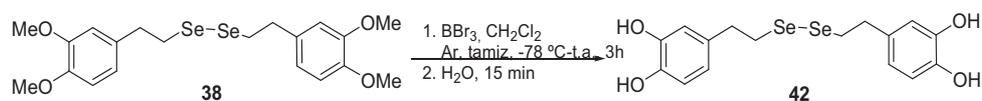
²⁹² Williard, P.G.; Fryhle, C.B. *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 3731-3734.

como electrófilo, y uno de los oxígenos de los grupos metoxi como nucleófilo, formándose un dibromoborato intermedio (i) que evoluciona hacia la formación del 2-bromobenzo[1,3,2]dioxaborolano (ii) (**Esquema 3.22**), el cual, por adición de H₂O al medio de reacción da lugar al producto dihidroxilado.



Esquema 3.22

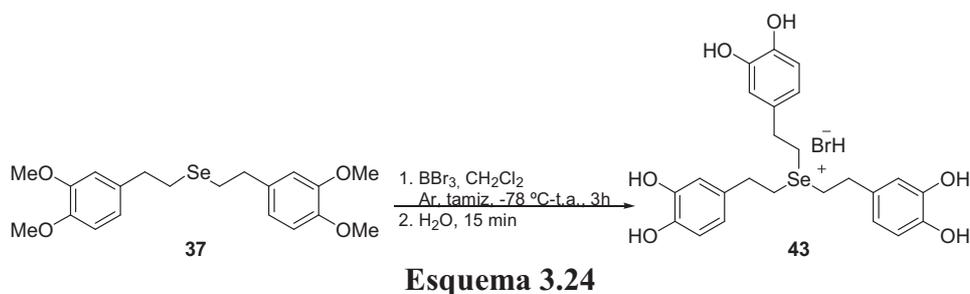
La des-*O*-metilación del diselenuro **38** se llevó a cabo añadiendo tribromuro de boro sobre una disolución de **38** a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitando en atmósfera de argón y con tamiz molecular, y usando diclorometano seco como disolvente. Al añadir agua al medio de reacción se produce la hidrólisis total del intermedio borado para dar **42** con un 55% de rendimiento (**Esquema 3.23**).



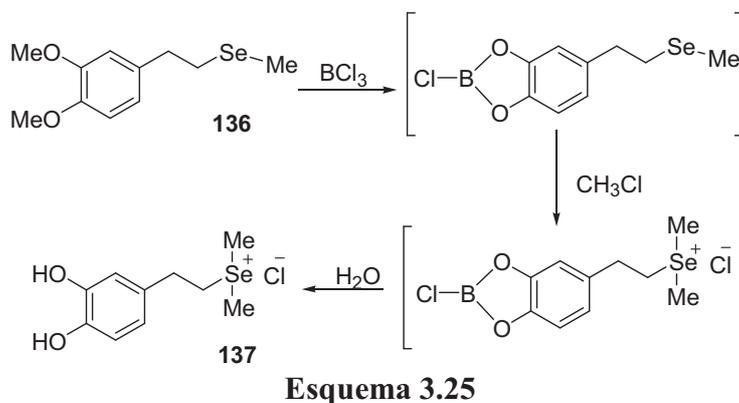
Esquema 3.23

En el caso del monoselenuro **37** la desprotección con BBr₃ condujo de manera inesperada a la formación mayoritaria de la sal de selenonio **43**

con un rendimiento del 67% después de purificación por cromatografía de columna (**Esquema 3.24**).

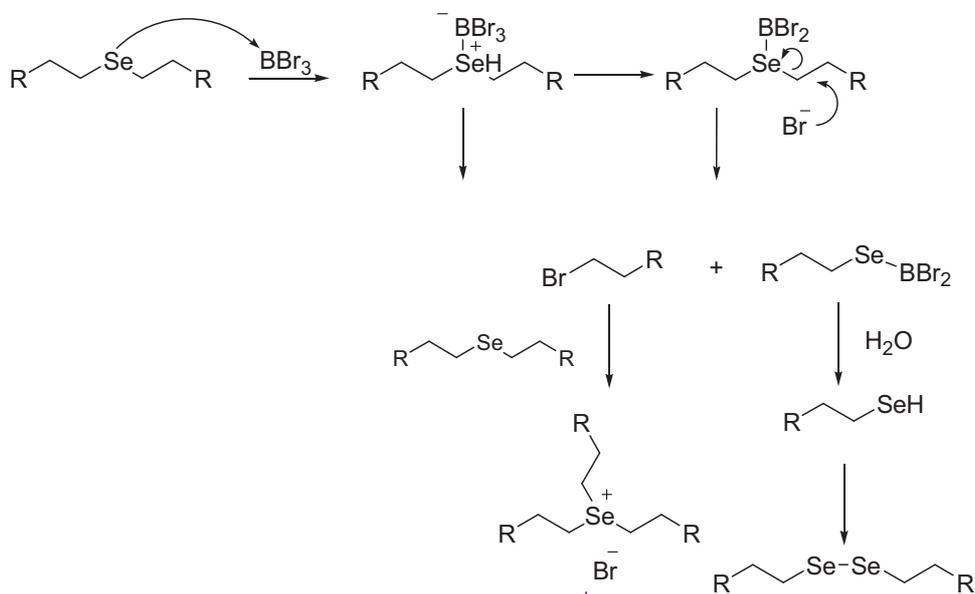


En la bibliografía se describe²⁹³ la formación de un dimetil selenonio en la desprotección con BCl_3 del metilselanil derivado **136** (**Esquema 3.25**) cuya des-*O*-metilación conduce a la formación de la sal de selenonio **137**, mediante desplazamiento nucleofílico por el átomo de selenio sobre el metilo del cloruro de metilo formado durante el proceso



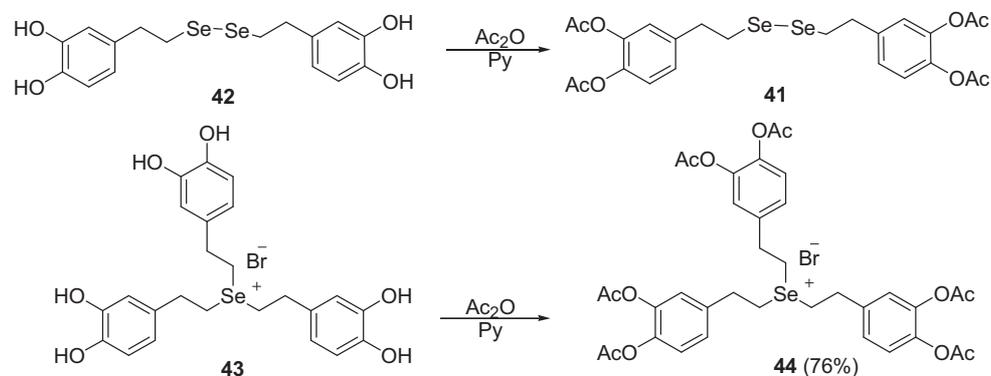
El mecanismo de reacción propuesto para la formación del selenonio **43** se detalla en el **Esquema 3.26**.

²⁹³ Sadek, S.A.; Basmadjian, G.P.; Hsu, P.M.; Rieger, J.A. *J. Med. Chem.*, **1983**, 26, 947-950.



La formación del selenonio **43** implica por tanto la formación de pequeñas cantidades del diselenuro **42**, detectadas en los espectros de masas y en RMN.

La confirmación de las estructuras de **42** y **43** también se ha llevado a cabo mediante la acetilación con anhídrido acético en piridina, lo que condujo a la formación de los derivados tetra-*O*-acetilado **41** y hexa-*O*-acetilado **44**, respectivamente (**Esquema 3.27**).



Esquema 3.27

Las estructuras de los compuestos descritos en este apartado quedan confirmadas por sus datos espectroscópicos. En espectroscopía de masas se aprecian las señales correspondientes a la ruptura de los diselenuros por el enlace Se–Se, con lo cual se observan los picos $[\text{M}/2]^+$ y el patrón característico de picos isotópicos del selenio. En la **Figura 3.1** se muestra, a modo de ejemplo, el espectro de ionización química del diselenuro **40**.

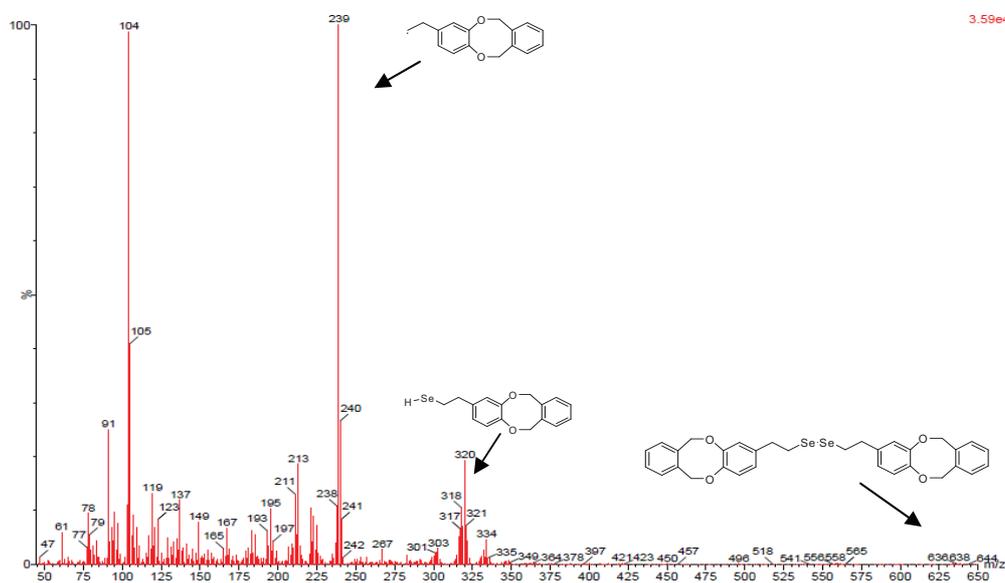


Figura 3.1. Espectro de masas del diselenuro **40**.

En ^1H -RMN las diferencias más significativas se observan entre las señales de los metilenos unidos al selenio y al anillo aromático. En el caso de los metilenos unidos a diselenuros **38**, **40**, **41**, **42** estas señales aparecen más desapantalladas (3.04–3.15 ppm) que cuando se trata de sus homólogos monoselenuros **37**, **39** y selenonio **43**, **44** (2.76–2.79 ppm), debido al mayor efecto de desapantallamiento inducido por la agrupación Se–Se. En el caso de los espectros de ^{13}C -RMN también se observan estas diferencias en los desplazamientos químicos en los carbonos unidos al Se–Se (29.9–32.3 ppm) frente a los δ de dichos carbonos unidos a Se o Se^+ (24.6–26.1 ppm); los carbonos unidos al anillo aromático son los que aparecen más desapantalladas (36.5–38.0 ppm) (**Tabla 3.2**).

Tabla 3.2. Desplazamientos químicos en ppm de los grupos metileno en ^1H -RMN y ^{13}C -RMN

	^1H -RMN (δ ppm)		^{13}C -RMN (δ ppm)	
	$\text{CH}_2\text{-Ar}$	$\text{CH}_2\text{-Se}$	$\delta \text{CH}_2\text{-Se}$	$\delta \text{CH}_2\text{-Ar}$
37 (CDCl₃)	2.90	2.78	25.4	36.8
38 (CDCl₃)	2.99	3.15	31.1	37.2
39 (CDCl₃)	2.66	2.79	24.8	36.5
40 (CDCl₃)	2.89	3.04	30.6	36.8
41 (CDCl₃)	3.03	3.12	29.9	36.9
42 (MeOD)	2.87	3.09	32.3	38.0
43 (MeOD)	2.68	2.76	26.1	37.9
44 (CDCl₃)	2.94	2.76	24.6	36.5

Estos valores concuerdan con los encontrados en la bibliografía para compuestos análogos.^{293,294}

²⁹⁴ Müller, J.; Tefort, A. *Inorg. Chim. Acta.*, **2006**, 359, 4821-4827

4. TIUREAS DERIVADAS DE DOPAMINA.
REACCIONES CON DDQ Y FORMACIÓN DE 2-
AMINO-1,3-BENZOTIAZEPINAS

4. TIOUREAS DERIVADAS DE HIDROXITIRO SOL. REACCIONES CON DDQ Y FORMACIÓN DE 2-AMINO-1,3-BENZOTIAZEPINAS.

4.1. Introducción y antecedentes.

4.1.1. Propiedades de la tioureas

La química de los compuestos *N*-tiocarbonílicos ha despertado interés desde hace más de un siglo, cuando Schoorl²⁹⁵ sintetizó la β -D-glucopiranosil tiourea por condensación de D-glucosa con tiourea. Desde entonces se han publicado numerosos artículos acerca de este tipo de compuestos²⁹⁶⁻²⁹⁹ considerados isómeros de ureas y de otros compuestos carbonílicos,³⁰⁰ por lo que podrían ser empleados en estudios de estructura-actividad de compuestos naturales que presenten un grupo *N*-carbonílico.

Las tioureas *N,N'*-disustituídas han mostrado tener actividad antiviral tanto *in vitro* como *in vivo*,^{301,302} habiendo revelado el análisis de estructura-actividad que la presencia de un grupo NH-(C=S)-NH es esencial para dicho efecto.³⁰³ Diversas familias de tioureas son también efectivas contra el VIH,³⁰⁴ y actúan como bactericidas,³⁰⁵ sustancias antimaláricas,³⁰⁶

²⁹⁵ Schoorl, M. N. *Rec. Trav. Chim.* **1903**, *22*, 31-77.

²⁹⁶ Takemoto, Y.; *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 593-601.

²⁹⁷ Sahu, S.; Sahoo, P. R.; Patel, S.; Mishra, B. K. *J. Sulfur Chem.*, **2011**, *32*, 171-197.

²⁹⁸ Li, A. F.; Wang, J. H.; Wang, F.; Jian, Y. B. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3719-3745

²⁹⁹ Marques-López, E.; Herrera, R.; Christmann, M. *Nat. Prod. Rep.*, **2010**, *27*, 1138-1167.

³⁰⁰ Werzel, M.; Light, M. E.; Davis, A. P.; Gale, P. A. *Chem. Comm.*, **2011**, *47*, 7641-7643.

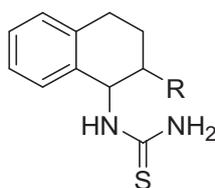
³⁰¹ Kang, I. J.; Wang, L. W.; Lee, C. C.; Lee, Y. C.; Chao, Y. S.; Hsu, T. A.; Chern, J. H. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *19*, 1950-1955.

³⁰² Todoulou, O. G.; Papadaki-Valiradi, A. E.; Filippatos, E. C.; Ikeda, S.; De Clerq, E. *Eur. J. Med. Chem.*, **1994**, *29*, 127-131.

³⁰³ Galabov, A.S.; Galabov, B.S.; Neykova, N.A., *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 1048-1051.

³⁰⁴ Weitman, M.; Lerman, K.; Ndelman, A.; Major, D. T.; Hizi, A.; Herschorn, A. *E. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 447-467.

antituberculosas³⁰⁷ y antinociceptivas.³⁰⁸ Las tetrahidronaftil tioureas han mostrado un elevado poder para suprimir el apetito en trastornos de obesidad, a partir de los experimentos llevados a cabo en animales.³⁰⁹ Las 1,3-dialquil o diaril tioureas exhiben actividad antifúngica contra los patógenos de plantas *Pyricularia oryzae* y *Drechslera oryzae*.³¹⁰



Tetrahidronaftil tioureas

Los derivados de ureas y tioureas representan uno de los grupos de agentes anticancerígenos más utilizados, con un amplio rango de actividades contra varias leucemias y tumores sólidos, debido a su buena actividad inhibitoria contra los receptores tirosina quinasa (RTKs), las proteínas tirosina quinasa (PTKs) y las NADH oxidasas, que juegan un papel crítico en muchos aspectos de la tumorigénesis.³¹¹⁻³¹³ Recientemente han sido

³⁰⁵ Suresha, G. P.; Suhas, R.; Kapfo, W.; Gowda, D. C. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, *46*, 2530-2540.

³⁰⁶ Ekoue-Kovi, K.; Yearick, K.; Iwaniuk, D.P.; Natarajan, J.K.; Alumasa, J.; de Dios A.C.; Roepe, P.D.; Wolf, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 270-283.

³⁰⁷ Liav, A.; Angala, S.K.; Brennan, J.; Jackson, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2649-2651.

³⁰⁸ dos Santos, L.; Azevedo-Lima, L; Cechinel-Filho, V.; Corrêa.R.; de Campos-Buzzi, F.; Nunes, R.J. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8526-8534.

³⁰⁹ Bhandari, K.; Srivastava, S.; Shankar, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4189-4196.

³¹⁰ Krishnamurthy, R.; Govindaraghavan, S.; Narayanasamy, J. *Pestic. Sci.*, **1999**, *52*, 145-151.

³¹¹ Ullrich, A.; Schlessinger, J. *Cell.* **1990**, *61*, 203-212.

³¹² Hubbard, S. R.; Till, J. H. *Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 373-398.

³¹³ Dai, Y.; Guo, Y.; Frey, R. R.; Ji, Z.; Curtin, M. L.; Ahmed, A. A.; Albert, D. H.; Arnold, L.; Arries, S. S.; Barlozzari, T.; Bauch, J. L.; Bouska, J. J.; Bousquet, P. F.; Cunha, G. A.;

sintetizadas las tioureas **138**, ópticamente activas, que han mostrado citotoxicidad contra carcinomas en ratas y en las células tumorales MCF-7 y HeLa.³¹⁴ Por el contrario otras tioureas como la etilentiourea **139** han mostrado ser cancerígenas.³¹⁵



Se han encontrado tioureas como la *N,N'*-bis(4-metoxibencil)tiourea, en extractos de plantas como la *Tropaeolum tuberosum*, en los que la hidrólisis enzimática de los glucosinolatos naturales da lugar a isotiocianatos, y éstos a tioureas simétricas.³¹⁶

Otros derivados como la *N,N'*-dietiltiourea, dibutiltiourea y difeniltiourea,³¹⁷ se usan en la industria del caucho y en la fabricación de neopreno, principalmente como aceleradores. También se usan en otros tipos de industrias, por ejemplo, como antioxidantes en la fabricación de tintas de impresora y de pinturas (especialmente la dietiltiourea).³¹⁸

Glaser, K. B.; Guo, J.; Li, J.; Marcotte, P. A.; Marsh, K. C.; Moskey, M. D.; Pease, L. J.; Stewart, K. D.; Stoll, V. S.; Tapang, P.; Wishart, N.; Davidsen, S. K.; Michaelides, M. R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6066-6083.

³¹⁴ Manjula S.N.; Malleshappa-Noolvi, N.; Vipani-Parihar, K.; Manohara-Reddy, S.A.; Ramanit, V.; Gadad, A. K.; Singh, G.; Gopalan-Kutty N.; Mallikarjuna-Rao, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2923-2929.

³¹⁵ Chhabra, R.S.; Eustis, S.; Haseman, J. K.; Kurtz, J.; Carlton, D. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1992**, *18*, 405-417.

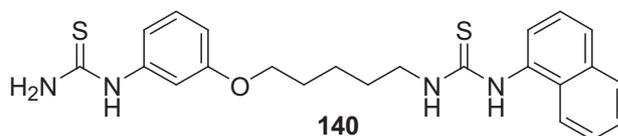
³¹⁶ Johns, T.; Towers, G. H. N. *Phytochem.* **1981**, *20*, 2687-2689.

³¹⁷ Martinez-Gonzalez, M.C.; Goday-Bujan, J.J.; Almagro, M.; Fonseca, E. *Actas Dermosifiliogr.* **2009**, *100*, 317-320.

³¹⁸ McCleskey P.E.; Swerlick, R.A.; *Cutis.* **2001**, *68*, 387-396.

La tiourea actúa como antioxidante en aceites industriales,³¹⁹ aunque su solubilidad en los mismos es limitada. La estabilidad oxidativa de los lubricantes sintéticos basados en ésteres y estabilizados con aminas antioxidantes se aumenta con tioureas,³²⁰ y los aceites vegetales son estabilizados por alquil o aril tioureas.³²¹ La tiourea inhibe la corrosión de los aceros,^{322,323} y se ha demostrado que la fenil y toliil tioureas se comportan como excelentes inhibidores de la corrosión de acero templado en ácido fórmico.³²⁴

Algunas tioureas han sido evaluadas por su actividad inhibitoria sobre la producción de óxido nítrico (NO) en cultivos, mediante la supresión de la proteína óxido nítrico sintasa insensible al calcio (iNOS), bloqueando la expresión del ARNm.³²⁵ La tiourea sintética **140** ha demostrado tener un elevado potencial farmacológico en estudios contra el Alzheimer.³²⁶



³¹⁹ Kajimoto, G.; Murakami, C.; *Shokuryo Gakkaishi*. **1998**, *51*, 207–212

³²⁰ Chao, T.S.; Kjonaas, M.; *Am. Chem. Soc. Preprints Div. Pet. Chem.* **1982**, *27*, 362–379.

³²¹ Abbott, T.; Wahlman, A.; Isbell, T.; Momany, F.; Cantrell, C. Garlotta, D. V.; Weisleder, D. *Ind. Prod. Crop.* **2002**, *16*, 43-57.

³²² Singh, I. *Corrosion*, **1993**, *49*, 473-478

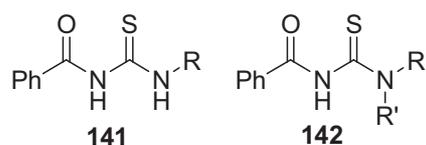
³²³ Agrawal, R.; Namboodhri, T.K.G. *Corr. Sci.* **1990**, *30*, 37-44.

³²⁴ Quraishi, M.A.; Ansari, F.A.; Jamal, D. *Mat. Chem. Phys.* **2002**, *77*, 687-690.

³²⁵ Kim, Y.J.; Ryu, J.H.; Cheon, Y.J.; Lim, H.J.; Jeon, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3317–3321.

³²⁶ Cherna, J.H.; Hsub, P.C.; Wanga, L.W.; Tsayb, H.J.; Kanga, I.J.; Shiec, F.S. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *188*, 228–236.

El estudio de *N*-benzoil-*N'*-alquiltioureas (**141**) y *N*-benzoil-*N'*,*N''*-dialquiltioureas (**142**) ha sido de reciente interés debido al potencial uso de estos compuestos como reactivos altamente selectivos para la concentración y separación de cationes metálicos,^{327,328} además de por su actividad antifúngica, especialmente en *Botrytis cinerea*.³²⁹



Las tioureas son también compuestos importantes en la síntesis de heterociclos, pudiendo transformarse en tiazoles, iminotiazolinas, tiohidantoínas, triazinas, oxazolidinas, selenazoles, etc.³³⁰⁻³³⁵ Se han descrito organocatalizadores que incluyen la función tiourea en su estructura que son utilizados en síntesis asimétrica.^{336,337} Por otro lado, el grupo tioureido es también una función versátil,³³⁸ que puede transformarse a su vez en otros

³²⁷ Beyer, L.; Criado, J.J.; García, E.; Lessmann, F.; Medarde, M.; Richter, R.; Rodríguez, E. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 6233-6239.

³²⁸ Bourne, S.; Koch, K.R. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1993**, 2071-2079.

³²⁹ Rodríguez-Fernández, E.; García, E.; Hermosa, M.R.; Jiménez-Sánchez, A.; Sánchez, M.M.; Monte, E.; Criado, J.J. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *75*, 181-188.

³³⁰ Kasmi, S.; Hamelin, J.; Benhaoua, H. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 8093-8096.

³³¹ Kidwai, M.; Venkataramanan, R.; Dave, B. *Green Chem.*, **2001**, *3*, 289-279.

³³² Ansu, D.; Kapil, A.; Meha, S. *Synth. Commun.*, **2004**, *34*, 1141-1155.

³³³ Heinelt, U.; Schultheis, D.; Jager, S.; Lindenmaire, M.; Pollex, A.; Beckmann, H.S. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 9883-9888.

³³⁴ Bellina, F.; Cauteruccio, S.; Rossi, R.; *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 4571-4624.

³³⁵ López, O.; Maza, S.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J. G. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 2556-2566.

³³⁶ Takemoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 593-601.

³³⁷ Yeboah, E. M. O.; Yeboah, S. O.; Singh, G. S. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 1725-1762.

³³⁸ García Fernández, J. M.; Ortiz Mellet, C. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1999**, *55*, 35-135.

grupos funcionales tales como ureas,^{339,340} carbodiimidas³⁴¹ o guanidinas.^{342,343} Otras tioureas han sido extensamente utilizadas en síntesis enantioselectiva en reacciones nitro-Mannich, aza-Henry y adiciones de Michael.³⁴⁴⁻³⁴⁶

Se han descrito muchos métodos para la síntesis de tioureas, aunque la mayoría de ellos se basan fundamentalmente en la reacción directa de isotiocianatos con aminas.^{343,347}

4.1.2. Transformación de tioureas en 2-amino-dihidro y 2-imino-tetrahidro-1,3-benzotiazepinas por oxidación con DDQ.

Los derivados de la 1,3-tiazepina (isotiourea cíclica de siete miembros) son compuestos de elevada importancia debido a su actividad biológica como inhibidores de la enzima óxido nítrico sintasa.³⁴⁸⁻³⁵¹ El anillo de 1,3-tiazepina está presente en el Omapatrilat, un fármaco inhibidor

³³⁹ Elbert, T.; Černý, M. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1985**, *50*, 2000-2009.

³⁴⁰ Avalos, M.; Babiano, R.; Cintas, P.; Jiménez, J. L.; Palacios, J. C.; Valencia, C. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 2676-2690.

³⁴¹ Linkleter, B. A.; Bruice, T. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1517-1520.

³⁴² Dempcy, R. O.; Browne, K. A.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6140-6141.

³⁴³ Márquez, J. M.; López, O.; Maya, I.; Fuentes, J.; Fernández-Bolaños, J. G.; *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3912-3915.

³⁴⁴ Yoon, T.P.; Jacobsen, E.N. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2005**, *44*, 466-468.

³⁴⁵ Okino, T.; Nakamura, S.; Furukawa, T.; Takemoto, Y. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 625-629.

³⁴⁶ Huang, H.B.; Jacobsen, E.N. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 7170-7171.

³⁴⁷ López, O.; Maya, I.; Fuentes, J.; Fernández-Bolanos, J. G. *Tetrahedron*, **2004**, 61-72.

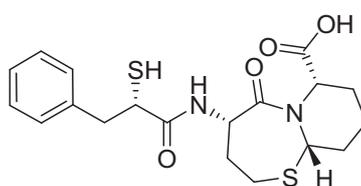
³⁴⁸ Shinji, Y.; Hidekazu, O.; Karekiyo, W. Eur. Pat. EP 717 040 (**1996**).

³⁴⁹ Shah, S.K.; Grant, S.K.; Maccoss, M.; Shankaran, K.; Qi, H.; Guthikonda, R.N. PCT Int. WO 96 14842 (**1996**).

³⁵⁰ Rongione, J.; Brown R.; Dwight, R. US Patent 6 300 503 (**2001**).

³⁵¹ Struga, M.; Kossakowski, J.; Koziol, A. E.; Kedzierska, E.; Fidecka, S.; La Colla, P.; Ibba, C.; Colu, G.; Sanna, G.; Secci, B.; Loddo, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4960-4969.

de la vasopectidasa, utilizado para el tratamiento de hipertensión y problemas cardiacos.³⁵² Inhibe la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que causa la constricción de los vasos sanguíneos y aumenta la presión sanguínea. También inhibe la enzima endopeptidasa neural, lo que provoca la relajación de venas y arterias.^{353,354}



Omapatrilat

Las benzotiazepinas son potentes agonistas del vasodilatador peptídico bradiquina,³⁵⁵ han mostrado actividad como inhibidores de la feniletanolamina *N*-metil transferasa que convierte la noradrenalina en adrenalina,³⁵⁶ y actúan como relajantes musculares, anticonvulsivos,³⁵⁷ sedantes e hipnóticos.³⁵⁸ Las 1,5-benzotiazepinas presentan un amplio rango de actividades farmacológicas entre las que destacan antagonista del canal

³⁵² Lobo, M.; Patel, J.; Kamins, G.; Francis, R.; Breza, B.; Jerzewsky, R. *Int. J. Pharm.*, **2007**, *339*, 168-174.

³⁵³ Robl, J.A.; Sun, C. Q.; Stevenson, J.; Ryono, D. E.; Simpkins, L. M.; Cimarusti, M.P.; Dejneka, T.; Slusarchyk, W. A.; Chao, S.; Stratton, L.; Misra, R. N.; Bednarz, M. S.; Asaad, M. M.; Cheung, H. S.; Abboa-Offei, B.E.; Smith, P.L.; Mathers, P. D.; Fox, M.; Schaeffer, T. R.; Seymour, A. A.; Trippodo, N. C.; *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1570-1577.

³⁵⁴ Delaney, N. G.; Barrish, J. C.; Neubeck, T.; Natajara, S.; Cohe, M.; Rovnyak, G. C.; Huber, G.; Murugesan, N.; Girotra, R.; Sieber-McMaster, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1783-1788.

³⁵⁵ Amblard, M.; Daffix, I.; Bedos, P.; Berge, G.; Pruneau, D.; Paquet, J.-L.; Luccarini, J.-M.; Belichard, P.; Dodey, P.; Martinez, J. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4185-4192.

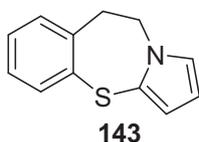
³⁵⁶ Grunewald, G. L.; Dahanukar, V. H.; Ching, P.; Criscione, K. R. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3539-3546.

³⁵⁷ Hoffmann, F. *Neth. Appl.* 6,500,817, 1965; *Chem. Abstr.* **1966**, *64*, 5122-.

³⁵⁸ Toshiyuki, H.; Takuhiro, I.; Hisao, Y. JP 7,227,107, 1972; *Chem. Abstr.* **1972**, *77*, 140187

de Ca^{2+} y vasodilatador, depresor del sistema nervioso central y antagonista de los receptores periféricos de benzodiazepina, antiagregante plaquetario, anticancerígeno, anti-VIH, inhibidor de enzimas convertidoras de angiotensinas, antimicrobiano y antifúngico.³⁵⁹

Campiani y col. han obtenido compuestos como la pirrolo[2,1-*b*][1,3]benzotiazepina **143**, con propiedades como antagonista de la dopamina y la serotonina.^{360,361}



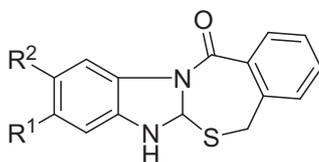
Rastkari y col.³⁶² han publicado recientemente la síntesis de benzimidazolo[2,1-*b*]benzo[*e*]tiazepin-5(10*H*)-onas sustituidas **144**, por condensación de 2-mercaptobenzimidazol con cloruro de clorometilbenzoilo, con notables propiedades como antioxidantes.

³⁵⁹ Bariwal, J. B.; Upadhyay, K. K.; Manvar, A. R.; Trivedi, J. C.; Singh, J. S.; Jain, K. S.; Shah, A. K., *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2279-2290.

³⁶⁰ Campiani, G.; Nacci, V.; Bechelli, S.; Ciani, S. M.; Garofalo, A.; Fiorini, I.; Wikstrom, H.; de Boer, P.; Liao, Y.; Tepper, P. G.; Cagnotto, A.; Mennini, T. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3763-3772.

³⁶¹ Campiani y col. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 143-157.

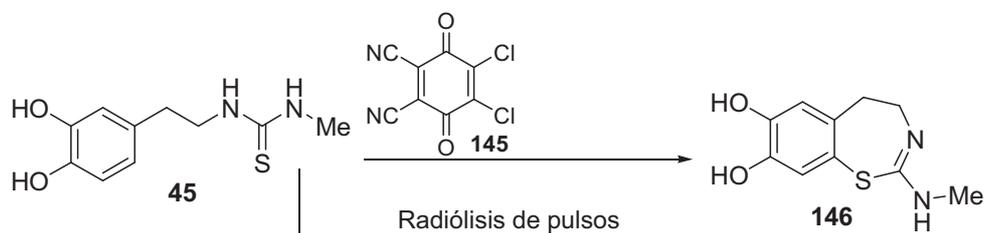
³⁶² Rastkari, N.; Abdollahi, M.; Ahmadkhaniha, R.; Shafiee, A. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2008**, *341*, 49-54.



144 a-h

- a: R¹ = H, R² = H
- b: R¹ = H, R² = Me
- c: R¹ = H, R² = NO₂
- d: R¹ = H, R² = Cl
- e: R¹ = H, R² = Br
- f: R¹ = CH₃, R² = H
- g: R¹ = NO₂, R² = Me
- h: R¹ = H, R² = OH

Land y col.³⁶³ obtuvieron la 4,5-dihidro-2-(metilamino)benzo-[f][1,3]tiazepina-7,8-diol **146** mediante la oxidación de la tiourea **45** con 2,3-diciano-5,6-dicloro-1,4-benzoquinona (DDQ) **145**, o empleando la técnica de radiólisis de pulsos (**Esquema 4.1**). Este estudio es el único antecedente de reacciones de formación de 1,3-benzotiazepinas.



Esquema 4.1

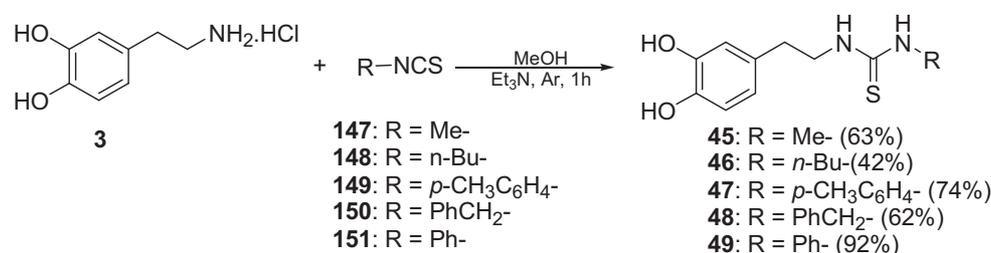
³⁶³ Land, E.; Perona, A.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 2387-2388.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Tioureas derivadas de dopamina

El objetivo del presente capítulo es la obtención de tioureas que contengan en su estructura el fragmento catecol presente en el hidroxitirosol y la dopamina.

Las tioureas **45-49** se obtuvieron por reacción a temperatura ambiente en atmósfera inerte durante una hora de los isotiocianatos comerciales **147-151** con clorhidrato de dopamina **3**, utilizando trietilamina como base y metanol como disolvente, mediante el procedimiento descrito en nuestro grupo de investigación. Los rendimientos de las tioureas obtenidas oscilaron entre el 40-90% (**Esquema 4.2**), después de su purificación por cromatografía en columna. Solo la tiourea **45** había previamente descrita.³⁶³



Esquema 4.2

Los datos espectroscópicos confirman las estructuras propuestas para las tioureas **45-49**. En los espectros de ¹H-RMN de **47** y **49** se observa como se produce un mayor desapantallamiento en el metileno unido a nitrógeno cuando el sustituyente sobre el otro nitrógeno de la función tioureido es

aromático (Tabla 1). El metileno del bencilo de **48** está más desapantallado, (4.66 ppm) que el metileno unido al segundo nitrógeno (3.66 ppm). En los espectros de ^{13}C -RMN la señal característica del carbono unido al azufre aparece entre 181.7 y 183.4 ppm.

Tabla 1. Desplazamientos químicos en ppm más característicos de las tioureas **45-49**.

	^1H -RMN (δ ppm)		^{13}C -RMN (δ ppm)	
	$\text{CH}_2\text{-NH}$	δ $\text{CH}_2\text{-Ar}$	δ $\text{CH}_2\text{-NH}$	δ $\text{C}=\text{S}$
45	3.60	2.72	47.0	183.2
46	3.62	2.71	46.9	182.8
47	3.72	2.74	47.2	181.7
48	3.66	2.71	46.9	183.4
49	3.74	2.76	47.3	181.8

4.2.2. Formación de 2-aminodihidro y 2-iminotetrahydro-1,3-benzotiazepinas por oxidación de tioureas con DDQ

En este apartado se describe la obtención de 1,3-benzotiazepinas a partir de tioureas derivadas de la dopamina que contienen en su estructura el fragmento catecol, lo que les confiere potencial actividad antioxidante, a pesar de proceder de una oxidación previa.

Para la oxidación de las tioureas **45-49** con DDQ (**145**) se siguió el procedimiento descrito por Land y col.³⁶⁴ La DDQ es un agente oxidante capaz de actuar en presencia o ausencia de agua, que se emplea para la oxidación de catecoles a quinonas,³⁶⁵ o para la desprotección de determinados éteres: bencil éteres,³⁶⁶ tioacetales y acetales.³⁶⁷ Actúa como aceptor de electrones y forma complejos de transferencia de carga con una amplia variedad de donadores.^{368,369}

La tiourea **45** se disolvió en MeOH-CHCl₃ 1:9 y se trató con 1 equivalente de DDQ formándose un precipitado que se recrystalizó en EtOH/HCl. La ausencia de señales en el espectro de ¹H-RMN y la presencia de tan sólo 4 señales en el espectro de ¹³C-RMN a 162.2, 129.9, 114.0 y 102.8 ppm indicaron que el producto aislado era la hidroquinona **152**, quedando la tiazepina **146** disuelta en las aguas madres en forma de hidrocloreuro y mezclada con **152** (**Esquema 4.3**), mezcla que no fue posible separar por cromatografía en columna.

³⁶⁴ Land, E. J.; Perona, A.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 944-950.

³⁶⁵ Aoyagi, Y.; Takahashi, Y.; Satake, Y.; Takeya, K.; Aiyama, R.; Matsuzaki, T.; Hashimoto, S.; Kurihara, T. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 5285-5291.

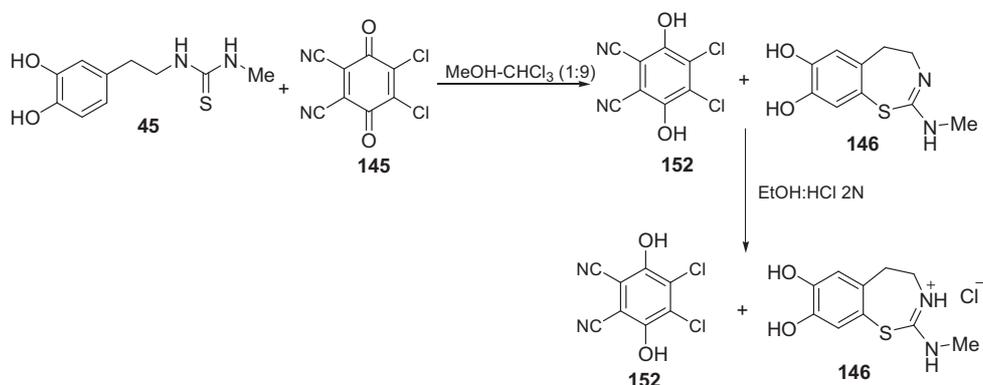
³⁶⁶ Rahin, M. A.; Matsumura, S.; Toshima, K.; *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7307-7309.

³⁶⁷ Mathew, L.; Sankararaman, S. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7576-7577.

³⁶⁸ Foster, R. *Organic Charge Transfer Complexes*; Academic Press:New York, **1969**.

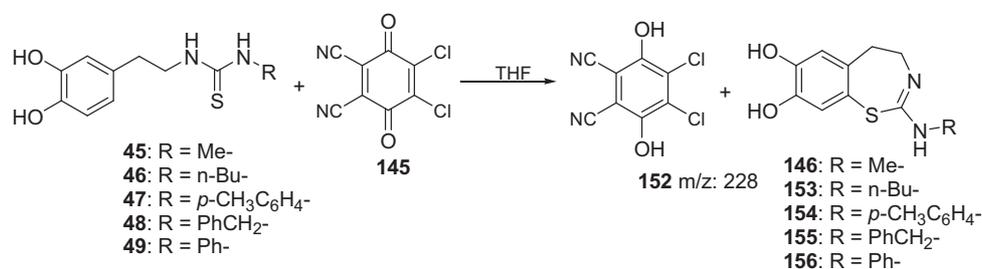
³⁶⁹ Foster, R.; Foreman, M. L. En *The Chemistry of the Quinonoid Compounds*; Patai, S., Ed.; John Wiley & Sons: New York, **1974**; Part 1, pp 257-333.

4. Tioureas derivadas de hidroxitirosol. Reacciones con DDQ y formación de 2-amino-1,3-benzotiazepinas



Esquema 4.3

La oxidación de las tioureas **45-49** con DDQ (Esquema 4.4) siguiendo el método usado por Aoyagi y col.,³⁶⁵ disolviendo las tioureas en tetrahidrofurano y adicionando DDQ en forma sólida, condujo a la formación de las benzotiazepinas **146** y **153-156**, obtenidas siempre como mezclas con **152** incluso después de su intento de purificación por cromatografía en columna.

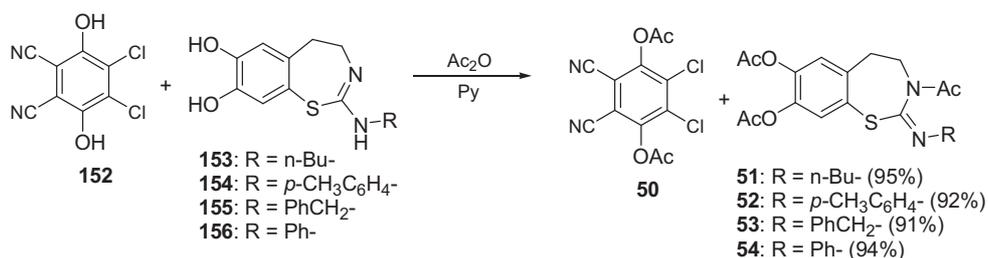


Esquema 4.4

Para poder separar las benzotiazepinas **146** y **153-156** del producto **152** se llevó a cabo la acetilación con anhídrido acético en piridina de las mezclas de reacción. De esta forma se obtuvieron los productos acetilados **51-54**, y el 3,6-diacetoxi-4,5-dicloroftalonnitrilo **50** (Esquema 4.5). La

acetilación no sólo tuvo lugar en los hidroxilos aromáticos, sino también en el nitrógeno situado en la posición 3 del anillo de tiazepina, produciéndose un reordenamiento molecular hacia la formación preferente de los 2-imino derivados

51-54.



Esquema 4.5

Con objeto de confirmar la estructura de **50** se procedió a la acetilación con anhídrido acético en piridina de **152**, obteniéndose **50** con un 58% de rendimiento. En los espectros de ¹³C-RMN se observaron las señales de los acetilos a 166.2 y 20.2 ppm, además de las señales de los carbonos aromáticos a 148.7, 135.3 y 110.6 ppm.

La estructura de las benzotiazepinas **51-54** queda confirmada mediante espectroscopía ¹H-RMN donde sólo se aprecian las señales de dos protones aromáticos, frente a las tres que presentan las tioureas de partida. En la espectroscopía bidimensional HMBC se observan los acoplamientos entre carbonos y protones a larga distancia (2 y 3 enlaces). El carbonilo del grupo acilo muestra una señal de acoplamiento con los protones del metileno situado en C-4, a través de tres enlaces. Si el acetilo hubiera estado

sobre el nitrógeno exocíclico el número de enlaces entre los protones en C-4 y el carbonilo serían cinco, por lo que no se detectaría ninguna correlación en el espectro HMBC (**Figura 4.1**).

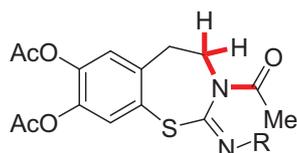
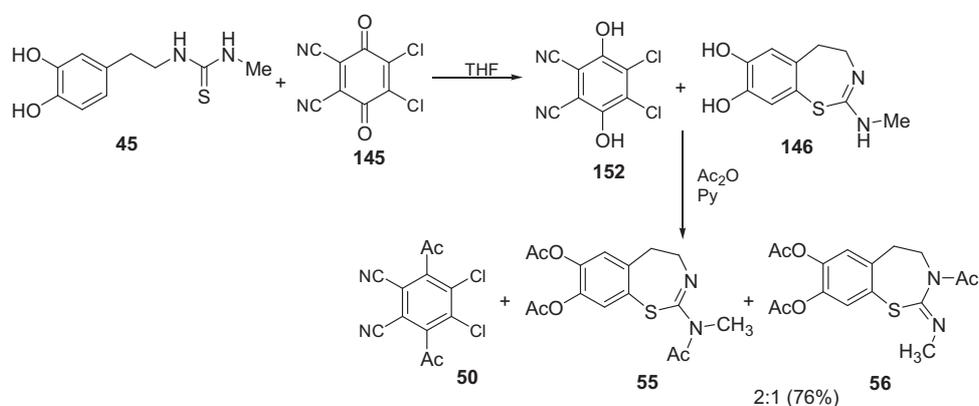


Figura 4.1.

El tratamiento de la tiourea **45** con DDQ, seguido de acetilación del crudo de reacción, condujo a una mezcla de tautómeros **55** y **56** en proporción 2:1, según se deduce de las señales de los espectros de ^1H -RMN (**Esquema 4.6**, **Figura 4.2**). El menor volumen del grupo metilo favoreció en este caso la acetilación sobre el nitrógeno exocíclico, pudiéndose aislar la mezcla de ambos tautómeros por cromatografía en columna de gel de sílice.



Esquema 4.6

4. Tioureas derivadas de hidroxitirosol. Reacciones con DDQ y formación de 2-amino-1,3-benzotiazepinas

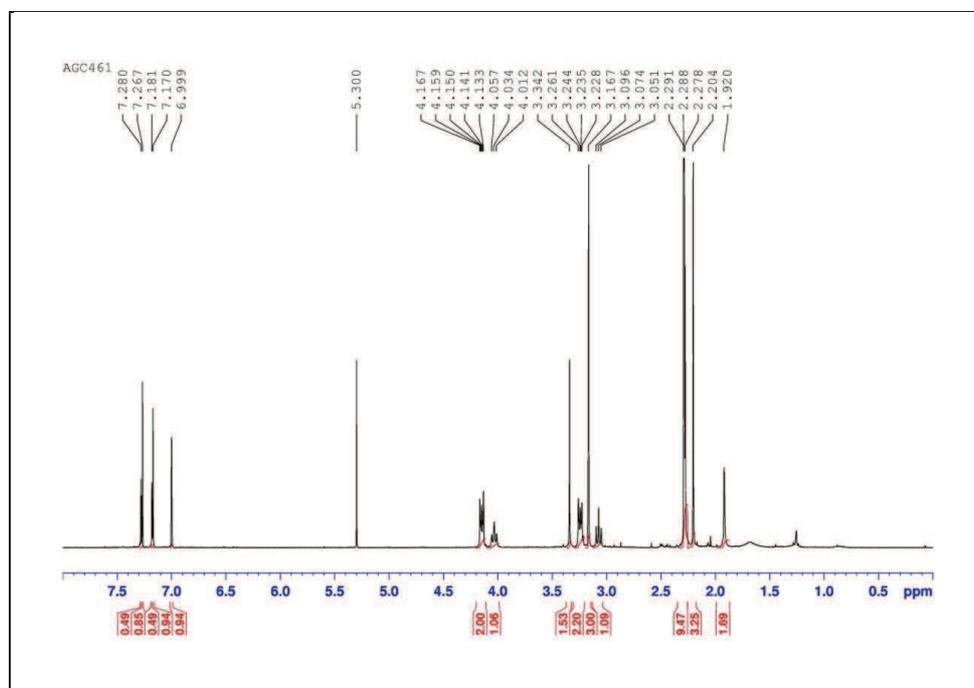


Figura 4.2.

Un seguimiento por espectroscopía de ^1H -RMN del equilibrio tautomérico **55/56** mostró que, después de 8 días, la proporción de los tautómeros **55** y **56** varió de 2:1 a 1:0.8, lo que demuestra la capacidad del grupo *N*-acilo de migrar de un nitrógeno a otro de la misma molécula. El tautómero mayoritario sigue siendo la 2-aminobenzotiazepina **55** frente al 2-iminoderivado **56** como demuestra el experimento HMBC, donde se observó la señal de acoplamiento del metileno en C-4 y el carbonilo acílico de **56**.

Al realizar el espectro NOESY sobre la mezcla de **55** y **56** no se observó correlación entre los protones del metileno C-4 y los protones del *N*-acetilo, por lo que la conformación preferente en torno al enlace N-

3-COCH₃ debe ser la *E*, como se describe en la **Figura 4.3**. La configuración del grupo imino debe ser la *Z* para evitar la interacción estérica entre el *N*-Me y el acetilo. En esta disposición *ZE* se evita la desestabilización que supone que los dipolos sobre el C=O y C=N estén paralelos, como ocurre en la disposición *ZZ*.

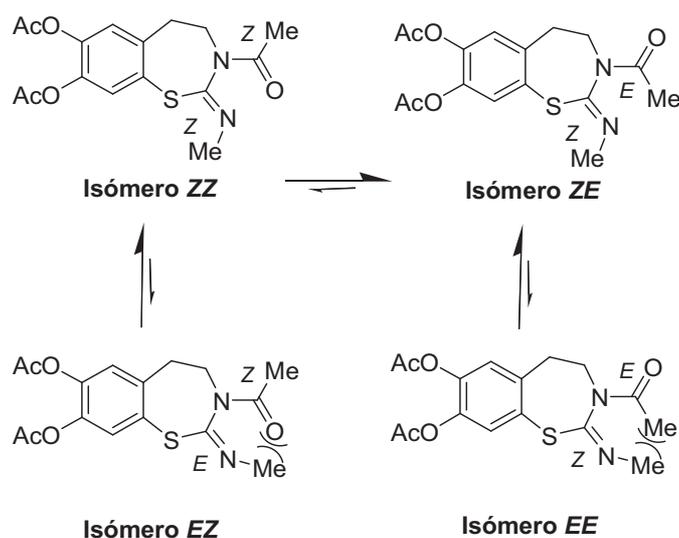
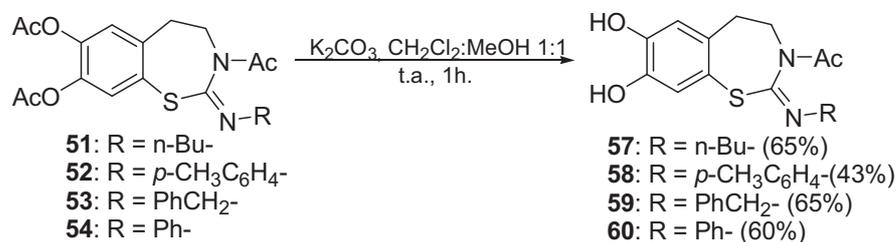


Figura 4.3

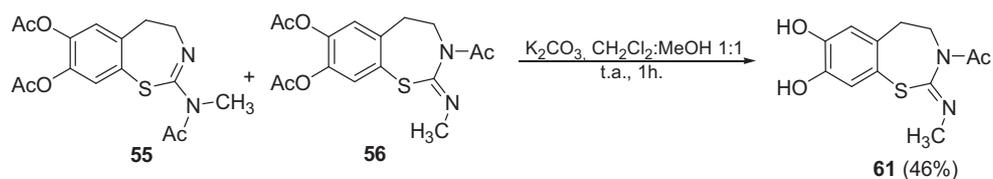
El tratamiento de las benzotiazepinas **51-54** con carbonato potásico en MeOH-CH₂Cl₂ durante 1 hora a temperatura ambiente provocó la hidrólisis de los acetilos del fragmento catecol, si bien no se consiguió con este método hidrolizar la amida sobre nitrógeno en posición 3, obteniéndose los derivados **57-60** con rendimientos moderados entre el 43 y el 65 %. (**Esquema 4.7**)

4. Tioureas derivadas de hidroxitirosol. Reacciones con DDQ y formación de 2-amino-1,3-benzotiazepinas



Esquema 4.7

La desacetilación de la mezcla de **55** y **56** por este método solamente condujo al derivado **61**. El medio básico parece catalizar la completa migración del acetilo hacia el regioisómero más estable con el acetilo sobre el nitrógeno endocíclico (**Esquema 4.8**).



Esquema 4.8

El intento de *N*-desacetilación en condiciones ácidas de las 1,3-benzotiazepinas **57-61** no condujo a los correspondientes derivados desprotegidos, sino a mezclas de productos de descomposición.

5. PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5. PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.1. Introducción y antecedentes

5.1.1. Determinación de la capacidad antioxidante

Los antioxidantes han alcanzado recientemente una importancia considerable. La búsqueda bibliográfica (SciFinder) de los términos “antioxidantes naturales” revela un total de 481 entradas para el año 2000, mientras que en el 2010 asciende a 3161 publicaciones, lo cual indica cómo en la última década prácticamente se ha multiplicado por seis el interés por estas sustancias.

Términos que se encuentran en la bibliografía para referirse a la capacidad antioxidante son eficiencia, poder, parámetro, potencial, potencia y actividad antioxidante.³⁷⁰ La acepción “actividad” antioxidante de un producto químico medida en un ensayo individual refleja sólo la reactividad bajo las condiciones de ese ensayo, por lo que puede conducir a error utilizar el dato como indicador de la “actividad antioxidante total”. Se usa el término “capacidad” para referirse a los resultados obtenidos por diferentes ensayos, como por ejemplo, “capacidad de reducción de iones férricos”, o “capacidad para secuestrar radicales peroxilo”. No existe por tanto una única reacción a través de la cual establecer la capacidad antioxidante de un extracto o compuesto, por lo que existen numerosos métodos basados en distintas técnicas para la medida de dicha capacidad.

³⁷⁰ Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841-1856.

En base a las reacciones químicas implicadas, la mayoría de los ensayos de capacidad antioxidante se pueden dividir en dos grupos, por un lado las reacciones basadas en transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT: *Hidrogen Atom Transfer*) y las reacciones basadas en transferencia de un electrón (ET: *Single Electron Transfer*). Los ensayos ET implican una reacción redox con el oxidante como indicador del punto final de la reacción. La mayoría de los experimentos HAT comprenden un generador de radicales libres, un oxidante y un compuesto susceptible de ser oxidado.³⁷⁰

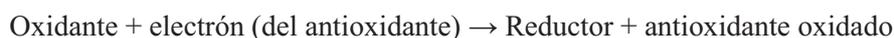
Las reacciones HAT y las ET pueden llegar a ser difíciles de distinguir, ya que las reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno pueden ser el resultado de transferencia de electrones acoplada a protones.^{371,372}

Dentro de los ensayos basados en transferencia de electrones, el más popular es el de fenoles totales utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Dentro de este grupo se encuentra la capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), el poder reductor del ión férrico (*Ferric Ion Reducing Power*), el ensayo de la *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamina (DMPD) y el ensayo de la capacidad de reducción de iones Cu^{2+} .³⁷⁰ Estos métodos implican dos componentes en la mezcla de reacción,

³⁷¹ Nakanishi, I.; Fukuhara, K.; Shimada, T.; Ohkubo, K.; Iizuka, Y.; Inami, K.; Mochizuki, M.; Urano, S.; Itoh, S.; Miyata, N.; Fukuzumi, J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2002**, 1520-1524.

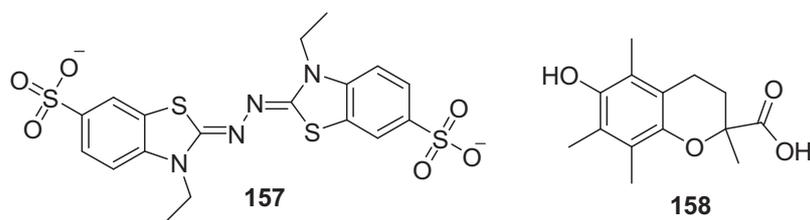
³⁷² Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1173-1183.

antioxidantes y oxidantes, además del compuesto a testar. Se basan en la siguiente reacción de transferencia de electrones:



El grado de cambio de color que experimenta el oxidante al captar el electrón es proporcional a la cantidad de antioxidante.

El ensayo TEAC fue descrito por primera vez por Miller y Rice-Evans³⁷³ y mejorado por Re y col.³⁷⁴ El oxidante ABTS^{•-} se generó por oxidación del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfúrico) sal diamónica **157** con persulfato potásico, y presenta su máximo de absorbancia a 734 nm. La concentración de antioxidantes necesaria para producir el mismo porcentaje de absorbancia que una concentración de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (**158**) 1 mM se conoce como el TEAC.



El Trolox es un antioxidante sintético utilizado en multitud de aplicaciones biológicas y bioquímicas para reducir el estrés o daño

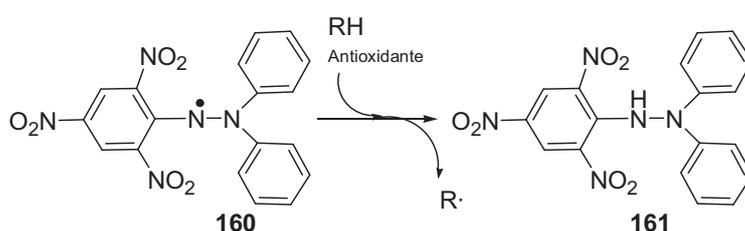
³⁷³ Miller, N.J.; Rice-Evans, C.A.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A.A. *Clin. Sci.* **1993**, *84*, 407-412.

³⁷⁴ Re., R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.; *Free Radical Biol.Med.*, **1999**, *26*, 1231-1237.

oxidativo.³⁷⁴ Es un análogo estructural de la vitamina E, conservando su fragmento fenólico, aunque es mucho más hidrófilo al carecer de la cadena lateral.

Debido a su simplicidad, el uso de la expresión TEAC se ha generalizado para otras pruebas de capacidad antioxidante para comparar los valores de los diferentes ensayos con los aportados por concentraciones de Trolox 1 mM.

En el ensayo de capacidad secuestrante de radicales DPPH está basado en el concepto de que un donador de hidrógeno es un reductor y por tanto un antioxidante. En el **Esquema 5.1** se muestra el mecanismo por el cual el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo **160** (DPPH) acepta hidrógeno de un antioxidante convirtiéndose en la especie reducida **161**.³⁷⁵



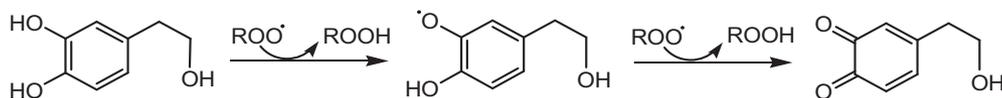
Esquema 5.1

El DPPH es uno de los pocos radicales de nitrógeno disponibles comercialmente. El efecto antioxidante es proporcional a la desaparición del DPPH en las cubetas o pocillos de reacción.

La actividad antioxidante que presentan los compuestos polifenólicos y entre ellos el hidroxitirosol, radica en su capacidad para

³⁷⁵ Moon, J.K.; Shibamoto, T. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, *57*, 1655-1666.

secuestrar radicales libres de oxígeno cediéndoles hidrógeno.³⁷⁶ (**Esquema 5.2**)



Esquema 5.2

Esta actividad se ha confirmado mediante diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, en los que se ha demostrado la eficiencia del hidroxitirosol para reducir los indicadores de daño celular inducidos por la radiación ultravioleta³⁷⁷ y la prevención del daño que causan en el ADN sustancias como el peroxinitrito (ONO_2^-), derivado de reacciones en las que interviene el anión radical superóxido (O_2^{2-}).³⁷⁸

Dentro de los ensayos asociados con las peroxidaciones lipídicas, algunos se basan en el uso de los productos secundarios formados en dicha peroxidación en ensayos con antioxidantes. La degradación oxidativa de los lípidos se ha estudiado desde varias perspectivas, como su papel en la alteración de los alimentos, la oxidación térmica, la autooxidación y la oxidación con especies reactivas de oxígeno (ROS), a través de mecanismos diferentes.³⁷⁹⁻³⁸² Uno de los mecanismos mejor conocidos es el de los ácidos

³⁷⁶ Morales, M. T.; Przybylski, R. *Olive oil oxidation*. In *Handbook of Olive Oil*; Harwood, J., Aparicio, R., Eds., Aspen Publishers: Gaithersburg, MD, **2000**, pp 459-490.

³⁷⁷ D'Angelo, S.; Ingrosso, D.; Migliardi, V.; Sorrentino, A.; Donnarumma, G.; Baroni, A.; Masella, L.; Tufano, M.A.; Zappia, M.; Galletti, P., *Free Radic. Biol. Med.*, **2005**, *38*, 908-919.

³⁷⁸ Deiana, M.; Aruoma, O.I.; Bianchi, M.L.; Spencer, J.P.; Kaur, H.; Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Banni, S.; Dessi, M.A.; Corongiu, F.P., *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, *26*, 762-769

³⁷⁹ Kochi, J.K., Ed. *Free Radicals*, Wiley: New York, **1973**.

grasos insaturados, tales como el ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico y varios ácidos grasos ω -3.³⁸³⁻³⁸⁶

El mecanismo propuesto para la peroxidación lipídica y formación de los productos típicos de la oxidación secundaria se muestra en el **Esquema 5.3**.³⁸⁷ La peroxidación es iniciada por las ROS, abstrayendo un átomo de hidrógeno de tipo doblemente alílico de un grupo metileno de un ácido graso insaturado y formando radicales libres como el radical peroxilo.³⁸⁸ Una vez que se forman estos radicales libres, la peroxidación lipídica progresa y, por tanto, los lípidos producen varios de los llamados productos de la oxidación secundaria, mostrados en el **Esquema 5.3**. Algunos de estos productos secundarios se han utilizado como biomarcadores con objeto de investigar su papel en enfermedades.

³⁸⁰ Sikorski, Z.E.; Kolakowska, A. *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*, Taylor and Francis: New York, **2002**.

³⁸¹ Cooper, S.B.; Vacklavik, V.; Christian, E.W. *Essentials of Food Science*; Springer: New York, **2003**.

³⁸² Pokorny, J. *Autoxidation of Unsaturated Lipids*, Chan, H. W. S. Ed.; Academic Press: London, U.K., **1987**, 141-206.

³⁸³ Porter, A.A.; Weber, B.A.; Weenen, H.; Khan, J. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5597-5601.

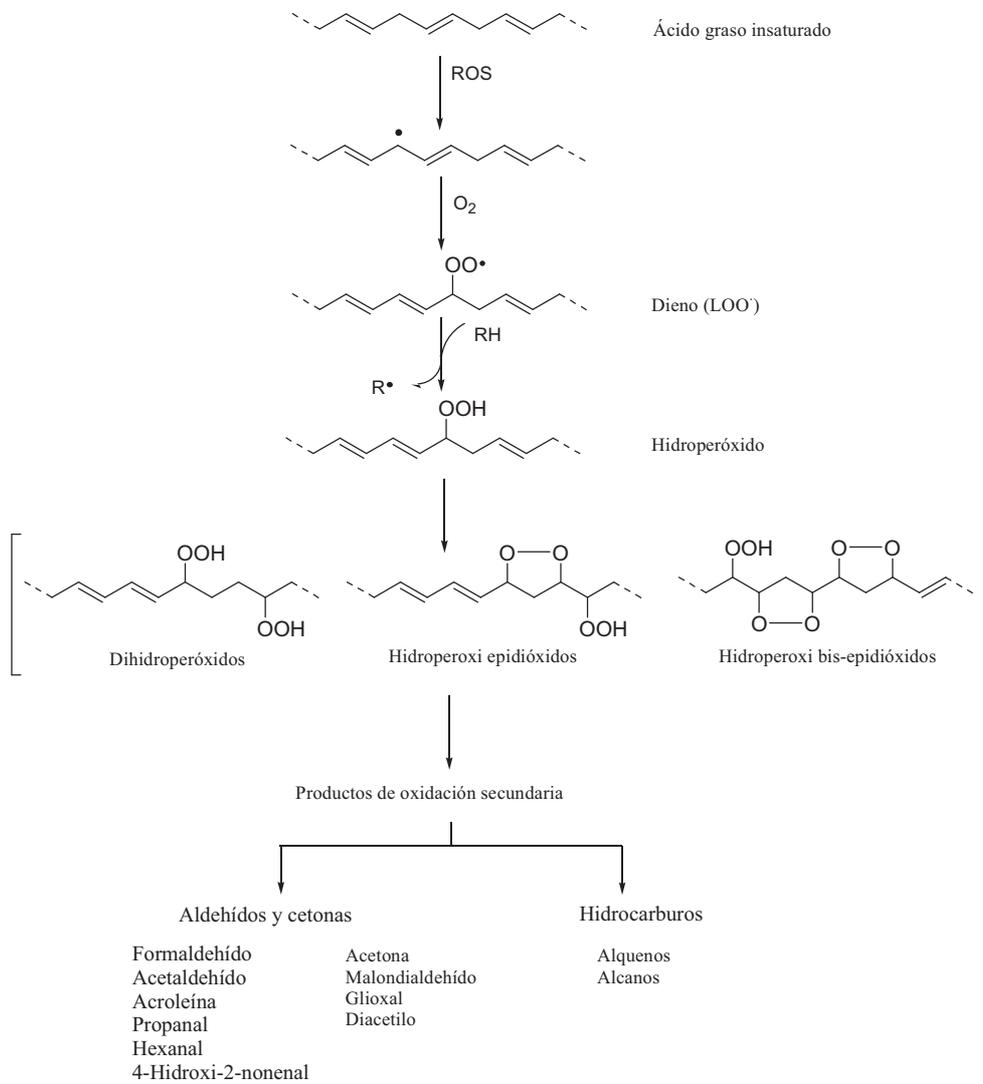
³⁸⁴ Wu, G.S.; Stein, R.A.; Mead, J.F. *Lipids*, **1982**, *17*, 403-413.

³⁸⁵ Pratt, D.A.; Mills, J.H.; Porter, N.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 5801-5810.

³⁸⁶ Roozen, J.P.; Frankel, E.N.; Kinsella, J. E. *Food Chem.* **1994**, *50*, 39-43.

³⁸⁷ Frankel, E.N. *Prog. Lipid. Res.* **1980**, *19*, 1-22.

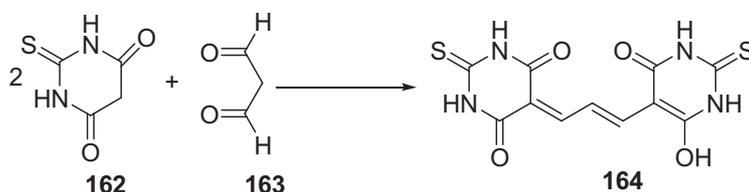
³⁸⁸ Matsuo, M. Formation and degradation of lipid peroxidation. En *Peroxide Lipid in Biological Systems*; Uchiyama, M.; Matsuo, M.; Sagai, M. Eds.; Japan Scientific Society Press: Tokyo, Japan, **1985**, 13-44.



Esquema 5.3

La mayoría de los tests asociados con la peroxidación lipídica implican la monitorización de hidroperóxidos o un producto secundario

oxidativo específico.^{370,389-392} Entre ellos, el malonaldehído **163** ha sido el más usado para evaluar la actividad antioxidante en sistemas de peroxidación de lípidos.^{393,394} En particular, el malonaldehído (MDA) es útil como biomarcador para investigar el estado final de la peroxidación lipídica. El malonaldehído (**163**) forma un aducto (**164**) (**Esquema 5.4**) con el ácido tiobarbitúrico (TBA) (**162**) que puede ser monitorizado por colorimetría midiendo la absorbancia a 535 nm,³⁹⁵ por HPLC (recomendado para suero y plasma sanguíneo),³⁹⁶⁻³⁹⁸ o por cromatografía de gases.³⁹⁹



Esquema 5.4

Sin embargo, el TBA reacciona con otros compuestos carbonílicos formados en la peroxidación de lípidos, formando complejos que presentan

³⁸⁹ Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Çelik, S.I.; Bechtasoglu, B.; Berker, K.I.; Özyurt, D. *Molecules*, **2007**, 1496-1547.

³⁹⁰ Moore, K.; Roberts, L.J. *Free Radical Res.* **1998**, 28, 659-671.

³⁹¹ Rael, L.T.; Thomas, G.W.; Craun, M.L.; Curtis, C.G.; Bar-Or, R.; Bar-or, D. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, 37, 749-752.

³⁹² Yoo, K.M.; Kim, D.O.; Lee, C. Y. *Food Sci. Biotechnol.* **2007**, 16, 177-182.

³⁹³ Neff, W. I.; Franke, E.N. *Lipids*, **1984**, 19, 952-957

³⁹⁴ Pryor, W. A.; Stanley, J. P.; Blair, E. *Lipids*, **1976**, 11, 370-379.

³⁹⁵ Waravdekar, V.S.; Saslaw, L.D. *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 1945-1950.

³⁹⁶ Kostner, K.; Banyai, S.; Jansen, M.; Khoshsorur, G.; Hori, W.J.; Maurer, F.; Winklhofer-Roob, B.; Defler, K. *Clin. Chim. Acta*, **1999**, 288, 21-30.

³⁹⁷ Carbonneau, M.A.; Peuchant, E.; Sess, D.; Canioni, P.; Clerc, M. *Clin. Chem.* **1991**, 37, 1423-1429.

³⁹⁸ Esben, S.; Tor, H.; Azam, M. M. *Clin. Biochem.* **2006**, 39, 947-954.

³⁹⁹ Umamo, K.; Dennis, K.J.; Shibamoto, T. *Lipids*, **1988**, 23, 811-814.

la misma absorbancia UV que el compuesto **164**; por lo tanto, el ensayo con TBA no es específico para el malonaldehído, y el resultado es una sobreestimación de la concentración de MDA, de ahí que los compuesto carbonílicos totales que reaccionan con el TBA son llamados Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS: *Tiobarbituric Acid Reactive Species*).⁴⁰⁰⁻⁴⁰²

5.1.2. Inhibición de la actividad tirosinasa

La tirosinasa (EC 1.14.18.1) cataliza la oxidación tanto de monofenoles (actividad creolasa o monofenolasa) como de difenoles (actividad catecolasa o difenolasa) a *o*-quinonas. El término tirosinasa se refiere a su sustrato típico, la tirosina. Ambas actividades de la tirosinasa presentan un amplio rango de sustratos específicos, aunque la enzima presenta una mayor afinidad por los isómeros L. En plantas, los sustratos fisiológicos están formados por una amplia variedad de compuestos fenólicos. La tirosinasa los oxida cuando los tejidos son dañados. La enzima extraída de los hongos *Agaricus bisporus* es homóloga a la de los mamíferos, disponible comercialmente y se utiliza como modelo para los estudios de melanogénesis.

La enzima contiene en el sitio activo dos átomos de cobre, coordinados cada uno tres histidinas.⁴⁰³⁻⁴⁰⁵ En la formación de los

⁴⁰⁰ Lykkesfeldt, J. *Clin. Chem.*, **2001**, *47*, 1725-1727.

⁴⁰¹ Stradaoli, G.; Magistrini, M. *Theriogenology*, **2002**, *58*, 347-350.

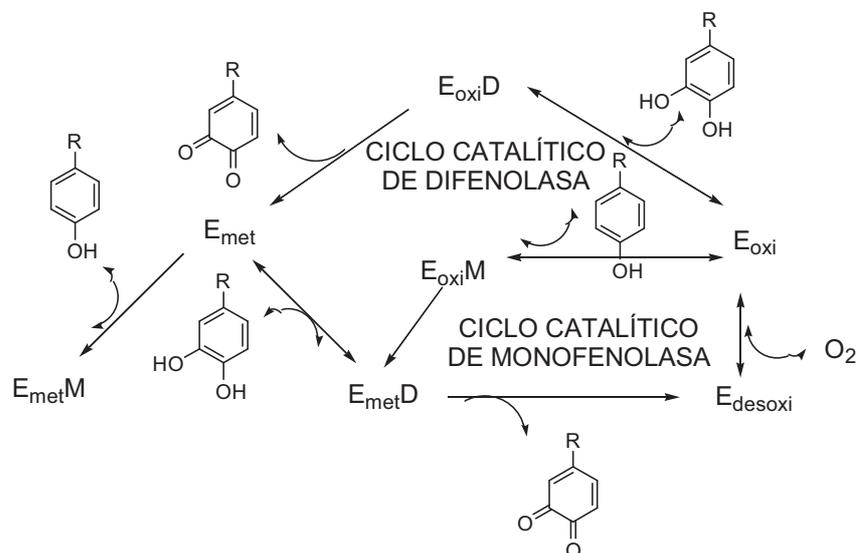
⁴⁰² De las Heras, A.; Schoch, A.; Gibis, M.; Fischer, A. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 180-184.

⁴⁰³ Chang, T. S. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 2440-2475.

pigmentos de melanina están implicados tres tipos de tirosinasa (oxi-, met-, y desoxitirosinasa) con diferentes estructuras de cobre binuclear en el sitio activo. La forma oxigenada (oxitirosinasa) consiste en dos átomos de cobre (II) tetragonal, cada uno coordinado por dos ligandos fuertes ecuatoriales y uno débil axial provenientes de la histidina. La molécula exógena de oxígeno se enlaza como peróxido y forma un puente entre los dos centros de cobre. La met-tirosinasa es similar a la forma oxi, conteniendo dos átomos de Cu(II) acoplados a través de un puente. La desoxitirosinasa contiene dos iones cobre (I) con una coordinación similar a la forma met, pero sin el puente de hidróxido. (**Esquema 5.5**)

⁴⁰⁴ Sánchez-Ferrer, A.; Rodríguez-López, J. N.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F. *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, *1247*, 1-11.

⁴⁰⁵ García-Borron, J. C.; Solano, F. *Pigmen Cell Res.* **2002**, *15*, 162-173.

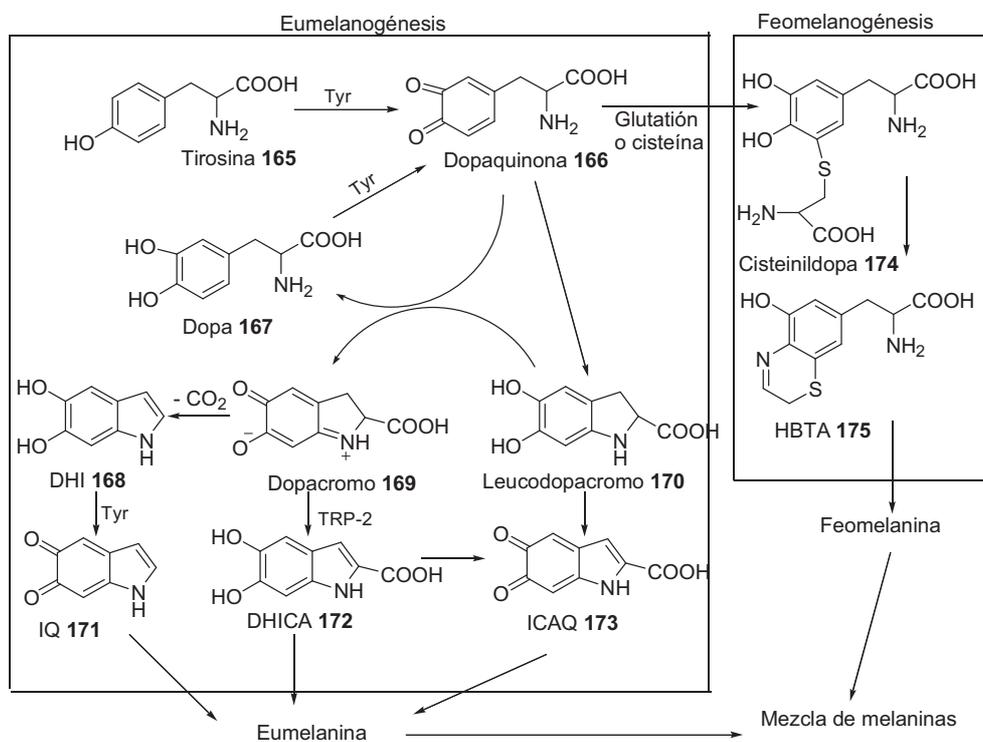


Esquema 5.5. Ciclos catalíticos de la hidroxilación de monofenol y la oxidación de *o*-difenol a *o*-quinona por la tirosinasa.^{405,406} E_{oxi} , E_{met} y E_{desoxi} son los tres tipos de tirosinasa, respectivamente. E_{oxiD} , E_{oxiM} y E_{metM} son complejos E_{oxi} -Difenol, E_{oxi} -Monofenol y E_{met} -Monofenol, respectivamente.

En las últimas décadas los inhibidores de la enzima tirosinasa han alcanzado un importante interés debido al papel de esta enzima tanto en la melanogénesis de mamíferos como en el pardeamiento de frutas y hongos. La melanogénesis se ha definido como el proceso mediante el cual se forman los pigmentos macromoleculares, por ejemplo, la melanina. La melanina se forma por una combinación de reacciones químicas y de otras catalizadas enzimáticamente. La ruta biosintética para la formación de melanina en organismos vivos fue descrita por primera vez por Raper a

⁴⁰⁶ Wilcox, D. E.; Porras, A. G.; Hwang, Y. T.; Lerch, K.; Winkler, M. E.; Solomon, E. I.; *J. Am. Chem.* **1985**, *107*, 4015-4027.

principios del siglo XX⁴⁰⁷ y posteriormente ha sido modificada por otros autores (**Esquema 5.6**).⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰



Esquema 5.6. Ruta biosintética de la melanina: Tyr, tirosinasa; TRP, proteínas relacionadas con tirosinasa; Dopa, 3,4-dihidroxifenilalanina; DHICA, ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico. DHI, 5,6-dihidroxiindol; ICAQ, ácido indol-2-carboxílico-5,6-quinona; IQ, indol-5,6-quinona; HBTA, 5-hidroxi-1,4-benzotiacinilalanina.

⁴⁰⁷ Raper, H. S. *Physiol. Rev.* **1928**, 8, 245-282.

⁴⁰⁸ Mason, H. S.; *J. Biol. Chem.*, **1948**, 172, 83-99.

⁴⁰⁹ Cooksey, D. J.; Garratt, P. J.; Land, E. J.; Pavel, S.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A.; Smit, N. P. M. *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 26226-26235.

⁴¹⁰ Schallreuter, K. U.; Kohari, S.; Chavan, B.; Spencer, J. D. *Exp. Dermatol.*, **2008**, 17, 395-404.

El primer paso de la melanogénesis es la oxidación de la tirosina a dopaquinona catalizado por tirosinasa. Este primer paso es el limitante del proceso debido a que el resto de la secuencia de reacción puede proceder espontáneamente a valores de pH fisiológico.⁴¹¹ La dopaquinona se convierte en dopa y dopacroma por reacción redox con intervención del leucodopacromo. La dopa también es el sustrato de la tirosinasa y se oxida a dopaquinona otra vez por medio de la enzima. Finalmente, la eumelanina se forma a través de una serie de reacciones de oxidación a partir de dihidroxiindol (DHI) y ácido dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA), que son los productos de reacción a partir de dopacromo. En presencia de cisteína o glutatión, la dopaquinona se convierte en cisteinildopa o glutatiónildopa, para finalmente formarse la feomelanina. Además de eumelanina y feomelanina se forman también otras melaninas. El fenómeno del pardeamiento en frutas y hongos también está relacionado con la polimerización oxidativa, conceptualmente similar a la melanogénesis. La principal diferencia reside en el hecho de que la alomelanina, o melanina producida en plantas, no contiene sustancialmente derivados de dopaquinona, sino que está basada en otros quinoides.⁴⁰³ La melanina juega un papel importante en la protección de la piel humana de los efectos perniciosos de los rayos UV del sol.

Aunque el papel de la melanina es fundamentalmente fotoprotector para la dermis humana, la acumulación de una cantidad anormal de melanina en diferentes partes específicas de la piel puede conllevar a

⁴¹¹ Halaban, R.; Patton, R. S.; Cheng, E.; Svedine, S.; Trombetta, E. S.; Wahl, M. L.; Ariya, S.; Hebert, D. N. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 14821-14828.

sobrepigmentaciones y manchas indeseables, resultando un problema estético.⁴¹¹ Además, el pardeamiento enzimático en frutas y hongos es también indeseable, por ejemplo, en fruta fresca, bebidas, verduras y setas.⁴¹² El pardeamiento después de la cosecha es un fenómeno común en cultivos como el de las setas, que disminuye el valor comercial de los productos. Tanto la hiperpigmentación en piel humana como el pardeamiento enzimático en frutas son fenómenos no deseables. Este fenómeno ha animado a los investigadores a buscar nuevos inhibidores de tirosinasa para su uso como inhibidores del pardeamiento en alimentos y blanqueadores de la piel, encontrándose en la bibliografía un gran número de agentes despigmentantes y blanqueantes.⁴¹³⁻⁴¹⁹

Se han identificado un gran número de inhibidores de tirosinasa tanto naturales como sintéticos. Sin embargo, la definición “inhibidor de tirosinasa” es a veces engañosa y muchos autores utilizan esta terminología para hacer referencia a inhibidores de la melanogénesis, cuya acción reside principalmente en interferir en la formación de melanina, sin tener en cuenta interacciones directas enzima-inhibidor. Muchos inhibidores se examinan en presencia de tirosina o dopa como sustrato de la enzima, y la actividad es

⁴¹² Artés, F.; Castañer, M.; Gil, M. I. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *4*, 377-389.

⁴¹³ Briganti, S.; Camera, E.; Picardo, M. *Pigment Cell Res.* **2003**, *16*, 101-110.

⁴¹⁴ Rendon, M. I.; Gaviria, J. I. *Dermatol. Surg.* **2005**, *31*, 886-889.

⁴¹⁵ Draelos, Z.D. *Dermatol. Ther.* **2007**, *20*, 308-313.

⁴¹⁶ Parvez, S.; Kang, M.; Chung, H. S.; Cho, C.; Hong, M. C.; Shin, M. K.; Bae, H. *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 921-934.

⁴¹⁷ Solano, F.; Brigant, S.; Picardo, M.; Ghanem G. *Pigment Cell Res.* **2006**, *19*, 550-571.

⁴¹⁸ Ando, H.; Kondoh, H.; Ichihashi, M.; Hearing, V. J. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 751-761.

⁴¹⁹ Zhu, W.; Gao, J. *J. Invest. Dermatol Symp. Proc.* **2008**, *13*, 20-24.

evaluada en términos de formación de dopacromo. Por lo tanto, la observación experimental de la inhibición de tirosinasa puede ser llevada a cabo por alguna de las causas siguientes:⁴²⁰

- a) Agentes reductores que causan la reducción química de la dopaquinona, tales como el ácido ascórbico, que se usa como inhibidor de la melanogénesis debido a su capacidad para reducir la *o*-dopaquinona a dopa, evitando la formación de dopacroma y melanina.
- b) Secuestrantes de *o*-dopaquinona, como la mayoría de los tiocompuestos, conocidos inhibidores de la melanogénesis y que reaccionan con la dopaquinona para formar productos incoloros. El proceso melanogénico se ralentiza hasta que se consume el secuestrante, y entonces vuelve a su velocidad inicial.
- c) Sustratos alternativos de las enzimas, tales como compuestos fenólicos, cuyos productos de reacción quinoides absorben en un rango espectral diferente del que corresponde al dopacromo. Cuando estos fenoles muestran una buena afinidad por la enzima, se previene la formación de dopacroma, y pueden ser erróneamente clasificados como inhibidores.
- d) Inactivadores no específicos de la enzima, como ácidos o bases, que desnaturalizan la enzima de forma no específica, y por lo tanto, inhibiendo su actividad.

⁴²⁰ Chang, T. S. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 2440-2475.

- e) Inactivadores específicos tales como los llamados sustratos suicidas o inhibidores basados en el mecanismo. Estos sustratos pueden ser catalizados por tirosinasa y una vez transformados formar enlaces covalentes con la enzima, por tanto inactivando irreversiblemente la enzima durante la reacción catalítica. Inhiben la actividad de la enzima catalizando la “reacción suicida”.
- f) Inhibidores específicos de tirosinasa, que se unen reversiblemente a la tirosinasa y reducen su capacidad catalítica.

Dentro de estos seis grupos de compuestos, sólo los inactivadores específicos de tirosinasa e) y los inhibidores f) son considerados “verdaderos inhibidores”, y se clasifican en cuatro tipos, incluyendo los *inhibidores competitivos* que se combinan con una enzima libre previniendo la unión del sustrato, los *acompetitivos*, que sólo se enlaza al complejo enzima-sustrato, *inhibidores mixtos* (competitivo/ incompetitivo), que puede enlazarse no sólo a la enzima libre, sino también al complejo enzima-sustrato, y *no competitivos*, que se unen a la enzima libre y al complejo enzima-sustrato con la misma constante de equilibrio.

El ácido kójico **176** es el inhibidor de tirosinasa más intensivamente estudiado. Es un metabolito fúngico usado corrientemente como blanqueante de piel en cosméticos, y como aditivo alimentario para prevenir el pardeamiento enzimático en alimentos.⁴²¹ El ácido kójico muestra un efecto inhibidor competitivo en la actividad monofenolasa y un efecto

⁴²¹ Chen, J. S.; Wei, C.; Marshall, M. R. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1897-1901.

inhibidor mezclado en la actividad difenolasa de la tirosinasa de hongos. La capacidad del ácido kójico para quelatarse al cobre en el sitio activo de la enzima podría explicar el efecto inhibidor competitivo. Además, el ácido kójico es un inhibidor de enlace lento en la actividad difenolasa de la tirosinasa.⁴²² Esto significa que la forma activa de la tirosinasa, generada en el ciclo catalítico en presencia de sustrato, es requerida antes de que pueda ocurrir el enlace del inhibidor a la enzima. Otros inhibidores de enlace lento de la tirosinasa son la tropolona⁴²³ **177**, y la L-mimosina⁴²⁴ **178**, conteniendo ambos el grupo α -hidroxicetona en su estructura. Los polifenoles representan el mayor grupo de inhibidores naturales de tirosinasa.⁴²⁰

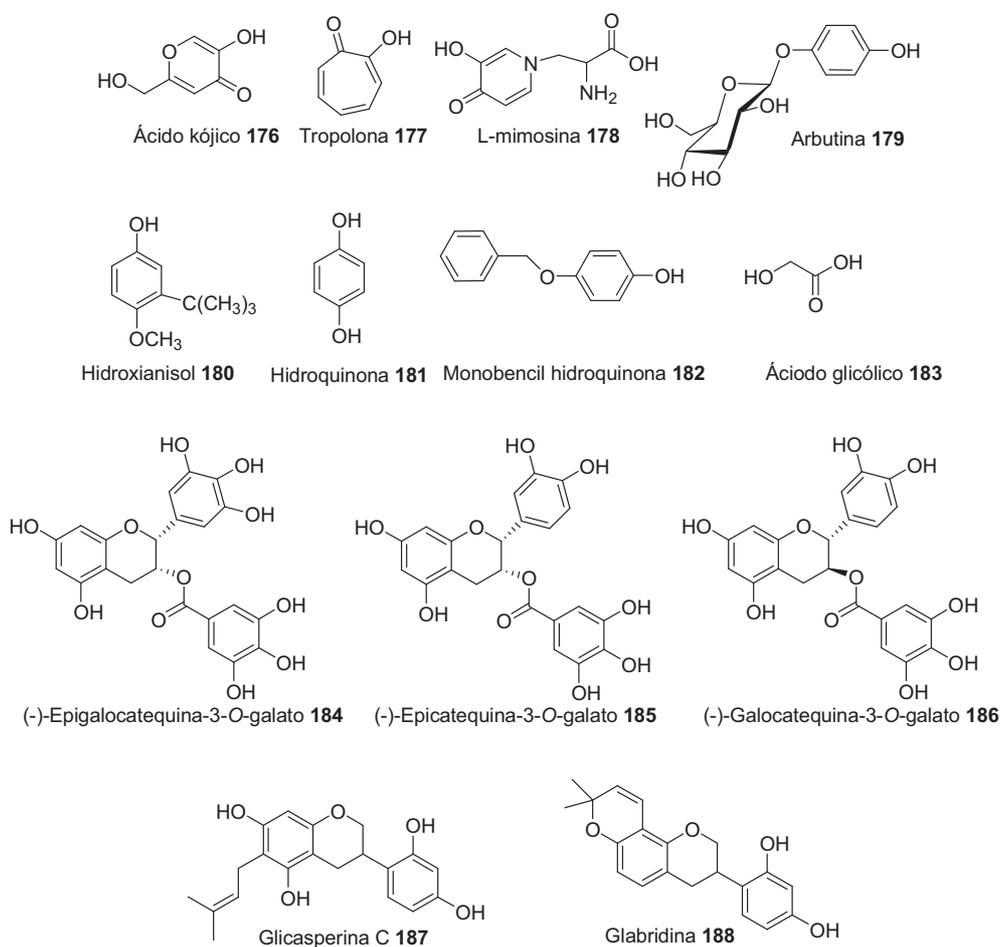
En el **Esquema 5.6** se representan algunos de los inhibidores de tirosinasa más ampliamente conocidos y estudiados:

⁴²² Cabanes, J.; García-Cánovas, F.; Tudela, J.; Lozano, J.A.; GAcría-Carmona, F. *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, *46*, 982-985.

⁴²³ Espín, J. C.; Wichers, H. J. *J. Agr. Food Chem.* **1999**, *47*, 2638-2644.

⁴²⁴ Cabanes, J.; García-Cánovas, F.; Tudela, J.; Lozano, J. A.; García Carmona, F. *Phytochemistry.* **1987**, *26*, 917-919.

5. Pruebas de actividad biológica.



Esquema 5.6

Dentro de los polifenoles, un importante grupo de inhibidores de tirosinasa son las chalconas.⁴²⁵ También se ha demostrado el potencial

⁴²⁵ Neyra, O.; Musa, R.; Khatib, S.; Tamir, S.; Vaya, J. *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 1389-1395.

inhibidor de benzaldehído y derivados del benzoato de bencilo,⁴²⁶ esteroides y lípidos de cadena larga.⁴²⁷

También han sido ensayados selenocompuestos como inhibidores de tirosinasa, por ejemplo, derivados de la 1,3-selenazol-4-ona,⁴²⁸ selenoureas,⁴²⁹ y carbohidratos que contienen selenio,⁴³⁰ mostraron una actividad inhibidora similar a la del ácido kójico frente a la actividad difenolasa de la tirosinasa de hongos. Sin embargo, cuando estos selenoderivados se aplicaron en ensayos de inhibición de melanogénesis en células de melanoma, la mayoría mostraron tanto citotoxicidad como efecto despigmentante, y por tanto su aplicación en cosméticos y alimentos está restringida.

5.1.3. Ensayos *ex vivo*. Inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas.

En los países septentrionales se produce generalmente un mayor número de fallecimientos prematuros por enfermedades coronarias y muertes repentinas.⁴³¹ Esto es en parte debido al bajo consumo de alimentos

⁴²⁶ Fang, Y.; Chen, Y.; Feng, G.; Ma, L. *Bioor. & Med. Chem.* **2011**, *19*, 1167-1171.

⁴²⁷ Choudhary, M. I.; Shah, S. A. A.; Rahman, A. U.; Khan, S.N.; Khan, M. T. H. *Steroids*, **2010**, *75*, 956-966.

⁴²⁸ Koketsu, M.; Choi, S. Y.; Ishihara, H.; Lim, B. O.; Kim, H.; Kim, S. Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1594-1596.

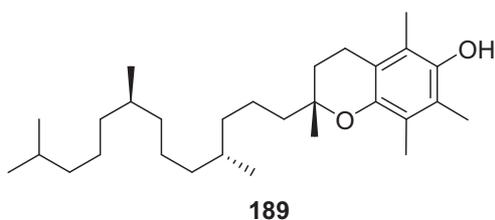
⁴²⁹ Ha, S. K.; Koketsu, M.; Lee, K.; Choi, S. Y.; Park, J. H.; Ishihara, H.; Kim, S. Y. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 838-840.

⁴³⁰ Ahn, S. J.; Koketsu, M.; Ishihara, H.; Lee, S. M.; Ha, S. K.; Lee, K. H.; Kang, T. H.; Km, S. Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 281-286.

⁴³¹ Bellizzi, M. C.; Franklin, M. F.; Duthie, G. G.; James, W. P. T. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1994**, *48*, 822-831.

ricos en micronutrientes antioxidantes.⁴³² Por ejemplo, en esos países más del 95 % de la población no alcanza la cantidad diaria de vitamina E recomendada por los Estados Unidos.⁴³³

El daño causado por las ROS la aparición de diversas patologías, incluyendo la isquemia, cáncer, enfermedades coronarias, artritis, desórdenes neurológicos y patologías autoinmunes.⁴³⁴ El cuerpo humano se autoprotege de la peroxidación lipídica en parte mediante la utilización de la vitamina E, α -D-tocoferol **189**, procedente de la dieta y su incorporación en las células y membranas de los orgánulos.⁴³⁵



La vitamina E presenta dos características estructurales, un componente fenólico que reacciona con las especies reactivas al oxígeno, donando el átomo de hidrógeno del hidroxilo fenólico para generar un radical tocoferoxil y una cadena hidrofóbica que ancla la molécula a la membrana celular.⁴³⁶ Esta cadena es fundamental para su absorción a partir

⁴³² Diplock, A. T. *Mol. Aspects Med.* **1994**, *15*, 293-376.

⁴³³ Duthie, G.G.; Arthur, J. R.; Beattie, J. A. G.; Browun, J. B.; Morrice, P. C.; Robertson, J.D.; Shortt, C. T.; Walker, K. A.; James, W. P. T. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *686*, 120-129.

⁴³⁴ Halliwell, V.; Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3^a Edición; Osford University Press: Oxford, **1999**.

⁴³⁵ Duthie, G. G., En *Human Nutrition and Dietetics*; Garrow, J.S.; James, W. P. T.; Ralph, A.; Eds.; Churchill Livingstone: London, **2000**. 226-236.

⁴³⁶ Bisby, R. H. Parker, A. W. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *317*, 170-178.

de los alimentos, el transporte sistémico y la orientación en las membranas celulares para su función antioxidante óptima. El incremento de lipofilia en antioxidantes solubles en agua como la miricetina conlleva un aumento en el potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades en las que la peroxidación de los lípidos de la membrana tiene consecuencias patogenéticas. La protección de la membrana no sólo depende de la lipofilia de la cadena lateral, sino también de la orientación, posición y longitud de la misma.⁴³⁷

Ramirez-Tortosa y col.⁴³⁸ estudiaron la capacidad de ciertos extractos de antocianinas (delfinidina, cianidina, petunidina y malvidina en sus formas 3-glucopiranosidos) para modificar los elevados índices de daño oxidativo en plasma e hígado de ratas inducido por la deficiencia de vitamina E en la dieta, observando una disminución del 30% de la capacidad antioxidante del plasma, y un incremento de hidroperóxidos y 8-Oxo-dG (8-oxo-2'-deoxiguanidina) en hígado, efecto que se invierte administrando *ex vivo* α -D-tocoferol o bien el extracto de antocianina. Los daños producidos al ADN por la no ingestión de vitamina E pueden producir mutaciones genéticas y aumentar por tanto el riesgo de carcinogénesis.⁴³⁹⁻⁴⁴²

⁴³⁷ Bennett, C. J.; Caldwell, S. T.; McPhail, D. B.; Morrice, P. C.; Duthie, G. G.; Hartley, R. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2079-2098.

⁴³⁸ Ramirez-Tortosa, C.; Andersen, O. M.; Gardner, P. T.; Morrice, P. C.; Wood, S. G.; Duthie, S. J.; Collins, A. R., Duthie, G. G. *Free Radical Biol. Med.*, **2001**, *31*, 1033-1037.

⁴³⁹ Levi, F.; Pasxche, C.; Lucchini, F.; La Vecchia, C. *Int. J. Cancer*, **2001**, *91*, 260-263.

⁴⁴⁰ Michaud, D. S.; Spiegelman, D.; Clinton, S. K.; Rimm, E. B.; Willett, W. C.; Giovannucci, E. *Am. J. Epidemiol.* **2000**, *152*, 1145-1153.

⁴⁴¹ Helzlsouer, K. J.; Huang, H. Y.; Alberg, A. J.; Hoffman, S.; Burke, A.; Norkus, E. P.; Morris, J. S.; Comstock, G. W. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 2010-2023.

⁴⁴² Shklar, G.; Oh, S.K. *Cancer Invest.* **2000**, *18*, 214-222.

Los microsomas son una herramienta importante para la investigación del metabolismo de compuestos, en reacciones de inhibición enzimática o identificación de metabolitos, y para examinar las interacciones entre medicamentos en estudios *in vitro*.⁴⁴³ Se utilizan por tanto como modelos moleculares para el estudio de la peroxidación lipídica.

En biología celular, los microsomas son vesículas formadas por el retículo endoplasmático (RE) cuando se produce la lisis por procedimientos mecánicos y posterior centrifugación de los tejidos hepáticos en el laboratorio, por lo tanto, los microsomas no están presentes como tales en las células vivas.⁴⁴⁴ Los microsomas pueden concentrarse y separarse de otros fragmentos de células rotas por centrifugación diferencial. Las células no rotas, núcleos y sedimentos de mitocondrias se eliminan a 10,000 g, mientras que las enzimas solubles y los retículos endoplasmáticos fragmentados, que contienen el citocromo P450, permanecen en disolución. A 100,000 g el RE sedimenta como pellet pero las enzimas solubles permanecen en el sobrenadante. De esta forma el citocromo P450 de los microsomas se concentra y aísla. Los microsomas son un objeto interesante de investigaciones sobre el metabolismo de ciertos compuestos

⁴⁴³ Voet, D.; Voet, J. G. (). *Biochemistry* (3rd ed.). 2004, Wiley. p. 1309.

⁴⁴⁴ Voet, D; Voet, J. G. *Biochemistry*, 3ª ed., 2004, Wiley. p. 1309.

(inhibición enzimática⁴⁴⁵ e identificación de metabolitos⁴⁴⁶), y para examinar las interacciones de medicamentos a través de ensayos *in vivo*.⁴⁴⁷

Albro y col.⁴⁴⁸ aplicaron el método del ácido tiobarbitúrico a microsomas de hígados de ratas en los que la peroxidación lipídica se inició con NADPH y se estimuló por el complejo Fe(II)-ADP (Adenosina difosfato).

5.1.4. Ensayos *in vivo*. Inhibición de la melanosis en camarones.

El camarón (*Palaemon longirostris*) es un tipo de marisco de aspecto translúcido que puede llegar a alcanzar los 7 cm de longitud. Se pesca en el estuario del Guadalquivir con barcos especiales, principalmente durante el verano. Recibe también otros nombres como camarón blanco, camarón de río, camarón dulce, camarón de Sanlúcar o quisquilla, entre otros.⁴⁴⁹

El camarón, como otras especies de su mismo género, es un alimento altamente perecedero debido a su limitada vida media, principalmente asociada con la melanosis y ataques microbianos.⁴⁵⁰ La melanosis se inicia con un mecanismo bioquímico que oxida los fenoles a quinonas por la

⁴⁴⁵ Leaden, P. J.; Catalá, A. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, **2007**, 77, 29-35.

⁴⁴⁶ Clemens, M.; Li, L. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 685, 36-44.

⁴⁴⁷ Staack, R. F.; Paul, L. D.; Springer, D.; Kraeme, T.; Maurer, H. H. *Biochem. Pharm.* **2004**, 67, 235-244.

⁴⁴⁸ Albro, P. W.; Corbett, J. T.; Schroeder, J. L. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1986**, 13, 185-194.

⁴⁴⁹ Base de datos terminológicos y de identificación de especies pesqueras de las costas de Cádiz y Huelva, www.ictioterm.es. Consulta a 12/09/2011.

⁴⁵⁰ Gokoglu, N.; Yerlikaya, P. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **2008**, 43, 1004-1008.

polifenoloxidasa (PPO).⁴⁵¹ El término polifenoloxidasa se usa generalmente para referirse a dos grupos de enzimas similares implicadas en la oxidación de fenoles: tirosinasas (EC 1.14.18.1), comentadas en el apartado 5.1.2., y catecoloxidasas (EC 1.10.3.1) que cataliza la oxidación de *o*-difenoles. Las *o*-quinonas podrían reaccionar de forma no enzimática con una variedad de compuestos en presencia de oxígeno y formar melaninas.

En los vertebrados, la PPO es sintetizada como una proPPO, un zimógeno que se activa por una proteinasa, iniciándose por compuestos microbianos (carbohidratos y lipopolisacáridos), y que implica a otras proteínas.⁴⁵² Este sistema tiene un papel fundamental en la respuesta inmune primaria, la esclerotización y curación de heridas en los crustáceos. Durante el almacenamiento post-mortem de los crustáceos, la proPPO también puede activarse en PPO por la acción de enzimas proteolíticas lixiviándose desde el trasto digestivo.⁴⁵³ Además, la hidrólisis de las proteínas por estas proteasas origina sustratos para la PPO. Seguidamente, la polimerización no enzimática de las quinonas da lugar a pigmentos oscuros de alto peso molecular.⁴⁵⁴ Aunque la melanosis, ennegrecimiento o manchas negras parece ser inocua para los consumidores, reduce drásticamente el valor del producto en el mercado, la aceptabilidad, y por tanto produce pérdidas

⁴⁵¹ Zamorano, J. P.; Martínez-Álvarez, O.; Montero, P.; Gómez-Guillén, M. C. *Food Chem.*, **2009**, *112*, 104-111.

⁴⁵² Wang, Y. C.; Chang, P. S.; Chen, H. Y. *Fish and Shellfish Immunology*, **2006**, *20*, 414-418.

⁴⁵³ Ali, M. T.; Gleeson, R. A.; Wei, C. I.; Marshall, M. R. *J. Food Sci.*, **1994**, *59*, 1024-1030.

⁴⁵⁴ Benjakul, S.; Bauer, F. *Food Chem.* **2001**, *72*, 207-217.

económicas.⁴⁵⁵ El deterioro por melanosis puede ser retardado mediante congelación, pero continúa en camarones descongelados.⁴⁵⁶ Además de la melanosis, la oxidación lipídica es otra reacción degenerativa que causa la no aceptación del pescado y mariscos.

Para prolongar la vida media de marisco y crustáceos se han usado inhibidores. Los sulfitos y sus derivados se han utilizado ampliamente como inhibidores de la PPO, previniendo la polimerización de las quinonas, combinándose irreversiblemente con ellos, formando compuestos incoloros.⁴⁵⁵ Sin embargo, los agentes sulfitantes pueden producir alergias, especialmente en personas asmáticas.⁴⁵⁷ Para evitar estos problemas se han utilizado y ensayado compuestos de origen natural como ácido ascórbico, ácido kójico,⁴⁵⁸ ficina,⁴⁵⁹ ácido cítrico,⁴⁵⁵ dodecil galato⁴⁶⁰, ácido oxálico,⁴⁶¹ catequina,⁴⁶² 4-hexilresorcinol,⁴⁶³ extractos de semillas de uvas,⁴⁶⁴ cisteína y glutatión,⁴⁶⁵ etc.

⁴⁵⁵ Montero, P.; López-Caballero, M. E.; Pérez-Materos, M. *J. Food. Sci.*, **2001**, *66*, 1201-1206.

⁴⁵⁶ López-Caballero, M. E.; Martínez-Álvarez, O.; Gómez-Guillén, M. C.; Montero, P. *Int. J. Food Sci. Tech.*; **2007**, *42*, 1029-1038.

⁴⁵⁷ DeWitt, B. J. *Resumen Internacional*. **1998**, *48*, 3463-3464.

⁴⁵⁸ Chen, J. S.; Wei, C. I.; Rolle, R. S.; Otwell W.S.; Balaban, M. O.; Marshall, M. R. *J. Agric. Food. Chem.* **1991**, *39*, 1396-1401.

⁴⁵⁹ Taoukis, P. S.; Labuza, T. P.; Lillemo, J. H.; Lin, S. W. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, **1990**, *23*, 52-54.

⁴⁶⁰ Kubo, I.; Chen, Q. X.; Nihei, K. I. *Food Chem.* **2003**, *81*, 241-247.

⁴⁶¹ Son, S. M.; Moon, K. D.; Lee, C. Y. *Food Chem.*, **2001**, *73*, 23-30.

⁴⁶² Nirmal, N. P.; Benjakul, S. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3578-3586.

⁴⁶³ Martínez-Álvarez, O.; Gómez-Guillén, C.; Montero, P. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **2008**, *43*, 2010-2018.

⁴⁶⁴ Gokoglu, N.; Yerlikaya, P. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **2008**, *43*, 1004-1008

⁴⁶⁵ Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Tanaka, M. *Food Chem.* **2006**, *98*, 158-163.

Existen estudios enzimáticos con compuestos que incluyen selenio en su estructura. El Ebselén se comportan como mimético de la glutatión peroxidasa,⁴⁶⁶ inhibiendo el daño del ADN mediado por dopamina/Cu²⁺/H₂O₂, secuestrando radicales y reduciendo el H₂O₂. Además, el diselenuro de difenilo se ha ensayado como inhibidor de la tioredoxin reductasa.

5.2. Resultados y discusión

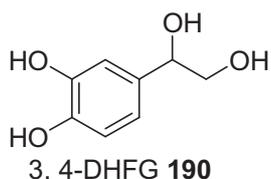
El objetivo del presente capítulo consiste en el estudio y determinación de las propiedades antioxidantes de la mayor parte de los compuestos sintetizados en el presente trabajo: los productos intermedios en la síntesis de dopamina **1** y **2**, la dopamina **3**, el sililéter **7**, los glicosil derivados **17-24**, las selenoureas **25-27**, el diselenuro **42**, el selenonio **43**, las tioureas **45-49**, y las benzotiazepinas **57**, **59** y **60**. Los resultados obtenidos se compararon con los de los antioxidantes naturales vitamina E, hidroxitirosol **64** y 3,4-dihidroxifenil glicol (3,4-DHFG) **190**. Este último compuesto es un potente antioxidante que se encuentra en pequeñas cantidades en el aceite de oliva virgen (inferior a 35 µmol/kg)⁴⁶⁷ y muy abundante en aceitunas maduras, con una actividad antioxidante incluso mayor que la del HT,⁴⁶⁸ siendo su eficiencia antioxidante 2-3 veces superior

⁴⁶⁶ Bsttin, E. E.; Brumaghin, J. L. *Cell Biochem. Biophys.*, **2009**, *55*, 1-23.

⁴⁶⁷ Medina, E.; de Castro, A.; Romero, C.; Brenes, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4954-4961.

⁴⁶⁸ Rodríguez, G.; Lama, A.; Trujillo, M.; Espartero, J. L.; Fernández-Bolaños, J. *Food Sci Tech*, **2009**, 483-490.

a la del ácido ascórbico o el hidroxitirosol en medios acuosos y comparable a la vitamina E en matrices lipídicas pese a su elevada polaridad.⁴⁶⁹ Puede ser obtenido en grandes cantidades y con elevada pureza a través de un método cromatográfico patentado por nuestro grupo de investigación.⁴⁷⁰



5.2.1. Ensayos *in vitro*

5.2.1.1. Poder reductor del hierro

Este método se basa en la capacidad de los antioxidantes para facilitar la reducción del hierro. Se empleó FeCl₃ como oxidante. El ión Fe²⁺ formado en la reacción redox forma un complejo coloreado con el 2,2'-bipiridilo, el cual es medido espectrofotométricamente.

El poder reductor (P_R) calculado según la modificación del método de Psarra y col.⁴⁷¹ por Jiménez y col.⁴⁷², se expresó como equivalentes

⁴⁶⁹ Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Jiménez, A.; Guillén, R.; Fernández-Bolaños, J. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 136–142.

⁴⁷⁰ Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Lama, A.; Rodríguez-Arcos, R.; Jiménez, A., Guillén, R. Procedimiento de purificación de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) a partir de productos vegetales. **2009**, PCT/ES2009/070541

⁴⁷¹ Psarra, E.; Makris, D. P.; Kallithraka, S.; Kefalas, P. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 1014–1020.

⁴⁷² Jiménez, A.; Rodríguez, R.; Jaramillo, S.; Rodríguez, G.; Espejo, J.A.; Guillén, R.; Fernández-Bolaños, J.; Heredia, A. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 5212–5217.

Trolox (μM trolox o mM trolox), de la ecuación obtenida por regresión lineal para el trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico):

$$P_R = 1932 \times A_{490} - 177.48 \quad (r = 0.9939)$$

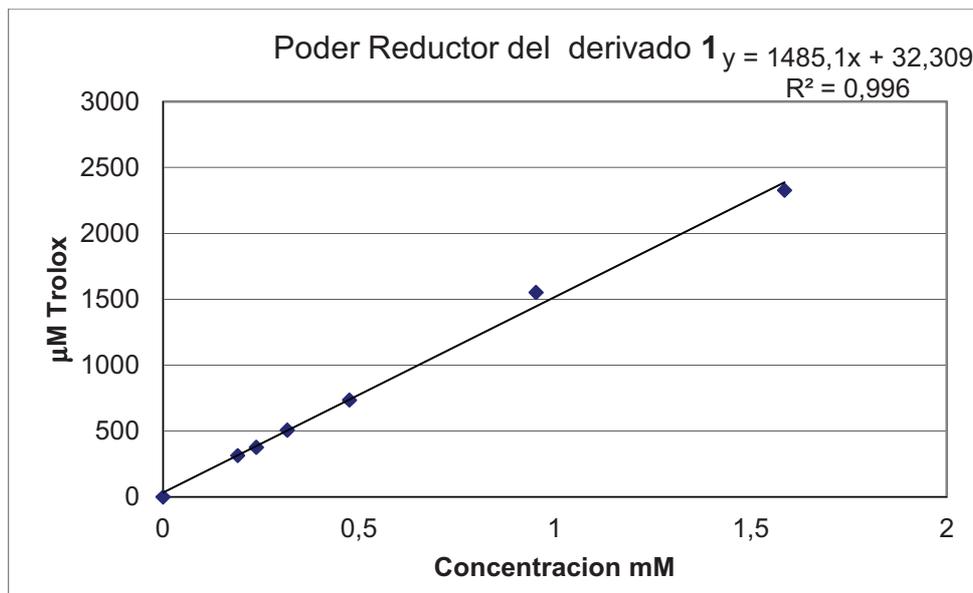
Productos intermedios en la síntesis de dopamina

Los valores de poder reductor del hidroxitirosol (**64**), los intermedios en la ruta sintética de dopamina **1** y **2**, la dopamina **3**, y el sililéter **7**, así como el cociente entre éstos y el HT se muestran en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1.: Poder reductor de los productos intermedios en la síntesis de dopamina.

Compuesto	P_R (mM Trolox)	P_R/P_R HT
HT (64)	1.11	1.00
1	1.52	1.36
2	0.28	0.25
3	1.44	1.29
7	0.93	0.84
3.4-DHFG (190)	1.18	1.06
Vit. C	1.01	0.91
Vit. E	-	-

El poder reductor del derivado **1** (**Gráfica 5.1**) es 1.36 veces superior al del hidroxitirosol, e incluso superior al de la dopamina **3**. Al sustituir el bromo por el grupo azido en **2** el poder reductor disminuye considerablemente. El sililéter **7** sigue presentando un elevado poder reductor de 0.93 mM Trolox, que aunque inferior al del hidroxitirosol, teniendo en cuenta la elevada lipofilidad de esta molécula y su posible solubilidad en matrices orgánicas, es un dato de elevado interés. La vitamina C posee un poder reductor ligeramente inferior al del HT y el glicol ligeramente superior. La vitamina E no mostró poder reductor.



Gráfica 5.1. Poder reductor del derivado 1

Glicosil derivados de hidroxitirosol y dopamina

Se ensayaron las mezclas de los glucosil derivados **17, 18** y **21, 22**, así como los galactopiranosidos **19, 20** y **23, 24**. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 5.2**.

Tabla 5.2: Poder reductor de los glicosil derivados 17-24.

Compuestos	P _R (mM Trolox)	P _R /P _R HT
17, 18	0.82	0.74
19, 20	1.04	0.93
21, 22	0.47	0.42
23, 24	0.84	0.76
HT	1.11	1.00

A pesar de tener el gluco o galactopiranosido unido a uno de los hidroxilos del fragmento de catecol, los derivados glicosilados siguen mostrando poder reductor. Los azido compuestos **17, 18** y **19, 20** muestran un mayor poder reductor que sus amino derivados **21, 22** y **23, 24** respectivamente. Los galactosil derivados presentan valores superiores a los glucósidos, pero en todos los casos los valores son inferiores a los del hidroxitirosol.

Selenoureas, diselenuro y selenonio derivados de hidroxitirosol

Los valores de poder reductor de las selenoureas **25-27**, el diselenuro **42** y el selenonio **43** se recogen en la **Tabla 5.3**.

Tabla 5.3: Poder reductor de las selenoureas 25-27, el diselenuro 42 y el selenonio 43.

Compuesto	P _R (mM Trolox)	P _R /P _R HT
25	2.78	2.50
26	2.03	1.82
27	2.29	2.06
42	5.61	5.05
43	6.02	5.41
HT	1.11	1.00

El poder reductor de las selenoureas es aproximadamente el doble que el del hidroxitirosol. Para el selenuro 42 y el selenonio 43 se obtuvieron valores extraordinariamente altos, hasta más de 5 veces superiores al HT, lo cual indica el elevadísimo potencial reductor de los derivados del selenio.

Tioureas derivadas de la dopamina

Los valores de poder reductor obtenidos para las tioureas 45-49 aparecen recogidos en la **Tabla 5.4**.

Tabla 5.4: Poder reductor de las tioureas 45-49

Compuesto	P _R (mM Trolox)	P _R /P _R HT
45	1.84	1.66
46	2.30	2.07
47	2.38	2.14
48	1.43	1.29
49	2.86	2.57
HT	1.11	1.00

En todos los casos se obtuvieron valores superiores a los del hidroxitirosol. La tiourea **49** muestra un poder reductor unas 2.5 veces superior al del HT. Comparando las tioureas **47** y **49** con sus isómeros selenoureas, **26** y **25** respectivamente, en el caso de las tioureas el poder reductor es ligeramente superior.

Benzotiazepinas derivadas de la dopamina

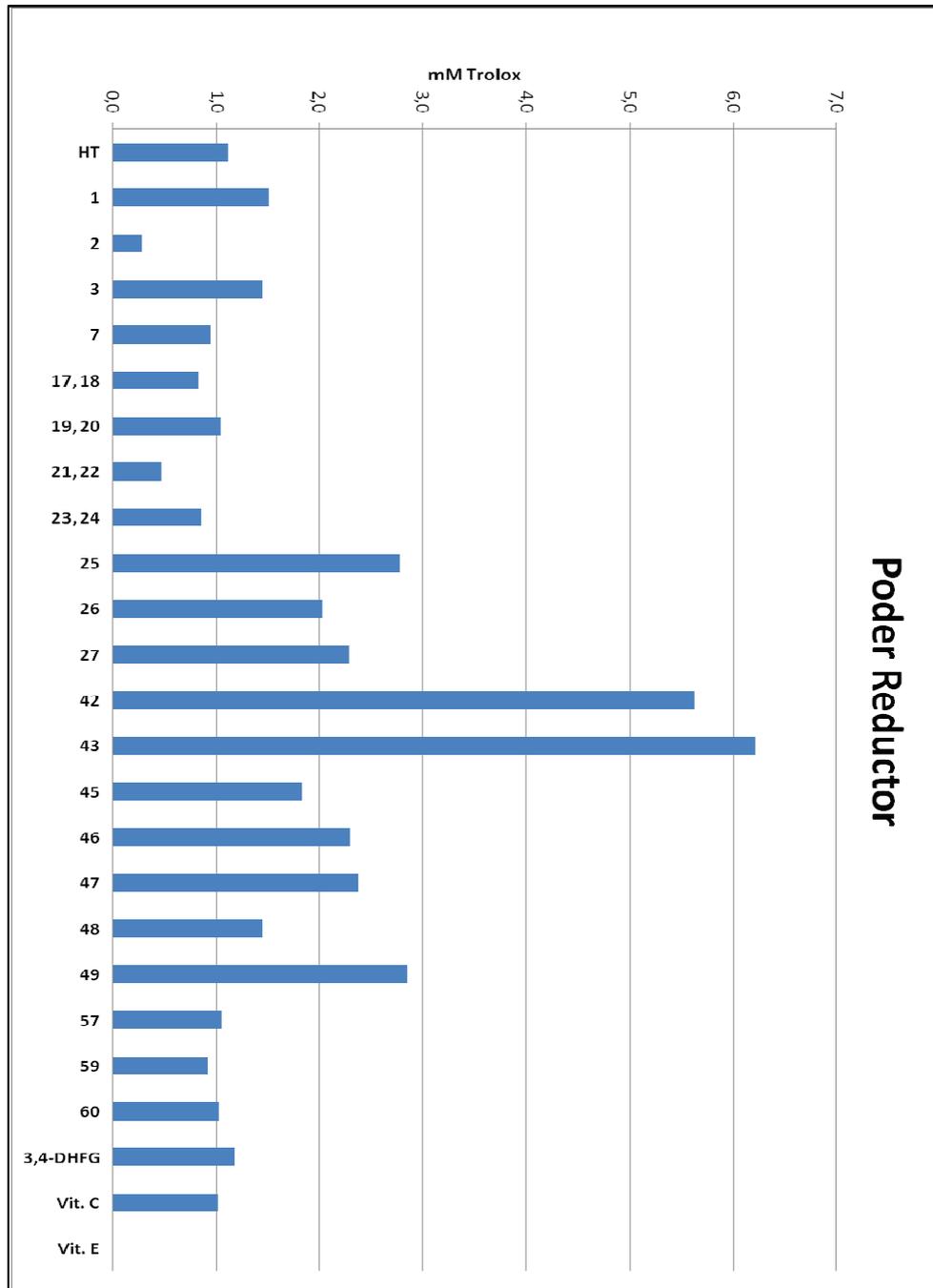
Se ensayaron también las benzotiazepinas **57**, **59** y **60**, cuyos resultados se expresan en la **Tabla 5.5**.

Tabla 5.5: Poder reductor de las benzotiazepinas **57**, **59** y **60**.

Compuesto	P _R (mM Trolox)	P _R /P _R HT
57	1.04	0.94
59	0.91	0.81
60	1.02	0.92
HT	1.11	1.00

Las benzotiazepinas **57**, **59** y **60** muestran un menor poder reductor que sus correspondientes tioureas de partida, aunque sus valores son próximos a los del HT, dato de relevada importancia teniendo en cuenta que estas benzotiazepinas provienen de tioureas sometidas a una oxidación con DDQ, que aún conservan el fragmento catecol y que por tanto mantienen un cierto potencial antioxidante.

Todos los datos relativos al poder reductor se recopilan en la **Gráfica 5.2**.



Gráfica 5.2. Poder reductor

Destacan por encima de los demás compuestos el el selenonio **43** y diselenuro **42**, seguidos por la selenourea **25** y la tiourea **49**.

Para derivados con la misma cadena lateral, por ejemplo la selenourea **25**, la tiourea **49** y la benzotiazepina **60** que comparten el fragmento benzilo, el mayor poder reductor se obtiene para la tiourea **49**. Lo mismo ocurre comparando la selenourea **26** con la tiourea **47**, siendo ésta última la que presenta un valor ligeramente superior. No obstante, las diferencias entre tio y selenoureas no son grandes. Sustituyentes aromáticos en las tioureas y selenoureas ensayadas conllevan un mayor poder reductor, probablemente debido a la posibilidad de deslocalización electrónica y estructuras resonantes, aunque en el caso de las bentotiazepinas **57**, **59** y **60** el valor mayor se obtuvo para el derivado **57**, donde el sustituyente lateral es butilo, aunque la benzotiazepina **60** que porta un grupo fenilo muestra un valor mayor al bencil derivado **59**.

Atendiendo nuevamente a los valores de poder reductor del diselenuro **42** (5.61 mM Trolox) y el selenonio **43** (6.02 mM Trolox), en comparación con el del HT (1.11 mM Trolox), cabe resaltar el efecto sinérgico que se produce los fragmentos de catecol y el átomo de selenio, porque aunque en **42** existen dos grupos catecol y tres en **43**, superan en más de cinco veces los obtenidos para el HT, con lo que queda patente el efecto sinérgico catecol-selenio en estas estructuras.

Comparando también el poder reductor del HT con el del bromoderivado **1** y la dopamina **3**, podría establecerse una correlación entre la mayor lipofilia del sustituyente y el mayor poder reductor del bromo y del amino derivado. El bajo poder reductor del azido derivado **2** pudiera estar

relacionado con la formación de especies de tipo hierro-imido ($\text{Fe}=\text{NR}$),⁴⁷³ susceptibles de ser reducidas por el fragmento de catecol.

5.2.1.2. Actividad antirradical

Capacidad de captación de radicales DPPH

Para la determinación de la captación de radicales libres se utilizó el método de Sánchez-Moreno⁴⁷⁴ con las modificaciones de Jiménez y col.⁴⁷² Para cada compuesto se dibujó la gráfica del descenso de absorbancia frente a la concentración (mM). La concentración eficiente EC_{50} representa la cantidad de antioxidante necesaria para hacer descender la absorbancia un 50 %. El TEAC (Trolox Antioxidant Equivalent Capacity) se define como el cociente entre las pendientes de las rectas obtenidas para el antioxidante testado frente a la del Trolox.

Capacidad de captación de radicales ABTS

El ensayo ABTS [ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) sal diamónica] **157** se emplea para evaluar la actividad antioxidante de componentes en alimentos y bebidas debido a su aplicabilidad en fases acuosa y lipídicas⁴⁷⁵. El radical estable ABTS^+ , de color verde-azulado, se produce por oxidación de ABTS con persulfato potásico previo a la adición del antioxidante, el cual reduce el catión radical, decolorándolo. Se empleó

⁴⁷³ Berry, J. F. *Comments Inor. Chem.* **2009**, *30*, 28-66.

⁴⁷⁴ Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J. A.; Saura-Calixto, F. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *76*, 270-276.

⁴⁷⁵ Abdullah, S.H.; Rahmat, A.; Ismail, M.; Rosli, R.; *Malaysian J. Biochem. Mol. Biol.*, **2000**, *5*, 47-51.

una modificación de los métodos descritos por Re y col.⁴⁷⁶ y Gülçin⁴⁷⁷, y los datos obtenidos se expresaron en función del EC₅₀ y el TEAC, al igual que en el caso del DPPH.

Productos intermedios en la síntesis de dopamina

Los valores de EC₅₀ (mM) para los ensayos DPPH y ABTS, así como los valores del TEAC de ambos, obtenidos para el Trolox, HT, Vitamina E los derivados **1** y **2**, la dopamina **3**, y el sililéter **7** se recogen en la **Tabla 5.6**.

Tabla 5.6: *Actividad antirradical DPPH y ABTS de los productos intermedios en la síntesis de dopamina*

Compuesto	EC ₅₀ mM DPPH	TEAC DPPH	EC ₅₀ mM ABTS	TEAC ABTS
Trolox (158)	1.19	1.00	0.142	1.00
HT (64)	1.43	0.86	0.210	0.70
1	1.50	0.77	0.176	0.82
2	4.18	0.29	0.583	0.24
3	0.67	1.82	0.082	1.74
7	1.56	0.79	0.162	0.88
Vit. E	1.87	0.61	0.320	0.43

⁴⁷⁶ Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M., Rice-Evans, C. *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 26, 1231–1237.

⁴⁷⁷ Gülçin, I. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, 179, 71-80.

Salvo la dopamina (**3**), el resto de derivados presentan una menor capacidad de captación de radicales libres, tanto DPPH como ABTS, que el Trolox, aunque es superior que la Vitamina E. El azido derivado **2** presenta una capacidad antirradicalaria muy reducida, lo que sugiere un carácter de atrapador de radicales libres.

Glicosil derivados de hidroxitirosol y dopamina

Los resultados obtenidos en las pruebas de captación de radicales libres ABTS y DPPH de los glicosil derivados **17-24** se muestra en la **Tabla 5.7**.

Tabla 5.7: *Actividad antirradical DPPH y ABTS de los glicosil derivados 17-24.*

Compuestos	EC ₅₀ mM DPPH	TEAC DPPH	EC ₅₀ mM ABTS	TEAC ABTS
17, 18	-	-	0.163	0.888
19, 20	-	-	0.166	0.901
21, 22	-	-	0.127	1.20
23, 24	-	-	0.088	1.68
HT	1.43	0.86	0.210	0.70

Los derivados glicosilados no mostraron la capacidad de secuestrar radicales libres DPPH, aunque en todos los casos los datos de captación de radicales ABTS son mejores a los del HT. Además, las mezclas de derivados **21, 22** y **23, 24** presentan un TEAC superior a 1, mostrando

incluso mejor actividad que el Trolox, dato muy importante teniendo en cuenta que en estos compuestos el grupo catecol se encuentra sustituido.

Selenoureas, diselenuro y selenonio derivados de hidroxitirosol

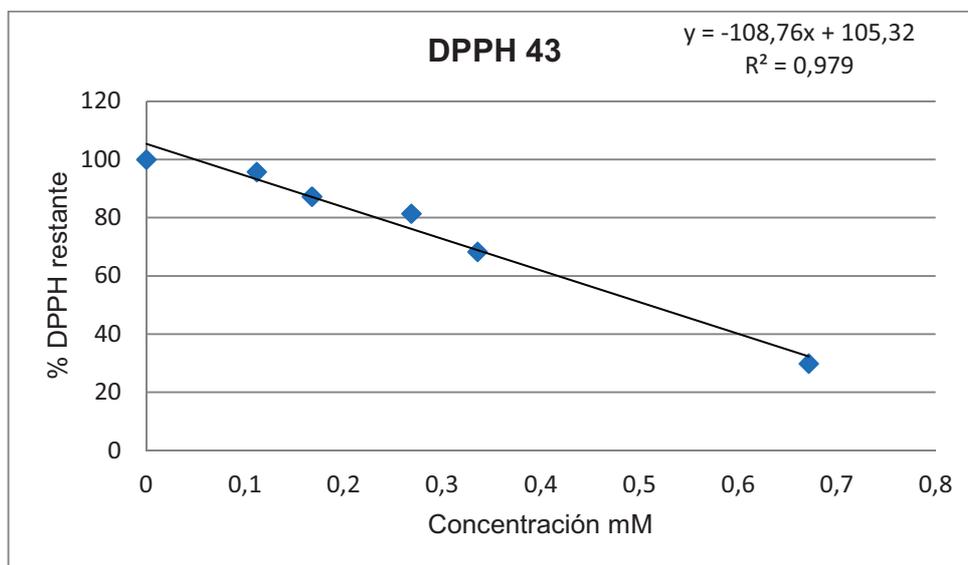
Los resultados obtenidos para los ensayos de actividad antirradical DPPH y ABTS de las selenoureas **25-27**, el diselenuro **42** y el selenonio **43** se muestran en la **Tabla 5.8**.

Tabla 5.8: *Actividad antirradical DPPH y ABTS de las selenoureas 25-27, el diselenuro 42 y el selenonio 43.*

Compuesto	EC ₅₀ mM DPPH	TEAC DPPH	EC ₅₀ mM ABTS	TEAC ABTS
HT (64)	1.43	0.86	0.210	0.70
25	0.77	1.57	0.055	2.50
26	0.72	1.69	0.059	2.29
27	0.80	1.50	0.028	5.02
42	0.74	1.65	0.031	4.76
43	0.51	2.64	0.021	7.23

En todos los casos los resultados obtenidos mejoran los del hidroxitirosol. Especialmente buenos son los datos de captación de radicales DPPH (**Gráfica 5.3**) y ABTS del selenonio **43** el cual, al tener tres grupos catecol en su estructura es un gran agente radicofílico, aunque en el caso de los ensayos ABTS el valor obtenido es diez veces superior al del

HT, produciéndose un efecto sinérgico entre los grupos catecol y el átomo de selenio.



Gráfica 5.3: Captación de radicales DPPH del selenonio 43.

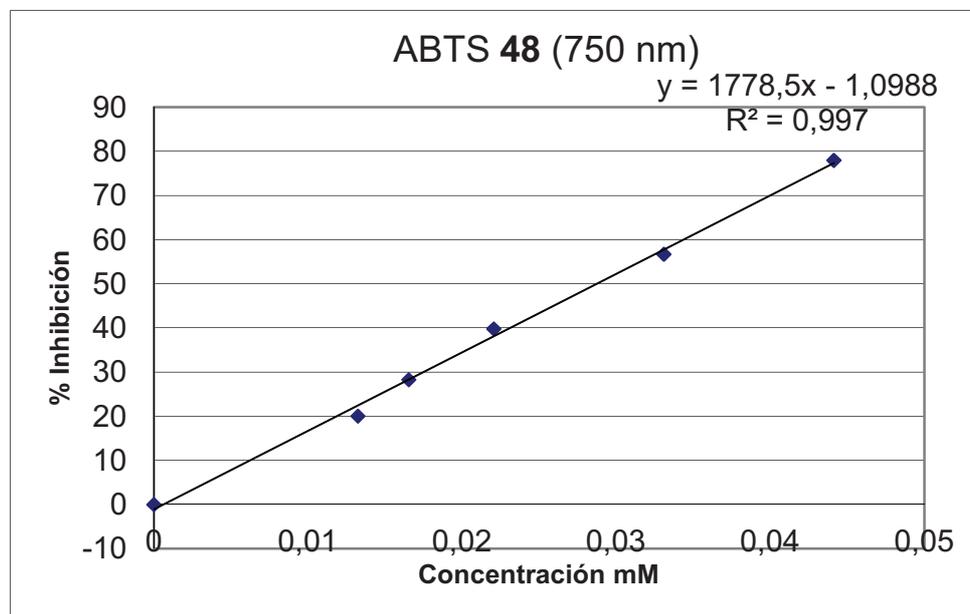
Tioureas derivadas de la dopamina

Los resultados obtenidos en los ensayos ABTS y DPPH para las tioureas 45-49 aparecen recogidos en la **Tabla 5.9**.

Tabla 5.9: Actividad antirradical DPPH y ABTS de las tioureas 45-49.

Compuesto	EC ₅₀ mM DPPH	TEAC DPPH	EC ₅₀ Mm ABTS	TEAC ABTS
HT (64)	1.43	0.86	0.210	0.70
45	1.04	1.15	0.053	2.48
46	1.12	1.06	0.050	2.65
47	1.01	1.26	0.040	3.37
48	1.00	1.17	0.029	4.95
49	1.20	1.05	0.057	2.41

Todas las tioureas muestran mayor capacidad de captación de radicales DPPH, mucho mayor en el caso del ABTS que el hidroxitirosol y el Trolox, siendo la tiourea **48** (**Gráfica 5.4**) la que muestra una mayor actividad hasta siete veces superior al HT.



Gráfica 5.4: Captación de radicales ABTS de la tiourea 48.

Benzotiazepinas derivadas de la dopamina

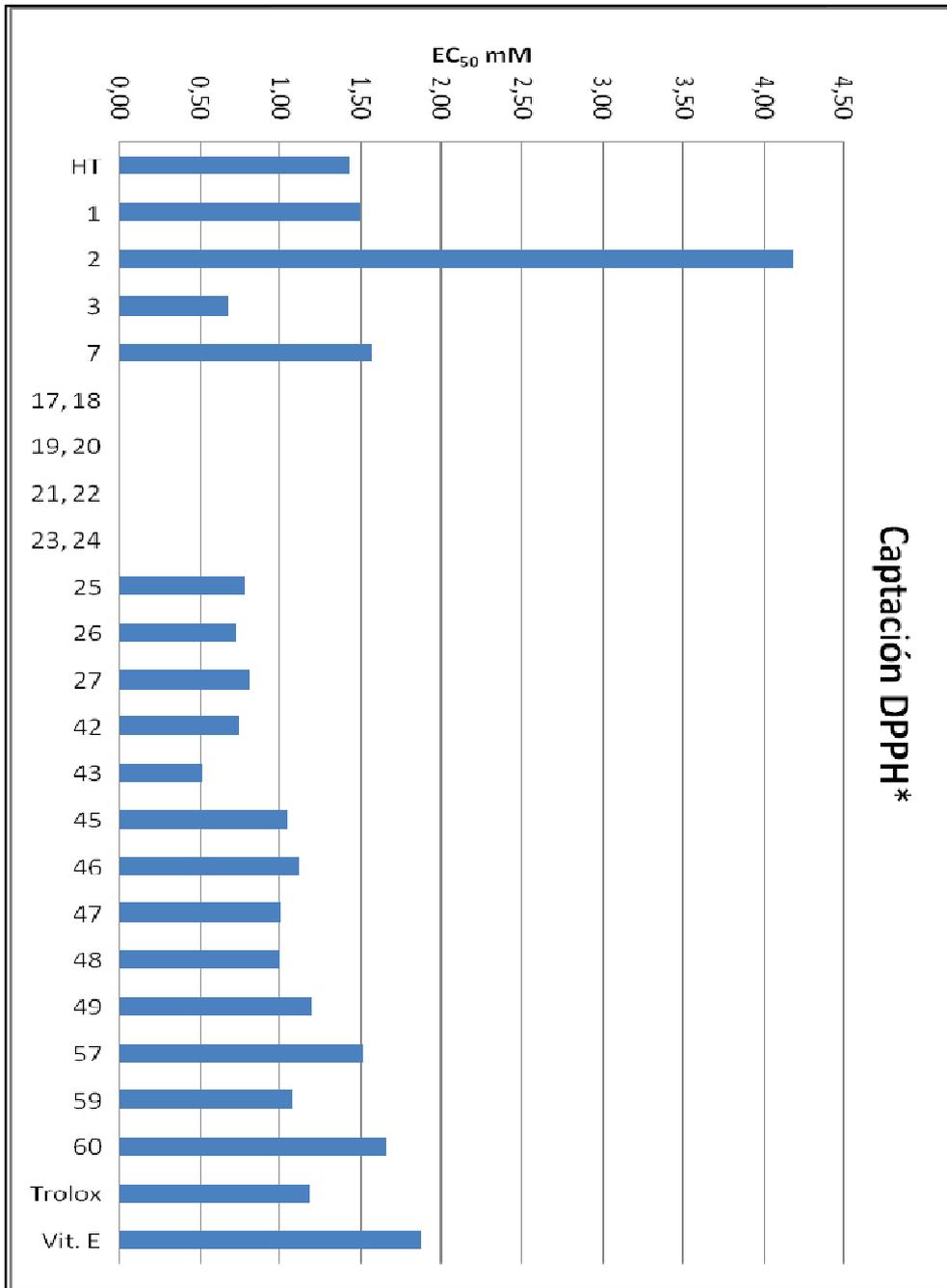
Los valores obtenidos para los ensayos de captación de radicales DPPH y ABTS de las benzotiazepinas 57, 59 y 60 se muestran en la **Tabla 5.10**:

Tabla 5.10: Actividad antirradical DPPH y ABTS de las benzotiazepinas **57**, **59** y **60**.

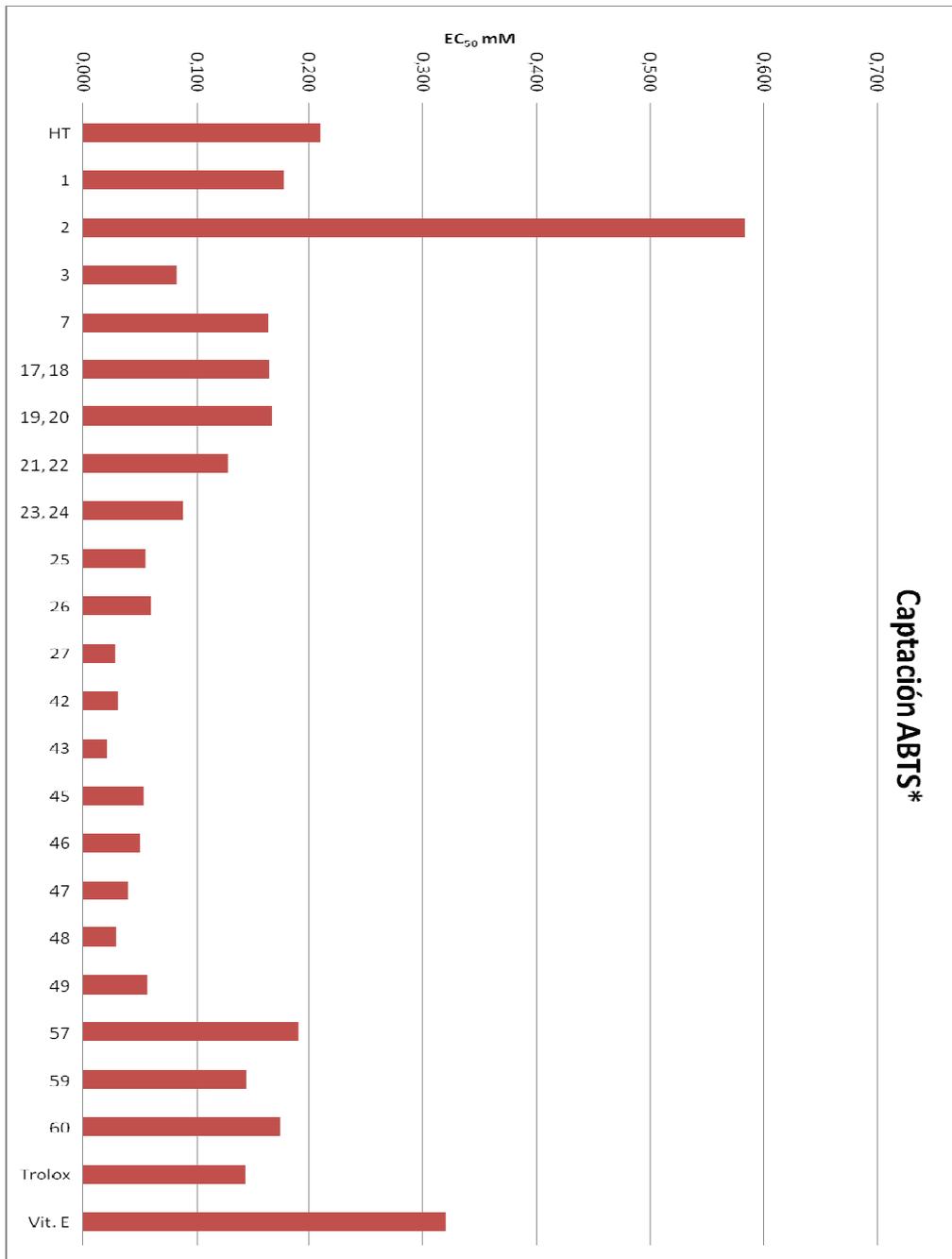
Compuesto	EC ₅₀ mM DPPH	TEAC DPPH	EC ₅₀ mM ABTS	TEAC ABTS
HT (64)	1.43	0.86	0.210	0.70
57	1.52	0.74	0.191	0.75
59	1.08	1.06	0.143	1.17
60	1.66	0.75	0.173	0.83

De las tres benzotiazepinas ensayadas, solamente **59** mostró valores mejores a los del HT, siendo los de **57** y **60** similares a los del hidroxitirosol, en el caso de los ensayos DPPH. En las pruebas de captación de radicales ABTS los tres derivados son mejores atrapadores de radicales que el HT, siendo **59** el mejor de los tres.

Todos los datos relativos a la captación de radicales DPPH se recopilan en la **Gráfica 5.5** y los referentes a los radicales ABTS en la **Gráfica 5.6** expresados ambos en función del EC₅₀ (mM).



Gráfica 5.5: Captación de radicales DPPH.



Gráfica 5.6: Captación de radicales ABTS.

Para ambos ensayos los mejores valores de EC₅₀ son los obtenidos para el selenonio **43**. En el ensayo de captación de radicales ABTS las diferencias entre los antioxidantes sintéticos y los naturales son mayores que en el caso del DPPH.

El HT **64** funciona mejor como captador de radicales libres DPPH y ABTS que la vitamina E, y la dopamina supera a ambos. El valor de EC₅₀ del diselenuro **42** en el caso del ensayo DPPH es aproximadamente la mitad del mostrado por el HT, con lo cual su potencial captador de radicales DPPH es el doble, lógico según su estructura con dos fragmentos catecol. Del mismo modo en el caso del selenonio **43** es el triple al poseer tres catecoles. Sin embargo, en el caso de los radicales ABTS los valores son siete y diez veces superiores para el diselenuro **42** y el selenonio **43** respectivamente, existiendo nuevamente un efecto sinérgico entre el grupo catecol y el átomo de selenio.

Las selenoureas muestran un potencial como captador de radicales DPPH que es aproximadamente el doble que el del HT **64**, siendo similares los valores de las distintas selenoureas entre sí. Sin embargo, en el caso de los radicales ABTS, la selenourea **27** es dos veces más activa que las selenoureas **25** y **26**, lo que podemos atribuir al grupo metoxi del anillo aromático contiguo al grupo selenoureido. Las tioureas **49** y **47** son peores agentes antirradicales que sus homólogos de selenio **25** y **26** respectivamente en los ensayos DPPH, aunque en el caso del ABTS la selenourea **25** presenta un valor muy similar al de la tiourea **49**, y la tiourea **47** muestra un valor mejor que el de su isómero **26**. Observando la secuencia de EC₅₀ ABTS de las tioureas **45-49**, **49 = 45 < 46 < 47 < 48**, teniendo en

cuenta los sustituyentes en las cadenas laterales de las tioureas, fenil = metil < butil < toлил < bencil, se aprecia que a mayor longitud de la cadena lateral de las tioureas mayor es la capacidad de captación de radicales ABTS. En el caso de las benzotiazepinas **57**, **59** y **60** también es el bencil derivado **59** el que muestra un mejor valor en el ensayo ABTS, aunque en este caso la estructura **60** con cadena lateral de fenilo supera en potencial antioxidante ABTS al butil derivado **57**.

5.2.1.3. Inhibición de la oxidación primaria del ácido linoleico en emulsión. Método del tiocianato férrico.

El ensayo de oxidación primaria está basado en la oxidación del ácido linoleico en emulsión, forzada por 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) dihidrocloruro granular (ABAP) y por calentamiento. Durante este proceso se forman radicales peróxido que oxidan el Fe^{2+} del FeCl_2 a Fe^{3+} , el cual forma un complejo de color rojo con el anión SCN^- del tiocianato amónico, el cual se mide espectrofotométricamente.⁴⁷⁸

Se empleó el método de Mitsuda y col.⁴⁷⁹ con algunas modificaciones. Los valores obtenidos se representaron en función del EC_{50} , es decir, la concentración de antioxidante a la cual la oxidación primaria descende en un 50%, calculado de la curva de regresión y expresado en unidades mM. También se calculó el porcentaje de inhibición para una concentración de antioxidante 1 mM.

⁴⁷⁸ Gülçin, I. *Life Sciences*, **2006**, 78, 803 – 811.

⁴⁷⁹ Mitsuda, H.; Yasumoto, K.; Iwami, K. *Eiyo to Shokuryo*, **1996**, 19, 210–214.

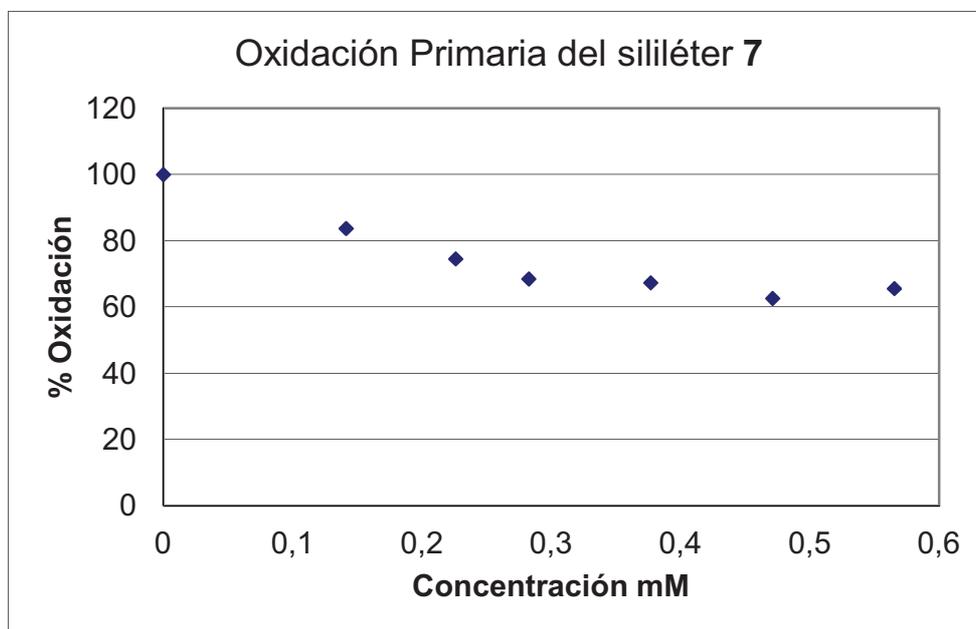
Productos intermedios en la síntesis de dopamina

Los valores del EC₅₀ y el porcentaje de inhibición a concentración 1 mM de los productos intermedios en la ruta sintética de dopamina **1** y **2**, la dopamina **3**, y el sililéter **7**, la vitamina E, el Trolox y el HT (**64**), para los ensayos de inhibición de la oxidación primaria se muestran en la **Tabla 5.11**.

Tabla 5.11: *Inhibición de la oxidación primaria de los productos intermedios en la síntesis de dopamina.*

Compuesto	EC₅₀ (mM)	% Reducción 1 mM
HT (64)	4.92	22.22
1	1.70	38.05
2	4.67	20.66
3	3.70	26.60
7	0.94	51.58
Vit. E	0.90	53.50
Trolox	1.09	47.62

Todos estos derivados presentan mejores valores de reducción de la oxidación primaria que el HT. Especialmente interesante es el caso del sililéter **7** (**Gráfica 5.7**), cuyos valores son similares a los de la vitamina E. Ambas moléculas poseen en su estructura un fragmento lipofílico que favorece la solubilidad de las mismas en matrices orgánicas.



Gráfica 5.7: *Inhibición de la oxidación primaria del sililéter de HT 7. El análisis de regresión proporciona el modelo de mejor ajuste que corresponde a: $y = a + \sqrt{x}$, con coeficientes de correlación superiores a 0.90*

Glicosil derivados de hidroxitirosol y dopamina

Las mezclas de los glucosil derivados **17**, **18** y **21**, **22**, y de los galactosil derivados **19**, **20** y **23**, **24** no mostraron capacidad de inhibición de la oxidación primaria por el método del ácido linoleico debido a la glicosilación del grupo catecol de estas moléculas sólo deja libre un hidroxilo fenólico

Selenoureas, diselenuro y selenio derivados de hidroxitirosol

Los resultados obtenidos para los ensayos de inhibición de la oxidación primaria de las selenoureas **25-27**, el diselenuro **42** y el selenio **43** se muestran en la **Tabla 5.12**.

Tabla 5.12: *Inhibición de la oxidación primaria de las selenoureas 25-27, el diselenuro 42 y el selenio 43.*

Compuesto	EC ₅₀ (mM)	% Reducción 1 mM
HT (64)	4.92	22.22
25	1.34	42.63
26	1.09	47.80
27	1.99	34.12
42	0.43	80.80
43	0.42	80.30

Nuevamente, al igual que ocurre con los ensayos de poder reductor y capacidad de captación de radicales libres DPPH y ABTS, los resultados obtenidos con los selenocompuestos fueron excelentes. Para el diselenuro **42** y el selenio **43** se obtuvieron valores de EC₅₀ diez veces mejores que los del hidroxitirosol, e incluso dos veces mejores a los de la vitamina E (**Tabla 5.11**). Con concentraciones 1 mM del diselenuro **42** y del selenio **43** se consigue inhibir en más del 80 % la oxidación primaria del ácido linoleico, superando ampliamente los valores de la vitamina E (53.50%).

Tioureas derivadas de la dopamina

Los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la oxidación primaria para las tioureas **45-49** aparecen recogidos en la **Tabla 5.13**.

Tabla 5.13: *Inhibición de la oxidación primaria de las tioureas 45-49.*

Compuesto	EC ₅₀ (mM)	% Reducción 1 mM
HT (64)	4.92	22.22
45	1.11	47.49
46	2.50	29.68
47	1.20	45.34
48	1.32	43.34
49	1.01	49.64

Todas las tioureas muestran valores de EC₅₀ mejores que el HT, y más del doble de reducción de la oxidación primaria para una concentración 1 mM, salvo el derivado **46**, que aunque mejora los valores del HT es inferior a sus homólogos.

Benzotiazepinas derivadas de la dopamina

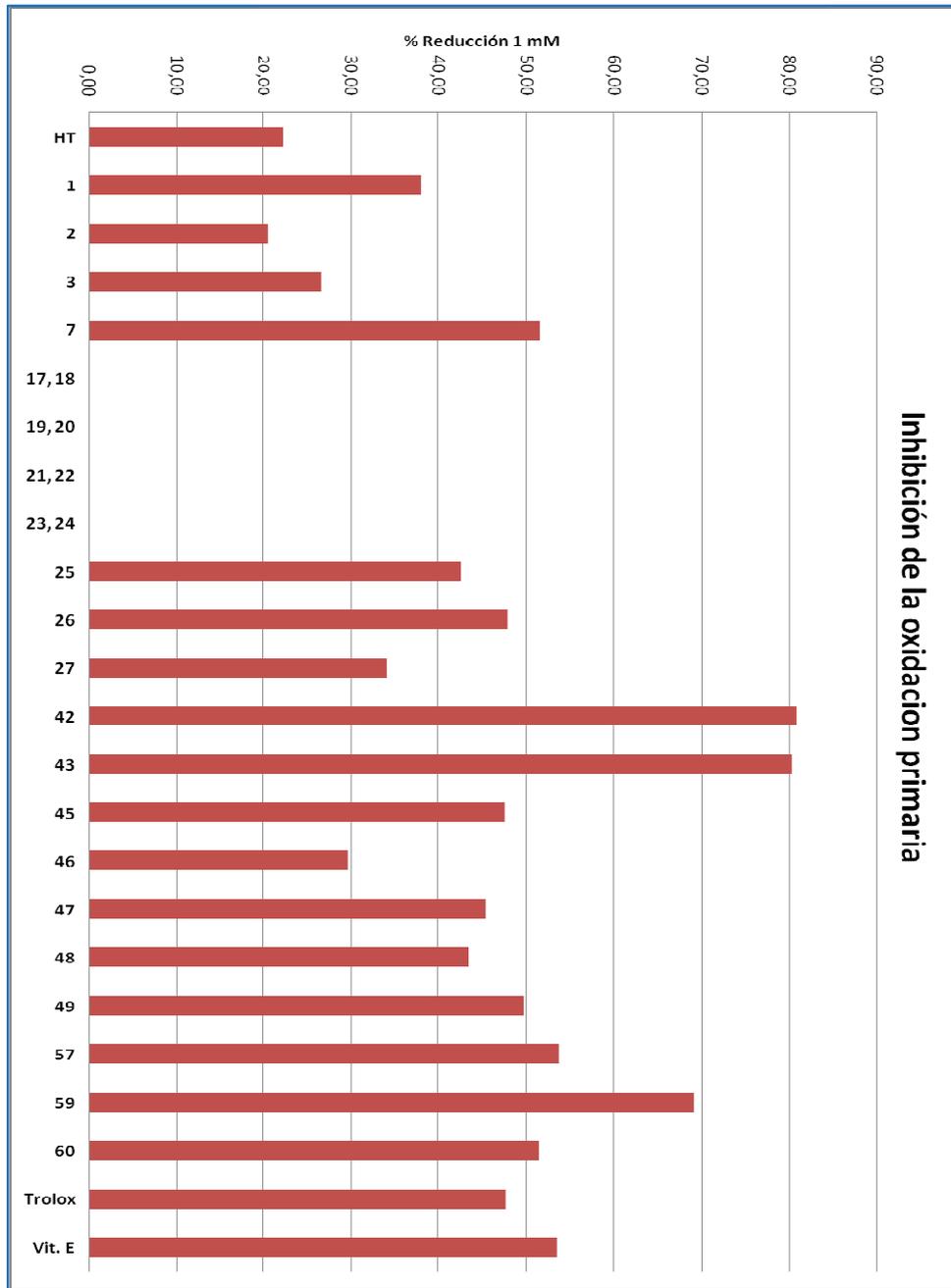
Los resultados obtenidos para los ensayos de captación inhibición de la oxidación primaria de las benzotiazepinas **57**, **59** y **60** se muestran en la **Tabla 5.14**.

Tabla 5.14: *Inhibición de la oxidación primaria de las benzotiazepinas 57, 59 y 60.*

Compuesto	EC ₅₀ (mM)	% Reducción 1 mM
HT (64)	4.92	22.22
57	0.861	53.76
59	0.493	69.04
60	0.941	51.47

Pese a haber sufrido una oxidación previa con DDQ, las benzotiazepinas **57**, **59** y **60** muestran valores no sólo superiores al HT, sino también a sus correspondientes tioureas de partida. La presencia del grupo acilo en el nitrógeno situado en la posición 3 del anillo de tiazepina proporciona una lipofilia mayor a los derivados **57**, **59** y **60** que a sus tioureas de partida, siendo un factor importante en los ensayos de oxidación primaria, como también pudo comprobarse con el sililéter **7** (**Tabla 5.11**). Los valores de **57** y **60** son del orden de los obtenidos para la vitamina E, mientras que el compuesto **59** lo supera ampliamente. La mayor actividad de este compuesto pudiera estar relacionada con la posibilidad de oxidación en la posición bencílica.

Todos los datos de inhibición de la oxidación primaria, expresados en función del porcentaje de reducción para concentración 1 mM se expresan en la **Gráfica 5.8**.



Gráfica 5.8: Inhibición de la oxidación primaria

Tras el diselenuro **42** y el selenonio **43**, la 1,3-benzotiazepina **59** es la que muestra mayor inhibición de la actividad primaria. Junto con el silil derivado **7** y la 1,3-benzotiazepina **57** inhiben en mayor medida que la vitamina E.

Dentro del grupo de las selenoureas **25-27** el mayor valor lo presenta el derivado **26** cuya cadena lateral *p*-tolil es la de mayor carácter +R. No hay diferencias significativas entre las selenoureas **25** y **26**, y sus tioureas análogas **49** y **47**, y salvo la tiourea **46**, las demás tioureas muestran valores similares. El porcentaje de reducción de la oxidación primaria del bromoderivado **1** es aproximadamente el doble que el del hidroxitirosol y también es superior al de la dopamina **3**, por lo que una reducción de la polaridad del hidroxitirosol aumenta la inhibición de la oxidación primaria, como se aprecia también en el sililéter **7**. Estructuras muy polares como los glicosil derivados **17-24** debido a su excesiva polaridad y a que no poseen libre el fragmento catecol no muestran inhibición. Las benzotiazepinas **57** y **60** tienen valores casi idénticos a la vitamina E, siendo **59** ligeramente superior. El grupo acilo confiere una mayor lipofilia y por tanto aumenta la inhibición. Sin embargo, el diselenuro **42** y el selenonio **43**, pese a su polaridad muestran valores muy superiores a la vitamina E.

5.2.1.4. Inhibición de la oxidación secundaria del ácido linoleico en emulsión. Método del ácido tiobarbitúrico (TBA).

Este método se basa en la medida de la cantidad de malondialdehído formado en sistemas de liperoxidación (inducida por el iniciador de

radicales libres soluble en agua ABAP y calentamiento prolongado), que reacciona con ácido tiobarbitúrico (TBA) formando un complejo coloreado. Además de con malondialdehído, el TBA reacciona con otras especies carbonílicas, es por ello que lo que se mide con este método es la concentración de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Se utilizó el procedimiento descrito por Moon y col.⁴⁸⁰ con algunas modificaciones. Los resultados obtenidos se expresaron en función del EC₅₀ en unidades mM, y el porcentaje de inhibición para una concentración de antioxidante 1 mM.

Productos intermedios en la síntesis de dopamina

Los valores del EC₅₀ y el porcentaje de inhibición a concentración 1 mM de los productos intermedios en la ruta sintética de dopamina **1** y **2**, la dopamina **3**, y el sililéter **7**, la vitamina E, el Trolox y el HT (**64**), para los ensayos de inhibición de la oxidación secundaria se muestran en la **Tabla 5.15**.

⁴⁸⁰ Moon, J.K.; Shinamoto, T. *J Agric Food Chem.* **2009**, *57*, 1655–1666.

Tabla 5.15: *Inhibición de la oxidación secundaria de los productos intermedios en la síntesis de dopamina.*

Compuesto	EC ₅₀ (mM)	% Reducción 1 mM
HT (64)	0.94	51.99
1	0.30	84.65
2	1.12	47.28
3	0.27	98.12
7	0.77	58.01
3,4-DHFG (190)	0.20	109.21
Vitamina E	0.96	52.28
Trolox	1.32	36.54

En este caso los valores de EC₅₀ y el porcentaje de reducción para concentraciones 1 mM, a excepción del azido derivado **2**, todos superan al HT, siendo la dopamina el producto que produce una mayor inhibición. También es muy significativo el elevado valor obtenido para el bromoderivado **1**, del 84.65%. El 3,4-DHFG (**190**) muestra un porcentaje superior a 100 debido a que una concentración del mismo inferior a 1 mM produce el 100% de inhibición.

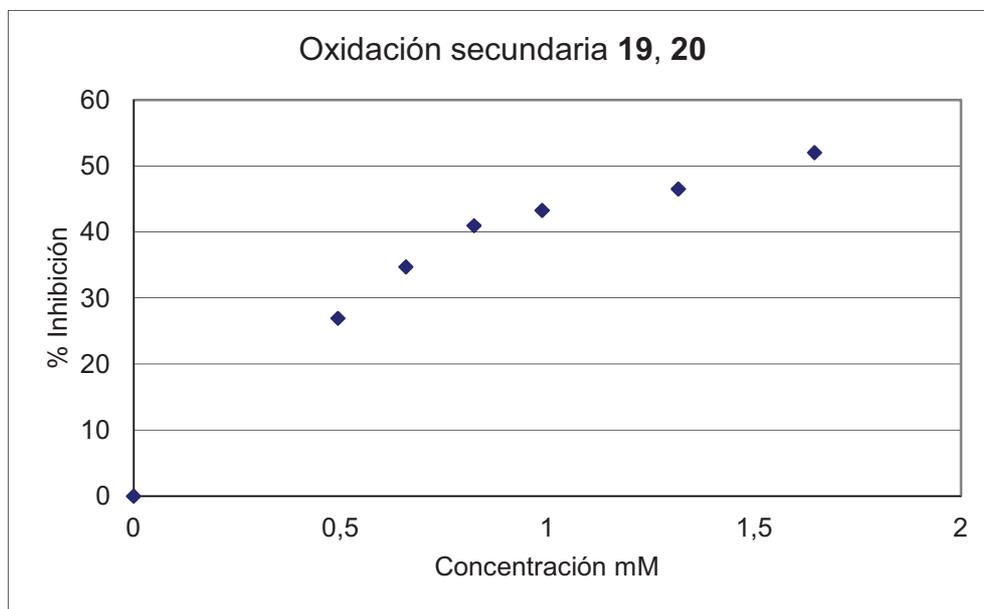
Glicosil derivados de hidroxitirosol y dopamina

Los datos obtenidos de los ensayos de inhibición de la oxidación secundaria de los glicosil derivados **17-24** aparecen recogidos en la **Tabla 5.16**.

Tabla 5.16: *Inhibición de la oxidación secundaria de los glicosil derivados 17-24.*

Compuestos	EC ₅₀ (mM)	% Reducción 1 mM
HT (64)	0.94	51.99
17, 18	1.41	41.92
19, 20	1.44	41.78
21, 22	3.73	26.37
23, 24	1.89	36.65

Aunque los glicosil derivados **17-24** sólo tienen libre uno de los –OH del fragmento catecol y no mostraron inhibición de la oxidación primaria por el método del ácido linoleico, sí que presentan un importante grado de inhibición de la oxidación secundaria, siendo la mezcla de glucosil derivados **17, 18** y galactosil derivados **19, 20** (**Gráfica 5.9**), los que reducen la oxidación en mayor grado, casi en un 42%.



Gráfica 5.9. *Inhibición de la oxidación secundaria de la mezcla de galactosil derivados 19, 20. El análisis de regresión proporciona el modelo de mejor ajuste, que corresponde a: $y = a + b\sqrt{x}$ con coeficientes de correlación superiores a 0.90*

Selenoureas, diselenuro y selenonio derivados de hidroxitirosol

Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la oxidación secundaria de las selenoureas **25-27**, el diselenuro **42** y el selenonio **43** se muestran en la **Tabla 5.17**.

Tabla 5.17: *Inhibición de la oxidación secundaria de las selenoureas 25-27, el diselenuro 42 y el selenonio 43.*

Compuesto	EC ₅₀ (mM)	% Reducción 1 mM
HT (64)	0.94	51.99
25	0.40	86.34
26	0.38	82.56
27	0.22	103.32
42	0.26	107.63
43	0.17	119.00

Nuevamente los selenoderivados ensayados son los compuestos que mejores valores ofrecen. Valores superiores al 100% para la selenourea **27**, el selenuro **42** y el selenonio **43** indican que con concentraciones inferiores al 1 mM se conseguiría una inhibición de la oxidación secundaria total. Estos valores duplican por tanto a los obtenidos con el hidroxitirosol.

Tioureas derivadas de la dopamina

Los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la oxidación secundaria para las tioureas **45-49** aparecen recogidos en la **Tabla 5.18**.

Tabla 5.18: *Inhibición de la oxidación secundaria de las tioureas 45-49.*

Compuesto	EC ₅₀ (mM)	% Reducción 1 mM
HT (64)	0.94	51.99
45	0.50	70.70
46	0.55	69.66
47	0.30	99.06
48	0.36	81.53
49	0.32	89.88

Las tioureas **45-49** también muestran un elevado poder inhibidor de la oxidación secundaria, en todos casos mayor al HT, siendo algunas incluso superiores a las selenoureas **25-27**, como la tiourea **47**, con más del 99% de inhibición para una concentración 1 mM.

Benzotiazepinas derivadas de la dopamina

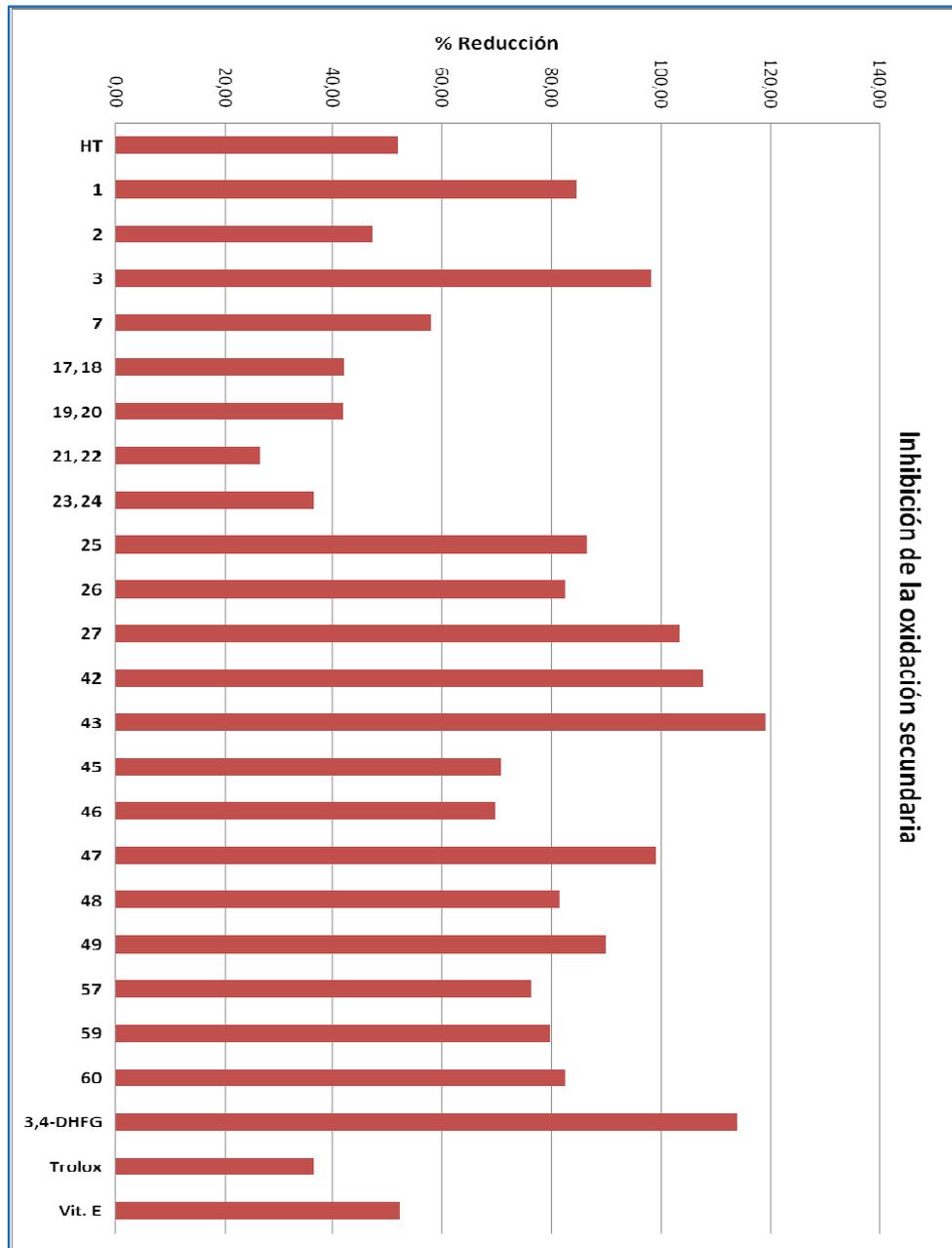
Los resultados obtenidos para los ensayos de inhibición de la oxidación secundaria de las benzotiazepinas **57**, **59** y **60** se muestran en la **Tabla 5.19**.

Tabla 5.19: *Inhibición de la oxidación secundaria de las benzotiazepinas 57, 59 y 60.*

Compuesto	EC₅₀ (mM)	% Reducción 1 mM
HT (64)	0.94	51.99
57	0.45	76.28
59	0.42	79.69
60	0.34	82.6

Las benzotiazepinas ensayadas mostraron importantes valores de inhibición de la oxidación secundaria, próximos al 80%, mejorando al HT, pese a haber sido previamente oxidados con DDQ, siendo similares a los de las tioureas de las cuales se obtuvieron.

Todos los datos de inhibición de la oxidación secundaria, expresados en función del porcentaje de reducción para una concentración 1 mM se expresan en la **Gráfica 5.10**.



Gráfica 5.10: Inhibición de la oxidación secundaria

En este caso prácticamente todos los derivados sintéticos muestran mayor inhibición de la actividad secundaria que la vitamina E, aunque sólo el selenonio **43** es mejor que el 3,4-DHFG **190**. El elevado potencial antioxidante del 3,4-DHFG siendo un compuesto muy polar se ajusta a la paradoja polar, que apunta que los polifenoles más polares son más efectivos en medios apolares.⁴⁸¹ Mientras que el HT se comporta de manera similar a la vitamina E, evitando la oxidación secundaria, compuestos más polares como el glicol **190** o la dopamina, superan ampliamente a la vitamina E, e incluso los glicosil derivados **17-24**, que no inhibieron la oxidación primaria, presentan un importante grado de inhibición secundaria.

En cuanto a las selenoureas **25-27**, las tioureas **45-49**, el selenuro **42** y el selenonio **43**, sus valores de inhibición de la oxidación secundaria son muy elevados, superando tanto al HT como a la vitamina E, dato muy importante de cara a los resultados esperables en los ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos.

5.2.1.5. Inhibición de la actividad tirosinasa de hongos *in vitro*

El objetivo de esta investigación es el estudio de las características inhibitoras sobre la tirosinasa de hongos (*Agaricus bisporus*) de los antioxidantes sintéticos (el diselenuro **42**, el selenonio **43**, las mezclas de glicosil derivados **17**, **18** y **21**, **22**, la benzotiazepina **57**) y el natural 3,4-DHFG (**190**), comparando las mismas con el hidroxitirosol de donde

⁴⁸¹ Frankel, E. N.; Huang, S. W.; Kanner, J.; German, J. B. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1054-1059.

proceden. Esta enzima cataliza las primeras dos reacciones de la síntesis de la melanina, la hidroxilación de la L-tirosina para dar 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (actividad monofenolasa o monofenoloxidasas) y la oxidación de la L-DOPA a dopaquinona (actividad difenolasa). Esta quinona es altamente reactiva y puede polimerizar espontáneamente a melanina.⁴⁰⁹

Los efectos de los compuestos ensayados sobre las actividades de monofenolasa, utilizando la L-tirosina como sustrato y de difenolasa sobre L-DOPA se siguieron mediante la inhibición de la formación del dopacromo realizando medidas espectrofotométricas a una longitud de onda de 490 nm en todos los casos.

Actividad monofenolasa

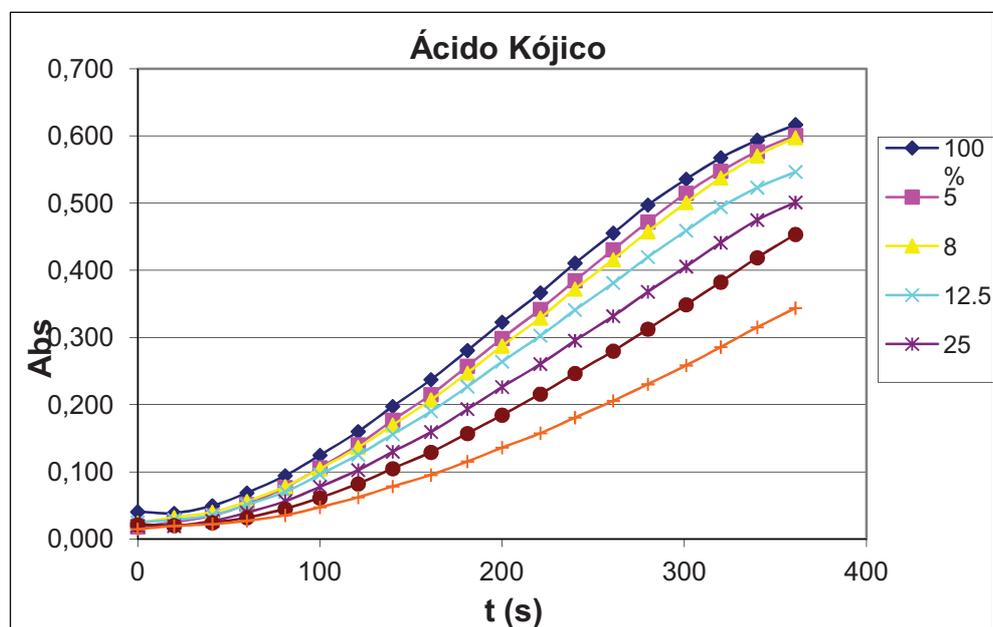
Cuando el sustrato de la enzima tirosinasa es la tirosina, existe un periodo de latencia o “lag” o de retraso, característico de la actividad monofenolasa, tiempo necesario para alcanzar una concentración determinada de *o*-difenol. Este periodo se acorta o se elimina en presencia de los compuestos ensayados al tratarse de *o*-difenoles, a partir del cual la reacción transcurre en su velocidad máxima.

El ácido kójico es un producto del metabolismo de hongos *Aspergillus*, fácilmente asequible y económico, utilizado como antioxidante alimentario y despigmentante en cosméticos por su conocida actividad como

inhibidor enzimático, de ahí su utilización como patrón en ensayos con enzimas al representar un modelo de buen inhibidor.⁴⁸²

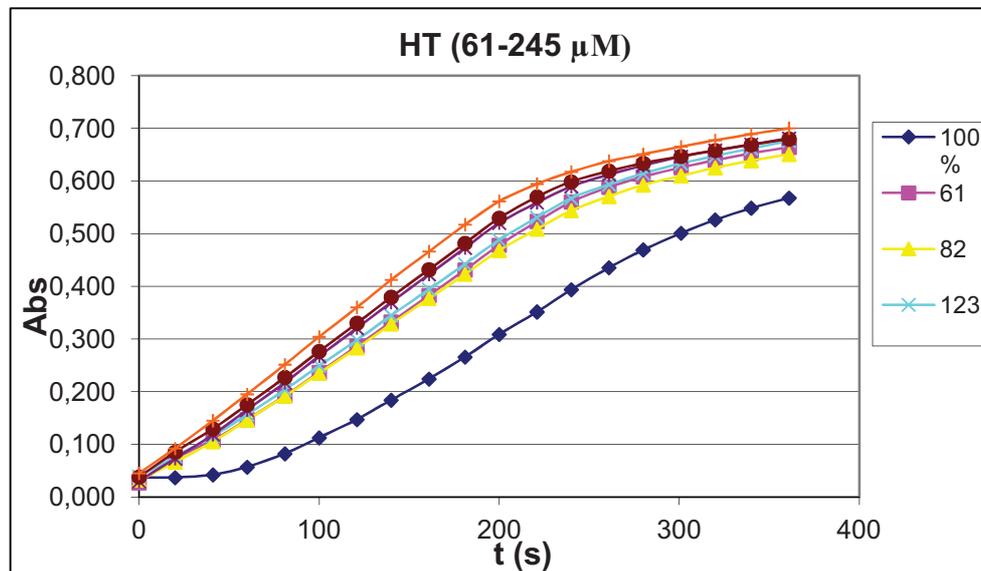
Se ensayó la inhibición enzimática de la tirosinasa frente a tirosina 1 mM utilizando ácido kójico (**176**) en distintas concentraciones (5-100 μ M), 25 unidades de enzima (50 μ L de disolución acuosa de enzima 500 U/mL) y un control sin inhibidor, en un periodo de 6 minutos (medidas cada 20 segundos), obteniéndose una serie de curvas en las que se aprecia un largo periodo “lag”, tras el cual se produce en las gráficas un aumento de absorbancia, cuya disminución de pendiente es función de la concentración de ácido kójico empleada. (**Gráfica 5.11**)

⁴⁸² Burdock, G. A.; Madhusudan, G. S.; Joana, G. S.; Carabin, I. G. *Reg. Tox. Pharm.*, **2001**, 33, 80-101.



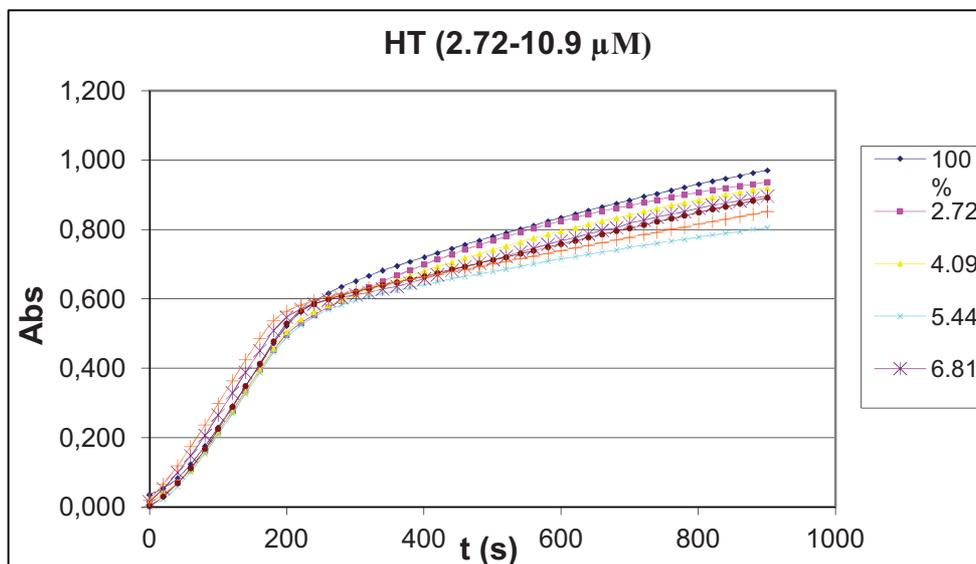
Gráfica 5.11. Inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa con ácido kójico (5-100 μM), utilizando como sustrato tirosina 1 mM y 25 unidades de enzima

Un ensayo análogo se realizó con HT en concentraciones comprendidas entre 61 y 245 μM . (Gráfica 5.12)

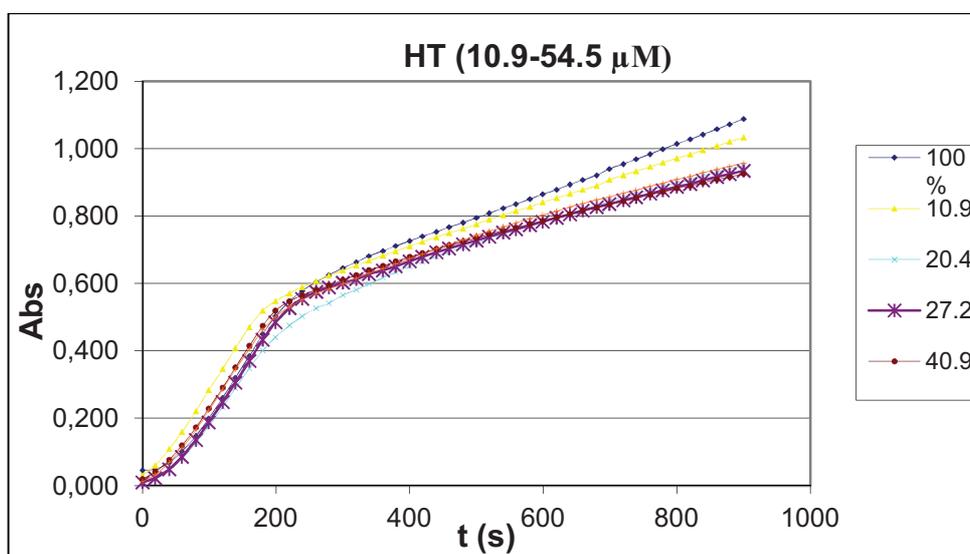


Gráfica 5.12. Inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa con HT (64) (61-245 μM).

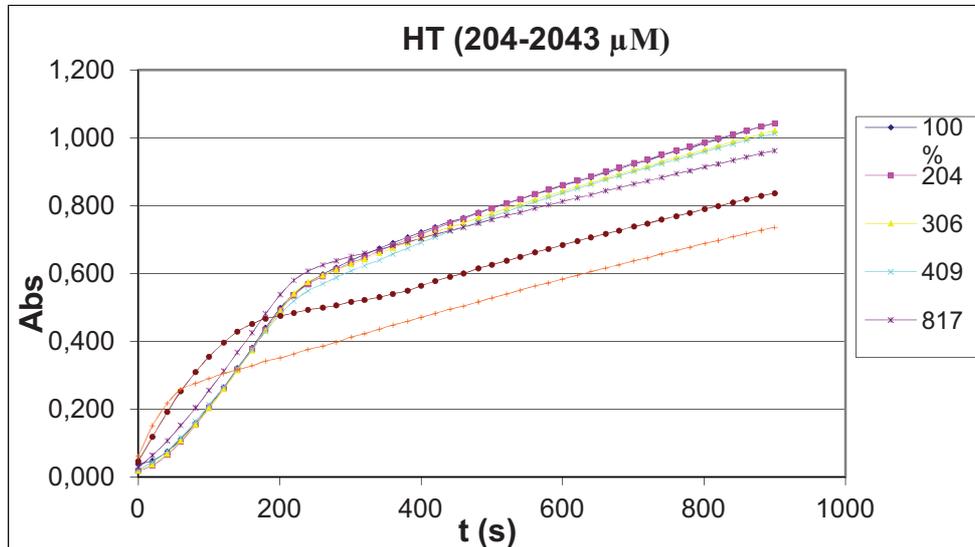
La cinética de la reacción sigue un patrón completamente diferente al del ácido kójico, puesto que en lugar de reducirse la pendiente de las curvas a mayor concentración del inhibidor, con el aumento de la concentración de HT aumenta la pendiente. De la gráfica también se deduce que a tiempos de reacción superiores a 6 minutos existirá un punto de corte entre el control y las diferentes concentraciones. Cuando se ensayaron otras concentraciones (2.72-10.9 μM , 10.9-54.5 μM y 204-2043 μM) y se alargó el tiempo de incubación hasta los 15 minutos se obtuvieron las siguientes gráficas: (**Gráfica 5.13**, **Gráfica 5.14**, **Gráfica 5.15**)



Gráfica 5.13. Inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa con HT (64) 2.72-10.9 μM utilizando L-tirosina 1 mM como sustrato y 25 unidades de tirosinasa.



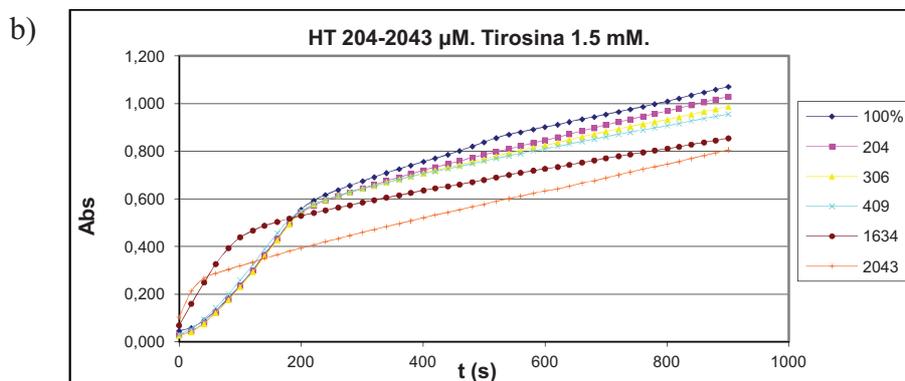
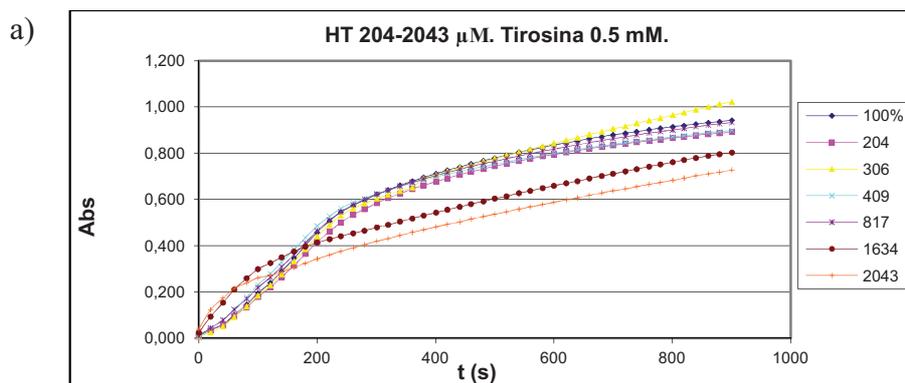
Gráfica 5.14. Inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa con HT (64) (9.5-54.5 μM) utilizando L-tirosina 1 mM como sustrato y 25 unidades de tirosinasa.

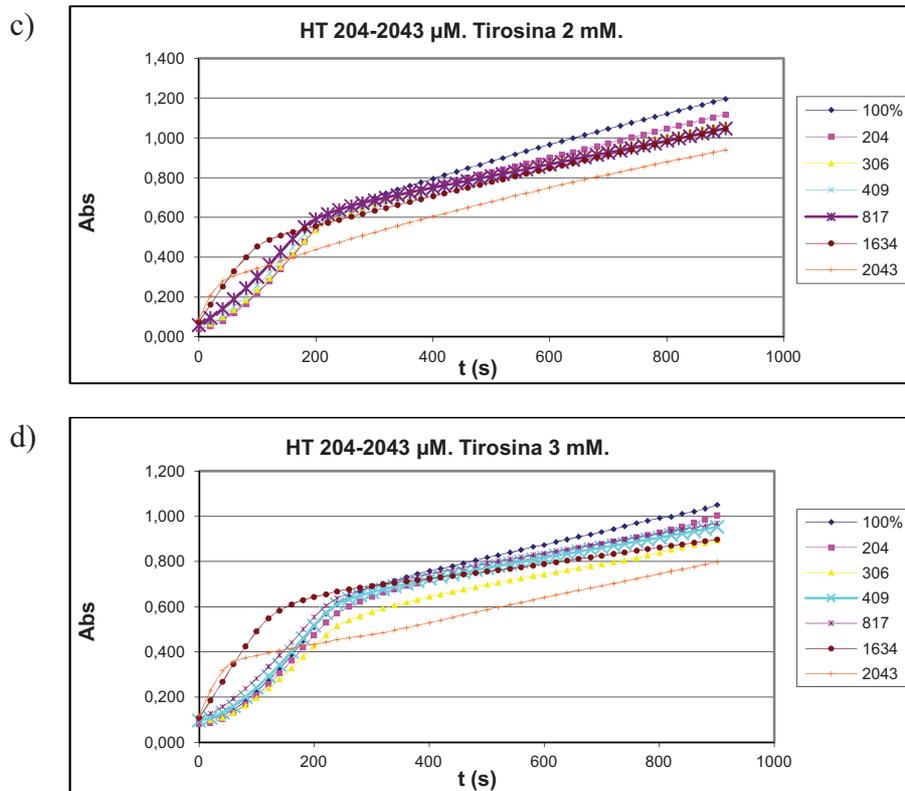


Gráfica 5.15. Inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa con HT (64) (204-2043 ppm) utilizando L-tirosina 1 mM como sustrato y 25 unidades de tirosinasa.

Cuanto más diluido está el HT menor es la diferencia del periodo de latencia con respecto al control. A concentraciones de HT diluidas y muy diluidas sí se observa un efecto de inhibición a tiempo final, aunque no puede establecerse una buena relación entre la concentración y el efecto inhibitor, produciéndose un punto de corte entre el control y las diferentes concentraciones. Cuando se usaron concentraciones muy elevadas de HT (64), el periodo “lag“ desaparece completamente, observándose una considerable inhibición a tiempo final a concentraciones de HT 1634 y 2043 μM .

En experimentos análogos se estudió la influencia de la concentración de sustrato en la inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa, utilizando las concentraciones de HT comprendidas entre 204-2043 μM y concentraciones de L-tirosina 0.5, 1.5, 2.0 y 3.0 mM. (**Gráfica 5.16 a, b, c y d**)

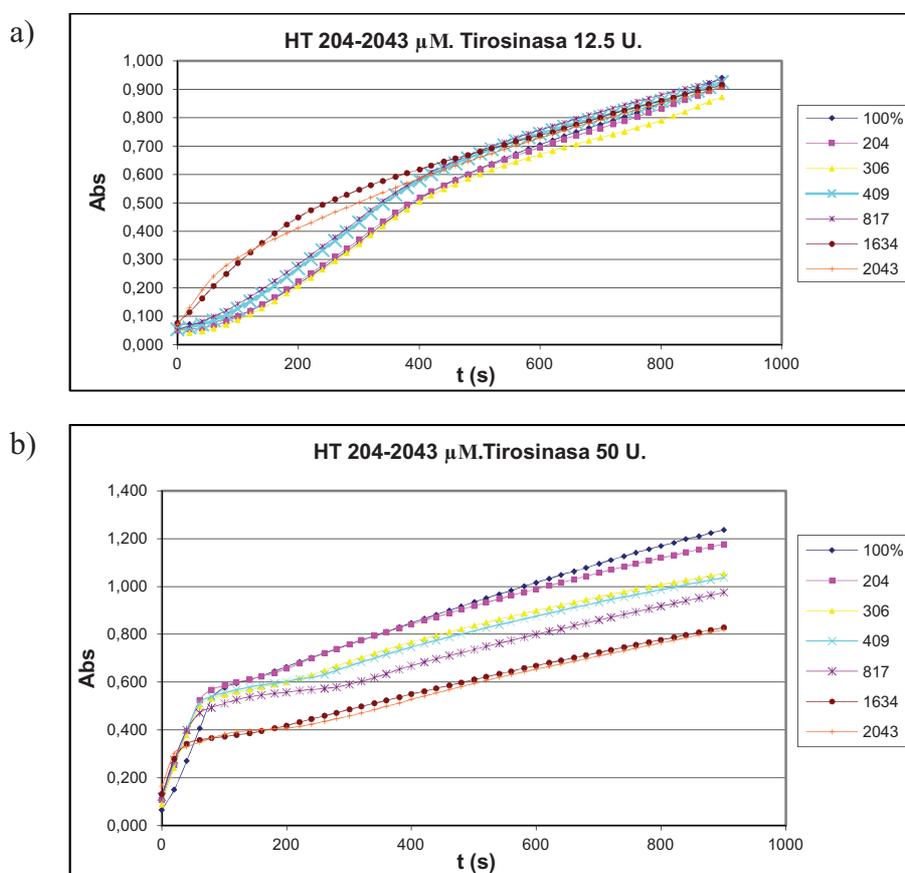




Gráfica 5.16. Inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa con HT (64) 204-2043 μM utilizando L-tirosina 0.5 mM (a), 1.5 mM (b), 2 mM (c) y 3 mM (d) como sustrato y 25 unidades de enzima

En todos los casos el HT a elevada concentración es buen inhibidor a tiempo final, independientemente de la concentración de L-tirosina empleada, viéndose cómo el efecto inhibitor comienza después del periodo de latencia. También se observa que a partir de una concentración de sustrato 1.5 mM se produce inhibición para todas las concentraciones ensayadas.

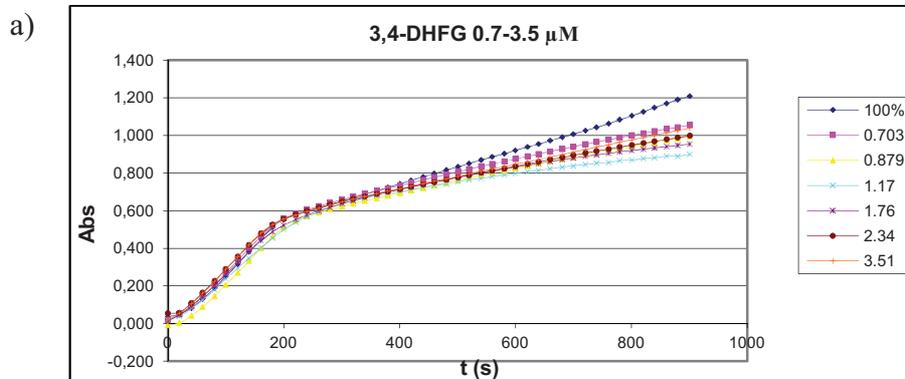
También se evaluó el efecto inhibitor del HT (64) muy concentrado sobre la actividad monofenolasa de la tirosinasa modificando la cantidad de enzima empleada, utilizando como sustrato L-tirosina 1 mM y la mitad de concentración de enzima tirosinasa (12.5 unidades, 25 μ L de disolución acuosa de enzima 500 U/mL), y el doble (50 unidades, 100 μ L de disolución acuosa de enzima 500 U/mL) (Gráfica 5.17 a y b)

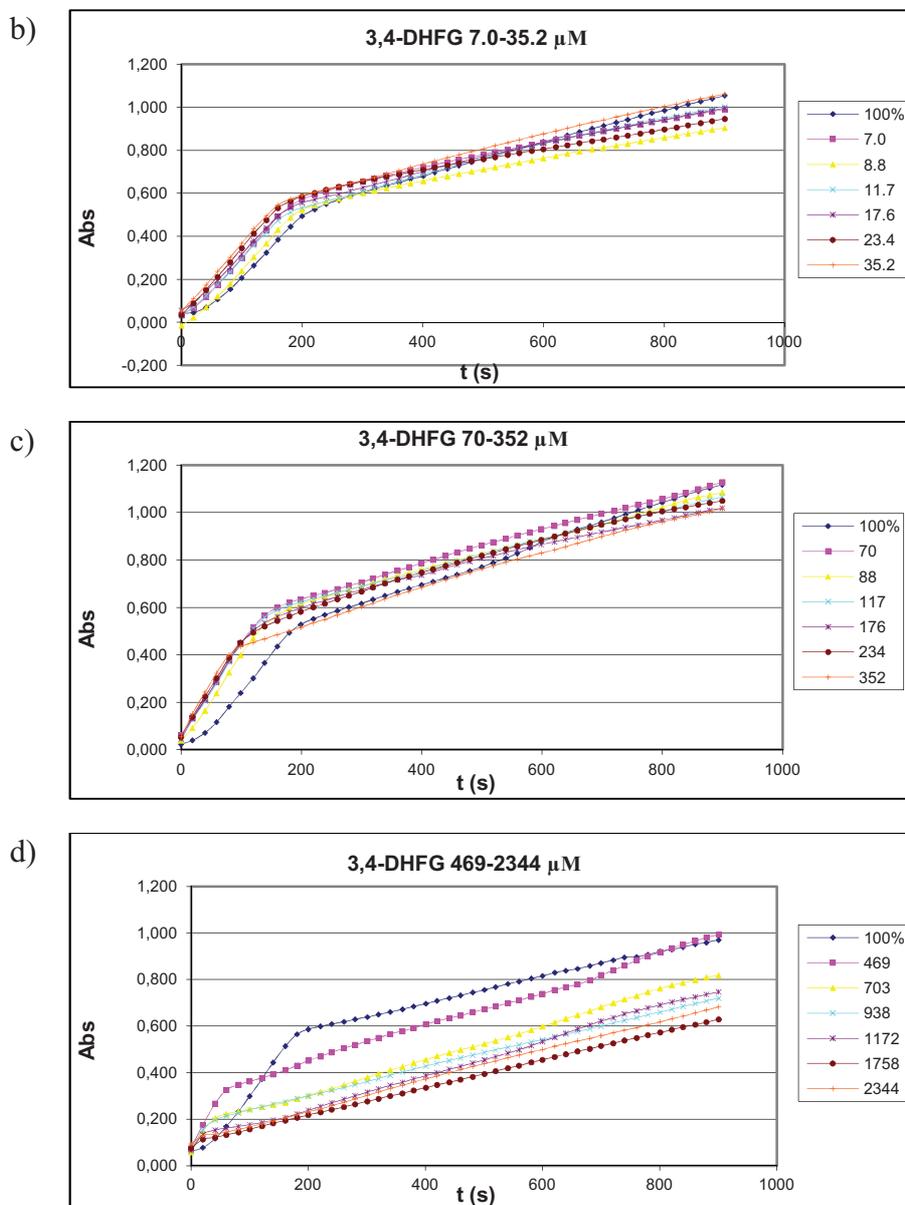


Gráfica 5.17. Inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa con HT (64) utilizando L-tirosina 1 mM como sustrato y 12.5 (a) y 50 (b) unidades de tirosinasa.

Al reducir a la mitad la concentración de enzima el periodo “lag” aumenta de 100 (Gráfica 5.15) a 400 segundos, debido a que la mitad de enzima tiene que oxidar la misma cantidad de sustrato. Por el contrario se reduce a la mitad cuando la concentración de enzima es el doble. Puede por tanto correlacionarse la cantidad de enzima empleada con la duración del periodo de latencia. Además, al transcurrir más rápida la reacción con 50 unidades de enzima el efecto inhibitor a tiempo final es más acusado para todas las concentraciones.

Se amplió el estudio al 3,4-DHFG (190) utilizando como sustrato L-tirosina 1 mM, y 25 unidades de tirosinasa. Los datos correspondientes a disoluciones de 3,4,-DHFG comprendidas entre 0.7 y 2344 μM aparecen recogidos en la siguientes gráficas: (Gráfica 5.18 a, b, c y d).





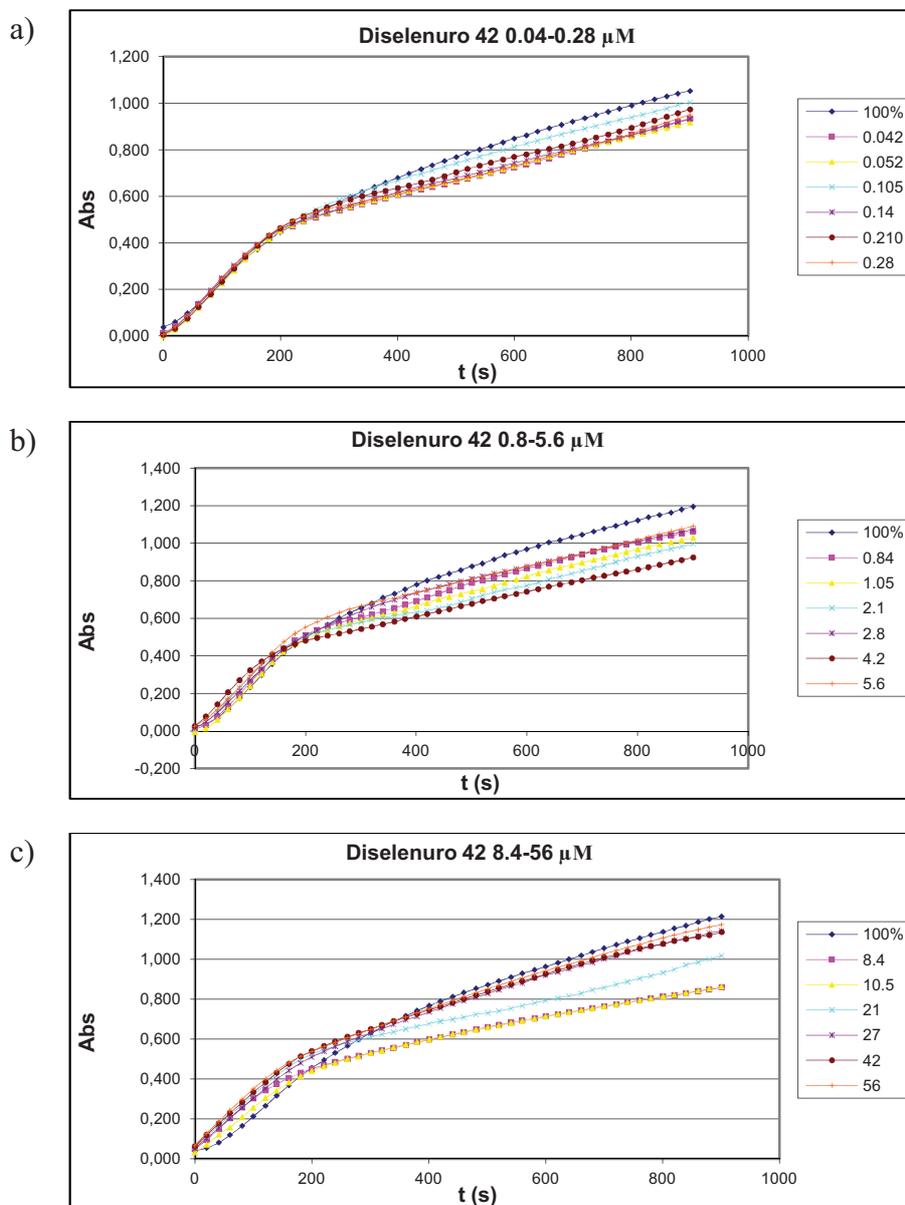
Gráfica 5.18. Inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa con 3,4-DHFG (**190**) 0.7-3.5 μM (a), 7.0-35.2 μM (b), 70-352 μM (c) y 469-2344 μM (d) utilizando L-tirosina 1 mM como sustrato y 25 unidades de tirosinasa.

Los resultados obtenidos son muy parecidos a los del HT (**64**), observándose reducciones en este caso el periodo “lag” a concentraciones más bajas de 3,4-DHFG. También se observa inhibición a tiempo final a partir de concentraciones de 3,4-DHFG de 469 μM , más bajas que en el caso del HT. Al igual que ocurría con el HT, para concentraciones muy bajas se produce inhibición a tiempo final.

De los datos de la **Gráfica 5.18 c)** se deduce que con el 3,4-DHFG en concentraciones comprendidas entre 70 y 352 μM el periodo “lag” se acorta para las diluciones más altas, y pierde en todos los casos su tendencia sinusoidal para convertirse en rectas cuya pendiente no es función directa de la concentración.

Para el 3,4-DHFG en concentraciones muy elevadas puede apreciarse una disminución del periodo de latencia relacionada con la cantidad de 3,4-DHFG glicol empleada. Este efecto es más notable que en el caso del HT. Además se puede ver una marcada inhibición a tiempo final dependiente de la concentración en la mayoría de los casos. Las muestras diluidas y muy diluidas tienden a aproximarse al control, aunque a tiempo final siguen mostrando efecto inhibitorio.

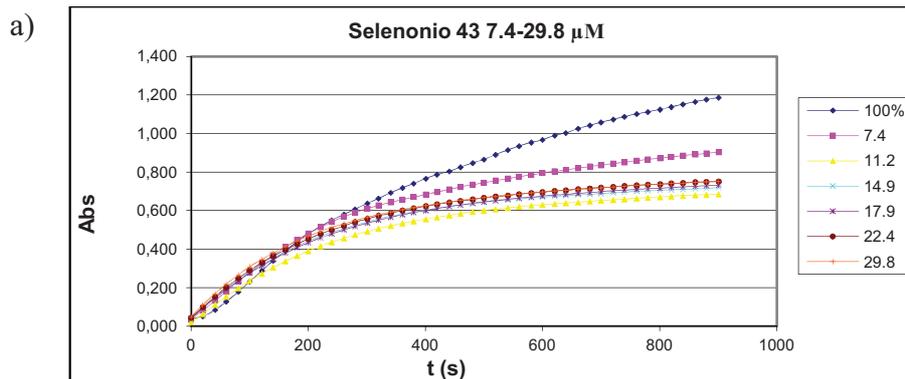
Los datos obtenidos en el caso del diselenuro **42**, para muestras de concentraciones comprendidas entre 8.4 y 56 μM , con una concentración de sustrato 1 mM y 25 unidades de tirosinasa se expresan en la **Gráfica 5.19 a, b y c**.

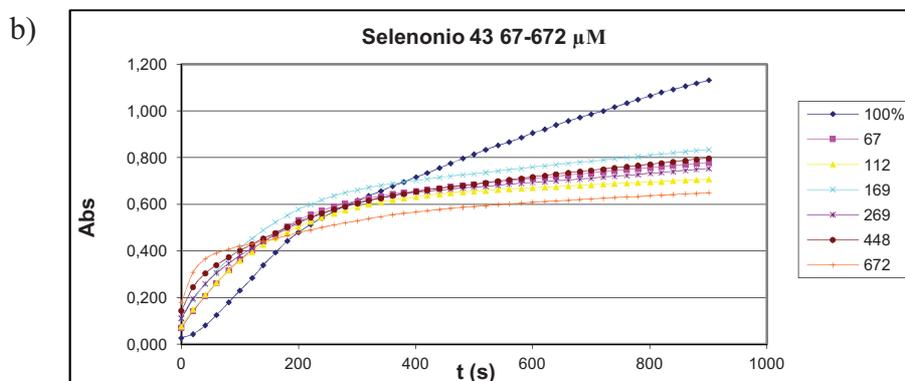


Gráfica 5.19. Inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa con el diselenuro 42 en concentraciones 0.04-0.28 μM (a), 0.8-5.6 μM (b) y 8.4-56 μM (c), utilizando como sustrato L-tirosina 1 mM y 25 unidades de tirosinasa.

En la **Gráfica 5.19 c)** puede observarse cómo la inhibición a tiempo final es mayor para las concentraciones más bajas de diselenuro **42**. A estas concentraciones bajas de diselenuro **42**, incluso a niveles nanomolares, se produce cierta inhibición a tiempo final. Los periodos de latencia tienden a igualarse con el del control para las muestras más diluidas.

Para el selenio **43** se ensayaron muestras de concentración comprendida entre 7.4 y 672 μM utilizando como sustrato L-tirosina 1 mM y 25 unidades de tirosinasa (**Gráfica 5.20 a y b**).

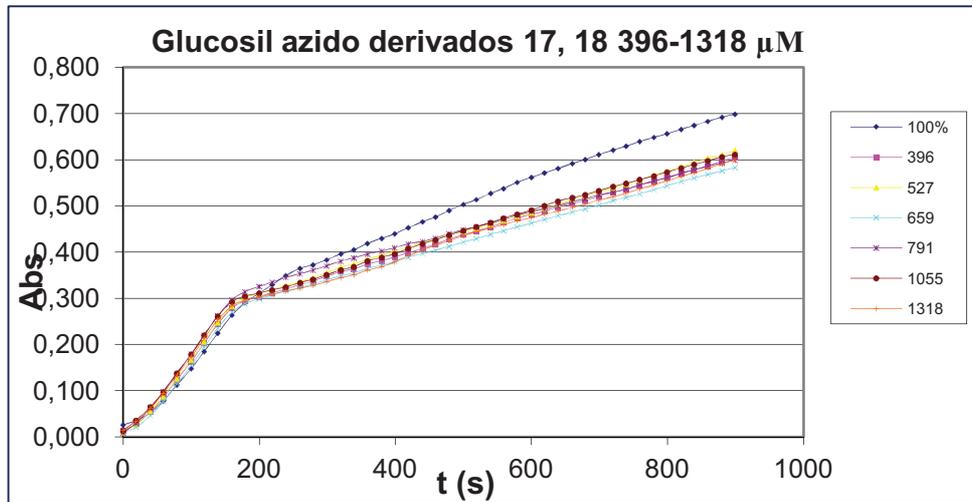




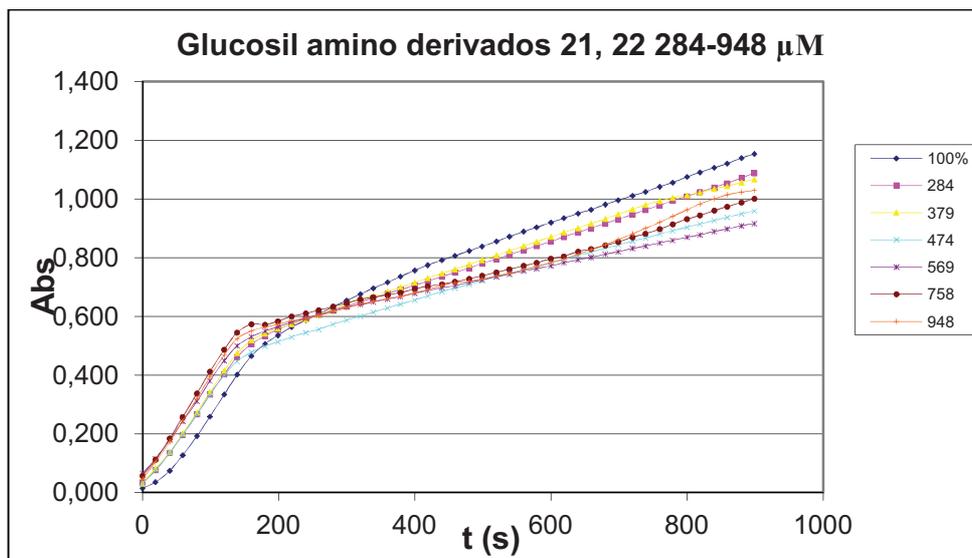
Gráfica 5.20. Inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa con el selenio **43** en concentraciones 7.4-29.8 μM (a) y 67-672 μM (b) usando como sustrato L-tirosina 1 mM y 25 unidades de tirosinasa.

El selenio **43** es un buen inhibidor de la tirosinasa a tiempo final, independientemente de la concentración empleada, mostrando a bajas concentraciones un comportamiento similar al HT y 3,4-DHFG, y otro diferente a concentraciones elevadas, en el sentido de que el cambio comienza a diluciones mayores de 67 μM , concentración mucho menor que en el caso del HT (**64**) y del 3,4-DHFG (**190**). En cuanto al periodo de latencia las muestras muy concentradas lo disminuyen, aumentando la velocidad máxima en ese periodo, mientras que las más diluidas se asemejan a las del control.

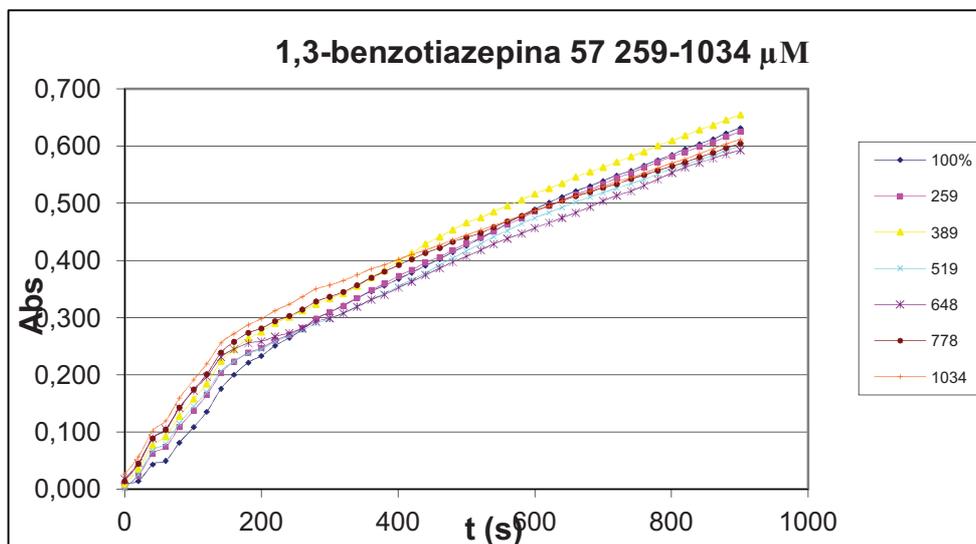
Se realizaron también ensayos de inhibición de la tirosinasa de hongos con muestras muy concentradas de las mezclas de glucosil derivados **17**, **18** (396-1398 μM) (**Gráfica 5.21**), de las glicosil dopaminas **21**, **22** (284-948 μM) (**Gráfica 5.22**) y de la 1,3-benzotiazepina **57** (**Gráfica 5.23**), usando como sustrato tirosina 1 mM y 25 unidades de tirosinasa.



Gráfica 5.21. Inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa con la mezcla de glucosil derivados **17, 18** a concentración 396-1318 µM usando como sustrato L-tirosina 1 mM y 25 unidades de tirosinasa.



Gráfica 5.22. Inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa con la mezcla de glucosil derivados **21, 22** 284-948 µM usando como sustrato L-tirosina 1 mM y 25 unidades de tirosinasa.



Gráfica 5.23. Inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa con la 1,3-benzotiazepina 57 259-1034 μM usando como sustrato L-tirosina 1 mM y 25 unidades de tirosinasa.

En el caso de los glicosil derivados **17**, **18** y **21**, **22** se observa una ligera inhibición a tiempo final sin que ésta siga una clara tendencia dependiente directamente de la concentración. Los derivados **17**, **18** inhiben en un grado similar para cualquier dilución empleada, siendo el comportamiento diferente del HT (**64**) de donde procede. La benzotiazepina **57** inhibe ligeramente en algunas concentraciones y prácticamente no inhibe para las altas concentraciones ensayadas.

A partir de los resultados de las gráficas podría establecerse el grado de inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa, utilizando las absorbancias a tiempo final del control ($A_{100\%}$) y de una muestra (A) en presencia de inhibidor, estableciendo como porcentaje de inhibición ($\%_{\text{inh}}$):

$$\%_{\text{inh}} = (A_{100\%} - A)/A_{100\%}$$

Los resultados obtenidos para los porcentajes de inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa a tiempo final (900 segundos) para el HT (**64**), 3,4-DHFG (**190**), el diselenuro **42**, el selenio **43**, los glucosil derivados **17**, **18** y **19**, **20**, y la 1,3-benzotiazepina **57**, para las concentraciones de inhibidor indicadas en cada caso, una concentración de L-tirosina 1 mM, 25 unidades de tirosinasa aparecen recogidas en la **Tabla 5.20**.

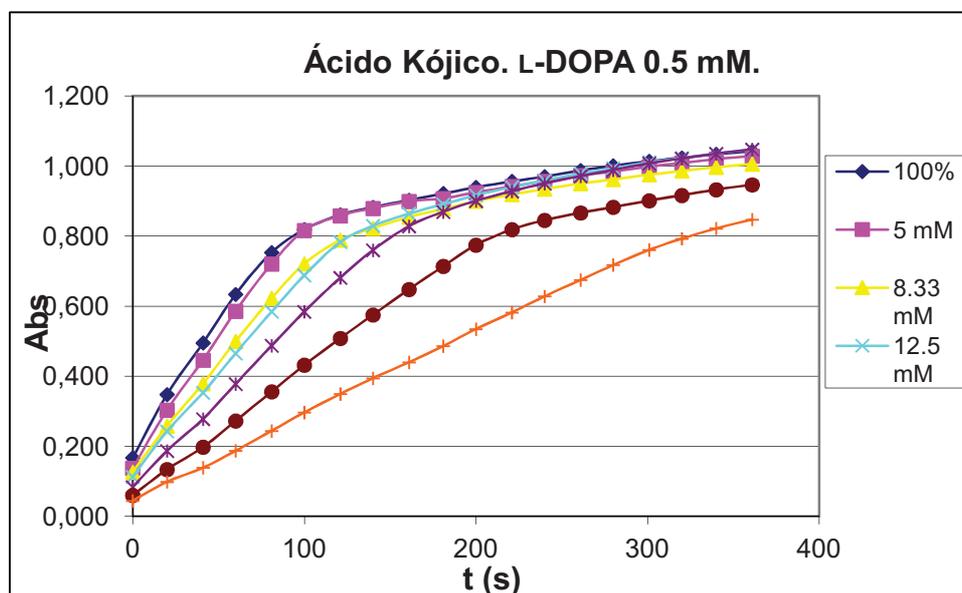
Tabla 5.20: Porcentajes de inhibición de la actividad monofenolasa de la tirosinasa.

Inhibidor	[Inhibidor]	Abs 100%	Abs	% Inh
HT (64)	2043 µM	1,043	0,736	29,4
HT (64)	1634 µM	1,043	0,837	19,8
HT (64)	817 µM	1,043	0,962	7,8
HT (64)	204 µM	1,043	1,043	0,0
HT (64)	54,5 µM	1,088	0,958	11,9
HT (64)	10,9 µM	1,088	1,033	5,1
3,4-DHFG (190)	2344 µM	0,97	0,683	29,6
3,4-DHFG (190)	1172 µM	0,97	0,747	23,0
3,4-DHFG (190)	703 µM	0,97	0,818	15,7
3,4-DHFG (190)	352 µM	1,118	1,017	9,0
3,4-DHFG (190)	70 µM	1,118	1,128	-0,9
3,4-DHFG (190)	35 µM	1,055	1,062	-0,7
3,4-DHFG (190)	8,8 µM	1,055	0,905	14,2
3,4-DHFG (190)	1,17 µM	1,209	0,899	25,6
42	56 µM	1,215	1,175	3,3
42	10.5 µM	1,215	0,864	28,9
42	4,2 µM	1,196	0,925	22,7
42	0,2 µM	1,053	0,974	7,5
42	0,05 µM	1,053	0,918	12,8
43	672 µM	1,132	0,65	42,6
43	169 µM	1,132	0,835	26,2
43	29,8 µM	1,186	0,751	36,7
43	11.2 µM	1,186	0,685	42,2
43	7,4 µM	1,186	0,904	23,8
17, 18	1318 µM	0,699	0,600	14,2
17, 18	659 µM	0,699	0,583	16,6
17, 18	396 µM	0,699	0,605	13,4
21, 22	948 µM	1,154	1,030	10,7
21, 22	569 µM	1,154	0,916	20,6
21, 22	284 µM	1,154	1,088	5,7
57	1034 µM	0,632	0,625	1,1
57	519 µM	0,632	0,600	5,1
57	259 µM	0,632	0,611	3,3

De los datos de la tabla se observa la gran inhibición del selenonio **43** tanto a una concentración muy elevada como 672 μM (42.6 %) y a otra tan diluida como 11.2 μM (42.2 %), que es prácticamente la misma. Para al 3,4-DHFG se llegan a alcanzar inhibiciones de hasta el 29.6 %, y algo menor (29.4 %) para el HT. Observando la tendencia de los datos de 3,4-DHFG (**190**) de la tabla, parece existir una tendencia a disminuir la inhibición desde concentraciones muy elevadas hasta 70-35 μM , para después volver a aumentar al disminuir la concentración. Similar es el comportamiento del HT (**64**), aunque en este caso, para concentraciones muy diluidas la inhibición es menor para las muestras de menor concentración.

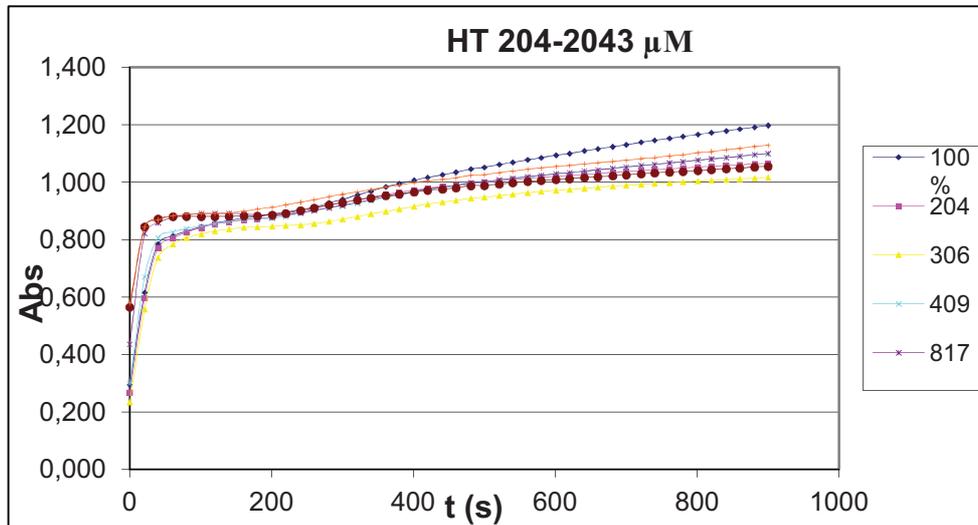
Actividad difenolasa

Para el estudio de la inhibición de la actividad difenolasa de la enzima tirosinasa se empleó L-DOPA 0.5 mM como sustrato, 25 unidades de tirosinasa. Nuevamente se usó como modelo el ácido kójico **176**. Se ensayaron diluciones entre 5 y 100 mM de ácido kójico, obteniéndose diferentes curvas cuya pendiente en el intervalo de velocidad máxima depende de la concentración de ácido kójico utilizada (**Gráfica 5.24**)

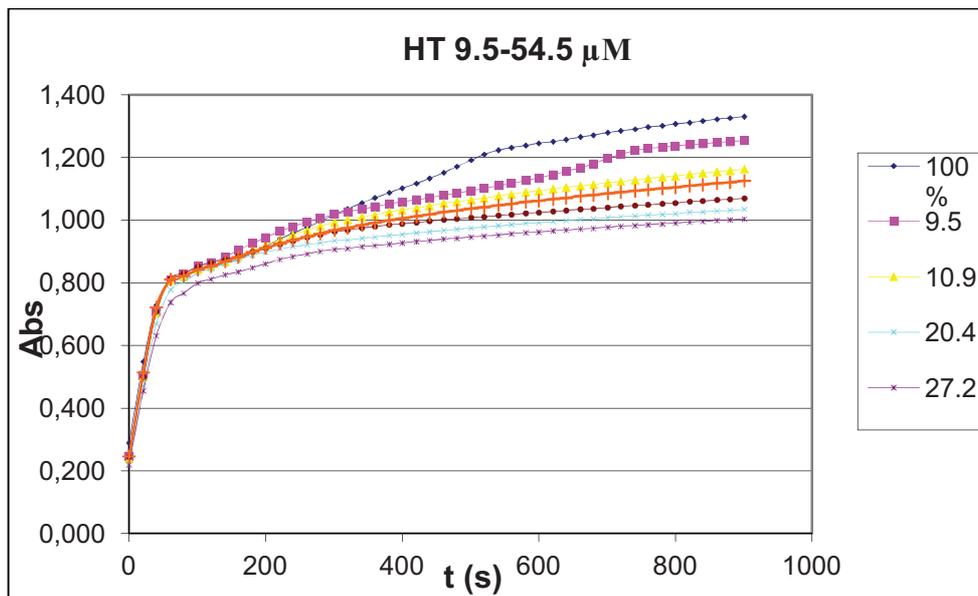


Gráfica 5.24. Inhibición de la actividad difenolasa de la tirosinasa con ácido kójico (176)

Para el HT se ensayaron muestras de concentración comprendida entre 204-2043 μM (Gráfica 5.25) y más diluidas, entre 9.5-54.5 μM (Gráfica 5.26) para una concentración de L-DOPA 0.5 mM y 25 unidades de tirosinasa.



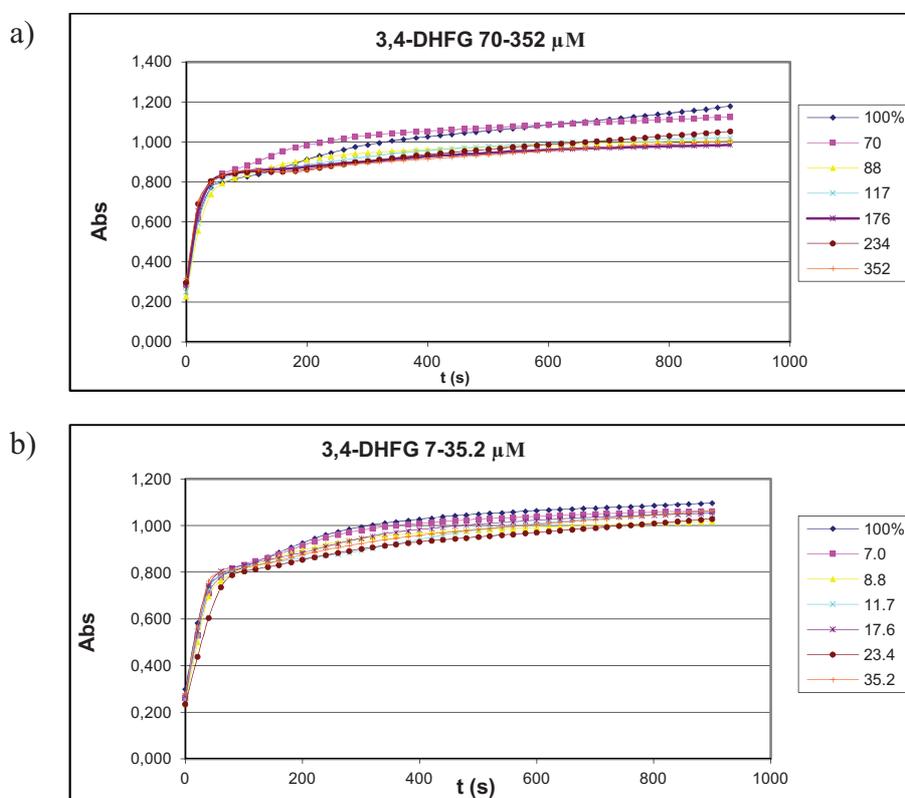
Gráfica 5.25. Inhibición de la actividad difenolasa de la tirosinasa con HT (64) 204-2043 μM , usando como sustrato L-DOPA 0.5 mM y 25 unidades de tirosinasa.



Gráfica 5.26. Inhibición de la actividad difenolasa de la tirosinasa con HT (64) 9.5-54.5 μM , usando como sustrato L-DOPA 0.5 mM y 25 unidades de tirosinasa.

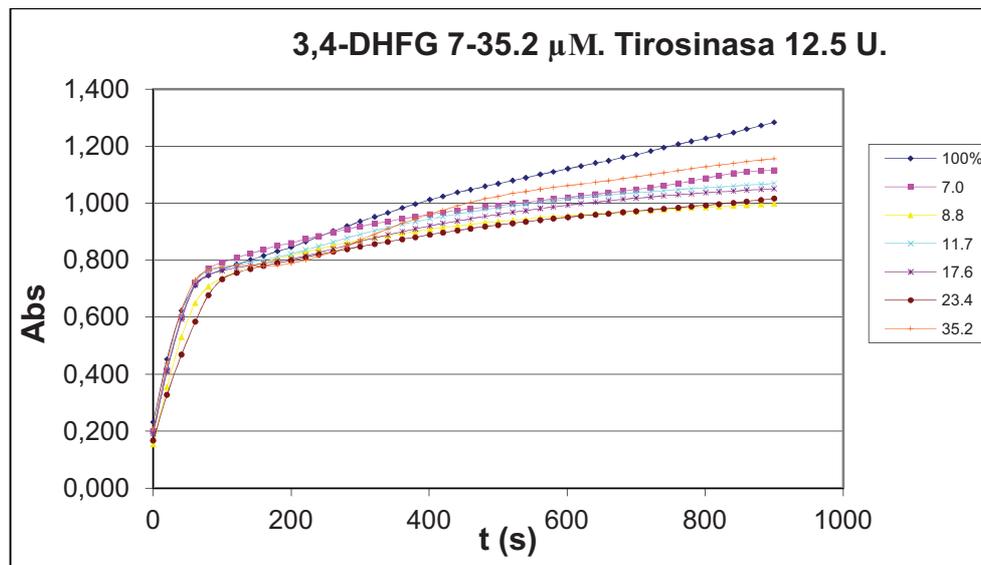
Para todas las concentraciones ensayadas se produce una inhibición de la actividad enzimática a tiempo final no dependiente directamente de la concentración de HT empleada. También se observan ligeras diferencias, aunque no muy significativas entre las disoluciones más concentradas y las más diluidas.

Se realizó también el ensayo con 3,4-DHFG 70-352 μM y 7-35.2 μM (Gráfica 5.27 a y b).



Gráfica 5.27. Inhibición de la actividad difenolasa de la tirosinasa con 3,4-DHFG (190) 70-352 μM (a) y 7-35.2 (b), usando como sustrato L-DOPA 0.5 mM y 25 unidades de tirosinasa.

El efecto inhibitor de la actividad difenolasa no muestra grandes diferencias para las distintas concentraciones ensayadas. Cuando la cantidad de enzima se redujo a la mitad (12.5 unidades) para muestras entre 7-35.2 μM , se redujeron las pendientes de las curvas en el intervalo de velocidad máxima. (Gráfica 5.28)

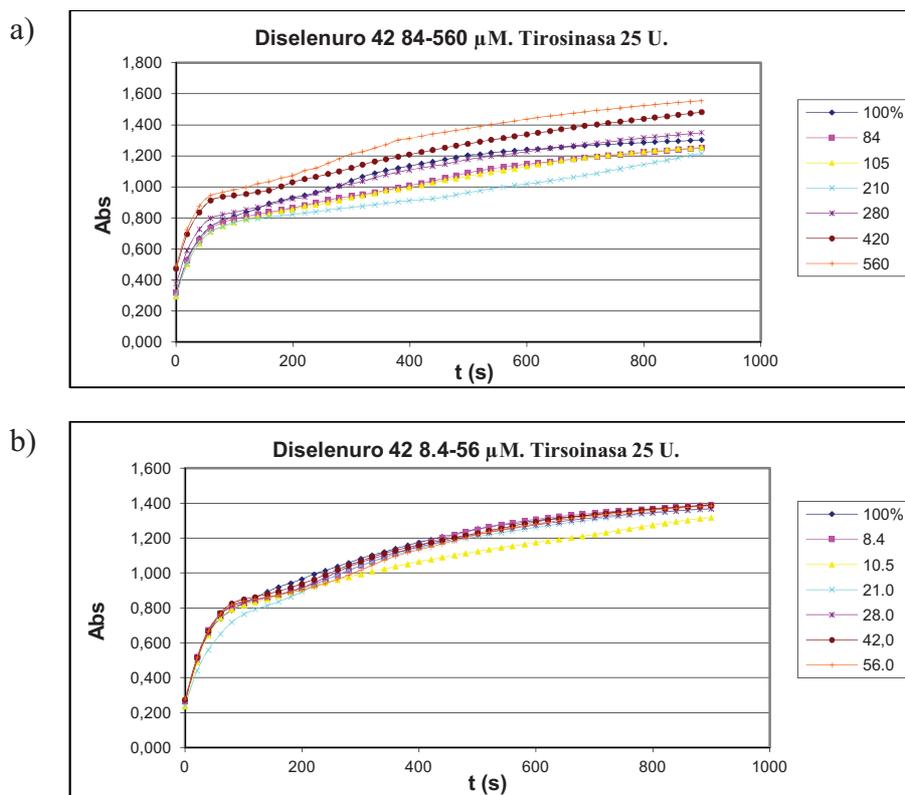


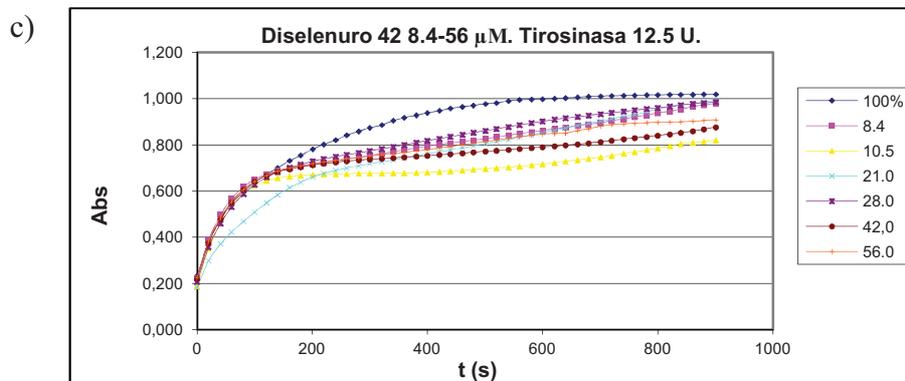
Gráfica 5.28. Inhibición de la actividad difenolasa de la tirosinasa con 3,4-DHFG (190) 7-35.2 μM , usando L-DOPA como sustrato y 12.5 unidades de tirosinasa.

Se aprecia además una mayor inhibición de la actividad enzimática, sin que la misma siga ningún patrón concreto con respecto a la concentración de 3,4-DHFG empleada.

Los ensayos con el diselenuro **42**, los glucosil derivados **17**, **18** y **21**, **22**, y la 1,3 benzotiazepina **57** no producen una inhibición clara de la actividad difenolasa, y sólo tiene lugar a concentraciones diluidas, aunque no sigue una tendencia dependiente directamente de la concentración.

Los datos obtenidos para el diselenuro **42** a concentraciones 84-560 μM y 8.4-56 μM para una concentración de L-DOPA 0.5 mM y 25 unidades de enzima, y para diselenuro **42** 8.4-56 μM usando L-DOPA 0.5 mM y 12.5 unidades de tirosinasa se representan en la **Gráfica 5.29 a, b y c**.

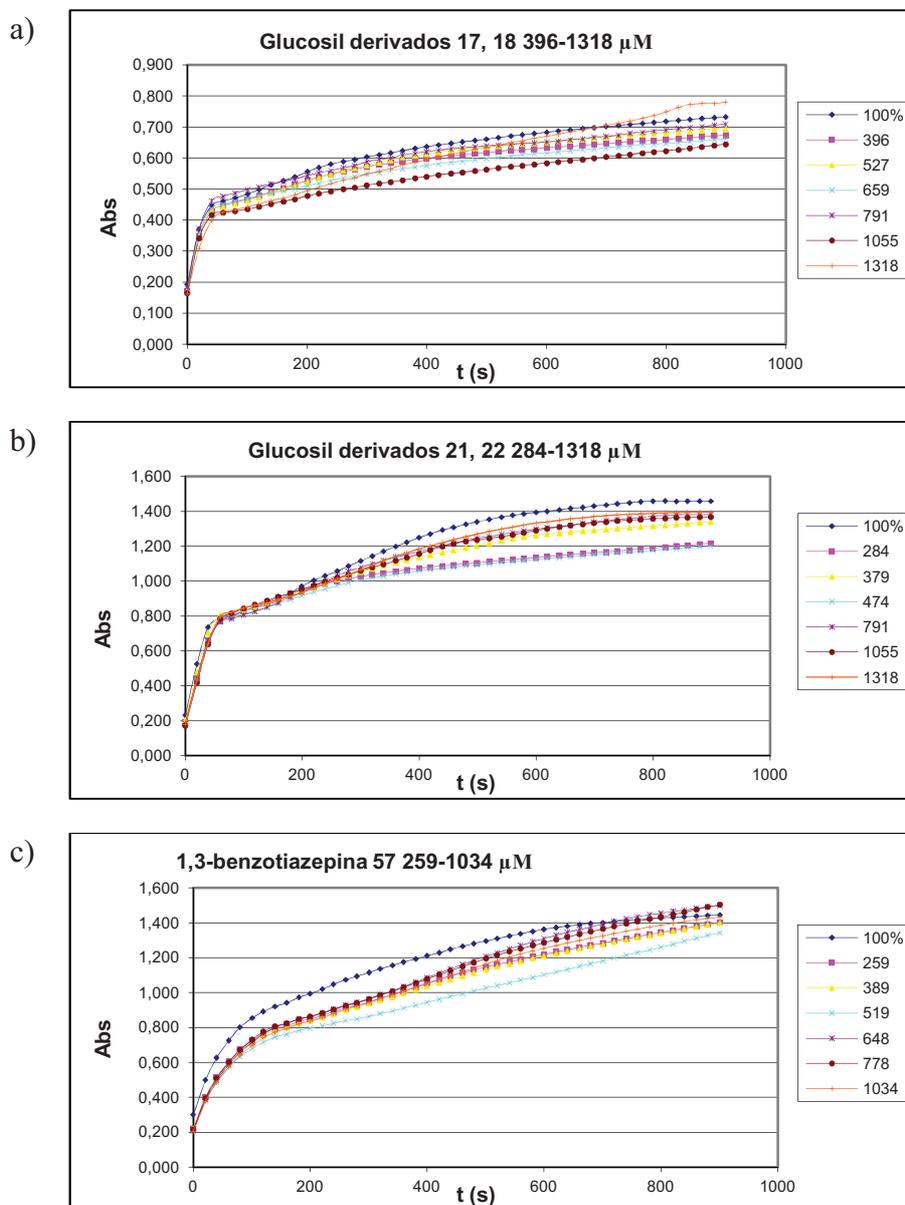




Gráfica 5.29. Inhibición de la actividad difenolasa de la tirosinasa con el diselenuro **42** a concentraciones 84-560 μM (a) y 8.4-56 μM (b) para una concentración de L-DOPA 0.5 mM y 25 unidades de enzima, y para diselenuro **42** 8.4-56 μM (c) usando L-DOPA 0.5 mM y 12.5 unidades de tirosinasa

De las gráficas 5.29 a) y b) se deduce que solamente para algunas concentraciones diluidas se produce inhibición con el diselenuro **42**. Cuando se repitió el ensayo utilizando concentraciones diluidas del diselenuro **42** y la mitad de enzima (12.5 unidades) (**Gráfica 5.29 c**) además de prolongarse el periodo de velocidad máxima se consigue una mayor inhibición, aunque ésta no sigue una tendencia dependiente directamente de la concentración empleada.

Los resultados obtenidos en los ensayos con disoluciones de las mezclas de glucosil derivados **17**, **18** 396-1318 μM , los compuestos **21**, **22** 284-1318 μM y la 1,3-benzotiazepina **57** 259-1034 μM , con una concentración de sustrato 0.5 mM y 25 unidades de enzima se representan en la **Gráfica 5.30 a, b y c**.



Gráfica 5.30. Inhibición de la actividad difenolasa de la tirosinasa con la mezclas de glucosil derivados 17, 18 396-1318 μM (a), los compuestos 21, 22 284-1318 μM (b) y la 1,3-benzotiazepina 57 259-1034 μM (c), usando como sustrato L-DOPA 0.5 mM y 25 unidades de enzima.

Chang⁴⁸³ realizó un ensayo con una serie de isoflavonas, dividiendo las mismas según su actividad en inhibidores competitivos, los cuales se unirían de forma irreversible a la enzima, inhibiendo la actividad monofenolasa, y sustratos “suicidas”, que inhiben tanto la actividad monofenolasa como la difenolasa. El comportamiento de estas isoflavonas con L-tirosina y L-DOPA fue similar al mostrado por los inhibidores ensayados por nosotros.

Como los compuestos ensayados contienen el fragmento *o*-difenol, el resultado implica que puedan actuar como sustratos de la tirosinasa. En esta situación la forma *met* de la enzima se reduce rápidamente a su forma *desoxi* al catalizar el paso de los sustratos *o*-difenoles a *o*-quinonas. Entonces la forma *desoxi* de la tirosinasa se convierte espontáneamente por captación de O₂ en su forma *oxi*, que es el único estado que puede enlazarse con L-tirosina. La *oxi*-tirosinasa a veces se enlaza a sustratos de tipo catecol en el modo oxigenasa, esto es, como si fueran fenoles. En este proceso, el OH extra se puede desprotonar dando lugar a la formación de una 3-hidroxiquinona, de CuO y una forma irreversiblemente desactivada de tirosinasa.⁴⁸⁴ Por eso ciertos catecoles pueden actuar como sustratos “suicidas”.

La inactivación suicida de la tirosinasa ha sido estudiada desde mediados del pasado siglo.⁴⁸⁵ Por tanto, estos nuevos sustratos suicidas de la

⁴⁸³ Chang, T. S.; *J. Agric. Food. Chem.* **2007**, *55*, 2010-2015.

⁴⁸⁴ Ramsden, C. A.; Riley, P. A. *Arkivoc*, **2010**, 260-274.

⁴⁸⁵ Graugard, M.; Nelson, J. M. *J. Biol. Chem.* **1935**, *111*, 757-770.

tirosinasa podrían presentar potenciales propiedades como despigmentantes de la piel y agentes antipardeantes en alimentos.

Estos ensayos sirven como estudio orientativo para el comportamiento de los inhibidores ensayados como antipardeantes en frutas y antimelanósicos en marisco, y su posible actividad en melanomas humanos.

5.2.2. Ensayos *ex vivo*.

5.2.2.1. Inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas.

Esta investigación se ha realizado en el Rowett Institute of Nutrition and Health de la Universidad de Aberdeen (Escocia, Reino Unido), bajo la supervisión del Profesor Garry Duthie y la Dra. Baukje de Roos, y su objetivo ha sido estudiar la inhibición de la peroxidación lipídica en los microsomas de hígados de ratas por medio de los antioxidantes sintetizados en este trabajo.

La peroxidación mediada por radicales libres de los ácidos grasos poliinsaturados de la bicapa lipídica de la membrana celular, puede ser iniciada por adición del quelato Fe (II)-ADP y ascorbato. El grado de peroxidación después de un periodo de tiempo determinado puede medirse añadiendo ácido tiobarbitúrico (TBA) y cuantificando las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas por productos de degradación oxidativa tales como el malondialdehído. El diselenuro **42**, el

selenio **43** y las selenoureas **25-27** se incubaron, siguiendo el protocolo de Mitchell y col.⁴⁸⁶, con microsomas hepáticos (vesículas con sus membranas microsomales que resultan de la fragmentación del retículo endoplasmático de las células del hígado), tras 20 minutos de estrés oxidativo inducidos por el quelato de Fe(II)-ADP y ascorbato. El daño oxidativo se midió entonces por la formación de TBARS: cuanto menor sea la cantidad de TBARS formado, mayor efecto protector sobre los lípidos de membrana. Los microsomas derivados de ratas deficientes en vitamina E se emplearon para determinar el diferente efecto protector de los compuestos ensayados, comparándolos con la vitamina E, que es el principal antioxidante lipídico soluble en membranas biológicas.⁴⁸⁷

Los microsomas se prepararon⁴⁸⁸ a partir de hígados de machos de rata del Rowett Hooded Lister de la Universidad de Aberdeen (Escocia), alimentados con una dieta semisintética deficiente en vitamina E un periodo de 12 semanas, durante las cuales, las concentraciones de vitamina E en alimentos estuvieron por debajo de los límites de detección por HPLC. A aproximadamente 10 g de hígado se añadieron 25 mL de KCl 0.154 M y se homogeneizó. Se centrifugó durante 20 minutos a 12000 rpm, descartando el pellet. El sobrenadante se centrifugó a 35000 rpm durante 1 hora. Se desechó el sobrenadante, y el pellet se disolvió resuspendiéndolo en KCl 0.154 M y se centrifugó otra vez durante una hora a 35000 rpm. El pellet se

⁴⁸⁶ Mithchel, J.H.; Gardner, P.T.; McPhail, D.B.; Morrice, P.C.; Collilns, A.R.; Duthie, G.G. *Archiv. Biochem. Biophys.*, **1998**, *360*, 142-148

⁴⁸⁷ Duthie, G.G.; Gonzalez, B.M.; Morrice, P.C.; Arthur, J. R. *Free Radic. Res. Commun.* **1991**, *15*, 35-40.

⁴⁸⁸ Lim, V.S.; Henriquez, C.; Seo, H.; Refetoff, S.; Mertigo, E.J. *J. Clin. Invest.*, **1980**, *66*, 946-954.

redisolvió en tampón fosfato pH 7.4 0.05 M y se calculó su concentración de proteínas, ajustando la misma a 10 mg/mL con buffer.

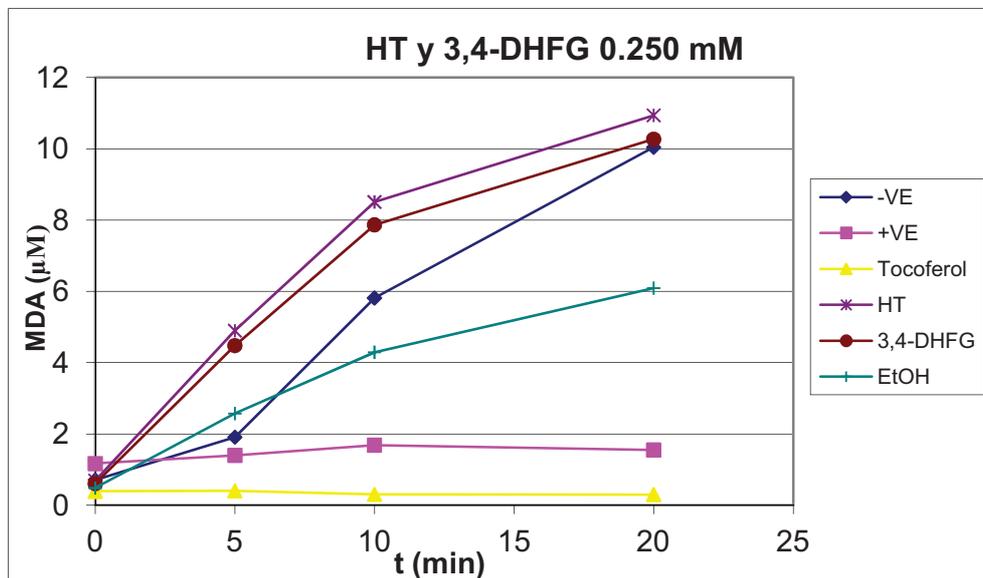
A una suspensión de 500 μ L de microsomas se añadieron 20 μ L de disoluciones de los selenoderivados disueltos en etanol (ó 20 μ L de disolvente para el blanco), de tal forma que las concentraciones finales fueron 0.250 mM, 0.100 mM y 0.050 mM. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se congeló a -80 °C hasta su posterior uso.

Las incubaciones se realizaron según el método descrito por Mitchell y col.⁴⁸⁶ Se incubaron 100 μ L de microsomas con 4.9 mL de tampón fosfato conteniendo ácido ascórbico 0.5 mM, Fe²⁺ 6 μ M y ADP 2 mM. La incubación se realizó en un baño de agua a 37 °C con suave agitación. Después de 0, 5, 10 y 20 minutos se tomó 1 mL de disolución y se añadió sobre 1 mL de ácido tricloroacético al 20 %. A continuación se adicionó 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0.67 % y 2 mL de agua y se hirvió durante 30 minutos. Después de enfriar en agua-hielo se inyectaron las muestras en un HPLC, obteniendo el valor del área de pico para cada concentración. Los resultados se compararon con los obtenidos para una recta patrón de malondialdehído con ácido tiobarbitúrico. Como controles se utilizaron, por un lado una muestra de microsomas de hígados de rata alimentados con una dieta con una concentración normal de vitamina E (+VE), una muestra de microsomas deficientes en vitamina E (-VE), y finalmente microsomas -VE a los que se adicionó tocoferol en las mismas concentraciones que los compuestos a ensayar (0.250 mM, 0.100 mM y 0.050 mM).

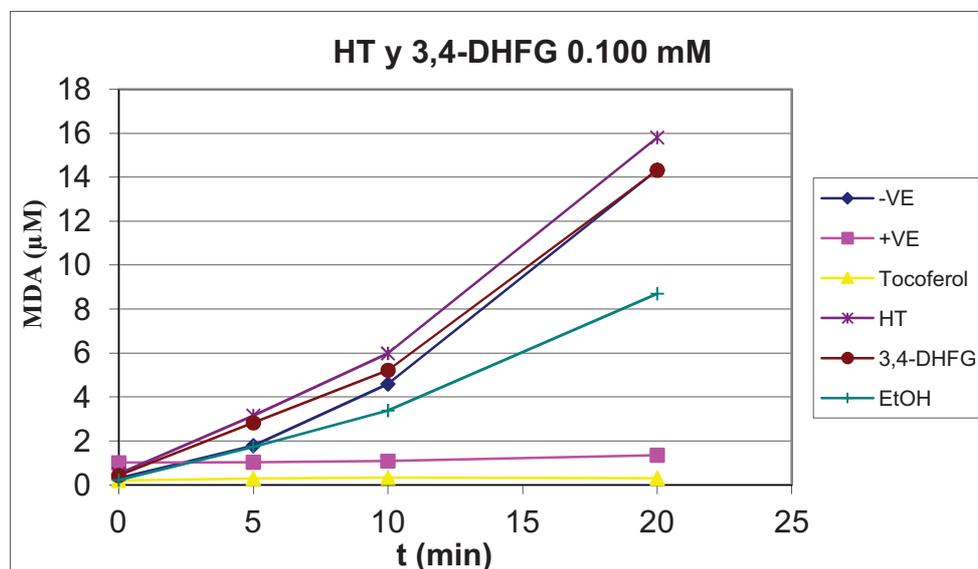
En todos los casos se realizaron controles con etanol en lugar de antioxidantes, puesto que es el disolvente en el que son preparadas las

muestras a ensayar, y que además provoca un cierto efecto inhibitor en la peroxidación de microsomas, que habrá que tener en cuenta y restar al que muestren los antioxidantes a ensayar.

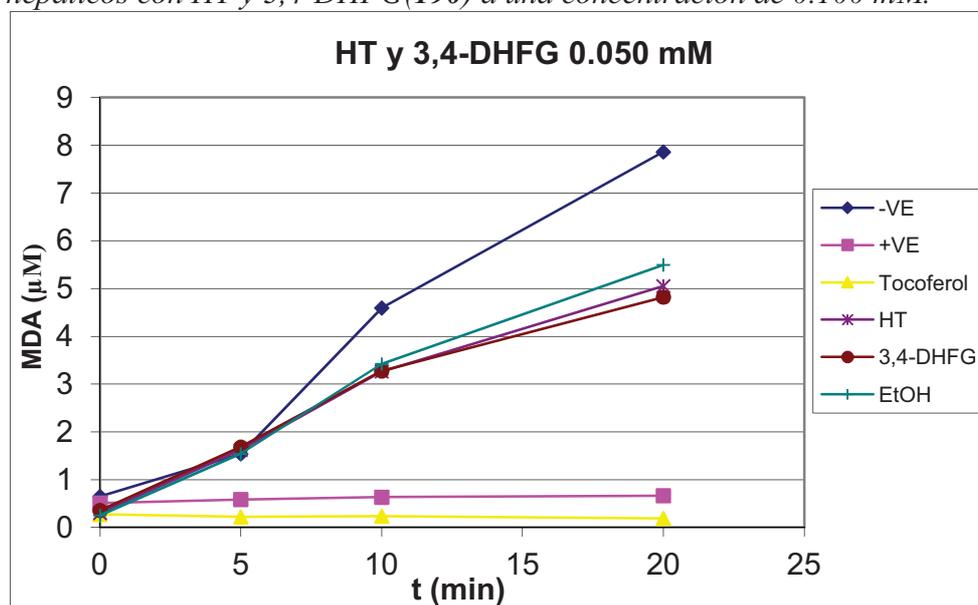
En las siguientes gráficas se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas para el HT y el 3,4-DHFG (190), en concentraciones 0.250 mM (Gráfica 5.55), 0.100 mM (Gráfica 5.56) y 0.050 (Gráfica 5.57) en etanol.



Gráfica 5.55. Inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos con HT y 3,4-DHFG (190) a una concentración de 0.250 mM.



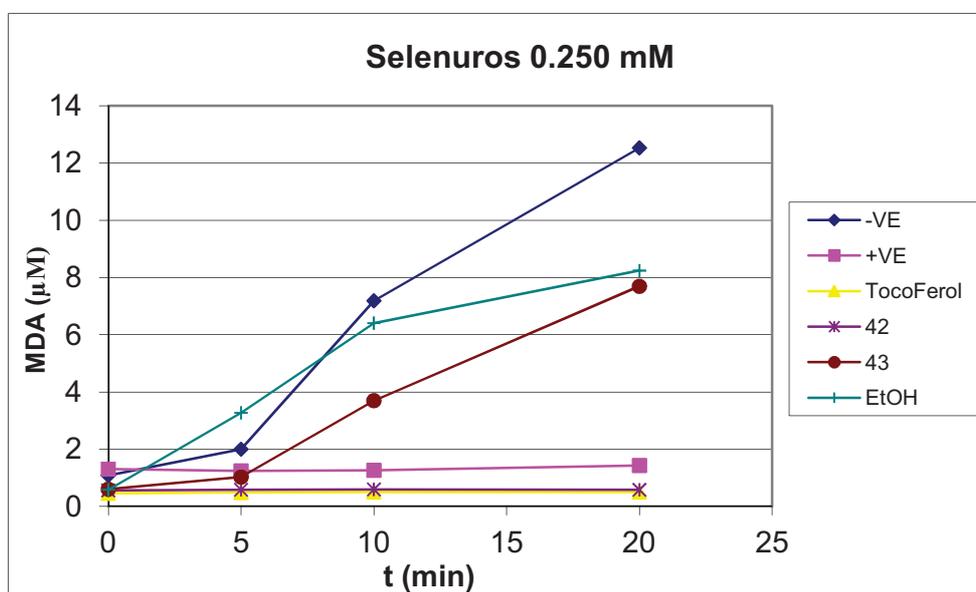
Gráfica 5.56. Inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos con HT y 3,4-DHFG(190) a una concentración de 0.100 mM.



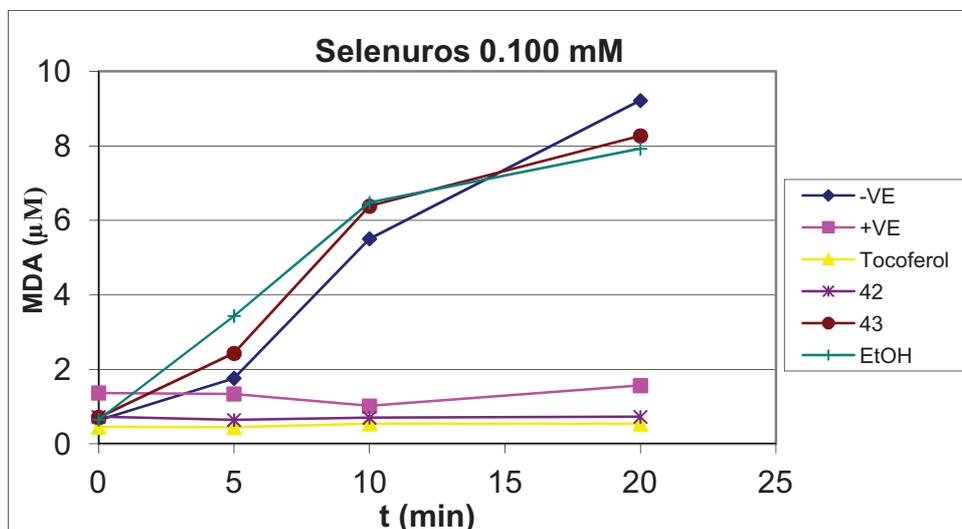
Gráfica 5.57. Inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos con HT y 3,4-DHFG (190) a una concentración de 0.050 mM.

El hidroxitirosol y el 3,4-DHFG se presentan una tendencia prooxidante a concentraciones 0.250 mM y 0.100 mM, mostrando inhibición a 0.050 mM.

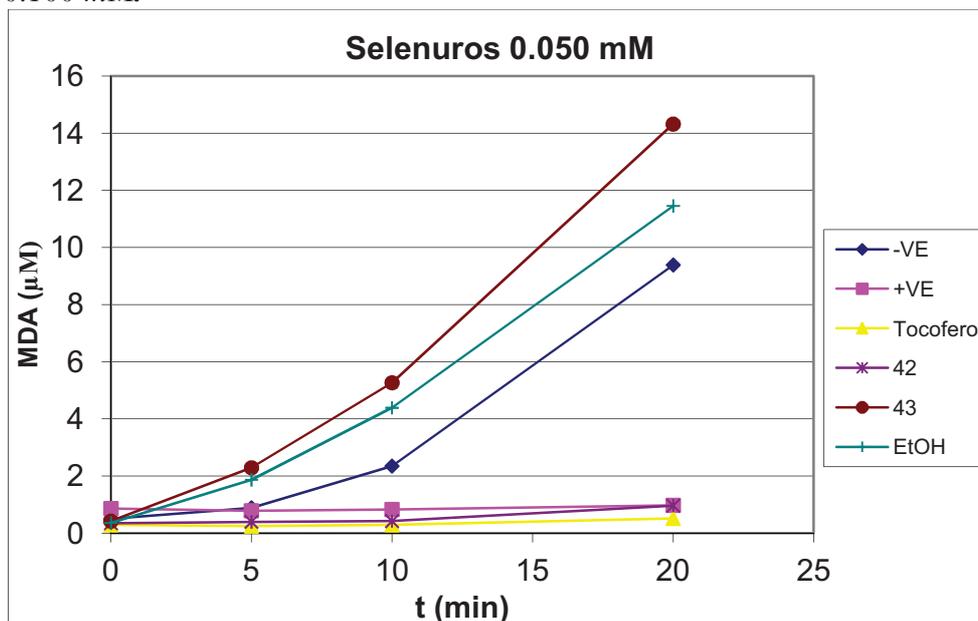
En las siguientes gráficas se expresan los resultados obtenidos para los ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas para el selenuro **42** y el selenio **43** en concentraciones 0.250 mM, 0.100 mM y 0.050 mM en etanol.



Gráfica 5.58. Inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos con el diselenuro **42** y el selenio **43** a una concentración de 0.250 mM.



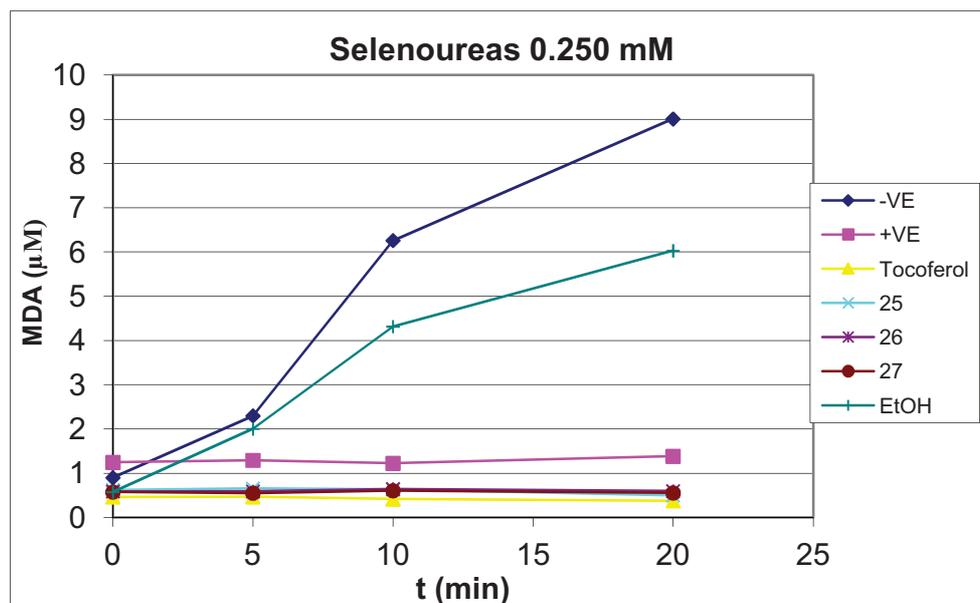
Gráfica 5.59. Inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos con el diselenuro 42 y el selenio 43 a una concentración de 0.100 mM.



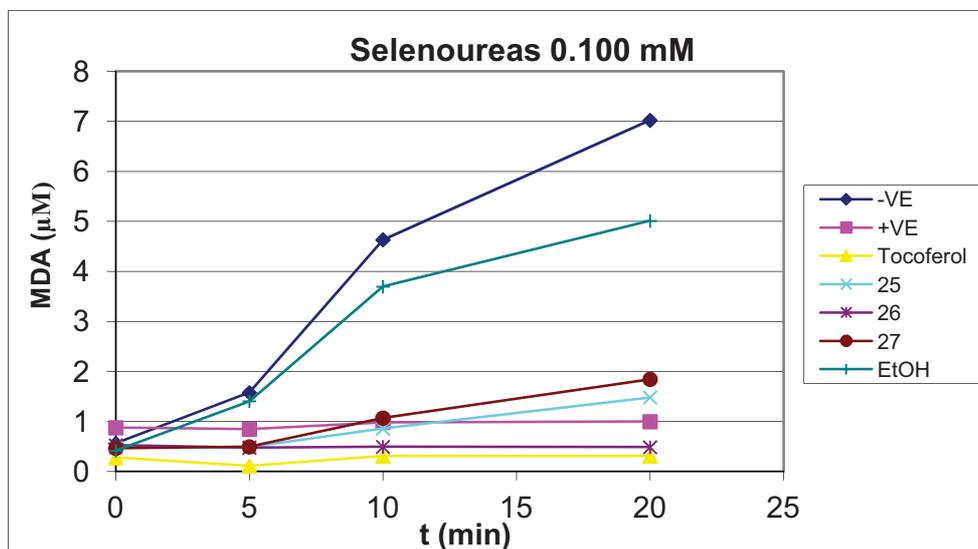
Gráfica 5.60. Inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos con el diselenuro 42 y el selenio 43 a una concentración de 0.050 mM.

De los datos de las gráficas se deduce que el selenio **43** tiene efecto a concentración 0.250 mM y a tiempo 10 minutos, pero no en el resto de las concentraciones ensayadas. Sin embargo, el diselenuro **42** muestra un efecto extraordinario, prácticamente análogo al del tocoferol, paliando el estrés oxidativo de los microsomas deficientes en vitamina E (-VE).

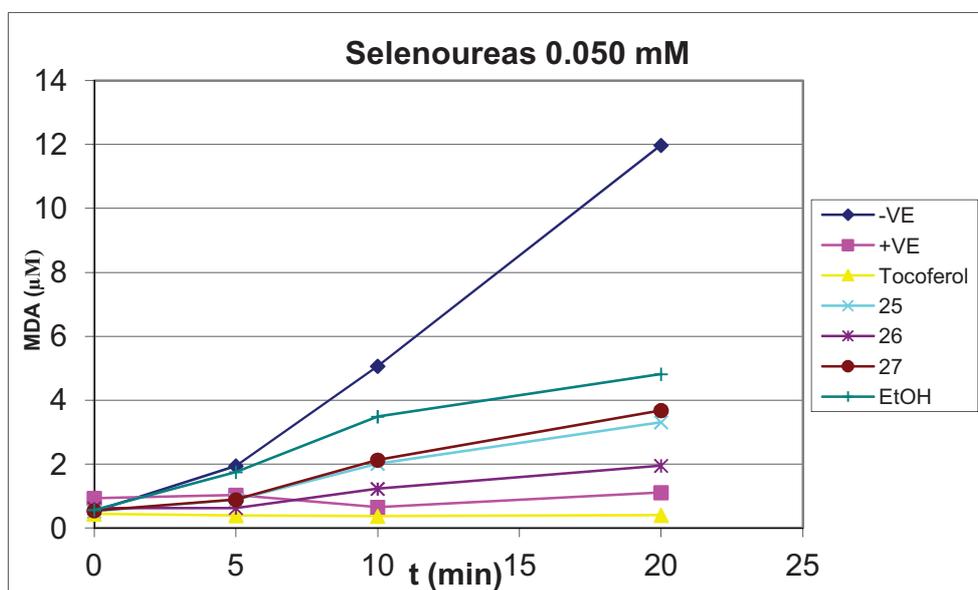
En las siguientes gráficas se muestra el efecto de inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas de hígados de rata para las selenoureas **25-27** a concentraciones de 0.250 mM (Gráfica 5.61), 0.100 mM (Gráfica 5.62) y 0.050 mM (Gráfica 5.63) en etanol.



Gráfica 5.61. Inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos con las selenoureas 25-27 a una concentración de 0.250 mM.



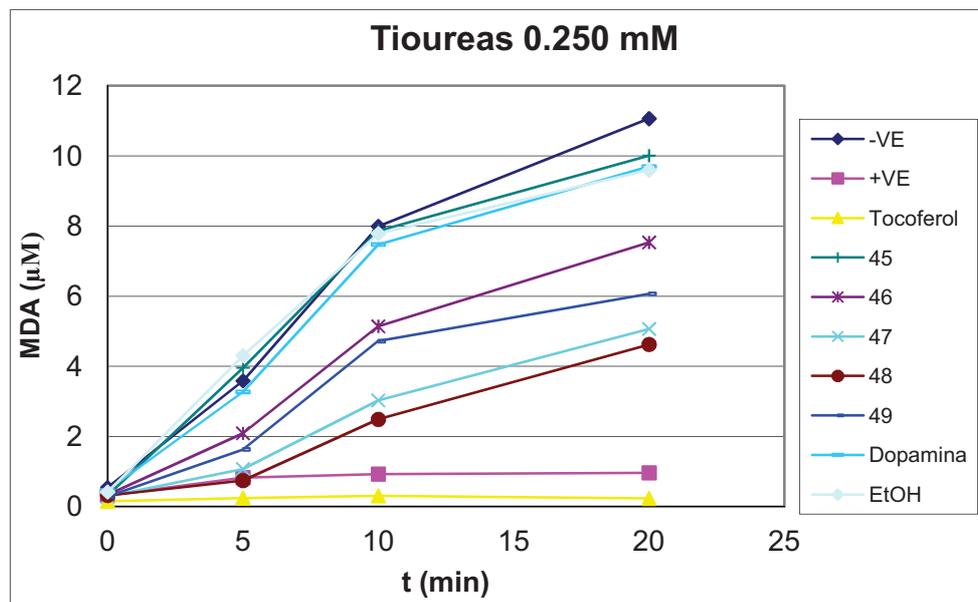
Gráfica 5.62. Inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos con las selenoureas 25-27 a una concentración de 0.100 mM.



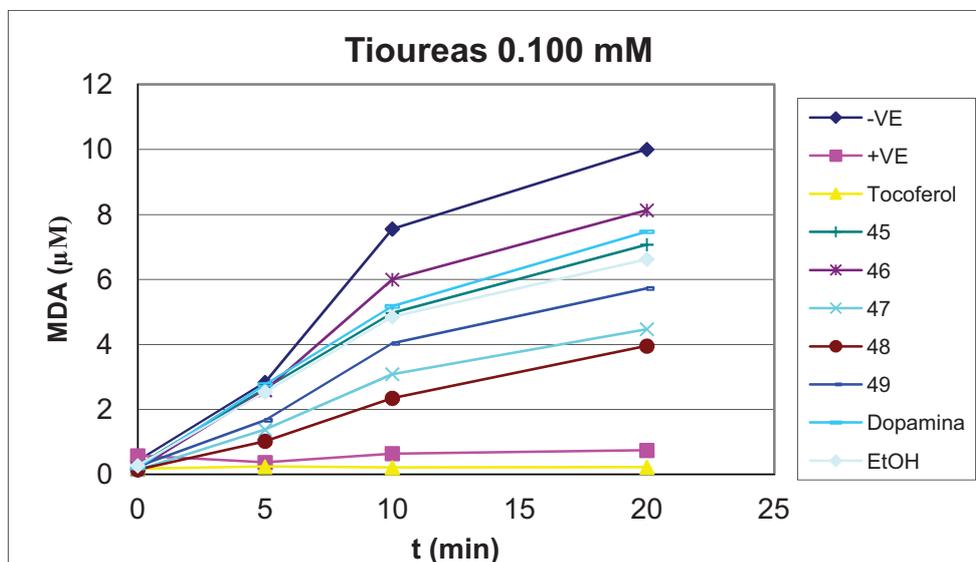
Gráfica 5.63. Inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos con las selenoureas 25-27 a una concentración de 0.050 mM.

Todas las selenoureas muestran una inhibición prácticamente total a una concentración de 0.250 mM, casi idéntica a la que proporciona el tocoferol. A concentración 0.100 mM el efecto inhibidor, aunque menor, continúa siendo alto para las selenoureas **25** y **27**, y total para **26**. Para disoluciones de selenoureas 0.050 mM en microsomas, se sigue observando una importante inhibición, algo mayor nuevamente para el selenoderivado **26**.

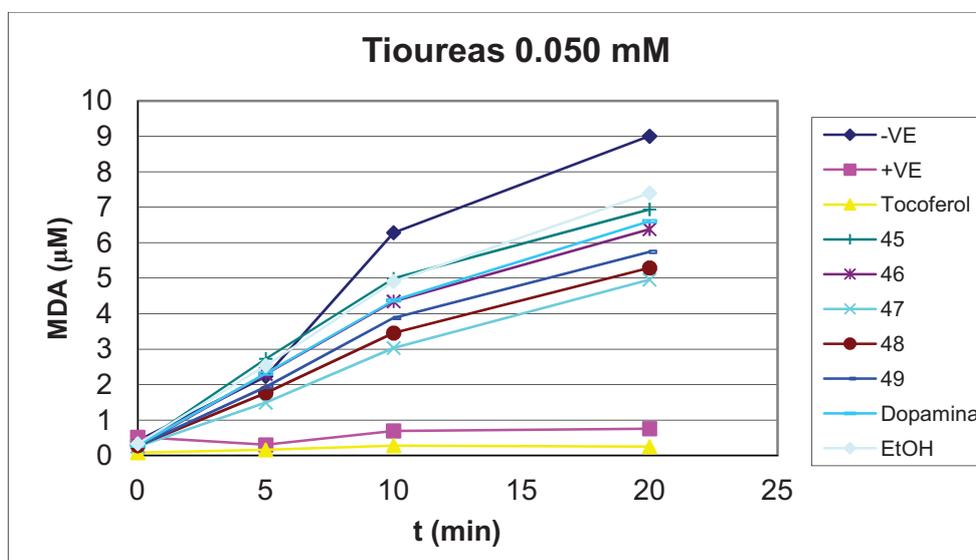
Las siguientes gráficas muestran los ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos de ratas para las tioureas **45-49** y la dopamina **3** a concentraciones de 0.250 mM (**Gráfica 5.64**), 0.100 mM (**Gráfica 5.65**) y 0.050 mM (**Gráfica 5.66**).



Gráfica 5.64. Inhibición de la peroxidación lipídica de microsomas hepáticos con las tioureas **45-49** y la dopamina a una concentración de 0.250 mM.



Gráfica 5.65. Inhibición de la peroxidación lipídica de microsomas hepáticos con las tioureas 45-49 y la dopamina a una concentración de 0.100 mM.



Gráfica 5.66. Inhibición de la peroxidación lipídica de microsomas hepáticos con las tioureas 45-49 y la dopamina a una concentración de 0.050 mM.

La dopamina no mostró potencial inhibitor a una concentración de 0.250 mM, pero sí a las demás concentraciones, mejorando el efecto del control aunque no el del etanol. Las tioureas **46-49** son buenos inhibidores de la peroxidación lipídica en microsomas para la concentración 0.250 mM, y su efecto va disminuyendo para las concentraciones más bajas. La tiourea **45** solo muestra el potencial inhibitor que es efecto del disolvente (EtOH).

A la vista de los resultados de los ensayos de inhibición de la peroxidación en microsomas se comprueba la magnífica capacidad de la mayoría los compuestos estudiados, especialmente el diselenuro **42** y las selenoureas **25-27** para prevenir la peroxidación en un sistema lipídico modelo como son los microsomas de hígado de rata.

El interés de este estudio radica en que la patología de muchas enfermedades está inducida por la peroxidación de membranas biológicas mediada por radicales libres. Los compuestos analizados ofrecen una alta protección contra la formación de fosfolípidos oxidados de las membranas celulares. Al igual que la vitamina E estos compuestos permitirían una buena nutrición y regeneración de los tejidos.

El diselenuro **42** actúa al mismo nivel que la vitamina E, importante para prevenir el desarrollo de condiciones patogénicas y adquirida mediante la dieta a través de alimentos grasos. En todos los casos el diselenuro **42** ofrece la misma protección sobre los microsomas de hígados de ratas con dieta deficiente en vitamina E (-VE) que la que se produce al añadir α -tocoferol a los mismos, y que es igual e incluso mejor que la que presentan los microsomas de hígados de ratas sometidos a una alimentación normal (+VE).

El hidroxitirosol (**64**) fracasa en la protección de la peroxidación de lípidos de los microsomas –VE, salvo a baja concentración (0.050 mM), a pesar de su aceptable capacidad de secuestrar radicales libres, superior incluso a la de la vitamina E (**Tabla 5.7**). El incremento en la lipofilidad y el grado de captación de radicales libres en los ensayos DPPH y ABTS, muy superior al mostrado por el HT, hace a los compuestos **42** y **43** muy importantes en cuanto a su eficacia antioxidante en microsomas. Caso particular es del selenonio **43**, que pese a sus excelentes valores en cuanto a captación de radicales DPPH y ABTS, en los ensayos con microsomas no aporta tan buen valor, debido probablemente a que su condición de sal de bromo podría provocar un desequilibrio osmótico.

Los ensayos con selenoureas también aportan excelentes resultados, especialmente en el caso de la selenourea **26**, algo más lipofílica que sus homólogos **25** y **27**, Comparando los resultados de las selenoureas **25-27** con las tioureas **45-49**, en el caso de los derivados de azufre su actividad, aunque muy buena, es inferior a la que muestran los derivados de selenio, por lo que todo parece indicar que el átomo de Se está implicado directamente en la inhibición de la peroxidación.

La secuencia de capacidad de inhibición de las tioureas **45-49** sería **45 < 46 < 49 < 47 < 48**, y sólo a concentraciones 0.050 mM la tiourea **47** supera ligeramente al derivado **48**. Por tanto, representándolo en función de las cadenas laterales, la inhibición sería metil < butil < fenil < tolil < bencil. Existe una marcada influencia de la lipofilia de los sustituyentes sobre el potencial inhibidor. Comparando esta secuencia con la obtenida para la captación de radicales ABTS, donde **49 = 45 < 46 < 47 < 48** (fenil = metil <

butil < tolil < bencil), nuevamente los sustituyentes bencilo y tolilo son los que proporcionan a las tioureas una mayor capacidad de inhibición, debido probablemente a la mayor longitud de las cadenas laterales.

Este estudio ofrece por lo tanto información relevante sobre el comportamiento de los compuestos ensayados y su potencial antioxidante en modelos de membrana lipídica. La complementación de estos ensayos con los estudios sobre el efecto en el metabolismo podrían determinar los beneficios sobre la salud de los nuevos antioxidantes sintéticos.

Aunque al preparar las muestras de microsomas se estimó una concentración de proteínas aproximada de 10 mg/mL se realizó la medida exacta de la misma en el total de la muestra (*microsomas totales*), del sobrenadante (*microsomas sobrenadante*) y del pellet (*microsomas pellet*) tras centrifugar a 37000 g durante 1 hora, frente a una recta patrón elaborada a partir de albúmina de suero bovino. Se utilizó para ello el método de Biuret. Del mismo modo se calculó la concentración de fenoles totales (una vez añadidos los compuestos antioxidantes) por el método de Singleton y Rossi en los microsomas totales (T), microsomas del sobrenadante (SN) y microsomas del pellet (P). (**Tabla 5.22**)

Tabla 5.22: Concentración de proteínas totales, fenoles totales y fenoles/proteínas en microsomas.

Compuesto	Proteínas totales mg/mL			Fenoles totales $\mu\text{g/mL}$ ác. Gálico			Fenoles/Proteínas (μg ácido Gálico/mg proteína)		
	T	P	SN	T	P	SN	T	P	SN
42	11.66	6.40	2.45	472.25	394.31	58.63	40.51	61.62	23.90
43	7.91	6.31	1.50	175.20	195.78	36.86	22.14	31.03	24.62
25	12.46	10.19	3.42	368.82	330.59	100.29	29.60	32.45	29.37
26	10.63	8.63	2.58	262.94	214.41	69.17	24.73	24.85	26.83
27	12.95	8.00	3.09	313.92	212.45	89.39	24.24	26.54	28.89
45	9.07	5.51	2.25	281.08	178.14	69.95	30.98	32.34	31.02
46	9.96	6.22	2.48	293.33	182.55	33.43	29.44	29.34	13.49
47	9.16	5.60	1.32	245.29	160.49	38.09	26.77	28.67	28.88
48	9.43	5.69	2.57	248.73	181.57	53.28	26.38	31.93	20.76
49	9.43	5.46	2.75	262.94	134.51	95.69	27.88	24.62	34.86
Dopamina (3)	9.70	5.29	2.48	282.55	185.98	87.11	29.14	35.19	35.16
Tocoferol (189)	10.99	8.32	2.60	206.57	173.73	44.78	18.80	20.89	17.25
EtOH	10.28	8.63	2.97	195.29	180.59	51.76	19.00	20.93	17.43

La cantidad de proteínas en microsomas es próxima a los 10 mg/mL. La mayor parte de esa cantidad se queda en el pellet una vez centrifugado, aunque una cantidad residual permanece suspendida en el sobrenadante. La mayor concentración de fenoles totales se obtuvo para el diselenuro **42**, situándose la mayoría de los mismos en el pellet. En las selenoureas **25-27** la cantidad de fenoles tanto en el total como en el pellet es superior a las tioureas **45-49**. Atendiendo a la relación existente entre la cantidad de fenoles por mg de proteína, como norma general éstos quedan adheridos en mayor proporción a los microsomas que forman el pellet, obteniéndose un elevado valor para el pellet del diselenuro **42**.

Investigaciones futuras permitirán determinar la concentración de fenol capaz de atravesar las membranas de los microsomas y la cantidad que se ha unido a las mismas. Con estos datos se podrá estudiar además la permeabilidad de las membranas celulares a los derivados sintéticos de hidroxitirosol descritos en el presente trabajo, de cara a estudiar sus potenciales aplicaciones farmacológicas.

5.2.2.2. Ensayos de actividad anticancerígena

Debido a los prometedores resultados obtenidos con los ensayos de actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos, se han llevado a cabo una serie de estudios preliminares de actividad antitumoral del HT, de las selenoureas **26** y **27**, del diselenuro **42** y del selenonio **43**, en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), en colaboración con el Dr. Amancio Carnero y la Dra. M^a Ángeles López.

En esta investigación se evalúa la capacidad de los citados selenoderivados para producir apoptosis (muerte celular programada) en líneas celulares A-375 (melanoma de piel humana), SF-268 (glioblastoma del sistema nervioso central), NCI-H460 (células grandes derivadas de cáncer de pulmón), siguiendo el procedimiento descrito por González-Vadillo y col.,⁴⁸⁹ y utilizando como referencia doxorubicina, un potente y

⁴⁸⁹ González-Vadillo, A. M.; Álvarez-Valdéz, A.; Moneo, V.; Blanco, F.; Díaz, R. G. Carnero, A.; Navarro-Ranninger, C. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 551-558.

conocido fármaco utilizado como antitumoral,⁴⁹⁰ y comparando los valores obtenidos con los del hidroxitirosol.

Los resultados obtenidos se expresan en función del IC₅₀, que representa la concentración de antioxidante necesaria para producir la apoptosis del 50% de las células tumorales, y se muestran en la **Tabla 5.20**:

Tabla 5.20: *Ensayos de actividad antitumoral en líneas celulares.*

IC ₅₀ (μM)	A-375	SF-268	NCI-H460
HT (64)	158,457	219,379	181,279
26	8,568	2,013	1,430
27	3,483	2,756	1,310
42	0,479	0,360	2,035
43	2,038	1,564	1,071
Doxorrubicina	0,028	0,023	0,012

De los datos de la tabla se deduce la gran diferencia existente entre los resultados obtenidos para el hidroxitirosol y los selenoderivados ensayados. Se observa que en las líneas celulares A-375 y SF-268 el diselenuro **42** es el más activo, unas 330 veces más activo que el hidroxitirosol. En las NCI-H460 es el selenonio **43** el que presenta mejor actividad, unas 170 veces más activo que el hidroxitirosol. En todos los selenoderivados analizados, los valores de IC₅₀ son notablemente inferiores a los mostrados por el HT (**64**), aunque no mejoran los de la doxorrubicina.

Este estudio preliminar sirve de base para futuras investigaciones relacionadas con el potencial anticancerígeno de los selenocompuestos

⁴⁹⁰ De Beer, E. L.; Bottone, A. E.; Voest, E. E. *Eur. J. Pharm.* **2001**, *415*, 1-11.

derivados de polifenoles, habiendo mostrado los compuestos analizados resultados muy prometedores en este campo.

5.2.3. Ensayos *in vivo*.

5.2.3.1. Inhibición del pardeamiento en manzanas.

El objetivo de este apartado es estudiar la inhibición del pardeamiento en manzanas utilizando los antioxidantes naturales y sintéticos descritos en este trabajo.

El pardeamiento en frutas también es debido a la acción de la enzima tirosinasa, devaluando el valor en el mercado de las mismas y llegando a producir importantes pérdidas económicas por rechazo del consumidor,⁴⁹¹ de ahí la importancia de los estudios encaminados a retardar e inhibir el mecanismo enzimático.

Existen numerosos trabajos acerca de la inhibición del pardeamiento en zumo de manzana utilizando 4-hexilresorcinol, metil jasmonato, β -ciclodextrina,⁴⁹² L-cisteína y ácido kójico,⁴⁹³ utilizando métodos enzimáticos y la técnica CIELAB para estudios colorimétricos.

⁴⁹¹ Zarivi, O.; Bonfigli, A.; Colafarina, S.; Aimola, A.; Agnelli, A. M.; Pacioni, G.; Miranda, M. *Phytochemistry*, **2011**, 72, 2317-2324.

⁴⁹² Álvarez-Parrilla, E.; de la Rosa, L. A.; Rodrigo-García, J.; Escobedo-González, R.; Mercado-Mercado, G.; Moyers-Montoya, E.; Vñazquez-Flores, A.; González-Aguilar, G. A. *Food Chem*, **2007**, 101, 1346-1356.

⁴⁹³ Iyidogan, N. F.; Baymdirh, A.; *J Good Engin*, **2004**, 62, 299-304.

Diversos autores han aplicado la metodología CIELAB para el estudio del pardeamiento en manzanas cortadas en rodajas⁴⁹⁴ o cilindros⁴⁹⁵ usando mezclas de ácido ascórbico, L-cisteína, NaCl, CaCl₂, ácido cítrico y ascorbato sódico, consiguiendo buenos resultados de inhibición.

Basándonos en estos datos estudiamos el efecto del HT (**64**), 3,4-DHFG (**190**), el diselenuro **42**, la selenourea **25**, el ácido kójico, y las tioureas **47** y **48** sobre rodajas de manzanas golden, sumergidas durante 5 minutos en 100 mL de disoluciones acuosas de los antioxidantes, utilizando como control una muestra con agua. Para hacer las rodajas se utilizó un cortador casero que dividió la manzana en 6 partes iguales, descartando el corazón. De esas piezas se realizaron las rodajas, que se sumergieron en grupos de 4 en las disoluciones a ensayar durante 5 minutos. Posteriormente se secaron y escurrieron, y se depositaron en bandejas de porcelana. Tres horas después se midieron en el colorímetro los parámetros L* (claridad), a* y b* (saturación de color) para cada una de las rodajas. Los resultados se expresaron en función de del cambio de color ΔE según la expresión:

$$\Delta E = [(L_t - L_{\text{inicial}})^2 + (a_t - a_{\text{inicial}})^2 + (b_t - b_{\text{inicial}})^2]^{1/2}$$

Para el cálculo del grado de inhibición del pardeamiento (% ΔL) y la inhibición del cambio de color (% ΔE) se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\% \Delta L = (\Delta L_{\text{control}} - \Delta L_{\text{tratamiento}}) / \Delta L_{\text{control}}$$

⁴⁹⁴ Toivonem, P. M. A. *Food Sci Tech*, **2008**, *41*, 1607-1609.

⁴⁹⁵ Tortoe, C.; Orchard, J.; Beezer, A.. *Int J Food Sci Tech*, **2007**, *42*, 1475-1481.

$$\% \Delta E = (\Delta E_{\text{control}} - \Delta E_{\text{tratamiento}}) / \Delta E_{\text{control}}$$

Los resultados obtenidos para el 3,4-DHFG, HT y ácido kójico al 0.1% se muestran en la **Tabla 5.21**:

Tabla 5.21: Estudio de la inhibición del pardeamiento en manzanas con HT y 3,4-DHFG

	ΔL	Δa^*	Δb^*	ΔE	$\% \Delta L$	$\% \Delta E$	$P_{\Delta E}$
Control	-7,18	2,57	4,22	8,72			
Ac. Kójico 0,1 %	-5,65	0,42	1,91	5,97	21%	31%	0.05
HT 0,005 mM	-2,68	2,91	7,95	8,88	63%	-2%	0.23
HT 0,01 mM	-6,39	2,55	4,50	8,22	11%	6%	0.91
HT 0,05 mM	-16,93	2,08	-0,92	17,08	-136%	-96%	0.09
HT 0,1 mM	-10,12	2,07	4,17	11,13	-41%	-28%	0.36
HT 0,5 mM	-8,86	2,82	5,18	10,64	-23%	-22%	0.49
3,4-DHFG 0,005 mM	-5,23	2,55	6,53	8,75	27%	0%	0.27
3,4-DHFG 0,01 mM	-7,87	2,53	4,03	9,20	-10%	-6%	0.54
3,4-DHFG 0,05 mM	-10,88	2,45	4,66	12,08	-51%	-39%	0.56
3,4-DHFG 0,1 mM	-16,28	2,45	2,05	16,58	-127%	-90%	0.04
3,4-DHFG 0,5 mM	-13,55	3,60	2,18	14,18	-89%	-63%	0.65
HT 5 μM+ 3,4-DHFG 5 μM.	-3,39	2,54	4,99	6,55	53%	25%	0.89

Según los datos de la tabla, solamente el ácido kójico previene el pardeamiento enzimático. Tanto el HT como el 3,4-DHFG parecen incluso favorecerlo. Pese a los demás resultados positivos de la tabla, como por ejemplo para el HT 0.01 mM, el análisis estadístico (p = probabilidad de error) de los datos indica una elevada dispersión de los mismos, no ajustándose a niveles de significancia respecto al control, a excepción del ácido kójico (p = 0.05).

Los resultados obtenidos para los ensayos de pardeamiento enzimático en manzanas utilizando como inhibidores la selenourea **25** y el diselenuro **42** se muestran en la **Tabla 5.22**:

Tabla 5.22: Estudio de la inhibición del pardeamiento en manzanas con la selenourea **25** y el diselenuro **42**.

	ΔL	Δa^*	Δb^*	ΔE	% ΔL	% ΔE
Control	11,78	-4,18	-7,26	14,46		
Ác. Kójico 0,1 %	7,63	-1,06	-2,64	8,15	35%	44%
25 0,005 mM	12,67	-4,38	-8,27	15,74	-8%	-9%
25 0,05 mM	13,16	-5,06	-8,73	16,58	-12%	-15%
25 0,1 mM	13,93	-5,55	-9,4	17,7	-18%	-22%
42 0,005 mM	14,75	-5,39	-9,34	18,27	-25%	-26%
42 0,05 mM	15,17	-5,63	-8,54	18,29	-29%	-26%
42 0,1 mM	15,95	-6,41	-9,71	19,75	-35%	-37%

En este caso tampoco hubo inhibición del pardeamiento, produciéndose un efecto similar al que producen el HT y 3,4-DHFG.

Finalmente se ensayaron las tioureas **47** y **48**, cuyos resultados se expresan en la **Tabla 5.23**:

Tabla 5.23: Estudio de la inhibición del pardeamiento en manzanas con las tioureas **47** y **48**.

	ΔL	Δa^*	Δb^*	ΔE	% ΔL	% ΔE
Control	9,32	-3,91	-7,69	12,7		
Ác. Kójico 0,1 %	5,84	-0,52	-3,64	6,9	37%	46%
47 0,005 mM	9,76	-4,23	-9,61	14,34	-5%	-13%
47 0,05 mM	11,56	-5,04	-9,47	15,77	-24%	-24%
47 0,1 mM	11,64	-5,05	-8,96	15,53	-25%	-22%
48 0,005 mM	10,96	-4,77	-7,99	14,38	-18%	-13%
48 0,05 mM	13,95	-5,81	-8,22	17,2	-50%	-35%
48 0,1 mM	15,35	-6,54	-9,97	19,44	-65%	-53%

Tampoco se observó inhibición alguna con las tioureas **47** y **48**, con lo que puede concluirse que con la metodología empleada los antioxidantes ensayados no muestran ningún tipo de inhibición sobre el pardeamiento en manzanas.

5.2.3.2. Inhibición de la melanosis en camarones.

El deterioro organoléptico, y fundamentalmente visual del marisco debido a la aparición de manchas negras debida a la melanosis, provoca importantes pérdidas en el sector, de ahí que se busque retardar todo lo posible el mecanismo enzimático llevado a cabo por la tirosinasa. Por ello el objetivo de este apartado es estudiar el comportamiento de los antioxidantes naturales hidroxitirosol (**64**) y 3,4-DHFG (**190**), así como de otros sintetizados por nosotros en la inhibición de la melanosis en camarones (*Palaemon longirostris*), mediante inmersión de los mismos en disoluciones de antioxidantes y conservación en frío durante varios días.

En un primer ensayo se emplearon disoluciones de HT y 3,4-DHFG de diferentes concentraciones comprendidas entre 0.1 mM y 5.0 mM.

Se pesaron 25 g de camarones para cada ensayo, y se sumergieron en 200 mL de las disoluciones a testar durante 1 hora, estableciendo como control una muestra en agua destilada. Transcurrido ese tiempo se sacaron, escurrieron y almacenaron refrigerados a 5 ± 1 °C. 6 días después se procedió a efectuar un conteo visual para cada muestra, descartando los individuos más pequeños. El criterio a seguir para el recuento fue:

- Bueno: camarón intacto, o con ligeras manchas pero siempre inferiores al 10% del cuerpo.
- Regular: camarón con manchas marrones en cabeza, cuerpo o patas, pero siempre entre el 10 y el 40% de la superficie de los mismos.
- Malo: camarón con la cabeza completamente negra, o con manchas en cabeza, cuerpo o patas cuya superficie total abarca más del 40% del mismo. (**Figura 5.3**)

Los resultados obtenidos para el conteo visual de camarones en esta primera experiencia se representan en la **Tabla 5.24**:

Tabla 5.24: Primer ensayo con camarones utilizando HT y 3,4-DHFG como inhibidores de la melanosis. Conteo y porcentajes tras 6 días almacenados a 5 °C.

Compuesto	Malos	Regular	Buenos	Total
Control	26 65%	4 10%	10 25%	40
HT 0,1 mM	11 30%	19 51%	7 19%	37
HT 0,5 mM	7 13%	46 87%	0 0%	53
HT 1 mM	12 18%	56 82%	0 0%	68
HT 5 mM	15 30%	35 70%	0 0%	50
3,4-DHFG 0,1 mM	0 0%	12 24%	38 76%	50
3,4-DHFG 0,5 mM	0 0%	11 25%	32 75%	43
3,4-DHFG 1 mM	2 4%	13 26%	36 70%	51
3,4-DHFG 2,5 mM	17 42%	9 22%	14 35%	40
3,4-DHFG 5 mM	16 35%	22 48%	8 17%	46

Los resultados de este ensayo preliminar muestran una disminución del porcentaje de camarones considerados como malos tras ser sumergidos en disoluciones con HT o 3,4-DHFG, aunque suponen un aumento de los regulares que es especialmente notable para muestras muy concentradas de HT, debido a un exceso de coloración de las mismas.

Para concentraciones iguales de HT y 3,4-DHFG se observa un efecto más positivo en el 3,4-DHFG, el cual muestra que para concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 mM casi no aparecen camarones considerados malos al cabo de 6 días, y además los buenos se incrementan desde un 25% del control hasta un 70-76%.

En un segundo ensayo se probaron concentraciones menores de HT y 3,4-DHFG (0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 mM), se pesaron 50 gramos de camarones y se sumergieron en 100 mL de las disoluciones durante 30 minutos, y se procedió al conteo de todos los individuos después de tres días

refrigerados a 5 ± 1 °C. Los resultados obtenidos se expresan en la **Tabla 5.25**:

Tabla 5.25: Segundo ensayo con camarones utilizando HT y 3,4-DHFG como inhibidores de la melanosis. Conteo y porcentajes tras 3 días almacenados a 5°C.

Compuesto	Malos		Regular		Buenos		Total
Control	131	34%	199	51%	57	15%	387
HT 0,01 mM	102	25%	238	57%	75	18%	415
HT 0,05 mM	100	28%	171	48%	86	24%	357
HT 0,1 mM	70	18%	276	71%	41	11%	387
3,4-DHFG 0,01 mM	68	19%	165	48%	113	33%	346
3,4-DHFG 0,05 mM	60	9%	144	42%	137	49%	341
3,4-DHFG 0,1 mM	101	26%	215	57%	64	17%	380
3,4-DHFG 0,5 mM	63	17%	247	65%	67	17%	377
HT + 3,4-DHFG 1:1 0,1 mM	56	17%	219	68%	48	15%	323

En este caso vuelve a ratificarse que el glicol tiene un mayor efecto que el HT para concentraciones iguales. Los mejores resultados se obtuvieron con disoluciones 0.05 mM tanto de hidroxitirosol como de 3,4-DHFG. La mezcla de ambos no mejora sustancialmente los resultados que se obtienen por separado.

En una tercera prueba se ensayaron disoluciones de HT y 3,4-DHFG 0.01 mM, 0.025 mM, 0.050 mM y 0.075 mM, además del control con agua y una muestra con ácido ascórbico y ácido cítrico 1:1 en una concentración final de 0.05 mM. Se pesaron 60 g de camarones y se sumergieron en las disoluciones durante 30 minutos. Para el 3,4-DHFG 0.05 mM se realizó además un control del tiempo de inmersión, preparando ensayos para 5, 10 y 15 minutos, además del de 30 minutos. El conteo se realizó tras 5 días

refrigerados a 5 ± 1 °C. Los resultados obtenidos se expresan en la **Tabla 5.26**:

Tabla 5.26: Tercer ensayo con camarones utilizando HT y 3,4-DHFG como inhibidores de la melanosis. Conteo y porcentaje tras 5 días almacenados a 5 °C.

Compuesto	Malos		Regular		Buenos		Total
Control	225	68%	90	27%	17	5%	332
HT 0.01 mM	166	41%	171	42%	66	16%	403
HT 0.025 mM	182	52%	119	34%	51	14%	352
HT 0,05 mM	95	44%	82	38%	38	18%	215
HT 0,075 mM	139	46%	121	40%	41	14%	301
3,4-DHFG 0,01 mM	133	42%	110	35%	74	23%	317
3,4-DHFG 0,025 mM	200	65%	60	19%	50	16%	310
3,4-DHFG 0,05 mM	69	27%	141	56%	43	17%	253
3,4-DHFG 0,075 mM	131	44%	116	39%	48	16%	295
3,4-DHFG 0,05 mM 5'	112	33%	176	52%	51	15%	339
3,4-DHFG 0,05 mM 10'	205	63%	69	21%	50	15%	324
3,4-DHFG 0,05 mM 15'	152	44%	125	36%	69	20%	346
AA+AC 0,05 mM	172	60%	67	23%	48	17%	287

Una vez más los resultados obtenidos para el glicol son algo mejores que los del HT. Para los ensayos a distinto tiempo de inmersión los mejores datos se obtuvieron a 15 minutos. La mezcla de ácido cítrico y ascórbico mejoró ligeramente los valores del control, pero no mejora sustancialmente al 3,4-DHFG o HT.

Se realizó un nuevo experimento empleando como inhibidores el diselenuro **42** en distintas concentraciones comprendidas entre 0.05 μ M y 0.02 mM, comparándolo con el HT y el 3,4-DHFG, con un tiempo de inmersión de 15 minutos, y realizando las medidas tras dos y cinco días de

almacenaje a 5 ± 1 °C. Los resultados obtenidos tras dos días se expresan en la **Tabla 5.27** y después de 5 días en la **Tabla 5.28**.

Tabla 5.27: Cuarto ensayo con camarones utilizando el diselenuro 42, HT y 3,4-DHFG como inhibidores de la melanosis. Conteo y porcentajes tras 2 días almacenados a 5 °C.

Compuesto	Malos		Regular		Buenos		Total
Control	28	21%	57	43%	47	36%	132
42 0.05 µM	30	26%	51	44%	36	31%	117
42 0.001 mM	2	2%	42	37%	70	61%	114
42 0.01 mM	10	8%	48	40%	62	52%	120
42 0.02 mM	5	4%	36	29%	83	67%	124
3,4-DHFG 0.001 mM	5	4%	44	35%	75	60%	124
3,4-DHFG 0.05 mM	7	6%	34	31%	68	62%	109
3,4-DHFG 0.075 mM	18	14%	49	39%	60	47%	127
HT 0.01 mM	11	8%	45	34%	75	57%	131
HT 0.05 mM	8	6%	59	48%	57	46%	124
HT 0.075 mM	26	26%	43	43%	32	32%	101

Tabla 5.28: Cuarto ensayo con camarones utilizando el diselenuro 42, HT y 3,4-DHFG como inhibidores de la melanosis. Conteo y porcentajes tras 5 días almacenados a 5 °C.

Compuesto	Malos		Regular		Buenos		Total
Control	95	74%	22	17%	11	9%	128
42 0.05 µM	59	49%	36	30%	26	21%	121
42 0.001 mM	87	69%	17	13%	22	17%	126
42 0.01 mM	60	46%	35	27%	35	27%	130
42 0.02 mM	67	54%	34	27%	23	19%	124
3,4-DHFG 0.001 mM	79	64%	20	16%	24	20%	123
3,4-DHFG 0.05 mM	42	34%	41	33%	40	33%	123
3,4-DHFG 0.075 mM	50	39%	47	37%	31	24%	128
HT 0.01 mM	74	56%	35	26%	24	18%	133
HT 0.05 mM	40	34%	54	47%	22	19%	116
HT 0.075 mM	63	62%	28	28%	10	10%	101

El diselenuro **42** también mostró un notable efecto inhibitor sobre la melanosis, similar al del 3,4-DHFG para concentraciones iguales, siendo muy llamativos los resultados obtenidos a los dos días de su almacenamiento.

Finalmente se repitió el ensayo utilizando como inhibidores la selenourea **25** y la tiourea **47**, seleccionando los camarones vivos de mayor tamaño (40 g en 100 mL), sumergiéndolos en las disoluciones durante 15 minutos, comparando los resultados con el glicol, usando como control camarones sumergidos en agua, y realizando las medidas tras dos (**Tabla 5.29**) y cinco días (**Tabla 5.30**) de almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Tabla 5.29: *Quinto ensayo con camarones utilizando la selenourea 25, la tiourea 47 y 3,4-DHFG como inhibidores de la melanosis. Conteo y porcentajes tras 2 días almacenados a 5 °C.*

Compuesto	Malos		Regular		Buenos		Total
Control	8	5%	90	55%	67	41%	165
25 0.001 mM	10	6%	78	46%	82	48%	170
25 0.01 mM	3	2%	21	15%	118	83%	142
25 0.02 mM	4	2%	44	27%	118	71%	166
47 0.001 mM	18	10%	71	41%	85	49%	174
47 0.01 mM	10	6%	81	51%	69	43%	160
47 0.02 mM	7	4%	69	40%	96	56%	172
3,4-DHFG 0.02 mM	6	4%	63	39%	91	57%	160
3,4-DHFG 0.05 mM	9	5%	48	29%	107	65%	164
3,4-DHFG 0.075 mM	7	4%	85	51%	74	45%	166

Tabla 5.30: Quinto ensayo con camarones utilizando la selenourea **25**, la tiourea **47** y 3,4-DHFG como inhibidores de la melanosis. Conteo y porcentajes tras 5 días almacenados a 5 °C.

Compuesto	Malos	Regular	Buenos	Total
Control	86 52%	56 34%	23 14%	165
25 0.001 mM	80 44%	78 43%	25 14%	183
25 0.01 mM	75 44%	73 43%	22 13%	170
25 0.02 mM	73 39%	84 45%	29 16%	186
47 0.001 mM	86 50%	54 32%	31 18%	171
47 0.01 mM	66 42%	79 50%	13 8%	158
47 0.02 mM	60 34%	91 52%	23 13%	174
3,4-DHFG 0.02 mM	61 37%	82 50%	21 13%	164
3,4-DHFG 0.05 mM	55 34%	54 34%	51 32%	160
3,4-DHFG 0.075 mM	74 46%	52 32%	36 22%	162

Aunque se aprecian diferencias importantes entre la selenourea **25** y la tiourea **47** con respecto al control tras dos días, siendo los resultados mejores en el caso de la selenourea **25**, éstas terminan por hacerse similares al quinto día. Nuevamente el mejor de los valores se obtuvo con el glicol a una concentración 0.05 mM.

En las siguientes figuras pueden apreciarse, a modo de ejemplo gráfico, camarones en el día de su recolección (**Figura 5.1**), tras dos días almacenados a 5 °C (**Figura 5.2**) y tras cinco días de almacenamiento a 5 °C (**Figura 5.3**).



Figura 5.1. *Camarones. Día 0.*



Figura 5.2. *Camarones. Día 2.*



Figura 5.3. Camarones. Día 5.

Los resultados obtenidos son muy interesantes, sobre todo teniendo en cuenta los siguientes factores:

- 1) Que las pruebas se han realizado de forma individual por un panel de hasta 6 observadores, con lo cual la reproducibilidad de las mismas ha estado condicionada a factores humanos (**Figura 5.4**), obteniéndose los mismos resultados en todos los casos, independientemente de los observadores.



Figura 5.4. *Conteo de camarones.*

- 2) El número de individuos en cada ensayo varía según el tamaño de los camarones en la partida adquirida, observándose que a pesar de esa variabilidad de tamaño y de individuos los resultados son similares y repetitivos.
- 3) Los experimentos se realizaron en distintas épocas del año, con lo que también se observa que los factores externos y los fisiológicos de los individuos tampoco condicionan los resultados.

Teniendo en cuenta lo anterior, cabe destacar que a pesar de la variabilidad de individuos, observadores y condiciones externas, los

resultados han sido siempre similares, afianzando los efectos positivos observados.

A dosis bajas, del orden de 0.01-0.05 mM de HT (**64**) o 3,4-DHFG (**190**), el efecto inhibitor es mayor que a dosis más altas. En el caso de los ensayos con tirosinasa de hongos, a partir de cierta concentración mínima se producía un efecto similar, que aunque no dependía directamente de la concentración sí que mostraba que las muestras más diluidas tenían mayor efecto inhibitor.

Los ensayos llevados a cabo con los compuestos sintéticos **42**, **25** y **47** muestran todos un buen efecto inhibitor, siendo el compuesto **42** el que presenta un mayor efecto, equiparable al mostrado por el 3,4-DHFG (**190**). Desde el punto de vista práctico el interés de las pruebas realizadas con camarones tienen una limitada aplicabilidad, puesto que los camarones por lo general son consumidos dentro de los dos primeros días desde su captura, con lo que no hay posibilidad de actividad melanósica alguna. Sin embargo, dado su pequeño peso y tamaño, el precio por unidad es muy bajo, siendo una fuente barata de individuos de estudio, estableciendo así unas directrices generales para ampliar futuros ensayos con otros tipos de marisco más grandes como gambas y langostinos y corroborar el efecto antimelanósico de los productos previamente ensayados con los camarones, buscando así su revalorización comercial.

El interés de este estudio podría estar además enfocado a la utilización de los antioxidantes ensayados en melanomas humanos, como despigmentantes para su utilización en el mundo de los cosméticos y para el tratamiento de melanomas en cánceres de piel.

6. FORMACIÓN DE ISOXAZOLES CON EL CATALIZADOR CeCl_3/NaI

6. FORMACIÓN DE ISOXAZOLES CON EL CATALIZADOR CeCl₃/NaI

6.1. Introducción y antecedentes.

Los estados de oxidación más estables para el cerio son +3 y +4, aunque el estado trivalente es el más común, siendo el cloruro de cerio (III) heptahidratado (CeCl₃·7H₂O) la principal fuente comercial de Ce³⁺. Por este hecho el CeCl₃ ha sido ampliamente usado en un amplio número de aplicaciones tanto industriales como de investigación, conectando la Química con otras disciplinas tales como la Ciencia de Materiales,^{496,497} la Física^{498,499} y la Biología.^{500,501} Además, en la Química Orgánica se está produciendo un interés creciente tanto en la llamada “Química Verde” (o respetuosa con el medio ambiente), como en las transformaciones químicas con economía (o eficiencia) atómica.⁵⁰² Investigaciones recientes han puesto de manifiesto las aplicaciones del tricloruro de cerio como un ácido de Lewis apto para *Química Verde*, de reducido impacto ambiental, y eficaz en síntesis orgánica moderna.⁵⁰³

A estas propiedades hay que sumar el carácter oxofílico, un factor crucial en la quimio, regio y estereoselectividad de transformaciones

⁴⁹⁶ Polard, I.; Sonm, A.; Guillame, S. M. *Chem. Eur. J.*, **2004**, *10*, 4054-4062.

⁴⁹⁷ Evans, W. J.; Giarikos, D. G.; Allen, N. T. *Macromolecules*, **2003**, *36*, 4256-4257

⁴⁹⁸ Charbonnière, L.; Ziessel, R.; Guardigli, M.; Roda, A.; Sabbatini, N.; Cesario, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2436-2437.

⁴⁹⁹ Parker, D. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 109-130.

⁵⁰⁰ Andre, J. P.; Gerald, C. F. G. C.; Martins, J. A.; Merbach, A. E.; Prata, M. I. M.; Santos, A. C.; de Lima, J. J. P.; Toth, E. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5804-5816.

⁵⁰¹ Sammes, P. G.; Yahioğlu, G. *Nat. Prod. Rep.*, **1996**, *13*, 1-28.

⁵⁰² Trost, B. M. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 695-705.

⁵⁰³ Sabitha, G.; Yadav, J. S. In *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; Paquette, L. A., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2006.

promovidas por Cerio (III),⁵⁰⁴ su baja toxicidad (similar a la del cloruro sódico),⁵⁰⁵ fácil manejo, bajo coste, estabilidad y capacidad de recuperación de disoluciones acuosas.^{506,507}

Una de las principales ventajas de las sales de lantánido (III) en general y de cerio (III) en particular es que pueden ser utilizados como ácidos de Lewis incluso en condiciones acuosas, salvando las dificultades que presentan los ácidos de Lewis que reaccionan con más avidez por el agua que por el sustrato.⁵⁰⁸

El $CeCl_3 \cdot 7H_2O$, ácido de Lewis barato e inocuo, es capaz de desproteger quimoselectivamente alcoholes protegidos como éteres de metoxietoximetilo (MEM),⁵⁰⁹ dejando intactos otros grupos protectores sensibles a los ácidos de Lewis tales como *terc*-BuMe₂Si-, *terc*-BuPh₂Si-, PMB (*p*-metoxibencil) y grupos isopropilideno. Con tricloruro de cerio heptahidratado ocurre una activación moderada,⁵¹⁰ pero en combinación con yoduro sódico se amplía su rango de aplicaciones, pudiendo desproteger grupos como los éteres de PMB tal como se describe en el **Esquema 6.1**.

⁵⁰⁴ Edelman, F. T. *Top. Curr. Chem.* **1996**, *179*, 247-276.

⁵⁰⁵ *Lanthanides in Organic Synthesis*; Academic Press: New York, 1994; p 5.

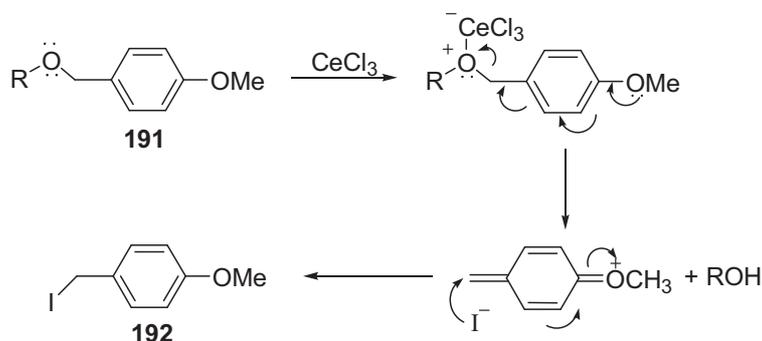
⁵⁰⁶ Bose, D. S.; Fatima, L.; Mereyala, H. B. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 587-590.

⁵⁰⁷ Cappa, A.; Marcantoni, E.; Torregiani, E.; Bartoli, G.; Bellucci, M. C.; Bosco, M.; Sambri, L. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5696-5699.

⁵⁰⁸ Kobayashi, S.; Manabe, K. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 209-217

⁵⁰⁹ Sabitha, G.; Babu, R. S.; Rajkumar, M.; Srividya, R.; Yadav, J. S. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1149-1151.

⁵¹⁰ Kobayashi, S.; Busujima, T.; Nagayama, S. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3491-3494.



Esquema 6.1

Al ser el CeCl_3 un ácido de Lewis duro, es capaz de formar con NaI un complejo ión yoduro-ácido de Lewis débil y lábil.⁵⁰⁷ Este complejo sigue presentando un fuerte carácter de ácido de Lewis, ya que los sitios libres del cerio resultan ser especialmente activos hacia una fuerte coordinación con bases de Lewis. Así pues, siendo el NaI un reactivo económico que no presenta ecotoxicidad es posible considerar el sistema $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{NaI}$ como uno de los catalizadores más baratos, efectivos y respetuoso con el medio ambiente en Química Orgánica contemporánea.⁵¹¹⁻⁵¹³

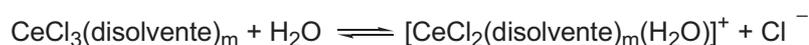
El agua de hidratación es otro componente importante en el sistema de reacción. Es conocido que la catálisis en presencia de agua depende de la capacidad del catalizador para tolerar el agua por un lado, y permanecer activo por otro. El $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{NaI}$ actúa mejor en presencia de agua, y la actividad del sistema se ve incrementada. Cuando se emplea CeCl_3 anhidro

⁵¹¹ Yadav, J. S.; Subba Reddy, B. V.; Chandrakauth, D.; Satheesh, G. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8040-8042.

⁵¹² Yadav, J. S.; Subba Reddy, B. V.; Narayane Kumar, G. G. K. S.; Madhusudhan Reddy, G. *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 426-427.

⁵¹³ Bartoli, G.; Marcantoni, E.; Marcolini, M.; Sambri, L. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6104-6143.

en disolvente seco, no hay actividad del catalizador CeCl₃-NaI, pero añadiendo un equivalente de agua a la mezcla de reacción, la reactividad es la misma que la observada con la sal de cerio heptahidratada.⁵¹⁴ Por lo tanto, el átomo de cerio podría necesitar coordinación con una o más moléculas de agua para generar especies completamente activas.^{515,516} Narayan y col.⁵¹⁷ proponen un mecanismo según el cual se promueve la disociación de un anión cloruro para formar una especie ácido de Lewis más activa.



Recientemente el sistema CeCl₃·7H₂O-NaI ha encontrado un amplio rango de aplicaciones interesantes ácido de Lewis en muchas reacciones orgánicas importantes, incluidas la formación de enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo.⁵¹³ Los protocolos desarrollados son en la mayoría de los casos mejores que los ya existentes, en términos de selectividad y eficiencia.

Formación de enlaces Carbono-Carbono

Recientemente se ha publicado un procedimiento diastereoselectivo de tres componentes catalizado por el sistema CeCl₃·7H₂O-NaI para la síntesis de varias *trans* 3-mercapto-2-(1*H*)-piridinonas de interés

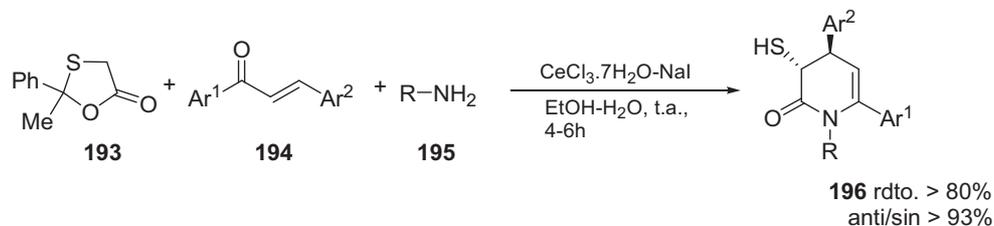
⁵¹⁴ Imamoto, T.; Takeda, N. *Org. Synth.* **1998**, *76*, 228-238.

⁵¹⁵ Evans, J. W.; Shreeve, J. L.; Ziller, J. W.; Doedens, R. J. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 576-585.

⁵¹⁶ Glinski, J.; Keller, B.; Legendziewicz, J.; Samela, S. *J. Mol. Struct.* **2001**, *559*, 59-66.

⁵¹⁷ Narayan, S.; Muldoon, J.; Finn, M. G.; Fokin, V. V.; Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 3275-3279

farmacológico,⁵¹⁸ (**Esquema 6.2**), obtenidas con buenos rendimientos (> 80%) y diastereoselectividad (> 93%).



Esquema 6.2

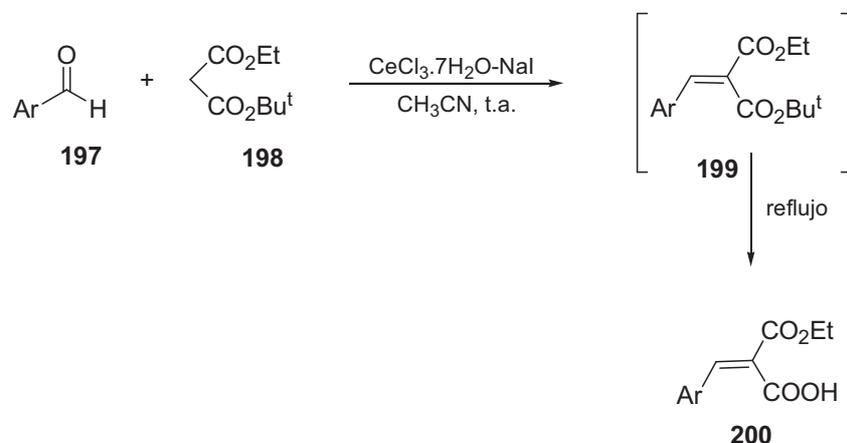
Este procedimiento de formación de 3-mercapto-2-(1*H*)-piridinonas implica una adición de Michael del tautómero enólico del heterociclo **193** a las chalconas **194**, seguido de la condensación del aducto de Michael con las aminas **195**, de acuerdo con la capacidad del sistema $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - \text{NaI}$ (1:1) para promover la adición de diversos nucleófilos a olefinas electrón-deficientes.⁵¹⁹ Esta síntesis supuso un considerable avance en operatividad y economía atómica.

El sistema de $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - \text{NaI}$ también puede ser usado como catalizador “verde”, suave y eficiente para la condensación de Knoevenagel de malonato de *terc*-butilo y etilo con aldehídos aromáticos o heteroaromáticos para obtener alquenos trisustituídos⁵²⁰ (**Esquema 6.3**).

⁵¹⁸ Yadav, L. D. S.; Kapoor, R. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4840-4844.

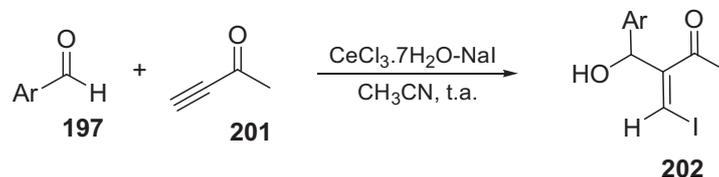
⁵¹⁹ Bartoli, G.; Marcantoni, E.; Sambri, L. *Synlett* **2003**, 2101-2116.

⁵²⁰ Bartoli, G.; Beleggia, R.; Giuli, S.; Giuliani, A.; Marcantoni, E.; Massaccesi, M.; Paoletti, M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6501-6504.



Esquema 6.3

Wei y col.^{521,522} utilizaron el $CeCl_3 \cdot 7H_2O-NaI$ para la preparación de los aductos de Baylis-Hillman (*Z*)- β -iodovinil cetonas en una reacción altamente estereoselectiva, ya que se obtienen exclusivamente isómeros (*Z*) con elevado rendimiento (**Esquema 6.4**).



Esquema 6.4

Se ha evaluado⁵²³ el catalizador $CeCl_3 \cdot 7H_2O-NaI/SiO_2$ en la reacción de García González,⁵²⁴ es decir, la condensación de Knoevenagel

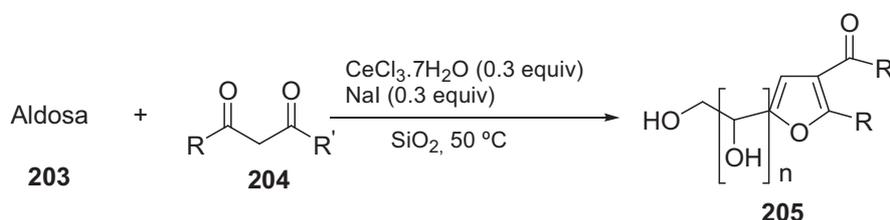
⁵²¹ Wei, H. X.; Hu, J.; Purkiss, D. W.; Pare, P. W. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 949-952.

⁵²² Li, G.; Wei, H. X.; Gao, J. J.; Johnson, J. *Synth. Commun.* **2002**, *32*, 1765-1773.

⁵²³ Bartoli, G.; Fernández-Bolaños, J. G.; Di Antonio, G.; Foglia, G.; Giuli, S.; Gunnella, R.; Mancinelli, M.; Marcantoni, E.; Paoletti, M. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6029-6036.

⁵²⁴ García González, F.; Gómez Sánchez, A.; *Adv. Carbohydr. Chem.*, **1965**, *20*, 303-355.

de compuestos β -dicarbonílicos con carbohidratos desprotegidos, para dar furanos polihidroxialquilados. La reacción tiene lugar con buenos rendimientos a 50 °C con el sistema de $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ –NaI soportado sobre SiO_2 en ausencia de disolvente, usando 0.3 equivalentes de catalizador y 0.5 g de sílica por mmol de carbohidrato (**Esquema 6.5**). Los rendimientos (95% con glucosa) son bastante más elevados que los obtenidos usando como catalizador $ZnCl_2$ en la reacción original (<30%).⁵²⁵



Esquema 6.5

Recientemente Silveira y col.⁵²⁶ han descrito la síntesis de bis(indol)metanos utilizando la mezcla glicerina/ $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ como catalizador. El método es simple, limpio y general para la reacción de aldehídos aromáticos con indol.

Formación de enlaces carbono-heteroátomo

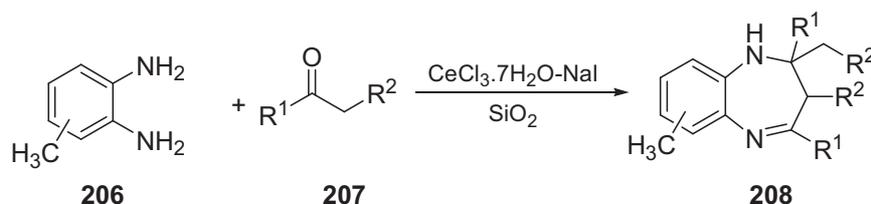
Spinelli y col.⁵²⁷ han llevado a cabo la adición-1,4 de bases de Fischer a nitroenaminas utilizando $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ –NaI/ SiO_2 en reacciones de

⁵²⁵ García González, F.; *Adv. Carbohydr. Chem.* **1956**, *11*, 97-143.

⁵²⁶ Silveira, C.C.; Mendes, S.R.; Líbero, F.M.; Lenardão, E.J; Perin, G. *Tetrahedron Letters*, **2009**, *50*, 6060–6063.

⁵²⁷ Attanasi, O. A.; Favi, G.; Filippone, P.; Forzato, C.; Giorni, G.; Morganti, S.; Nitti, P.; Pitocco, G.; Rizzato, E.; Spinelli, D.; Valentin, E. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 6420-6434.

formación de nuevos enlaces carbono-nitrógeno. Sabitha y col.^{509,528,529} han descrito la síntesis de 1,5-benzodiazepinas **208** usando el catalizador soportado sobre gel de sílice en ausencia de disolvente (**Esquema 6.6**).



Esquema 6.6

También se ha utilizado para la reacción de aza-Michael, entre aminas secundarias y (*Z*)-enonas⁵³⁰ para dar aminocetonas, muy útiles en la preparación de compuestos nitrogenados biológicamente activos.⁵³¹

Yadav y col.⁵³² mostraron que el glucal triacetato **209** reacciona con una variedad de alcoholes **210** en presencia del sistema $CeCl_3 \cdot 7H_2O-NaI$ en acetonitrilo a reflujo, rindiendo los correspondientes 2-deoxi- α -glicopiranosidos **211** con elevados rendimientos (**Esquema 6.7**).

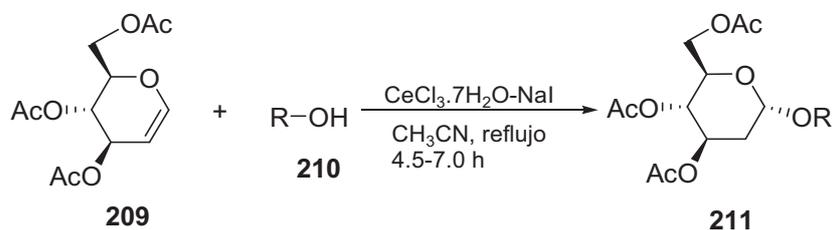
⁵²⁸ Sabitha, G.; Satheesh Babu, R.; Rajkumar, M.; Yadav, J. S. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 343-351.

⁵²⁹ Sabitha, G.; Satheesh Babu, R.; Rajkumar, M.; Srinivas Reddy, C.; Yadav, J. S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3955-3958.

⁵³⁰ Bartoli, G.; Bosco, M.; Marcantoni, E.; Petrini, M.; Sambri, L.; Torregiani, E. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 9052-9055

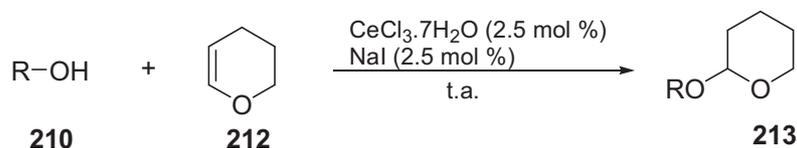
⁵³¹ Juaristi, E.; Lopez-Ruiz, H. *Curr. Med. Chem.* **1998**, *6*, 983-1004.

⁵³² Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Bhaskar Reddy, K.; Satyanarayana, M. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7009-7012.



Esquema 6.7

Esta misma metodología se ha aplicado a la protección de grupos hidroxilo por tetrahidropiranilación⁵³³ en ausencia de disolvente (**Esquema 6.8**).



Esquema 6.8

Los isoxazoles presentan diversas actividades biológicas, siendo buenos candidatos para el diseño de fármacos, como el recientemente registrado leflunomida (Arava[®]), un conocido inmunodepresor.⁵³⁴ Los isoxazoles también actúan como antiinflamatorios,⁵³⁵ anticonvulsiantes,^{536,537} antivirales,⁵³⁸⁻⁵⁴⁰ antibacterianos,⁵⁴¹ hipoglucémicos,⁵⁴² analgésicos⁵⁴³ e inmunológicos.^{544,545}

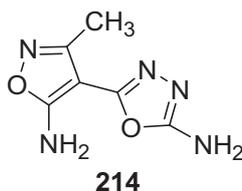
⁵³³ Bartoli, G.; Giovannini, R.; Giuliani, A.; Marcantoni, E.; Massaccesi, M.; Melchiorre, P.; Paoletti, M.; Sambri, L. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1476-1482.

⁵³⁴ Pinto, P.; Douglas, M.; *Acta Reumatol. Port.* **2006**, 31, 215-224.

⁵³⁵ Ko, D.-H.; Maponya, M. F.; Khalil, M. A.; Oriaku, E. T.; You, Z.; Lee, J. *Med. Chem. Res.* **1998**, 8, 313-324.

⁵³⁶ Lepage, F.; Tombret, F.; Cuvier, G.; Marivain, A.; Gillardin, J.M. *Eur. J. Med. Chem.*, **1992**, 27, 581-593.

Recientemente se ha demostrado el poder inmunosupresor del 5-(5-amino-3-metilisoxazol-4-il)-1,3,4-oxadiazol-2-amina **214**, un compuesto importante para el diseño de otras moléculas con alta actividad biológica.⁵⁴⁶



Algunos derivados del isoxazol han mostrado propiedades como inhibidores de la fosfatasa Ptp8 de la *Mycobacterium tuberculosis*,⁵⁴⁷ o de la oxidasa de D-aminoácidos.⁵⁴⁸

⁵³⁷ Eddington, N.D.; Cox, D.S.; Roberts, R.R.; Butcher, R.J.; Edafiohgo, I.O.; Stables, J.P.; Cooke, N.; Goodwin, A.M.; Smith, C.A.; Scott, K.R. *Eur. J. Med. Chem.*, **2002**, *37*, 635-648.

⁵³⁸ Diana, G.D.; Cutcliffe, D.; Oglesby, R.C.; Otto, M.J.; Mallamo, J.P.; Akullian, V.; McKinlay, M. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 450-455.

⁵³⁹ Lee, Y.-S.; Kim, B.H.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 1395-1397.

⁵⁴⁰ Tucker, J.A.; Clayton, T.L.; Chidester, C.G.; Schulz, M.W.; Harrington, L.E.; Conrad, S.J.; Yagi, Y.; Oien, N.L.; Yurek, D.; Kuo, M.-S. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 601-615.

⁵⁴¹ Kang, Y. Y.; Shin, K. J.; Yoo, K. H.; Seo, K. J.; Hong, C. Y.; Lee, C.-S.; Park, S. Y.; Kim, D. J.; Park, S. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 95-99.

⁵⁴² Conti, P.; Dallanoce, C.; Amici, M. D.; Micheli, C. D.; Klotz, K.-N. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 401-408.

⁵⁴³ Mishra, A.; Jain, S. K.; Asthana, J. G. *Orient. J. Chem.* **1998**, *14*, 151-152.

⁵⁴⁴ Ryng, S.; Machón, Z.; Wieczorek, Z.; Zimecki, M.; Mokrosz, M.J.; *Eur. J. Med. Chem.*, **1998**, *33*, 831-836.

⁵⁴⁵ Ryng, S.; Zimecki, M.; Sonnenberg, Z.; Mokrosz, M.J.; *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1999**, *332*, 158-162.

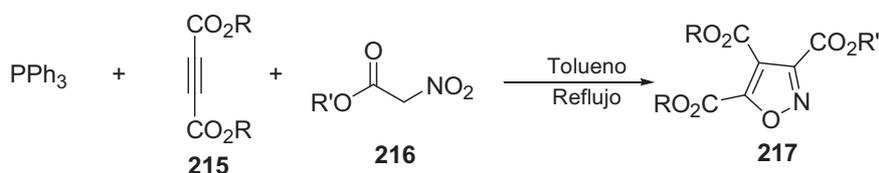
⁵⁴⁶ Ryng, S.; Zimecki, M.; Jezierska-Mazzarello, A.; Panek, J.J.; Maczynski, M.; Głowiak, T.; Sawka-Dobrowolska, W.; Koll, A.; *J. Mol. Struct.* **2011**, *999*, 60-67.

⁵⁴⁷ Soellner, M.B.; Rawls, K.A.; Grundner, C.; Alber, T.; Ellman, J.A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9613-9620.

⁵⁴⁸ Ferraris, D.; Duvall, B.; Ko, Y.-S.; Thomas, A.G.; Rojas, C.; Majer, P.; Hashimoto, K.; Tsukamoto, T.; *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3357-3359.

Desde un punto de vista sintético, los isoxazoles son una clase importante de compuestos heterocíclicos utilizados como sintones versátiles en síntesis orgánica. Pueden ser convertidos en unidades sintéticas importantes como β -hidroxicetonas,⁵⁴⁹ γ -aminoalcoholes,⁵⁵⁰ oximas α,β -insaturadas⁵⁵¹ y β -hidroxinitrilos.⁵⁵²

Se han descrito diversos métodos para la síntesis de isoxazoles.⁵⁵³ Por ejemplo, la reacción de acetilendicarboxilatos de dialquilo **215** con 2-nitroetanoatos de alquilo **216** en presencia de trifenilfosfina conduce a isoxazoles funcionalizados **217** con buenos rendimientos⁵⁵⁴ (**Esquema 6.9**).



Esquema 6.9

Zhu y col.⁵⁵⁵ han simplificado la síntesis de isoxazoles a partir de aldehídos, mediante la formación de oximas, cloración de las mismas y cicloadición 1,3-dipolar de dipolarófilos con óxidos de nitrilo generados *in situ* en una reacción *one-pot*. Este procedimiento es particularmente útil debido al ahorro de tiempo y costes para la obtención de isoxazoles a gran escala (**Esquema 6.10**).

⁵⁴⁹ Bode, J. W.; Carreira, E. M. *Org. Lett.* **2001**, 3, 1587-1590.

⁵⁵⁰ Muller, I.; Jager, V. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 4777-4780

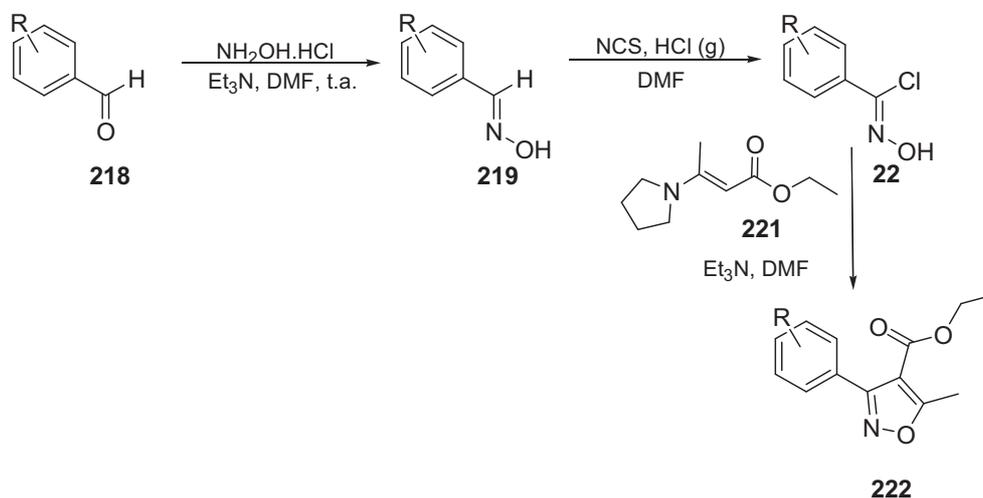
⁵⁵¹ Lee, S. Y.; Lee, B. S.; Lee, C.-W.; Oh, D. Y. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 256-257

⁵⁵² Yashiro, A.; Nishida, Y.; Kobayashi, K.; Ohno, M. *Synlett*, **2000**, 361-362.

⁵⁵³ Padwa, A., Pearson, W. H., Eds.; *Chemistry of Heterocyclic Compounds*; Wiley: Hoboken, **2002**; Vol. 59, pp 361-472.

⁵⁵⁴ Yavari, I.; Moradi, L.; *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 1627-1629.

⁵⁵⁵ Zhu, S.; Shi, S.; Gerritz, S.W. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 4001-4004.

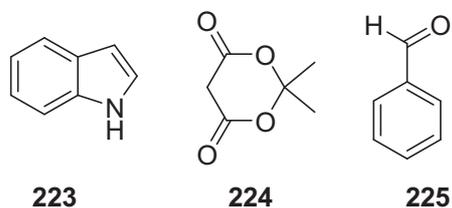


Esquema 6.10

6.2. Resultados y discusión.

Esta investigación se realizó en la Universidad de Camerino (Italia) bajo la supervisión del profesor Enrico Marcantoni.

El propósito de esta investigación consistía en el estudio de la reacción de adición nucleofílica entre el indol **223**, el ácido de Meldrum (2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona) **224** y benzaldehído **225**, catalizada por el sistema $CeCl_3 \cdot 7H_2O - NaI / SiO_2$.



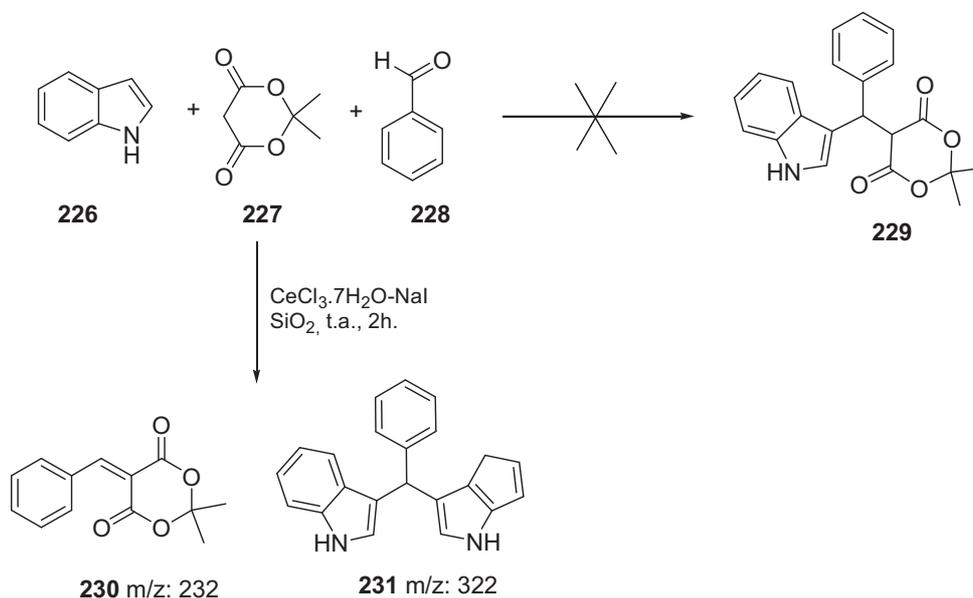
El ácido de Meldrum es un compuesto con un metileno activo preparado por Meldrum en 1908;⁵⁵⁶ la acidez de los protones unidos a su carbono central le confiere un interés especial para las reacciones de condensación con aldehídos y cetonas a través de la reacción de Knoevenagel.⁵⁵⁷

El catalizador de cerio (III) se preparó disolviendo 0.3 mmol de $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ y 0.3 mmol de NaI en 7 mL de acetonitrilo. Se añadieron 0.5 g de SiO_2 gruesa que permaneció en suspensión. La mezcla fue agitada durante toda la noche y al evaporar el disolvente se obtuvo el catalizador sólido, sobre el que se añadieron cantidades equimoleculares (1 mmol) de indol, ácido de Meldrum y benzaldehído, agitando a temperatura ambiente.

La reacción fue seguida mediante cromatografía de gases, y cromatografía de gases-masas. Tras dos hora de reacción no fue detectado el pico m/z 349 correspondiente al compuesto esperado **229**, sino los picos m/z 232 y 322 que pertenecen respectivamente a **230**, formado por condensación del carbono nucleofílico de **227** y el C=O de **228**, y el bis(indolilmetano) derivado **231**, resultante de la doble adición nucleofílica de indol a benzaldehído (**Esquema 6.11**).

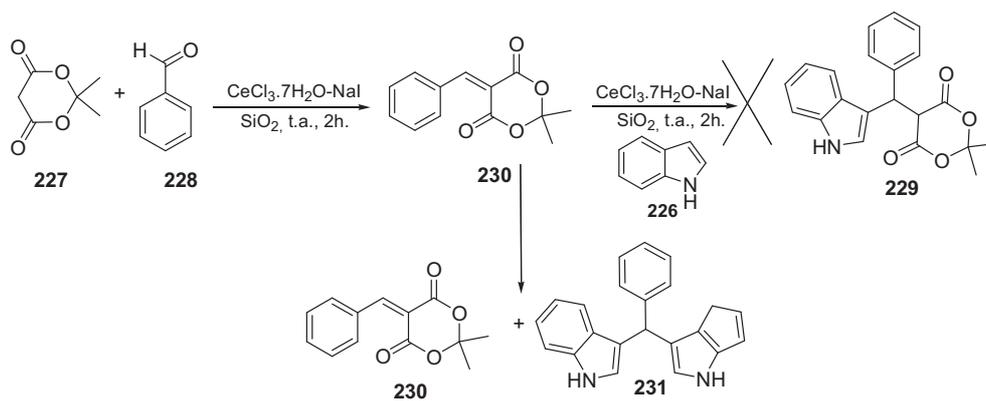
⁵⁵⁶ Meldrum, A. N.; *J. Chem. Soc.* **1908**, 93, 598–601.

⁵⁵⁷ Chen, B.-C. *Heterocycles* **1991**, 32, 529-597.



Esquema 6.11

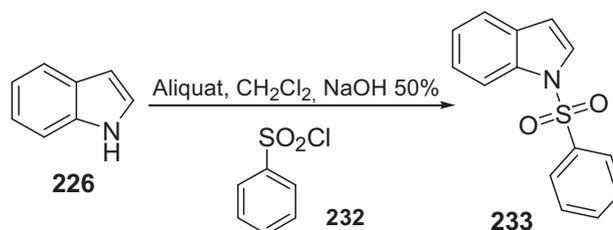
Una modificación del orden de adición de los reactivos, añadiendo en primer lugar **227** y **228** y, una vez formado el producto de condensación **230**, el indol **226**, también condujo a la formación de una mezcla de **230** y **231** (Esquema 6.12).



Esquema 6.12

En los casos en los que se intentó la reacción sin el catalizador de cerio (III) o sustituyendo el SiO_2 por acetonitrilo no se observó evolución alguna, obteniéndose los reactivos de partida sin reaccionar.

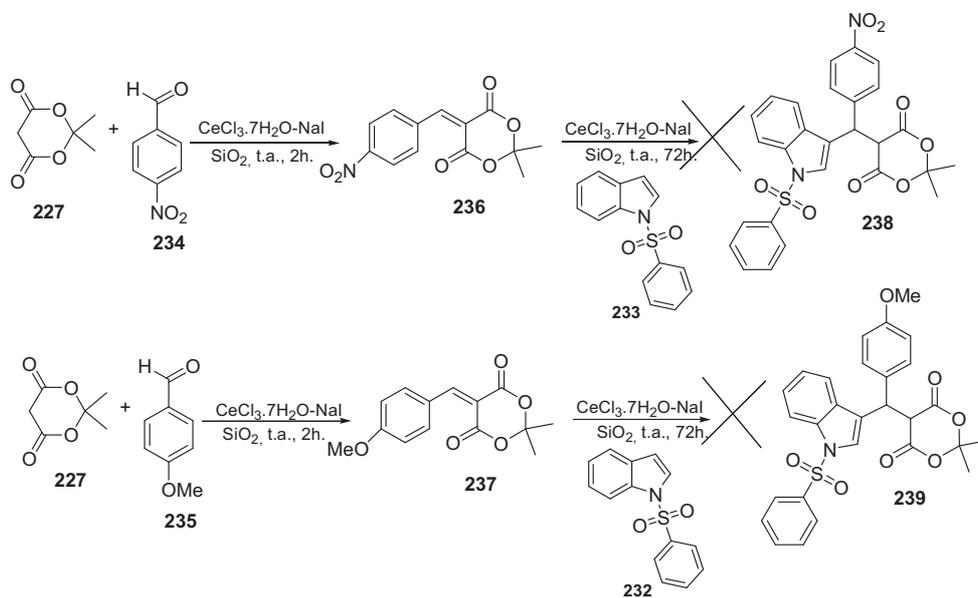
Con el objeto de reducir la elevada nucleofilia del indol, se preparó su sulfonilderivado **233** por reacción de **226** con cloruro de bencenosulfonilo **232** en diclorometano, usando como base NaOH al 50% y Aliquat® 336 como agente de transferencia de fase, según el método descrito por Ottoni y col.⁵⁵⁸ (Esquema 6.13).



Esquema 6.13

Por reacción del *p*-nitrobenzaldehído **234** y el *p*-anisaldehído **235** con el ácido de Meldrum en presencia de $CeCl_3-NaI/SiO_2$, se obtuvieron tras 2 horas de reacción, los productos de condensación **236** y **237** respectivamente, con rendimientos del 65% en ambos casos. Se ensayó la reacción de **236** y **237** con el sulfonilderivado **233** pero tras 72 horas de agitación, a temperatura ambiente con el catalizador de cerio soportado sobre sílice, en ninguno de los dos casos se obtuvieron los productos esperados **238** y/o **239** (Esquema 6.14).

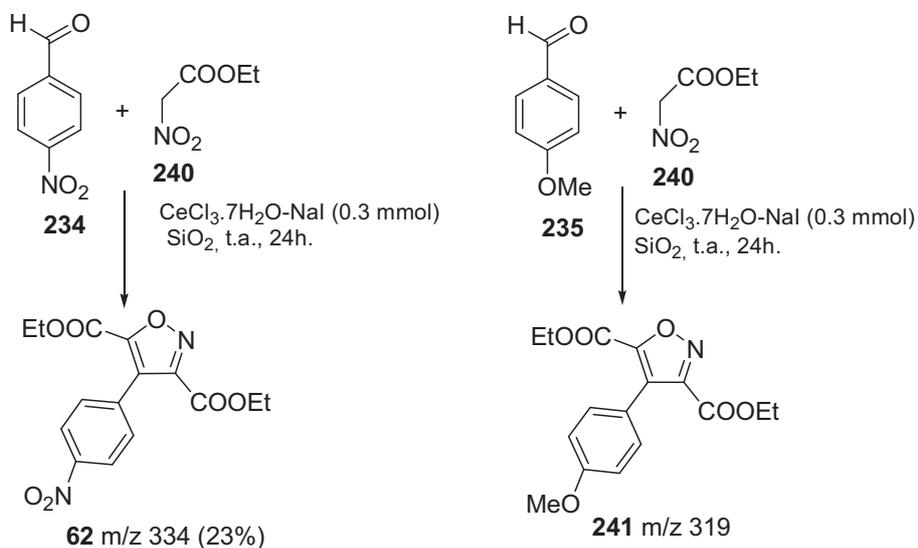
⁵⁵⁸ Ottoni, O.; Cruz, R.; Alves, R. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 13915-13928.



Esquema 6.14

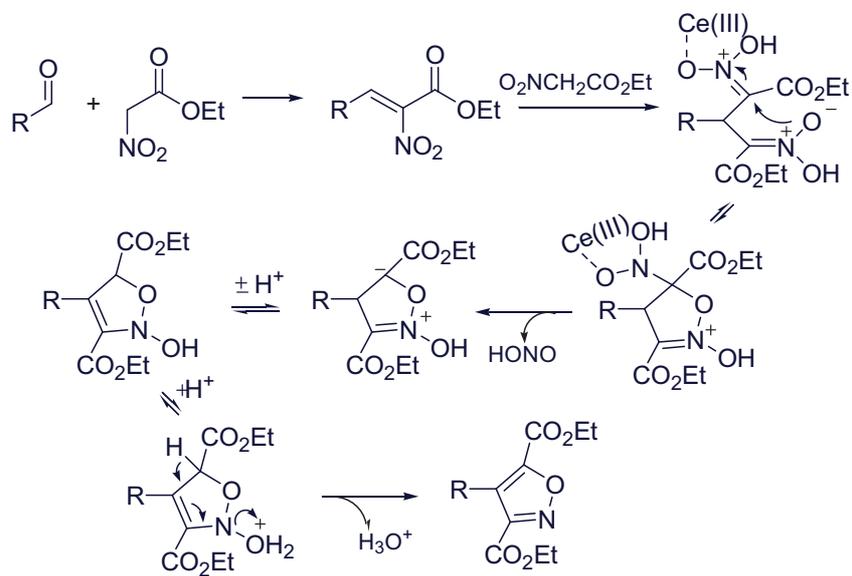
Por tanto, se concluyó que el sistema $CeCl_3 \cdot 7H_2O-NaI/SiO_2$, en general un potente catalizador para la obtención de aductos de Michael, no es adecuado para formar las estructuras que se pretenden. Se sustituyó el ácido de Meldrum por otro nucleófilo, el nitroacetato de etilo **240**.

La condensación de Knoevenagel de los aldehídos **234** y **235** con 1.2 equivalentes de nitroacetato de etilo condujo de manera inesperada a los isoxazoles **62** y **241**, aislándose **62** con un 23% de rendimiento (**Esquema 6.15**), no detectándose los esperados productos de adición. El isoxazol **241**, detectado por cromatografía de gases-masas, no pudo ser aislado del medio de reacción y caracterizado como compuesto puro.



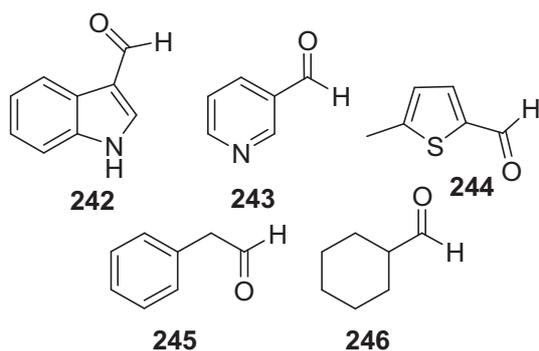
Esquema 6.15

El mecanismo propuesto para la obtención de derivados del isoxazol a partir de nitroacetato de etilo y aldehídos se muestra en el **Esquema 6.16**.

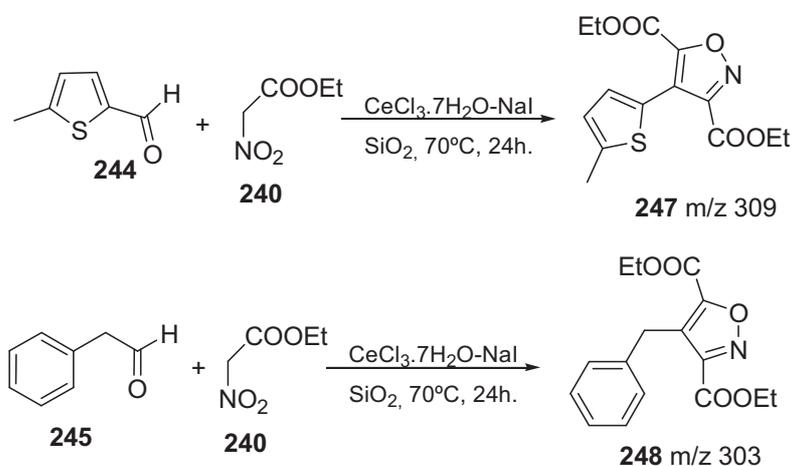


Esquema 6.16

Se realizaron nuevos ensayos utilizando como aldehídos los derivados comerciales **242–246**, añadiendo 2.2 equivalentes de nitroacetato de etilo, 0.3 equivalentes del catalizador $CeCl_3 \cdot 7H_2O-NaI/SiO_2$ y calentando a 70 °C durante 24 horas.

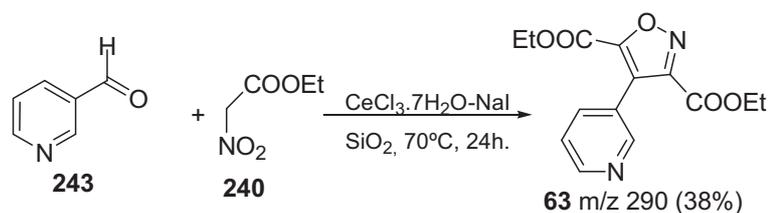


Las reacciones entre el nitroacetato de etilo y los aldehídos **242** y **246** no evolucionaron hacia la formación de los isoxazoles deseados. Sí se detectaron por cromatografía de gases-masas los picos m/z 309 y m/z 303 correspondientes a los isoxazoles **247** y **248** formados a partir de los aldehídos **244** y **245** respectivamente, aunque debido al escaso grado de evolución de la reacción no pudieron ser aislados y caracterizados como compuestos puros (**Esquema 6.17**).



Esquema 6.17

El isoxazol **63** se obtuvo con un 38 % de rendimiento a partir de piridina-3-carbaldehído **243** (Esquema 6.18).

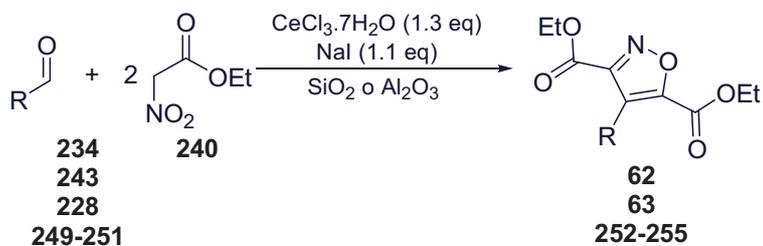


Esquema 6.18

Los datos espectroscópicos confirman las estructuras propuestas para los isoxazoles **62** y **63**.

En posteriores investigaciones, el grupo de investigación del profesor Marcantoni ha conseguido optimizar el procedimiento para la obtención de isoxazoles a partir de aldehídos, utilizando 1.3 equivalentes de $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ y 1.1 equivalentes de NaI , siendo los soportes tanto SiO_2 como Al_2O_3 (Esquema 6.19). De esta forma se han conseguido mejorar los

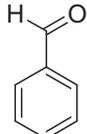
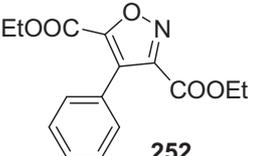
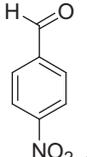
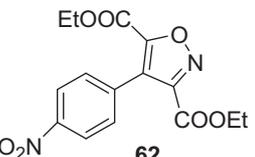
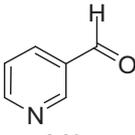
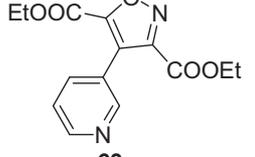
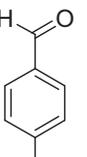
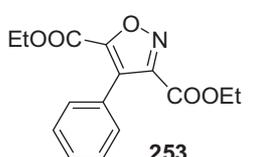
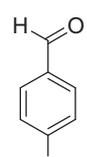
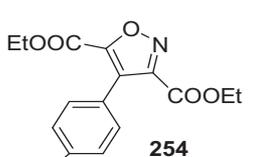
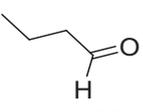
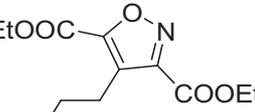
rendimientos de **62** y **63** hasta el 57 y 62 % respectivamente, además de aislar y caracterizar los nuevos isoxazoles **252–255**. (Tabla 6.1)



Esquema 6.19

Este trabajo servirá de base para futuras investigaciones en síntesis de isoxazoles con distintos sustituyentes alcoxicarbonilo en las posiciones 3 y 5 del anillo de isoxazol.

Tabla 6.1.

Aldehído	Soporte	Isoxazol	Rendimiento
 228	Al_2O_3 o SiO_2	 252	63 %
 234	Al_2O_3	 62	57 %
 243	SiO_2	 63	62 %
 249	Al_2O_3	 253	54 %
 250	Al_2O_3 o SiO_2	 254	53 %
 251	SiO_2	 255	52 %

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

PRIMERA

Se ha desarrollado una nueva ruta de síntesis de dopamina (**3**) a partir de hidroxitirosol, bien de forma directa en tres pasos vía el azido derivado **2** o bien en cuatro pasos empleando una estrategia de protección-desprotección de los hidroxilos aromáticos del hidroxitirosol con el grupo *o*-xililenodiilo.

SEGUNDA

Se ha desarrollado la síntesis de los *O*- β -D-glucopiranosil y *O*- β -D-galactopiranosil derivados de dopamina a partir de hidroxitirosol, como mezclas de regiosómeros no separables cromatográficamente.

TERCERA

Se han sintetizado las primeras selenoureas derivadas de dopamina por reacción entre el hidrocloreto de dopamina (**3**) y su homólogo di-*O*-metilado, homoveratrilamina, (**30**) con isoselenocianatos aromáticos no comerciales.

CUARTA

Se han obtenido los primeros selenuros, diselenuros y selenonios de hidroxitirosilo con los hidroxilos del fragmento catecol libres o protegidos con grupos *O*-acetilo, *O*-metilo y *O*-xililenodiilo.

QUINTA

Se ha abordado la síntesis de nuevas tioureas por reacción entre el hidrocloreto de dopamina (**3**) con isotiocianatos comerciales. Hemos desarrollado también la transformación de dichas tioureas en 2-amino-dihidro- y 2-imino-tetrahidro-1,3-benzotiazepinas por oxidación de las tioureas con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ), y purificación mediante una estrategia de acetilación-desacetilación.

SEXTA

La mayoría de los nuevos productos sintetizados en esta Tesis han sido ensayados en pruebas *in vitro* (poder antioxidante de reducción férrica, capacidad de captación de radicales DPPH, capacidad de captación de radicales ABTS, inhibición de la oxidación primaria y secundaria del ácido linoleico), comprobándose que en la mayoría de los casos los nuevos compuestos preparados superan ampliamente la actividad mostrada por el hidroxitirosol (**64**) de partida.

SÉPTIMA

Se ha estudiado la inhibición *in vitro* de la actividad de la enzima tirosinasa por hidroxitirosol (**64**), 3,4-DHFG (**190**), y por diversos compuestos obtenidos en este trabajo. Se ha comprobado un efecto de inhibición de la actividad monofenolasa de la enzima al utilizar L-tirosina como sustrato, y selenonio **43** como inhibidor, tanto a una concentración elevada (672 μM , 42.6%) como diluida (11.2 μM , 42.2%). Para el hidroxitirosol, 3,4-DHFG y el diselenuro **42** se llegan a obtener inhibiciones

del orden del 29-30%. El diselenuro **42** es activo incluso en el rango nanomolar (50 nM, 12.8 %).

OCTAVA

Se ha estudiado, utilizando L-DOPA como sustrato, la inhibición de la actividad de difenolasa por hidroxitirosol, 3,4-DHFG y una serie de compuestos preparados en esta Tesis. Se ha comprobado que actúan como moderados inhibidores, siendo la actividad no dependiente de la concentración.

NOVENA

Se han realizado estudios de inhibición del pardeamiento en manzanas y actividad antimelanósica en camarones con hidroxitirosol (**64**), 3,4-DHFG (**190**) y la mayoría de los nuevos compuestos, con resultados negativos para los ensayos de pardeamiento y positivos en la mayoría de los casos para la actividad retardante de la melanosis en camarones. El 3,4-DHFG y el diselenuro **42** mostraron los mejores efectos retardantes a baja concentración (0.001 – 0.05 mM).

DÉCIMA

Se ha realizado el estudio de la actividad antioxidante *ex vivo* de las selenoureas **25-27**, el selenuro **42**, el selenonio **43** y las tioureas **45-49** frente a la degradación de lípidos insaturados de microsomas de hígado de ratas alimentadas con dieta deficiente en vitamina E, comprobándose que la adición las selenoureas **25-27** y del diselenuro **42** suplementan a nivel oxidativo la falta de vitamina E en la dieta durante el tiempo de carencia. El

carácter protector de estos compuestos en estos microsomas es muy superior al del hidroxitirosol y al del 3,4-DHFG, que a concentraciones de 0.1–0.25 mM se comportan como prooxidantes.

UNDÉCIMA

Se ha evaluado la capacidad antitumoral de las selenoureas **26** y **27**, el diselenuro **42** y del selenio **43** como inductores de apoptosis en las líneas celulares A-375 (melanoma), SF-268 (glioblastoma) y NCI-H460 (cáncer de pulmón). Todos los selenocompuestos analizados han resultado ser mucho más activos que el HT. Frente a A-375 y SF-268 el más activo resultó ser **42** (IC₅₀ 0.48 y 0.36 μM) y frente a NCI-H460 el selenio **43** (IC₅₀, 1.07 μM)

DUODÉCIMA

Se ha desarrollado una estrategia sintética para la síntesis de los isoxazoles **62** y **63** a partir de aldehídos aromáticos y heteroaromáticos por reacción con nitroacetato de etilo, utilizando el catalizador CeCl₃·7H₂O–NaI/SiO₂ en reacciones sin disolvente.

8. CONCLUSIONS

FIRST

A new strategy in three steps for the synthesis of dopamine (**3**) from hydroxytyrosol has been developed, without protection of aromatic hydroxyl groups via azido derivative **2**, or in four steps through hydroxyl protection with a xylylenediyl group.

SECOND

Syntheses of *O*- β -D-glucopyranosyl and *O*- β -D-galactopyranosyl derivatives of dopamine, as non resolved regioisomer mixtures, have been carried out.

THIRD

The first selenoureas derived from dopamine have been prepared by coupling of dopamine hydrochloride (**3**) or its di-*O*-methyl derivative, homoveratrylamine, (**30**) with non-commercial aromatic isoselenocyanates.

FOURTH

The syntheses of hydroxytyrosyl selenides, diselenides and selenonia having the catechol moiety free or protected with *O*-acetyl, *O*-methyl and *O*-xylylenediyl groups have been developed.

FIFTH

The synthesis of new thioureas by coupling of dopamine hydrochloride (**3**) with commercial isothiocyanates has been accomplished. We have also studied the transformation of those thioureas into 2-amino-

dihydro and 2-imino-tetrahydro-1,3-benzothiazepines by thiourea oxidation with 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ). The heterocyclic compounds were purified following an acetylation/deacetylation strategy.

SIXTH

The antioxidant and antiradical activities of most of the new compounds prepared in this thesis have been tested *in vitro* following different assays (ferric-reducing antioxidant power assay, DPPH free radical scavenging capacity method, ABTS free radical scavenging method, inhibition of primary and secondary oxidation of linoleic acid). Most of the new compounds showed to be more active than starting hydroxytyrosol (**64**).

SEVENTH

The *in vitro* inhibition of tyrosinase by hydroxytyrosol (**64**), 3,4-dihydroxyphenylglycol (**190**), and a series of the new compounds obtained in this thesis has been studied. Monophenolase has been strongly inhibited using tyrosine as substrate, and selenonium **43** as inhibitor, at high and low concentrations (672 μM , 42.6%; 11.2 μM , 42.2%). Inhibitions of about 29-30% are obtained with HT, 3,4-DHPG and diselenide **42**. The last one is active in the nanomolar range (50 nM, 12.8%).

EIGHTH

The inhibition of diphenolase activity of tyrosinase has been assessed using L-DOPA as substrate and hydroxytyrosol, 3,4-DHPG, and a

series of synthesized compounds as inhibitors. Moderate inhibitions in a no concentration-dependent manner have been observed.

NINTH

Anti-browning of apples and antimelanotic activity on small shrimps by hydroxytyrosol (**64**), 3,4-dihydroxyphenylglycol (**190**) or most of the new compounds showed negative results for the browning assays and effective retarding melanosis on shrimps. The 3,4-DHPG and the diselenide **42** showed the best retarding effects at low concentrations (0.001 – 0.05 mM).

TENTH

Ex vivo antioxidant activity of selenoureas **25-27**, selenide **42**, selenonium **43** and thioureas **45-49** against unsaturated lipid degradation of rat liver microsomes fed with a vitamin E deficient diet has been checked. The results indicated that the addition of selenoureas and selenide supplements, at oxidative levels, the lack of vitamin E in the diet during the deprivation period. The protective nature shown by these compounds in the microsomes is much higher than the one shown by hydroxytyrosol and by 3,4-dihydroxyphenylglycol, which at 0.1–0.25 mM behave as pro-oxidants.

ELEVENTH

Antitumor activity of selenoureas **26** and **27**, diselenide **42** and selenonium **43** has been evaluated by studying induced apoptosis in A-375 (melanoma), SF-268 (glioblastoma) and NCI-H460 (lung cancer) cell lines. The selenocompounds were found to be much more active than

hydroxytyrosol; diselenide **42** was the most active against A-375 and SF-268 cell lines (IC_{50} 0.48 and 0.36 μ M), whereas selenonium **43** was the most active against NCI-H460 (IC_{50} 1.07 μ M).

TWELFTH

A synthetic strategy for the synthesis of isoxazoles **62** and **63** from aromatic and heteroaromatic aldehydes by reaction with ethyl nitroacetate, using $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ –NaI/SiO₂ as catalyst in solvent-free reactions, has been developed.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. MÉTODOS GENERALES

Los *puntos de fusión* se han medido en un aparato analógico Electrothermal y en uno digital Electrothermal 9200 y no están corregidos.

La *cromatografía de capa fina (c.c.f.)*, con fines cualitativos, se ha llevado a cabo utilizando láminas de aluminio prefabricadas para cromatografía en capa fina de gel de sílice (Merck 60 F254) de 0.2 mm de espesor. Como eluyentes se han empleado los que se indican en cada caso y como reveladores H₂SO₄ etanólico al 10%, ninhidrina (ninhidrina al 0.1% en etanol de 96%), revelador de Mostain (5 g de molibdato amónico tetrahidratado y 0.1 g de sulfato cérico-amónico en 100 mL de H₂SO₄ al 10%), permanganato potásico (3 g KMnO₄, 20 g K₂CO₃ y 5 mL NaOH al 10% en 300 mL de agua) y luz ultravioleta de longitud de onda de 254 nm.

Para la *cromatografía en columna*, con fines preparativos, se ha empleado como fase estacionaria gel de sílice (*Merck 60*; tamaño de partícula 0.040-0.063 mm), eluyendo por gravedad o sometiendo a una ligera presión. Los eluyentes empleados se indican en cada caso.

Para la *cromatografía de capa preparativa* se han utilizado placas cromatográficas de vidrio recubiertas de gel de sílice (Merck 60 F254) de espesor aproximado de 1 mm, y como eluyentes los que se indican en cada caso.

Las **medidas de pH** se realizaron con un pH-metro de la marca Crison modelo Microcrison pH 2001, calibrando el aparato al menos una vez al día con tampones comerciales pH=4 y pH=7.

La **rotación óptica** se ha medido en un espectropolarímetro Perkin-Elmer modelo 241 MC y en un polarímetro Jasco modelo P-2000, empleando la línea de emisión del sodio (λ 598 nm) en celdas de 1 cm ó 1 dm, y como disolventes los que se indican en cada caso.

Los **espectros de infrarrojo** se han registrado en un espectrofotómetro FT-IR BOMEM MB-120 empleando pastillas de bromuro potásico, y en un espectrómetro Jasco modelo FT/IR-4100, aplicando directamente sobre la lente el sólido o sirupo.

Los **espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN** se han registrado en espectrómetros, Bruker AMX 300, Bruker AMX 500, Bruker AV 300 y Bruker AV 500. Se han empleado como disolventes D_2O , CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$, $\text{MeOH-}d_4$, y $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Los valores de desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm, tomando como referencia el tetrametilsilano ($\delta=0$) o calibrando respecto a las señales del disolvente, y los valores de constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz. La asignación de las señales de ^1H RMN se ha facilitado mediante experimentos de correlación homonuclear 2D COSY (Correlated Spectroscopy). La asignación de las señales de ^{13}C RMN se completó mediante el empleo de técnicas de correlación 2D HETCOR (Heteronuclear Correlated Spectroscopy) y correlación DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer).

Los *espectros de masas* se han realizado en espectrómetros Kratos MS 80 RFA y Micromass AutoSpeQ. Las diferentes experiencias realizadas en cada uno de estos aparatos fueron:

Equipo Kratos MS 80 RFA

- Ionización por Impacto Electrónico (EI) a 70 eV; corriente de ionización de 100 μA ; voltaje acelerador de 4 kV; resolución 1000 ó 10000 (definición del 10% de valle) y velocidad de barrido de 3 ó 10 s/dec respectivamente.

- Ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB, Fast Atom Bombardment). El gas empleado fue argon o xenon. Voltaje acelerador de 7-8 kV en el cañón del gas; 1 μA , $2 \cdot 10^{-4}$ mbar. Voltaje acelerador de 4 kV. Resolución de 1000 ó 10000 (definición del 10% de valle) y velocidad de barrido de 3 ó 10 s/dec. respectivamente. Las matrices usadas fueron tioglicerol y alcohol *m*-nitrobencílico.

- Ionización química (CI, Chemical Ionization) a 150 eV, usando como gas reactivo isobutano a una presión de 0.8 bar, corriente de 500 μA , voltaje acelerador de 4 u 8 kV, resolución 1000 (definición del 10% de valle) y velocidad de barrido de 10 s/dec.

Equipo Micromass AutoSpeQ:

- FAB-LSIMS (FAB-Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry). Se empleó cañón de Cs (35 kV y 2 μA) con sonda de muestra y fuente de FAB. Voltaje acelerador de 8 kV, $2 \cdot 10^{-4}$ mbar. Voltaje acelerador de 4 kV. Resolución 10000 (definición del 5% de valle) y velocidad de barrido de 5

s/dec. Las matrices usadas fueron tioglicerol y alcohol *m*-nitrobencílico. Como referencias internas se emplearon PEG-400, 600, 900 y 1000.

- Ionización química (CI, Chemical Ionization) a 150 eV, usando como gas reactivo metano e isobutano a una presión de 0.8 bar, corriente de 500 μ A, voltaje acelerador de 8 kV, resolución 10000 (definición del 5 % de valle) y velocidad de barrido de 5 s/dec.

Los espectros mediante técnica de electrospray fueron llevados a cabo en un espectrómetro Micromass LC-TOF.

Las *lecturas de microplatos* se llevaron a cabo en un aparato Microplate Reader iMark de la marca BioRad.

Las *medidas de absorbancia UV/Vis* se realizaron en un espectrofotómetro Jasco V-350.

Las *medidas de los parámetros L^* , a^* y b^** se realizaron en un colorímetro KONICA MINOLTA CR-400.

8.2. SECADO DE DISOLVENTES Y REACTIVOS

Anhídrido acético.

Se seca sobre P_2O_5 durante 3 horas, se decanta y se seca de nuevo sobre K_2CO_3 durante 3 horas más. A continuación se destila con rectificación.

N,N-Dimetilformamida.

Destilada a presión reducida previo secado sobre BaO (50 °C, 5 mm).

Piridina anhidra.

Se calienta a reflujo durante una hora sobre hidróxido de potasio y se destila con columna de fraccionamiento.

Diclorometano.

Secado sobre CaCl_2 18 horas y destilado sobre P_2O_5 en atmósfera de Ar, recogién dose sobre tamiz molecular de 4 Å.

Tolueno.

Secado sobre P_2O_5 durante 12 h y destilación sobre el mismo desecante, recogién dose sobre tamiz molecular de 4 Å.

Trietilamina.

Secado sobre KOH durante 12 h y destilación con rectificación sobre P_2O_5 , recogién dose sobre tamiz molecular de 4 Å.

8.3. PRODUCTOS COMERCIALES

2,2'-Azo-bis(2-metil-propionamidina) dihidrocloruro granular (ABAP)
(Sigma-Aldrich)

1,4 Fenilendiamina (Panreac)

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno [DBU] (Sigma Aldrich)

2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfúrico) sal diamónica ABTS
(Fluka)

2,2'-Bipiridilo (Aldrich)

2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich)

2,3-Diciano-5,6-dicloro-1,4-benzoquinona [DDQ] (Acros Organics)
Acetobromo α -D-galactosa (Sigma Aldrich)
Acetobromo α -D-glucosa (Sigma Aldrich)
 α,α' -Dicloroxileno (Acros Organics)
 α -Tocoferol (Sigma-Aldrich)
Acetato de etilo (SDS)
Acetonitrilo (Acros Organics)
Ácido 2-tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich)
Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich)
Ácido acético (Sigma-Aldrich)
Ácido ascórbico anhidro (Sigma-Aldrich)
Ácido cafeico (Sigma-Aldrich)
Ácido cítrico monhidrato (Panreac)
Ácido clorhídrico (Panreac)
Ácido fórmico (Panreac)
Ácido fosfórico (Sigma-Aldrich)
Ácido gálico (Sigma-Aldrich)
Ácido kójico (Sigma-Aldrich)
Ácido linoleico (Sigma-Aldrich)
Ácido tricoloroacético (Panreac)
Anhídrido acético (Sigma Aldrich)
Anisidina (Scharlau)
Ascorbato sódico (Acros Organics)
Azida sódica (Sigma Aldrich)

Bencil isotiocianato (Sigma Aldrich)
Bicarbonato sódico (Sigma Aldrich)
Borohidruro sódico (Merk)
Bromuro de 3,4-dihidroxifenetilo (Sigma Aldrich)
Bromuro de tetrabutilamonio (Sigma Aldrich)
Butanol (Sigma-Aldrich)
Butanona (Panreac)
Butil isotiocianato (Sigma Aldrich)
Carbonato cálcico (Sigma Aldrich)
Carbonato potásico (Sigma Aldrich)
Cloruro de hierro (II) tetrahidrato (Sigma-Aldrich)
Cloruro de hierro (III) (Sigma-Aldrich)
Cloruro de *tert*-butildifenilsililo (Sigma Aldrich)
Cloruro de *p*-tolueno-4-sulfonilo (Sigma Aldrich)
Cloruro potásico (Scharlau)
Cloruro sódico (Panreac)
Diclorometano (SDS)
Dihidrógenofosfato de sodio (Panreac)
Dimetilformamida (Panreac)
Dioxano (Sigma-Aldrich)
Dopamina hidrocloreto (Acros Organics)
Etanol (Panreac)
Éter dietílico (SDS)
Fenil isotiocianato (Sigma Aldrich)

Ferrocianuro potásico (Merk)
Ferrozina (Sigma-Aldrich)
Formanilida (Acros Organics)
Formiato de etilo (Panreac)
Hexano (SDS)
Hidrogenofosfato de disodio (Panreac)
Hidrosulfito sódico (Sigma Aldrich)
Hidróxido de paladio sobre carbón activo (Sigma Aldrich)
Hidróxido de potasio (Riedel-de Haën)
Hidróxido de sodio (SDS)
Imidazol (Sigma Aldrich)
Lauril sulfato sódico (SDS) (Merk)
L-DOPA (Sigma-Aldrich)
Metanol (Sigma Aldrich)
Metil isotiocianato (Sigma Aldrich)
Nitrato sódico (Sigma Aldrich)
Paladio sobre carbón activo (Sigma Aldrich)
Peroxodisulfato de potasio (Sigma-Aldrich)
Piridina (Panreac)
Potasio dihidrógeno fosfato (Sigma-Aldrich)
p-Tolil isotiocianato (Sigma Aldrich)
Selenio negro (Merk)
Sulfato magnésico (Panreac)
TBAB (Sigma Aldrich)

Tetrabromuro de carbono (Sigma Aldrich)
Tetrahidrofurano (Acros Organics)
Tiocianato potásico (Sigma-Aldrich)
Tirosina (Sigma-Aldrich)
Tirosinasa de hongos (Sigma-Aldrich)
Tolueno (Sigma Aldrich)
Toluidina (Scharlau)
Tribromuro de boro (Acros Organics)
Trietilamina (Sigma Aldrich)
Trifenilfosfina (Panreac)
Trifosgeno (Acros Organics)
Yema de huevo liofilizada (Sigma-Aldrich)

8.4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

8.4.1.- Poder de reducción del hierro.

Se usó la modificación del método de Psarra y col.⁵⁵⁹ por Jiménez y col.⁵⁶⁰ Se empleó FeCl₃ como oxidante. Para la determinación del poder reductor se utilizó un lector de microplacas Bio-Rad iMark. En cada pocillo se añadieron por cuadruplicado 10 µL de cada estándar y 10 µL de FeCl₃ 6 mM en ácido cítrico 5 mM. Para cada muestra se incluyó un blanco sin

⁵⁵⁹ Psarra, E.; Makris, D. P.; Kallithraka, S.; Kefalas, P. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 1014-1020.

⁵⁶⁰ Jiménez, A.; Rodríguez, R.; Jaramillo, S.; Rodríguez, G.; Espejo, J.A.; Guillén, R.; Fernández-Bolaños J., Heredia, A. *J. Agric. And Food Chem.*, **2005**, *53*, 5212-5217.

FeCl₃. La placa se incubó durante 20 minutos a 50 °C. A continuación se agregaron 180 µL de una disolución de bipyridilo 5 g/L en ácido tricloroacético 1.2%, y transcurridos otros 30 minutos se procedió a la lectura de la placa a 490 nm.

Para expresar los resultados se estableció una curva de calibración representando la absorbancia a 490 nm (A₄₉₀) frente a la recta patrón del Trolox [Coeficiente de correlación (R) = 0.9936]. El poder reductor (P_R) se expresó como equivalentes Trolox (mM o µM Trolox) de la ecuación obtenida por regresión lineal:

$$P_R = 1.932 \times A_{490} - 177.48$$

8.4.2.- Actividad antirradical

La medida de *captación de radicales DPPH* se llevó a cabo utilizando el método de Sánchez-Moreno⁵⁶¹ con las modificaciones de Jiménez y col.² Alícuotas de 5 µL de muestra a diferentes concentraciones y 195 µL de la disolución de DPPH' (3.8 mg de DPPH en 50 mL de metanol) se adicionaron a los pocillos por triplicado. Para cada muestra se incluyó un blanco con metanol en lugar de DPPH'. Transcurridos 30 minutos desde la adición del radical, se procedió a la lectura de la placa a 490 nm en un lector de microplacas Bio-Rad iMark.

Para cada muestra se expresó el descenso de la absorbancia (expresada como porcentaje de la absorbancia inicial). La concentración

⁵⁶¹ Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J. A.; Saura-Calixto, F. *J. Sci. Food Agric.*, **1998**, *76*, 270-276.

eficiente EC_{50} representa la cantidad de antioxidante necesaria para provocar una disminución de la absorbancia inicial del 50 %, y fue calculada a partir de una curva de calibración por regresión lineal. El EC_{50} se expresó en términos de la concentración (mM). A menores valores del EC_{50} mayor actividad antirradical de la muestra.

La *capacidad de captación de radicales ABTS* fue determinada mediante los métodos descritos por Re y col.⁵⁶² y Gülçin⁵⁶³ pero modificados para lector de placas Bio-Rad iMark por Gonçalves y col.⁵⁶⁴ Se mezclaron 10 mL de una disolución 7 mM de 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazilina-6-sulfonato) (ABTS) con 10 mL de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), y la mezcla se mantuvo entre 12-16 horas al abrigo de la luz a temperatura ambiente. 200 μ L del radical formado se diluyeron en 10 mL de etanol 80 %, etanol 96% o buffer fosfato sódico 0.1 M, pH 7.4, ajustando la absorbancia de la disolución resultante a 0.700 ± 0.025 . En las placas se añadieron 13 μ L de muestra (o disolvente para el blanco), y 187 μ L de la disolución de ABTS' por triplicado. Para cada muestra se incluyó un blanco con EtOH o buffer PBS en lugar del radical y se incluyó una muestra de oxidación total con disolvente (sin muestra). Transcurridos 30 minutos se procedió a la lectura de la absorbancia a tres longitudes de onda diferentes, 414, 655 y 750 nm. El resultado se expresa como la media de los cocientes de las pendientes de la rectas obtenidas para cada muestra con las calculadas para el Trolox a cada una de esas tres longitudes de onda.

⁵⁶² Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M., Rice-Evans, C. *Free Radical Biol. & Med.*, **1999**, *26*, 1231–1237.

⁵⁶³ Gülçin, I. *Chem-Biol Interact.* **2009**, *179*, 71-80.

⁵⁶⁴ Gonçalves, B.; Falco, V.; Moutinho-Pereira, J.; Bacelar, E.; Peixoto, F.; Correia, C. J. *Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 265-273.

Las rectas correspondientes al Trolox aparecen reflejadas en la **Tabla 7.1:**

Tabla 7.1: *Rectas obtenidas para el Trolox por el método del ABTS*

	Trolox	
	EtOH 80 %	PBS
415 nm	$y = 373,05x - 0,0191$	$y = 355,52x - 0,2500$
655 nm	$y = 369,43x + 0,9805$	$y = 341,42x + 1,6749$
750 nm	$y = 376,75x - 0,1317$	$y = 339,86x + 1,1966$

8.4.3.- Inhibición de la oxidación primaria del ácido linoleico en emulsión. Método del tiocianato férrico.

Este método se ha usado para la medida de la inhibición de la oxidación primaria (fase inicial de la peroxidación lipídica) según Mitsuda y col.,⁵⁶⁵ con algunas modificaciones. A 25 μL de la muestra se añaden 5 μL de ABAP (2,2'- Azobis(2-metil-propionamida) dihidrocloruro) 0.07 M en agua, como iniciador de la reacción de oxidación, y 2 mL de una emulsión de ácido linoleico 1.3 mM con SDS 0.1 M en buffer fosfato 0,01 M (pH 7.4). Se prepara un blanco (sin ácido linoleico) para cada muestra. También se hace conjuntamente y por triplicado un ensayo de oxidación total (sin muestra). La mezcla se agita y se calienta a 50 °C. Después de 15.5 horas, se añaden 100 μL de tiocianato amónico al 30 % y 100 μL de FeCl_2 0,02 M en HCl 3.5 %. Durante la oxidación del ácido linoleico, se producen los peróxidos que oxidan el Fe^{2+} a Fe^{3+} . Los iones Fe^{3+} forman un complejo de

⁵⁶⁵ Mitsuda, H.; Yasumoto, K.; Iwami, K. *Eiyo to Shokuryo*, **1996**, 19, 210–214.

color rojo con el tiocianato que tiene un máximo de absorbancia a 490 nm. Se mide la absorbancia de las soluciones coloreadas a esta longitud de onda en el lector de microplacas Bio-Rad iMark (Hercules, CA, EE. UU.). Una elevada absorbancia es indicativa de una alta concentración de peróxidos. Las determinaciones se realizan por cuadruplicado. Los resultados se expresan en función el EC₅₀ (mM), entendiéndose como la cantidad de producto necesaria para reducir la oxidación primaria en un 50%, y también del porcentaje de reducción 1 mM, siendo éste el grado de inhibición que produce el antioxidante el antioxidante ensayado a una concentración 1 mM.

8.4.4.- Inhibición de la oxidación secundaria del ácido linoleico en emulsión. Método del ácido tiobarbitúrico (TBA).

El método se basa en la medida de la cantidad de malondialdehído (MDA), un subproducto formado en sistemas de lipoperoxidación. Para la determinación se usa la reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico. Se sigue el procedimiento que se describe en Moon y col.,⁵⁶⁶ con modificaciones. A 25 µL de muestra se añaden 5 µL de ABAP 0,07 M en agua y 1 mL de una emulsión de ácido linoleico 5,2 mM con SDS 0,1 M en buffer fosfato 0,01 M (pH 7,4). Se prepara un blanco (sin ácido linoleico) para cada muestra. También se hace conjuntamente y por triplicado un ensayo de oxidación total (sin muestra). La mezcla se agita y se calienta a 50 °C. Después de 24 horas de incubación, se toman 100 µL de la mezcla de reacción y se añaden 100 µL de ácido tricloroacético al 2,8 % (p/v) en agua y 100 µL de ácido tiobarbitúrico al 0,8 % en SDS 1,1 %. Esta mezcla se

⁵⁶⁶ Moon, J.K.; Shinamoto, T. *J Agric Food Chem.* **2009**, *57*, 1655–1666.

agita vigorosamente en Vortex y se calienta a 90 °C durante 20 minutos. Después se enfría en baño de hielo durante 10 minutos, se añade 0,5 mL de *n*-butanol, se agita y centrifuga a 12000 rpm durante 3 minutos. La fase de butanol se separa después de la centrifugación y se mide la absorbancia de las soluciones coloreadas a 540 nm. Los resultados se dan como promedio de cuatro replicados. Los resultados se expresan en función el EC₅₀ (mM), entendiéndose como la cantidad de producto necesaria para reducir la oxidación primaria en un 50%, y también del porcentaje de reducción 1 mM, siendo éste el grado de inhibición que produce el antioxidante ensayado a una concentración 1 mM.

8.4.5. Inhibición de la peroxidación en microsomas.

Obtención de los microsomas.

Los microsomas se prepararon⁵⁶⁷ a partir de hígados de machos de rata Lister Hooded (Cepa del Instituto Rowett) de la Universidad de Aberdeen (Escocia), alimentados con una dieta semisintética deficiente en vitamina E durante 12 semanas. A aproximadamente 10 g de hígado se añadieron 25 mL de KCl 0.154 M y se homogeneizó. Se centrifugó durante 20 minutos a 12000 rpm, descartando el pellet. El sobrenadante se centrifugó a 35000 rpm durante 1 hora. Se desechó el sobrenadante, y el pellet se disolvió resuspendiéndolo en KCl 0.154 M y se centrifugó nuevamente durante una hora a 35000 rpm. El pellet se redisolvió en

⁵⁶⁷ Lim, V.S.; Henriquez, C.; Seo, H.; Refetoff, S.; Mertigo, E.J. *J. Clin. Invest.*, **1980**, *66*, 946-954.

tampón fosfato pH 7.4 0.05 M y se calculó su concentración de proteínas por el método de Biuret, ajustando la misma a 10 mg/mL.

Tratamiento de los microsomas con antioxidantes

A una suspensión de 500 μ L de microsomas se añadieron 20 μ L de disoluciones de antioxidantes en etanol a concentraciones finales de 0.250 mM, 0.100 mM y 0.050 mM. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se congeló a -80 °C hasta su posterior uso.

Producción de malondialdehído en microsomas de hígados de rata.

Se incubaron 100 μ L de microsomas con 4.9 mL de tampón fosfato potásico 0.05 M pH 7.4, conteniendo ácido ascórbico 0.5 mM, Fe²⁺ y ADP 2 mM. La incubación se hizo en un baño de agua a 37 °C. Después de 0, 5, 10 y 20 minutos se tomó 1 mL de disolución y se añadió sobre 1 mL de ácido tricloroacético al 20 %. A continuación se adicionó 1 mL de ácido tiobarbitúrico 2 μ M y 2 mL de agua y se hirvió durante 30 minutos. Después de enfriar en agua-hielo se inyectaron las muestras en un HPLC Waters 2695, equipado con una columna Luna 5 μ , C18 100A 150x4.6 mm. Flujo 0.8 mL/min y tiempo total 13 minutos, enfriador ajustado a 4 °C, detector a 30 °C, volumen de inyección 50 μ L. La fase móvil es 60 % KH₂PO₄ 50 mM pH 7.0 y 40 % MeOH. Los resultados se compararon con los obtenidos para una curva patrón de malondialdehído.

Preparación de las muestras de microsomas para la determinación del contenido de proteínas y fenoles totales.

Se añadieron 120 µL de las disoluciones 6.25 mM de antioxidantes a ensayar sobre 3 mL de microsomas de ratas sometidas a una dieta deficiente en vitamina E (-VE), estableciendo un control con hígados de rata alimentadas normalmente (+VE), de modo que la concentración final de antioxidante en microsomas sea 0.250 mM. Las muestras se agitaron durante 30 minutos en un agitador de rodillos, y se almacenaron congeladas a -80 °C hasta su posterior uso. Tras descongelarlas se separó 1 mL de microsomas (*microsomas totales*), y el resto se centrifugó a 37000 g durante 1h, a temperatura 4 °C. Se decantó el sobrenadante (*microsomas sobrenadante*) y el pellet (*microsomas pellet*) se redisolvió en 1 mL del tampón fosfato pH 7.4 0.05M..

Determinación del contenido de proteínas en microsomas de hígados de rata.

Se determinó el contenido de proteínas en microsomas totales, microsomas del sobrenadante y microsomas del pellet. Se realizó por el método de Biuret frente a una recta patrón de albúmina de suero bovino. Se añadieron 4 mL de reactivo de Biuret a 1 mL de muestra o estándar, se agitó en vortex y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se leyó a 540 nm en un espectrofotómetro frente a un blanco con 1 mL de agua destilada, y se compararon los resultados con los obtenidos para la recta de la albúmina de suero bovino 1-10 mg, $y = 0.0561x + +0.0012$, $r^2 = 0.9996$.

Determinación del contenido de fenoles totales en microsomas de hígados de rata.

Se determinó el contenido de fenoles totales en microsomas totales, microsomas del sobrenadante y microsomas del pellet. Se llevó a cabo mediante el método de Singleton y Rossi. Se añadieron 0.5 mL de muestra, estándar o blanco a 2.5 mL de reactivo Folin Ciocalteau al 10% y se agitó en vortex. Se dejó reposar al menos 30 segundos pero menos de 8 minutos. Se adicionaron 2 mL de Na₂CO₃ 7.5 % anhidro. Se mezcló e incubó durante 2 horas a 24 °C. Se leyó en un espectrofotómetro a 765 nm frente a un blanco con agua destilada. La recta patrón se obtuvo con disoluciones 0-50 µg/mL de ácido gálico en búffer fosfato potásico 0.05 M pH 7.4: $y = 0.0102x + 0.0143$, $r^2 = 0.9939$.

8.4.6. Estudio de la inhibición de la actividad tirosinasa.

Para la medida de la inhibición de la actividad tirosinasa se estudia la disminución del producto generado en la reacción que tiene lugar entre la L-Tirosina o L-DOPA y la tirosinasa. Para ello en microplacas Bio-Rad iMark (Hercules, CA, EE. UU) se realiza el ensayo por triplicado junto a un blanco muestra y a un ensayo de actividad total (100%) también por triplicado. En cada pocillo se añaden 50 µL de L-tirosina 5 mM, que actúa como sustrato, en buffer fosfato 0,05 M a pH 6,6 o bien 50 µL de L-DOPA 5 mM en 100 µL de buffer fosfato 0,05 M a pH 6,6. La mezcla se incuba a 30 °C durante 10 minutos, y a continuación se añadieron 50 µL de muestra y 50 µL de tirosinasa 500 U/mL procedente de hongos (*Agaricus bisporus*). Se mide durante 15 minutos el desarrollo de color que se produce tomando medidas

cada 20 segundos. Para el ensayo de actividad total no se adicionó la muestra.

8.4.7. Estudio del pardeamiento en manzanas.

Se emplearon manzanas golden adquiridas en el mercado local. Se lavaron con agua y se cortaron en pedazos con un cortador manual. Con la ayuda de una loncheadora se obtuvieron finas rodajas de aproximadamente 0.5 cm de espesor. Grupos de cuatro rodajas se sumergieron durante 5 minutos en 100 mL de disoluciones de antioxidantes o de agua para el control. Se filtraron y escurrieron y se depositaron en bandejas de porcelana. Se realizaron medidas a tiempo inicial, 30, 90 y 180 minutos de los parámetros L^* , a^* y b^* del método Cielab en un colorímetro Gardner, realizando 10 medidas por cada rodaja en diferentes puntos de la misma, pero siempre por la cara expuesta al aire. El colorímetro aporta la media de los diez replicados y se calculó manualmente la media de los valores de las 4 rodajas.

8.4.8. Estudio de la inhibición de la melanosis en camarones.

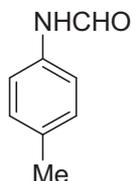
Los camarones se adquirieron vivos en el mercado local de Sanlúcar de Barrameda (Cádiz), y se transportaron refrigerados con hielo en una nevera. Una vez en el laboratorio se descartaron manualmente los subproductos de pesca, y se seleccionaron los camarones vivos de mayor tamaño. Se pesaron 35 gramos de camarones para cada muestra, y se sumergieron durante 15 minutos en 100 mL de disoluciones de antioxidantes o en agua como control. Se filtraron y se secaron con papel de filtro, depositándolos en bandejas de porcelana. Se almacenaron a 5 °C hasta

su posterior conteo. A los 2, 3 5 o 6 días se sacaron y se realizó una exploración visual del estado de ennegrecimiento de los individuos, clasificándolos como buenos (menos del 10% de ennegrecimiento), regulares (entre el 10 y el 40% de ennegrecimiento), y malos (más del 40% de ennegrecimiento, o cabeza totalmente melanósica).

8.5. MATERIAS PRIMAS

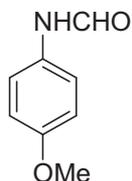
Todas las formamidas e isoselenocianatos descritos a continuación han sido preparados según el método puesto a punto por nuestro grupo de investigación,²⁴⁴ con ligeras modificaciones. La síntesis de los isoelenocianatos se basa a su vez en la metodología descrita por Barton.²⁴³

8.5.1. *N*-(*p*-metilfenil)formamida (127)



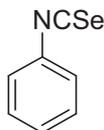
Una disolución de *p*-toluidina (1.0 g, 9.33 mmol) en formiato de etilo (10 mL) y AcOH (0.54 mL, 9.33 mmol; 1.0 equiv.) se mantiene a reflujo durante 5 h. A continuación, se concentra a sequedad y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:5→AcOEt-hexano 1:2. Rendimiento: 1.24 g, 98 %.

8.5.2. *N*-(*p*-Metoxifenil)formamida (128)

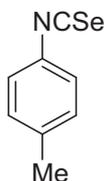


Una disolución de *p*-anisidina (2.0 g, 16.26 mmol) y Et₃N (10 gotas) en formiato de etilo (30 mL) se añadió AcOH y se calentó a reflujo 4 horas. A continuación se concentra a sequedad y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:2→AcOEt-hexano 2:1. Rendimiento: 2.22 g, 90%.

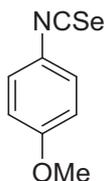
8.5.3. Isoselenocianato de fenilo (129)



Una disolución de trifosgeno (260 mg, 0.88 mmol; 1.6 equiv.) en CH₂Cl₂ seco (4 mL) se añade, lentamente durante 1 h, sobre una disolución a reflujo de la formamida (200 mg, 1.65 mmol) y Et₃N (1.0 mL, 7.1 mmol; 4.3 equiv.) en CH₂Cl₂ seco (4 mL), con tamiz molecular de 4 Å y bajo atmósfera de Ar. Finalizada la adición, la mezcla se calienta a reflujo durante 2.5 h, se añade Se negro (260 mg, 3.3 mmol; 2.0 equiv.) y se calienta a reflujo en la oscuridad durante 7 h. A continuación, se filtra sobre un lecho de Celita, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano). Rendimiento: 225 mg, 75 %.

8.5.4. Isoselenocianato de *p*-metilfenilo (130)

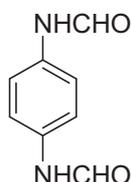
Una disolución de trifosgeno (348 mg, 1.18 mmol; 1.6 equiv.) en CH₂Cl₂ seco (5 mL) se añade, lentamente durante 1 h, sobre una disolución a reflujo de la *N*-(*p*-metilfenil)formamida (**1**) (300 mg, 2.22 mmol) y Et₃N (1.34 mL, 9.54 mmol; 4.3 equiv.) en CH₂Cl₂ seco (5 mL), con tamiz molecular de 4 Å y bajo atmósfera de Ar. Finalizada la adición, la mezcla se calienta a reflujo durante 2.5 h, se añade Se negro (349 mg, 4.44 mmol; 2.0 equiv.) y se calienta a reflujo en la oscuridad durante 7 h. A continuación, se filtra sobre un lecho de Celita, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano). Rendimiento: 382 mg, 88 %.

8.5.5. Isoselenocianato de *p*-metoxifenilo (131)

Una disolución de trifosgeno (320 mg, 1.315 mmol; 1.6 equiv.) en CH₂Cl₂ seco (5 mL) se añade, lentamente durante 1 h, sobre una disolución a reflujo de la *N*-(*p*-metoxifenil)formamida (**2**) (300 mg, 1.98 mmol) y Et₃N (1.49 mL, 10.63 mmol; 4.3 equiv.) en CH₂Cl₂ seco (5 mL), con tamiz

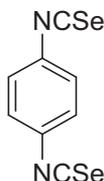
molecular de 4 Å y bajo atmósfera de Ar. Finalizada la adición, la mezcla se calienta a reflujo durante 2.5 h, se añade Se negro (389 mg, 4.95 mmol; 2.0 equiv.) y se calienta a reflujo en la oscuridad durante 7 h. A continuación, se filtra sobre un lecho de Celita, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano). Rendimiento: 426 mg, 88 %.

8.5.6. (*N,N'*-1,4-Fenileno)bisformamida (133)



A una disolución de 1,4-fenilendiamina (1.50 g, 13.87 mmol) en formiato de etilo (20 mL), se añade AcOH (0.8 mL, 13.87 mmol; 1.0 equiv.). La mezcla se disuelve cuando se comienza el calentamiento a reflujo y transcurridos 10 min empieza a precipitar un sólido. Se mantiene a reflujo durante 24 h y a continuación se filtra el sólido y se lava con formiato de etilo. Rendimiento: 2.20 g, 95 %.

8.5.7. Benceno-1,4-diisoselenocianato (134)



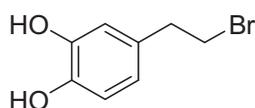
Una disolución de trifosgeno (191 mg, 0.65 mmol; 1.6 equiv.) en CH₂Cl₂ seco (4 mL) se adiciona gota a gota durante 1.5 h sobre una

disolución a reflujo de la formamida **133** (100 mg, 0.61 mmol) y Et₃N (0.73 mL, 5.25 mmol; 4.3 equiv.) en CH₂Cl₂ seco (4 mL), con tamiz molecular de 4 Å y bajo atmósfera de Ar. Finalizada la adición, la mezcla se calienta a reflujo durante 2 h, se añade Se negro (192 mg, 2.44 mmol; 2.0 equiv.) y se calienta a reflujo en la oscuridad durante 3 h. A continuación, se filtra sobre un lecho de Celita, se concentra a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano–Et₂O 1:1). Rendimiento: 148 mg, 85 %.

8.6. NUEVAS INVESTIGACIONES

8.6.1. SÍNTESIS DE DOPAMINA Y GLICODERIVADOS DE DOPAMINA A PARTIR DE HIDROXITIRO SOL

8.6.1.1 4-(2-Bromoetil)benzeno-1,2-diol (1)



Una disolución enfriada a 0 °C de hidroxitirosol (500 mg, 3.246 mmol), tetrabromuro de carbono (6.491 mmol, 1.958 g, 2 equiv.), trifenilfosfina (9.737 mmol, 2.688 g, 3 equiv.) y ascorbato sódico (3.246 mmol, 642.8 mg, 1 equiv.) en DMF (10 mL), bajo atmósfera de argón, se agitó una hora a 0 °C, y seguidamente otras 7 horas a t.a.. Se concentró a sequedad, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:20 → AcOEt-hexano 1:5), obteniéndose el bromuro como un sólido.

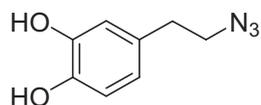
Rendimiento 564 mg, 80 %; R_F 0.28 AcOEt/hexano (1:2); p.f.: 76-78 °C.

IR (KBr): ν_{\max} : 3439, 3323, 2926, 1617, 1531, 1449, 1375, 1269, 1210, 1122, 944, 863, 820, 790, 760 cm^{-1} .

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 6.81 (d, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 1H, H-6), 6.73 (d, $J_{3,5}$ 1.8 Hz, 1H, H-3), 6.65 (dd, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, $J_{3,5}$ 1.8 Hz, 1H, H-5), 5.20 (s.a., 2H, OH), 3.51 (t, $J_{1',2'}$ 7.6 Hz, 2H, CH_2Br), 3.04 (t, $J_{1',2'}$ 7.6 Hz, 2H, CH_2Ar), ppm.

- ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 143.6 (C-2), 142.3 (C-1), 132.1 (C-4), 121.2 (C-5), 115.8 (C-6), 115.5 (C-3), 38.7 (CH_2Br), 33.2 (CH_2Ar) ppm.
- EIMS m/z 346 ($[\text{M}]^+$, 27%), 137 ($[\text{M}-\text{Br}]^+$, 23%).
- HREIMS Calc. para $\text{C}_8\text{H}_9^{79}\text{BrO}_2$ ($[\text{M}^+]^+$): 215.9786. Encontrado: 215.9793.

8.6.1.2. 4-(2-Azidoetil)benceno-1,2-diol (**2**)



A una disolución de **1** (400 mg, 1.843 mmol) en etanol:agua (15 mL:1.5 mL), se añadió NaN_3 (2.764 mmol, 174.7 mg) y ascorbato sódico (1.843 mmol, 365.2 mg), y la mezcla se agitó a 55 °C en atmósfera de argón durante 5 horas. Se concentró a sequedad, y el residuo bruto se pasó por una columna cromatográfica (hexano \rightarrow AcOEt/Hexano 1:4), dando **2** como un aceite oscuro muy viscoso.

Rendimiento 287 mg, 87 %. R_F 0.51 AcOEt/hexano (1:1).

- IR (KBr): ν_{max} : 3330, 2931, 2105, 1689, 1527, 1259, 796 cm^{-1} .
- ^1H -RMN (300 MHz, $\text{MeOH}-d_4$): δ 6.69 (d, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 1H, H-6), 6.67 (d, $J_{3,5}$ 2.1 Hz, 1H, H-3), 6.55 (dd, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, $J_{3,5}$ 2.1 Hz, 1H, H-5), 3.41 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 7.1 Hz, 2H, CH_2N_3), 2.72 (t,

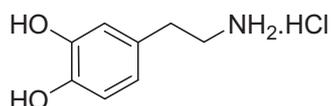
$J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 7.1 Hz, 2H, CH₂Ar) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): 146.3 (C-2), 145.0 (C-1), 131.2 (C-4), 121.1 (C-5), 116.9 y 116.4 (C-6 y C-3), 53.9 (CH₂N₃), 35.7 (CH₂Ar) ppm.

EIMS *m/z* 179 ([M]⁺, 20%), 123 ([M – CH₂N₃]⁺, 100%).

HREIMS Calc. para C₈H₉N₃O₂ (M⁺): 179.0695 Encontrado: 179.0694.

8.6.1.3. Dopamina hidrocloreto (3)



PROCEDIMIENTO A

A una disolución de **2** (100 mg, 0.355 mmol) en etanol (3mL) se añadió HCl 2N (0.32 mL, 6.4 mmol) y una cantidad catalítica de paladio sobre carbón al 10 % (40 mg). Se desoxigenó la mezcla con nitrógeno y se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 3 horas. Se filtró sobre un lecho de celita, lavando con etanol. Se disolvió en agua (50 mL) y se lavó con 3x20 mL de diclorometano. La fracción acuosa se concentró a sequedad, obteniendo **3** como un sólido blanco.

Rendimiento 66 mg, 98 %. *R*_F 0.61 (AcOEt/AcOH/MeOH/H₂O 6:2:1:1).

PROCEDIMIENTO B

A una disolución de **6** (200 mg, 1.438 mmol) y paladio sobre carbón al 10 % (150 mg) en etanol (8 mL) se añadió HCl en EtOH 2N (3.62 mL, 7.24 mmol, 5 equivalentes). Se desoxigenó con nitrógeno y se hidrogenó a presión atmosférica en la oscuridad a temperatura ambiente durante 3 horas. Se filtró sobre celita y se concentró a sequedad. Se disolvió en la mínima cantidad de etanol y se fue añadiendo éter etílico hasta turbidez. Se dejó toda la noche a baja temperatura y se filtró el producto, que aparece como un sólido de color pardo.

Rendimiento 136 mg, 50 %. R_F 0.61 (AcOEt/AcOH/MeOH/H₂O 6:2:1:1). p.f.: 235-240 °C (Lit.⁵⁶⁸ 248-250 °C)

IR ν_{\max} : 3330, 3039, 2957, 1619, 1597, 1502, 1347, 1322, 1177, 1114, 814 cm^{-1} .

¹H-RMN (300 MHz, MeOH-*d*₄): δ 6.74 (d, $J_{5,6}$ 7.9 Hz, 1H, H-6), 6.70 (d, $J_{3,5}$ 2.0 Hz, 1H, H-3), 6.58 (dd, $J_{5,6}$ 7.9 Hz, $J_{3,5}$ 2.0 Hz, 1H, H-5), 3.10 (m, 2H, CH₂NH₂.HCl), 2.81 (m, 2H, CH₂Ar) ppm.

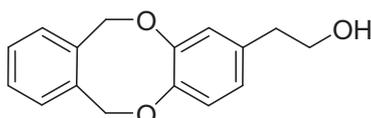
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): 146.7 (C-2), 145.6 (C-1), 129.1 (C-4), 121.0 (C-5), 116.8 y 116.7 (C-6 y C-3), 42.2 (CH₂NH₂), 33.9 (CH₂Ar) ppm.

⁵⁶⁸ Kohno, M.; Sasa, S.; Murahashi, S. I. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 1252-1254.

CIMS m/z 154 ($[M]^+$, 72%), 137 ($[M - NH_3^+]^+$, 100%).

HRCIMS Calc. para $C_8H_{12}NO_2$ (M^+): 154.0868 Encontrado: 154.0871.

8.6.1.4. 2-[3,4-(*o*-Xililendioxi)fenil]etanol (4)



A una disolución de hidroxitirosol (100 mg, 0.649 mmol) en etanol (5 mL) y agua (0.5 mL) se añadió α,α' -dicloroxileno (0.649 mmol, 113.7 mg) y carbonato potásico (1.291 mmol, 189.4 mg), y la mezcla se agitó a reflujo durante una hora. Transcurrido ese tiempo se concentró a sequedad, se disolvió en agua (50 mL) y se extrajo con 3x35 mL de AcOEt. Las fracciones orgánicas se unieron y se lavaron con 2x50 mL de cloruro sódico saturado, se secaron con sulfato magnésico y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt/hexano 1:2) obteniendo **4** como un sólido blanco.

Rendimiento 86 mg, 52 %. R_F 0.56 AcOEt/hexano (2:1); p.f.: 100-102 °C.

IR (KBr): ν_{max} : 3427, 3251, 3028, 2931, 2868, 2406, 1583, 1503, 1450, 1377, 1283, 1044, 992, 746 cm^{-1} .

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.22 (m, 4H, H-3', H-4', H-5' y H-6'), 6.87 (d, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 1H, H-5), 6.81 (d, $J_{2,6}$ 2.0 Hz, 1H, H-2), 6.63 (dd, $J_{2,6}$ 2.0 Hz, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 1H, H-6), 5.39 y 5.35 (2 s, 2x2H, CH_2OAr), 3.66 (t, J_{CH_2,CH_2} 7.0 Hz, 2H, CH_2OH), 2.67

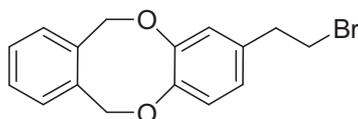
(t, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 7.0 Hz, 2H, CH_2Ar), ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 150.7 (C-3), 149.1 (C-4), 137.5 y 137.1 (C-1' y C-2'), 136.2 (C-1), 130.5, 129.9, 129.6 y 129.5 (C-3', C-4', C-5' y C-6'), 125.0 (C-6), 123.1 y 122.8 (C-2 y C-5), 76.2 y 75.6 (2x CH_2OAr), 64.1 (CH_2OH), 39.4 (CH_2Ar) ppm.

FABMS m/z 256 ($[\text{M}]^+$, 8%), 279 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 28%)

HRFABMS Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 279.0997. Encontrado: 279.0987.

8.6.1.5. 4-(2-Bromoetil)-1,2-(*o*-xililenodioxo)benceno (5)

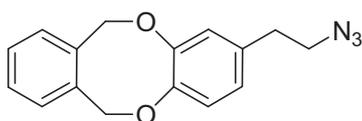


Una disolución de **4** (500 mg, 1.951 mmol), tetrabromuro de carbono (3.901 mmol, 1.307 g, 2 equivalentes) y trifenilfosfina (5.852 mmol, 1.551 g, 3 equivalentes) en acetonitrilo (15 mL), bajo atmósfera de argón, se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se concentró a sequedad, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt-hexano 1:30), obteniéndose el bromuro **5** como un aceite muy viscoso.

Rendimiento 492 mg, 79 %. R.f.: 0.69 AcOEt/hexano (1:2).

- IR (KBr): ν_{\max} : 2925, 2859, 1736, 1578, 1500, 1451, 1375, 1287, 1199, 1010, 749 cm^{-1} .
- ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.27 (m, 2H, H-3' y H-6'), 7.19 (m, 2H, H-4' y H-5'), 6.94 (d, $J_{5,6}$ 8.2 Hz, 1H, H-6), 6.83 (d, $J_{3,5}$ 2.1 Hz, 1H, H-3), 6.74 (dd, $J_{3,5}$ 2.1 Hz, $J_{5,6}$ 8.2 Hz, 1H, H-5), 5.41 y 5.38 (2 s, 2x2H, CH_2OAr), 3.49 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 7.7 Hz, 2H, CH_2Br), 3.03 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 7.7 Hz, 2H, CH_2Ar), ppm.
- ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 149.8 (C-2), 148.6 (C-1), 135.9 y 135.6 (C-1' y C-2'), 134.5 (C-4), 129.2, 128.8, 128.5 y 128.4 (C-3', C-4', C-5' y C-6'), 123.6 (C-5), 122.0 y 121.9 (C-3 y C-6), 75.4 y 75.1 (2x CH_2O), 38.7 (CH_2Ar), 32.7 (CH_2Br) ppm.
- FABMS m/z 318 ($[\text{M}]^+$, 7%), 239 ($[\text{M} - \text{Br}]^+$, 8%).
- HRFABMS Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_2^{79}\text{Br}$ ($[\text{M}]^+$): 318.0255. Encontrado: 318.0257.

8.6.1.6. 4-(2-Azidoetil)-1,2-(*o*-xililenodioxi)benceno (6)



A una disolución de **5** (150 mg, 0,472 mmol) en dimetilformamida (5 mL), se añadió azida sódica (0.949 mmol, 61.3 mg), y la mezcla se agitó a 55 °C durante 4 horas. Se eliminó el disolvente en bomba de aceite, se lavó con diclorometano y se concentró a sequedad. El crudo obtenido se

purificó por cromatografía en columna (hexano→AcOEt/hexano 1:10), obteniéndose **6** como un aceite viscoso.

Rendimiento 110 mg, 83 %; R_F 0.38 AcOEt/hexano (1:10).

IR (KBr): ν_{\max} : 3447, 2924, 2859, 2094, 1688, 1534, 1258, 1005, 791 cm^{-1} .

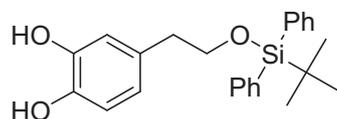
^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.27 (m, 2H, H-3' y H-6'), 7.18 (m, 2H, H-4' y H-5'), 6.94 (d, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 1H, H-6), 6.84 (d, $J_{3,5}$ 2.1 Hz, 1H, H-3), 6.75 (dd, $J_{3,5}$ 2.1 Hz, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 1H, H-5), 5.41 y 5.38 (2 s, 2x2H, CH_2OAr), 3.43 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 7.2 Hz, 2H, CH_2N_3), 2.76 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 7.2 Hz, 2H, CH_2Ar), ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 149.9 (C-2), 148.6 (C-1), 136.0 y 135.7 (C-1' y C-2'), 133.8 (C-4), 129.4, 128.9, 128.7 y 128.6 (C-3', C-4', C-5' y C-6'), 123.8 (C-5), 122.2 y 122.1 (C-3 y C-6), 75.6 y 75.2 (2x CH_2O), 52.5 (CH_2N_3), 34.7 (CH_2Ar) ppm.

EIMS m/z 281 ($[\text{M}]^+$, 15%), 225 ($[\text{M} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}_3]^+$, 7%).

HREIMS Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ ($[\text{M}]^+$): 281.1164. Encontrado: 281.1160.

8.6.1.7. 4-[2-[*tert*-butildifenilsililo]etil]benceno-1,2-diol (7)



A una disolución de hidroxitirosol (400 mg, 2.594 mmol) e imidazol (3.113 mmol, 214.1 mg) en dimetilformamida seca (5 mL), bajo atmósfera de argón, se añadió cloruro de *t*-butildifenilsililo (3.113 mmol, 826 μ L) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3.5 horas. Se concentró a sequedad en bomba de aceite y **7** se aisló puro del crudo de reacción por cromatografía en columna (Hexano \rightarrow AcOEt/Hexano 1:5).

Rendimiento 815 mg, 80 %. R_F 0.27 AcOEt/Hexano (1:3). p.f.: 82-87 $^{\circ}$ C.

IR ν_{\max} : 3243, 2957, 2930, 2853, 1606, 1519, 1445, 1359, 1276, 1106, 1087, 811 700 cm^{-1} .

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.59 (m, 4H, H-2' y H-6'), 7.37 (m, 6H, H-3', H-4' y H-5'), 6.74 (d, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 1H, H-6), 6.63 (d, $J_{3,5}$ 1.9 Hz, 1H, H-3), 6.57 (dd, $J_{3,5}$ 1.9 Hz, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 1H, H-5), 5.06 (sa, 2H, OH), 3.79 (t, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 7.0 Hz, 2H, CH_2OSi), 2.73 (t, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 7.0 Hz, 2H, CH_2Ar), 1.02 (s, 9H, 3x CH_3) ppm.

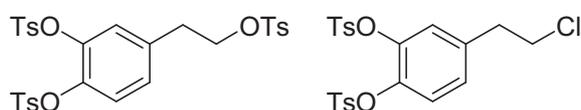
^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 143.2 (C-2), 141.8 (C-1), 135.6 (C-2' y C-6'), 133.8 (C-1'), 132.2 (C-4), 129.6 (C-4'), 127.6 (C-3' y C-5'), 121.8 (C-5), 117.2 (C-6), 115.1 (C-3), 65.3 (CH_2OSi),

38.6 (CH₂Ar), 26.8 (CH₃), 19.2 (C-(CH₃)₃) ppm.

FABMS m/z 335 ([M - ^tBu]⁺, 45%), 415 ([M+Na]⁺, 60%).

HRFABMS Calc. para C₂₄H₂₈NaO₃Si ([M+Na]⁺): 415.1705. Encontrado:
415.1717

8.6.1.8. 1,2-di-*O*-Tosil-4-(2-tosiloxietil)benceno-1,2-diol (8) y 4-(2-cloroetil)-1,2-di-*O*-tosilbenceno-1,2-diol (9).



A una disolución de hidroxitirosol (148 mg) en piridina enfriada en baño de hielo, se le añade cloruro de tosilo (659 mg, 3.2 equiv), con agitación, y se mantiene en la nevera durante 24 horas. A continuación, se añaden unas gotas de agua para hidrolizar restos de cloruro de tosilo, y se elimina la piridina por adición de 30 ml de CH₂Cl₂ y lavados sucesivos con porciones de HCl 2N (20 ml) hasta pH ácido, con NaHCO₃ saturado (20 ml) hasta pH básico, y por último con agua (20 mL) hasta pH neutro. Se añade MgSO₄ para secar y se concentra a sequedad. El residuo obtenido se purifica en columna (AcOEt : hexano 1:20 → 1:2) obteniéndose los compuestos **8** y **9**.

8: Sólido blanco. Rendimiento: 260 mg, 44%. R_F 0.32 (AcOEt- hexano 1:2);

IR ν_{\max} 3064, 1594, 1453, 1369, 1180, 844 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.68, 7.66 (m, 6H, H-2 y H-6 Ts), 7.26

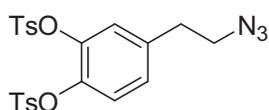
- (m, 6H, H-3 y H-5 Ts), 7.12 (d, 1H, $J_{5,6}$ 7Hz, H-6), 6.99 (sa, 1H, H-3), 6.98 (dd, 1H, H-5, $J_{3,5}$ 2.1 Hz), 4.17 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2'}$ 6.6 Hz, CH_2OTs), 2.90 (t, 2H, CH_2Ar), 2.45 (s, 9H, CH_3) ppm.
- ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): δ 145.8, 145.7, 145.1 (C-1 Ts), 141.2 (C-2), 140.1 (C-1), 136.8 (C-4), 132.7, 132.2, 132.1 (C-4 Ts), 130.0, 129.8, 129.8 (C-3 y C-5 Ts), 128.5, 128.5, 127.8 (C-2 y C-6 Ts), 128.2 (C-5), 124.7 (C-6), 124.4 (C-3), 69.5 (CH_2OTs), 34.6 (CH_2Ar), 21.8, 21.8, 21.6 (CH_3 Ts) ppm.
- FABMS m/z 639 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100%)
- ANÁLISIS Calc. para $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{O}_9\text{S}_3$: C, 56.48; H, 4.58; S, 15.60, encontrado: C, 56.66; H, 4.60; S, 15.26.
- 9:** Sólido blanco. Rendimiento: 90 mg, 20%. R_F 0.58 (AcOEt- hexano 1:2);
- IR ν_{max} 3059, 1595, 1499, 1375, 1184, 846, 697 cm^{-1}
- ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.63 (m, 4H, H-2 y H-6 Ts), 7.27 (m, 4H, H-3 y H-5 Ts), 7.20 (d, 1H, $J_{5,6}$ 8.1Hz, H-6), 7.11 (sa., 1H, H-3), 7.09 (dd, 1H, $J_{3,5}$ 2.0 Hz, H-5), 3.66 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 7 Hz, CH_2Cl), 3.02 (t, 2H, CH_2Ar), 2.45 (s, 6H, CH_3) ppm.
- ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): δ 145.9 (C-1 Ts), 141.4 (C-2), 140.3 (C-1), 138.6 (C-4), 132.4, 132.3 (C-4 Ts), 129.9, 129.9 (C-3 y C-5 Ts), 128.8, 128.7 (C-2 y C-6 Ts), 128.4 (C-5), 124.9

(C-6), 124.6 (C-3), 44.4 (CH₂Cl), 33.3 (CH₂Ar) ppm.

FABMS m/z 503 ([M+Na]⁺, 100%)

HREIMS Calc. para C₂₂H₂₁ClO₆S₂ ([M]⁺): 503.0365. Encontrado 503.0373.

8.6.1.9. 4-(2-Azidoetil)-1,2-di-*O*-tosilbenceno-1,2-diol (**10**).



A una mezcla de **8** y **9** (5:2) (100 mg, 0.176 mmoles) en DMF (2 mL) se le añade azida sódica (26 mg, 0.440 mmol, 2.5 equiv), a temperatura ambiente, con agitación. La mezcla se agitó a temperatura ambiente 20 horas, se añadió más azida sódica (5 mg, 0.088 mmol, 0.5 equiv), y se calentó a 50 °C otra hora. Se concentró a sequedad. Se disolvió en H₂O (25 mL) y se extrajo con 3x10 mL de CH₂Cl₂, la fracción orgánica se lavó con 2x15 mL de una disolución saturada de NaCl, se secó con MgSO₄ y se concentró a sequedad, obteniendo **10** como un aceite viscoso amarillento.

Rendimiento : 75mg, 86%; R_F 0.74 (CH₂Cl₂)

IR ν_{\max} 2952, 2100, 1597, 1454, 1361, 1181, 811, 765 cm⁻¹

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) 7.63 (m, 4H, H-2 y H-6 Ts), 7.27 (m, 4H, H-3 y H-5 Ts), 7.20 (d, 1H, $J_{5,6}$ 8.3 Hz, H-6), 7.13 (d, 1H, $J_{5,3}$ 2.1 Hz, H-3), 7.09 (dd, 1H, H-5), 3.48 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 7.0 Hz, CH₂N₃), 2.84 (t, 2H, CH₂Ar), 2.47 (s, 6H,

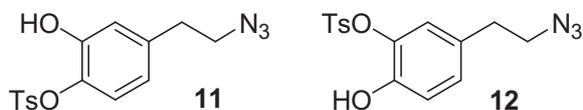
CH₃) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 146.0 (C-1 Ts), 141.6 (C-2), 140.3 (C-1), 138.8 (C-4), 132.5, 132.5 (C-4 Ts), 130.1, 130.1 (C-3 y C-5 Ts), 128.9, 128.9 (C-2 y C-6 Ts), 128.5 (C-5), 125.0 (C-6), 124.8 (C-3), 52.3 (CH₂N₃), 35.1 (CH₂Ar), 22.1, 22.1 (CH₃) ppm.

FABMS *m/z* 510 ([M+Na]⁺, 100%);

HREIMS Calc. para C₂₂H₂₁N₃O₆S₂Na ([M]⁺): 510.0769. Encontrado: 510.0761.

8.6.1.10. 4-(2-Azidoetil)-1-*O*-tosilbenceno-1,2-diol (**11**) y 4-(2-azidoetil)-2-*O*-tosilbenceno-1,2-diol (**12**)



Una disolución de **10** (280 mg, 0.57 mmoles) en potasa metanólica (1.15 mmoles, 2 equiv, 7 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora bajo atmósfera de nitrógeno. Seguidamente se neutralizó con HCl 1N y se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en H₂O (100 mL) y se extrajo con 3x100 mL de CH₂Cl₂. La fracción orgánica se lavó con NaCl (sat) y se concentró la fase orgánica. El residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 1:1), obteniéndose la mezcla de **11** y **12** como un aceite amarillento.

Rendimiento: 72 mg, 75 %. *R_F* 0.14 (CH₂Cl₂-hexano 5:1).

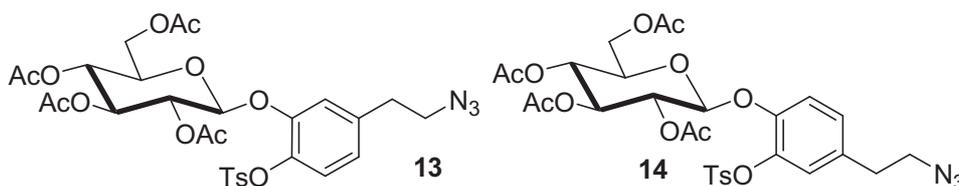
IR	ν_{\max} 3472, 2924, 1599, 1442, 1368, 1177, 753 cm^{-1}
^1H -RMN	(300 MHz, CDCl_3) 7.76, 7.75 (m, 4H, H-2 y H-6 Ts 11 y 12), 7.35, 7.34 (m, 4H, H-3 y H-5 Ts 11 y 12), 6.99 (dd, 1H, $J_{5,6}$: 8.1 Hz, $J_{5,3}$: 1.9 Hz, H-5 12), 6.94 (d, 1H, H-6 12), 6.87 (d, 1H, $J_{3,5}$: 2.0 Hz, H-3 11), 6.71 (d, 1H, $J_{5,6}$: 8.3, H-6 11), 6.63 (d, 1H, H-3 12), 6.61 (dd, 1H, H-5 11); 5.92 (sa, 2H, OH 11 y 12), 3.32, 3.46 (t, 4H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$: 7.1 Hz, CH_2N_3 11 y 12), 2.79, 2.68 (t, 4H, CH_2Ar 11 y 12), 2.46 (s, 6H, CH_3) ppm.
^{13}C -RMN	(75.5 MHz, CDCl_3): δ 148.3, 147.3 (C-1, C-2 11 y 12), 146.4, 146.3 (C-1 Ts 11 y 12), 139.0, 136.1 (C-4 11 y 12), 131.3, 131.1 (C-4 Ts 11 y 12), 130.1 (C-3 y C-5 Ts 11 y 12), 128.8 (C-2 y C-6 Ts 11 y 12), 128.9, 123.6, 123.4, 121.4, 118.7, 118.7 (C-3, C-5, C-6 11 y 12), 52.5, 52.2 (CH_2N_3 11 y 12), 35.0, 34.3 (CH_2Ar 11 y 12), 21.9 (CH_3 11 y 12) ppm.
FABMS	m/z 356 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100%)
HREIMS	Calc. para $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{SNa}$: 356.0681, encontrado: 356.0699.

Procedimiento general para la obtención de los derivados glicosilados **13**, **14** y **15**, **16**.

A una disolución de la mezcla de regiosímeros **11** y **12** (600 mg, 1.800 mmol) y α -acetobromo azúcar (D-glucosa o D-galactosa) (0.810 mmol, 370.1 mg, 0.45 equiv) en diclorometano (15 mL) se añadió una

disolución de TBAB (1.800 mmol, 586 mg) y NaOH 0.8131 M (2.699 mmol, 3.32 mL, 1.5 equiv) en agua (15 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se siguió cromatográficamente y se fue añadiendo α -acetobromo azúcar (370.1 mg, 0.810 mmol) y NaOH 0.813 M (0.900 mmol, 1.11 mL) después de 2, 4 y 6 horas de reacción. Tras la última adición se calentó la reacción a 50 °C durante 2.5 horas. Se neutralizó a pH \approx 6, se diluyó en agua (150 mL) y se extrajo con 3x50 mL de diclorometano. La fracción orgánica se lavó con 2x100 mL de una disolución saturada de NaCl, se secó sobre MgSO₄ y se concentró a sequedad.

8.6.1.11. 5-(2-Azidoetil)-2-tosiloxifenil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosido (13) y 4-(2-azidoetil)-2-tosiloxifenil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosido (14).



Se obtuvo a partir de α -acetobromo glucosa. El bruto de reacción se purificó por cromatografía en columna (Et₂O/hexano 1:4→Et₂O/hexano 2:1), obteniéndose **13** y **14** como un aceite muy viscoso.

Rendimiento 860 mg, 72 %. R_F 0.30 (Et₂O/Hexano 5:1). $[\alpha]_D^{23}$: 10 (c 1.0, CH₂Cl₂).

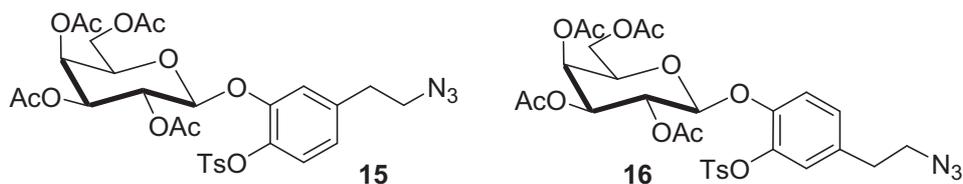
IR ν_{\max} : 2957, 2870, 2098, 1744, 1599, 1507, 1428, 1366, 1211, 1177, 1037, 813 cm⁻¹.

¹ H-RMN	(500 MHz, CDCl ₃) δ 7.73 (m, 4H, H-2 y H-6 Ts 13 y 14), 7.32 (m, 4H, H-3 y H-5 Ts 13 y 14), 7.07 y 7.04 (2 d, 2x1H, <i>J</i> _{5,6} 8.4 Hz, H-3 13 y H-6 14), 7.02, 6.88 (2 dd, 2x1H, <i>J</i> _{5,6} 8.4 Hz, H-4 13 y H-5 14), 7.01, 7.00 (2 d, 2x1H, <i>J</i> _{3,5} 2 Hz, H-6 13 y H-3 14), 5.23, 5.22 (2 m, 2x1H, <i>J</i> _{3,4} 2.1 Hz, <i>J</i> _{3,2} 1.7 Hz, H-3 Glc 13 y 14), 5.12 (m, 2H, H-2 Glc 13 y 14), 5.09 (m, 2H, <i>J</i> _{4,5} 9 Hz, H-4 Glc 13 y 14), 4.91, 4.90 (2 d, 2x1H, <i>J</i> _{1,2} 7.9 Hz, H-1 Glc 13 y 14), 4.23, 4.21 (2 m, 2x1H, <i>J</i> _{6a,6b} 2.6 Hz, <i>J</i> _{6a,5} 12.0 Hz, H-6a Glc 13 y 14), 4.18, 4.14 (2 m, 2x1H, <i>J</i> _{6b,5} 12.3 Hz, H-6b Glc 13 y 14), 3.77 (m, 2H, H-5 Glc 13 y 14), 3.45 (m, 4H, CH ₂ N ₃ a y b), 2.82, 2.78 (2 t, 2x2H, CH ₂ Ar 13 y 14), 2.47, 2.46 (2 s, 2x3H, CH ₃ 13 y 14), 2.11, 2.10, 2.08, 2.07, 2.04 (s, 24H, CH ₃ Ac 13 y 14) ppm.
¹³ C-RMN	(125.7 MHz, CDCl ₃) δ 170.4, 170.1, 169.6, 169.4 (C=O), 149.1, 147.9, (C-1 y C-2 13 y 14), 145.4, 145.3 (C-1 Ts 13 y 14) 139.5 y 138.4 (C-4 Ts 13 y 14), 134.2, 132.8 (C-5 13 y C-4 14), 129.9 (C-3 y C-5 Ts 13 y 14), 128.9 (C-2 y C-6 Ts 13 y 14), 128.2, 124.3 (C-4 13 y C-5 14), 125.7, 119.6 (C-6 13 y C-3 14), 124.2, 119.0 (C-3 13 y C-6 14), 99.8 (C-1 Glc 13 y 14), 72.3 (C-3 Glc 13 y 14), 72.2 (C-5 Glc 13 y 14), 70.8 (C-2 Glc 13 y 14), 68.3 (C-4 Glc 13 y 14), 62.1 (C-6 Glc 13 y 14), 52.1, 51.9 (CH ₂ N ₃ 13 y 14), 35.2, 34.5 (CH ₂ Ar 13 y 14), 21.9 (CH ₃ Ts 13 y 14), 20.8 (CH ₃ Ac 13 y 14) ppm.
FABMS	<i>m/z</i> 663 ([M] ⁺ , 5%), 686 ([M+Na] ⁺ , 15%).

HRFABMS Calc. para $C_{29}H_{33}N_3O_{13}NaS$ ($[M+Na]^+$): 686.1632.

Encontrado: 686.1646.

8.6.1.12. 5-(2-Azidoetil)-2-tosiloxifenil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosido (15) y 4-(2-azidoetil)-2-tosiloxifenil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosido (16).



Se obtuvo a partir de α -acetobromo galactosa. El bruto de reacción se purificó por cromatografía en columna (Et_2O -Hexano 1:4 \rightarrow Et_2O -Hexano 2:1), obteniéndose la mezcla de **15** y **16** como un sólido de color blanco.

Rendimiento 1.12 g, 94 %. R_F 0.30 (Et_2O /Hexano 5:1). p.f.: 42-48 °C. $[\alpha]_D^{24}$: -24 (c 1.0, CH_2Cl_2).

IR (KBr) ν_{max} : 3471, 2932, 2876, 2103, 1751, 1602, 1510, 1374, 1228, 1071, 810 cm^{-1} .

1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.76 (m, 4H, H-2 y H-6 Ts **15** y **16**), 7.32 (m, 4H, H-3 y H-5 Ts **15** y **16**), 7.08 y 7.03 (2d, 2x1H, $J_{5,6}$ 8.4 Hz, H-3 **15** y H-6 **16**), 7.01 y 6.85 (2dd, 2x1H, $J_{5,6}$ 8.4 Hz, H-4 **15** y H-5 **16**), 7.00 y 6.94 (2d, 2x1H, $J_{3,5}$ 2 Hz, H-6 **15** y H-6 **16**), 5.43 (m, 4H, H-3 y H-2 Gal **15** y **16**), 5.07 y 5.05 (2dd, 2x1H, $J_{3,4}$ 3.3 Hz, $J_{4,5}$ 0.9 Hz, H-4 Gal **15** y **16**),

4.91 y 4.89 (2d, 2x1H, $J_{1,2}$ 8.0 Hz, H-1 Gal **15** y **16**), 4.18, 4.17, 4.12 (m, 4H, H-6a y H-6b Gal **15** y **16**), 3.99 (m, 2H, H-5 Gal **15** y **16**), 3.47 y 3.42 (m, 4H, CH₂N₃ **15** y **16**), 2.82, 2.77 (t, 2x2H, CH₂Ar **15** y **16**), 2.46, 2.45 (s, 2x3H, CH₃ **15** y **16**), 2.20, 2.12, 2.05, 2.04, 2.01 (s, 24H, CH₃Ac **15** y **16**) ppm.

¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 170.3, 170.1, 170.0, 169.7 (C=O **15** y **16**), 149.1, 147.9, (C-1 y C-2 **15** y **16**), 145.4, 145.3 (C-1 Ts **15** y **16**) 139.3 y 138.2 (C-4 Ts **15** y **16**), 134.0, 132.5 (C-5 **15** y C-4 **16**), 129.6 (C-3 y C-5 Ts **15** y **16**), 128.8 (C-2 y C-6 Ts **15** y **16**), 128.0 y 124.0 (C-4 **15** y C-5 **16**), 124.0 y 119.6 (C-6 **15** y C-3 **16**), 124.0 y 119.1 (C-3 **15** y C-6 **16**), 100.3 (C-1 Gal **15** y **16**), 71.2 y 71.0 (C-3 Glc **15** y **16**), 70.9 y 70.8 (C-5 Gal **15** y **16**), 68.0 (C-2 Glc **15** y **16**), 66.9 y 66.8 (C-4 Gal **15** y **16**), 61.5 y 61.2 (C-6 Gal **15** y **16**), 52.3, 52.1 (CH₂N₃ **a** y **b**), 35.0 y 34.4 (CH₂Ar **15** y **16**), 21.7 (CH₃ Ts **a** y **b**), 20.8, 20.7, 20.6 y 20.5 (CH₃ Ac **15** y **16**) ppm.

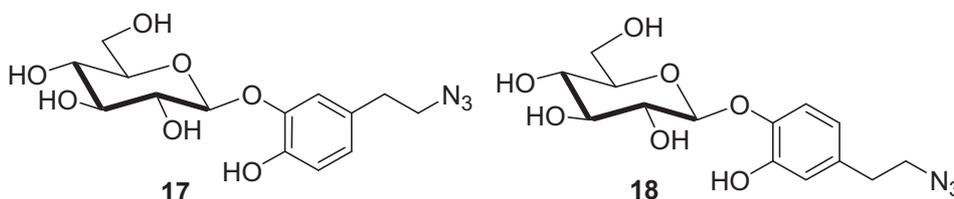
FABMS m/z 662 ([M-H]⁺, 2%), 686 ([M+Na]⁺, 20%).

HRFABMS Calc. para C₂₉H₃₃N₃O₁₃NaS ([M+Na]⁺): 686.1632.
Encontrado: 686.1627.

Procedimiento general para la obtención de los derivados glicosilados 17, 18 y 19, 20.

A una disolución mezcla de regioisómeros **17** y **18**, ó **19** y **20** (500 mg, 0.753 mmol) en metanol (12 mL), bajo atmósfera de nitrógeno, se añadió una disolución desoxigenada de KOH 0.47 M en metanol (4.9 mmol, 10.4 mL), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas. Pasado ese tiempo se neutralizó a pH próximo a 6 con ácido clorhídrico diluido en etanol, y se concentró a sequedad.

8.6.1.13. 5-(2-Azidoetil)-2-hidroxifenil β-D-glucopiranosido (17) y 4-(2-azidoetil)-2-hidroxifenil β-D-glucopiranosido (18).



Se obtuvo a partir de la desprotección de la mezcla de regioisómeros **13** y **14**. El bruto de reacción se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂-MeOH 20:1), obteniéndose **17** y **18** como un aceite muy viscoso.

Rendimiento 159 mg, 62 %. R_F 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH 5:1). $[\alpha]_D^{20}$: -44.0 (*c* 1.1, MeOH).

IR (KBr) ν_{max} : 3377, 2925, 2876, 2102, 1654, 1593, 1512, 1439, 1280, 1071, 1038, 1014, 805 cm⁻¹.

¹H-RMN (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ 7.12 y 6.78 (2d, 2x1H, $J_{5,6}$ 8.2 Hz, H-3 **17** y H-6 **18**), 7.11 y 6.76 (2d, 2x1H, $J_{3,5}$ 2.1 Hz, H-6 **17** y H-3 **18**), 6.81 y 6.67 (2dd, 2x1H, H-4 **17** y H-5 **18**), 4.75 y

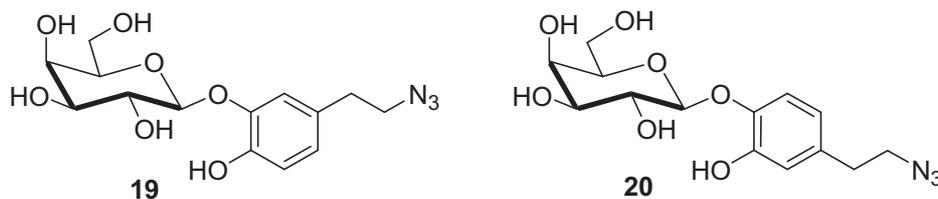
4.72 (2d, 2x1H, $J_{1,2}$ 7.5 Hz, H-1 Glc **17** y **18**), 3.90 (m, 2H, $J_{5,6a}$ 1.9 Hz, $J_{6a,6b}$ 12.1 Hz, H-6a Glc **17** y **18**), 3.72 (m, 2H, $J_{5,6b}$ 4.9 Hz, H-6b **17** y **18**), 3.44 (m, 12H, H-2, H-3, H-4, H-5 Glc y CH_2N_3 **17** y **18**), 2.77, 2.76 (2t, 2x2H, CH_2Ar **17** y **18**) ppm.

^{13}C -RMN (125.7 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) 148.5, 147.1, 146.7, 145.6, (C-1 y C-2 **17** y **18**), 135.6, 131.5 (C-5 **17** y C-4 **18**), 125.1 y 121.2 (C-4 **17** y C-5 **18**), 119.4, 119.1, 117.6, 117.1 (C-3 y C-6 **17** y **18**), 104.6 y 104.4 (C-1 Glc **17** y **18**), 78.3, 77.6 (C-3 y C-5 Glc **17** y **18**), 74.9, (C-2 Glc **17** y **18**) 71.4 y 71.3 (C-4 Glc **17** y **18**), 62.5 y 62.4 (C-6 Glc **17** y **18**), 53.6 (CH_2N_3 **17** y **18**), 35.7 y 35.6 (CH_2Ar **17** y **18**) ppm.

FABMS m/z 364 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 23%), 341 ($[\text{M}]^+$, 6%).

HRFABMS Calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 364.1121.
Encontrado: 364.1118

8.6.1.14. 5-(2-Azidoetil)-2-hidroxifenil β -D-galactopiranosido (**19**) y 4-(2-azidoetil)-2-hidroxifenil β -D-galactopiranosido (**20**).



Se obtuvo a partir de la desprotección de **15** y **16** siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. El bruto de reacción se

purificó por cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1), obteniéndose la mezcla **19** y **20** como un sólido de color blanco.

Rendimiento 111 mg, 43 %. R_F : 0.48 (CH_2Cl_2 -MeOH 5:1). p.f.: 47-50 °C.

$[\alpha]_D^{26}$: -39 (c 1.1, MeOH).

IR ν_{max} : 3330, 2928, 2874, 2100, 1595, 1508, 1439, 1274, 1044, 807 cm^{-1} .

^1H -RMN (500 MHz, MeOH- d_4) δ 7.13 y 6.78 (2d, 2x1H, $J_{5,6}$ 8.2 Hz, H-3 **19** y H-6 **20**), 7.12 y 6.75 (2d, 2x1H, $J_{3,5}$ 2.1 Hz, H-6 **19** y H-3 **20**), 6.81 y 6.67 (2dd, 2x1H, H-4 **19** y H-5 **20**), 4.70 y 4.67 (2d, 2x1H, $J_{1,2}$ 7.8 Hz, H-1 Gal **19** y **20**), 3.89 (2dd, 2x2H, $J_{3,4}$ 3.5 Hz, $J_{4,5}$ 0.9 Hz, H-4 Gal **19** y **20**), 3.83 y 3.82 (m, 2H, $J_{2,3}$ 9.7 Hz, H-2 Gal **19** y **20**), 3.81 y 3.79 (m, 2H, $J_{5,6a}$ 7.0 Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5 Hz, H-6a Gal **19** y **20**), 3.75 (m, $J_{5,6b}$ 7.0 Hz, H-6b Gal **19** y **20**), 3.66 y 3.63 (m, 2H, H-5 Gal **19** y **20**), 3.45 (t, 4H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 7.0 Hz, CH_2N_3), 2.77, 2.76 (t, 2x2H, CH_2Ar **19** y **20**) ppm.

^{13}C -RMN (125.7 MHz, MeOH- d_4) 148.7, 147.3, 146.8, 145.6, (C-1 y C-2 **19** y **20**), 135.6, 131.4 (C-5 **19** y C-4 **20**), 125.1 y 121.2 (C-4 **19** y C-5 **20**), 119.6, 119.3, 117.6, 117.1 (C-3 y C-6 **19** y **20**), 105.4 y 105.1 (C-1 Gal **19** y **20**), 77.2 y 77.1 (C-5 Gal **19** y **20**), 74.6 (C-3 Gal **19** y **20**), 72.4, (C-2 Gal **19** y **20**), 70.2 (C-4 Gal **19** y **20**), 62.4 y 62.3 (C-6 Gal **19** y **20**), 53.6 (CH_2N_3 **19** y **20**), 35.7 y 35.6 (CH_2Ar **19** y **20**) ppm.

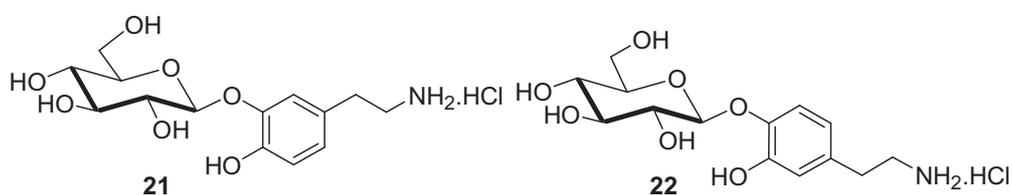
FABMS m/z 364 ($[M+Na]^+$, 100%), 341 ($[M]^+$, 3%).

HRFABMS Calc. para $C_{14}H_{19}N_3O_7Na$ ($[M+Na]^+$): 364.1121.
Encontrado: 364.1133

Procedimiento general para la obtención de los *O*-glicósidos de dopamina **21**, **22** y **23**, **24**.

La mezcla de regioisómeros **17** y **18** ó **19** y **20** (150 mg, 0.438 mmol) se disolvió en EtOH (4 mL), se añadió paladio sobre carbón (40 mg), y se desgasificó con nitrógeno. Se hidrogenó a temperatura ambiente durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo se filtró sobre Celita, se añadió HCl 2N (0,438 mmol, 219 μ L, 1 equiv) y se concentró a sequedad.

8.6.1.15. 5-(2-Aminoetil)-2-hidroxifenil β -D-glucopiranosido hidrocloreuro (**21**) y 4-(2-aminoetil)-2-hidroxifenil β -D-glucopiranosido hidrocloreuro (**22**).

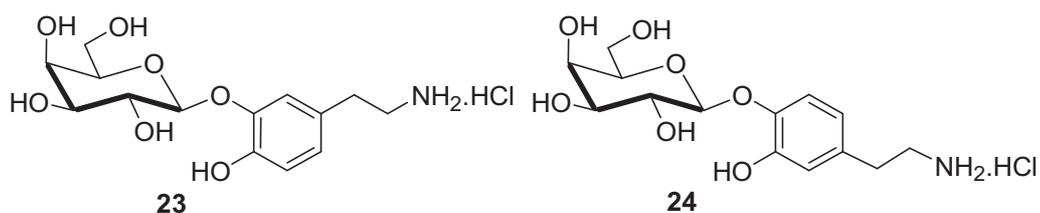


Se obtuvo a partir de la mezcla de regioisómeros **17** y **18**. El producto obtenido no precisó más purificación, obteniéndose un sólido de color blanco.

Rendimiento 128 mg, 83 %. R_F : 0.23 (AcOEt/MeOH/AcOH/H₂O 6:2:1:1).
p.f.: 72-74 °C. $[\alpha]_D^{24}$: -37 (c 1.0, MeOH).

IR	ν_{\max} : 3277, 2928, 1653, 1513, 1440, 1385, 1228, 1070, 1036, 805 cm^{-1} .
^1H -RMN	(500 MHz, MeOH- d_4) δ 7.17 y 6.82 (2d, 2x1H, $J_{5,6}$ 8.2 Hz, H-3 21 y H-6 22), 7.11 y 6.79 (2d, 2x1H, $J_{3,5}$ 2.0 Hz, H-6 21 y H-3 22), 6.84 y 6.70 (2dd, 2x1H, H-4 21 y H-5 22), 4.75 y 4.72 (2d, 2x1H, $J_{1,2}$ 7.5 Hz, H-1 Glc 21 y 22), 3.92 y 3.93 (2dd, 2H, $J_{5,6a}$ 2.2 Hz, $J_{6a,6b}$ 11.9 Hz, H-6a Glc 21 y 22), 3.70 (m, 2H, $J_{5,6b}$ 6.5 Hz, H-6b Glc 21 y 22), 3.49 (m, 2H, $J_{2,3}$ 9.2 Hz, H-2 Glc 21 y 22), 3.47 (m, $J_{3,4}$ 8.6 Hz, H-3 Glc 21 y 22), 3.39 (m, 2H, H-5 Glc 21 y 22), 3.34 (m, 2H, H-4 Glc 21 y 22) y 3.14 y 3.13 (2t, 2x2H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_2}$ 7.0 Hz, CH_2NH_2 a y b), 2.86, 2.85 (2t, 2x2H, CH_2Ar 21 y 22) ppm.
^{13}C -RMN	(125.7 MHz, MeOH- d_4) 148.9, 147.6, 146.9, 146.0, (C-1 y C-2 21 y 22), 133.4, 129.3 (C-5 21 y C-4 22), 124.6 y 121.1 (C-4 21 y C-5 22), 119.4, 119.0, 117.4, 116.7 (C-3 y C-6 21 y 22), 104.5 y 104.1 (C-1 Glc 21 y 22), 78.5, 78.4, 77.6 (C-3 y C-5 Glc 21 y 22), 74.8 (C-2 Glc 21 y 22) 71.6 y 71.3 (C-4 Glc 21 y 22), 62.7 y 62.4 (C-6 Glc 21 y 22), 43.0 (CH_2NH_2 21 y 22), 34.0 y 33.9 (CH_2Ar 21 y 22) ppm.
FABMS	m/z 316 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 34%), 338 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 42%).
HRFABMS	Calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_7$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 316.1396. Encontrado: 316.1394.

8.6.1.16. 5-(2-Aminoetil)-2-hidroxifenil β-D-galactopiranosido hidrocloreto (23) y 4-(2-aminoetil)-2-hidroxifenil β-D-galactopiranosido hidrocloreto (24).



Se obtuvo a partir de la mezcla de **19** y **20** siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. El sólido blanco obtenido no precisó más purificación, aunque se obtuvo cristalino por recristalización de EtOH-Éter.

Rendimiento 151 mg, 98 %. R_f : 0.23 (AcOEt/MeOH/AcOH/H₂O 6:2:1:1). p.f.: 117-120 °C. $[\alpha]_D^{24}$: -19 (*c* 1.1, MeOH).

IR ν_{\max} : 3326, 2966, 2924, 2894, 1599, 1512, 1439, 1390, 1279, 1065, 1041, 881 cm^{-1} .

¹H-RMN (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ 7.20 y 6.77 (2d, 2x1H, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, H-3 **23** y H-6 **24**), 7.15 y 6.73 (2d, 2x1H, $J_{3,5}$ 2.0 Hz, H-6 **23** y H-3 **24**), 6.81 y 6.73 (2dd, 2x1H, H-4 **23** y H-5 **24**), 4.72 y 4.70 (2d, 2x1H, $J_{1,2}$ 7.5 Hz, H-1 Gal **23** y **24**), 3.92 (dd, 2x2H, $J_{3,4}$ 3.5 Hz, $J_{4,5}$ 0.9 Hz, H-4 Gal **23** y **24**), 3.86 y 3.85 (m, 2H, $J_{2,3}$ 9.7 Hz, H-2 Gal **23** y **24**), 3.80 y 3.79 (m, 2H,

$J_{5,6a}$ 7.0 Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5 Hz, H-6a Glc **a** y **b**), 3.73 (m, $J_{5,6b}$ 7.0 Hz, H-6b Gal **23** y **24**), 3.63 y 3.64 (m, 2H, H-5 Gal **23** y **24**), 3.16 y 3.15 (t, 4H, J_{CH_2,CH_2} 7.0 Hz, CH_2N_3), 2.89 y 2.88 (t, 2x2H, CH_2Ar **23** y **24**) ppm.

^{13}C -RMN (125.7 MHz, MeOH- d_4) 149.1, 147.8, 146.8, 146.0 (C-1 y C-2 **23** y **24**), 133.5, 131.4 (C-5 **23** y C-4 **24**), 125.0 y 121.1 (C-4 **23** y C-5 **24**), 119.7, 119.4, 116.8, 116.7 (C-3 y C-6 **23** y **24**), 105.2 y 104.8 (C-1 Gal **23** y **24**), 77.4 y 77.2 (C-5 Gal **23** y **24**), 74.6 (C-3 Gal **23** y **24**), 72.4, (C-2 Gal **23** y **24**) 70.3, 70.2 (C-4 Gal **23** y **24**), 66.1 y 64.5 (C-6 Gal **23** y **24**), 42.2, 42.0 (CH_2NH_2 **23** y **24**), 34.0 y 33.9 (CH_2Ar **23** y **24**) ppm.

FABMS m/z 316 ($[M+H]^+$, 15%), 338 ($[M+Na]^+$, 23%).

HRFABMS Calc. para $C_{14}H_{22}NO_7$ ($[M+H]^+$): 316.1396. Encontrado: 316.1394.

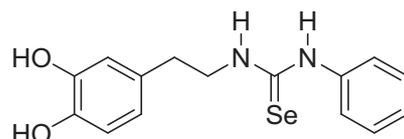
8.6.2. SÍNTESIS DE SELENOUREAS, SELENUROS Y DISELENUROS DE HIDROXITIRO SOL

Procedimiento general para la obtención de selenoureas derivadas del hidroxitirosol

A una disolución de clorhidrato de dopamina (300 mg, 1.582 mmol) y del isoselenocianato correspondiente (1.2 equiv), en metanol (20 mL) se añadió trietilamina (1.582 mmol, 220 μ L) y la mezcla se agitó en oscuridad a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón durante una hora. Se

concentró a sequedad, y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna.

8.6.2.1. 1-(3,4-Dihidroxifenetil)-3-fenilselenourea (25).



Se obtuvo a partir del isoselenocianato de fenilo **129**. Se purificó por cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 40:1), obteniéndose **25** como un sólido amarillento.

Rendimiento 493 mg, 93%. R_F : 0.32 $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (20:1). p.f.: 106-108 °C.

IR (KBr): ν_{max} : 3215, 2362, 1597, 1549, 1510, 1447, 1348, 1281, 1187, 1113, 810 cm^{-1} .

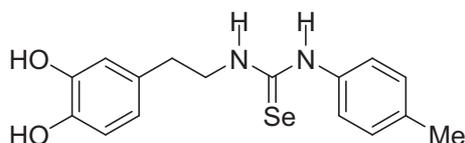
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): δ 7.35 (m, 2H, H-3' y H-5'), 7.23 (m, 1H, H-4'), 7.08 (m, 2H, H-2' y H-6'), 6.68 (m, 2H, H-2 y H-6), 6.53 (d, $J_{5,6}$ 7.8 Hz, 1H, H-5), 3.81 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 7.2 Hz, 2H, CH_2NH), 2.78 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 7.2 Hz, 2H, CH_2Ar), ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 178.8 (C=Se), 146.4 (C-3), 144.9 (C-4 y C-1'), 131.6 (C-1), 130.8 (C-3' y C-5'), 127.1 (C-4'), 126.1 (C-2' y C-6'), 121.1 (C-6), 117.0 y 116.5 (C-2 y C-5), 49.9 (CH_2NH), 35.2 (CH_2Ar) ppm.

FABMS m/z 337 ($[M+H]^+$, 22%), 359 ($[M+Na]^+$, 25%).

HRFABMS Calc. para $C_{15}H_{16}N_2O_2^{80}SeNa$ ($[M+Na]^+$): 359.0285.
Encontrado: 359.0275.

8.6.2.2. 1-(3,4-Dihidroxifenil)-3-(*p*-tolil)selenourea (26).



Se obtuvo a partir del isoselenocianato de *p*-metilfenilo **130**. Se purificó por cromatografía en columna ($CH_2Cl_2 \rightarrow CH_2Cl_2$ -MeOH 30:1), obteniéndose **26** como un sólido amarillento.

Rendimiento 530 mg, 96 %. R_F : 0.28 CH_2Cl_2 -MeOH (20:1). p.f.: 142-148 °C.

IR (KBr): ν_{max} : 3446, 3307, 2950, 1599, 1510, 1460, 1281, 1184, 1106, 1021, 810 cm^{-1} .

1H -RMN (300 MHz, MeOH- d_4): δ 7.15 (m, 2H, H-3' y H-5'), 6.94 (m, H-2' y H-6'), 6.67 (m, 2H, H-2 y H-6), 6.51 (d, $J_{5,6}$ 7.9 Hz, 1H, H-5), 3.79 (t, J_{CH_2,CH_2} 7.0 Hz, 2H, CH_2NH), 2.76 (t, J_{CH_2,CH_2} 7.0 Hz, 2H, CH_2Ar), 2.31 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, MeOH- d_4): 178.5 (C=Se), 146.4 (C-3), 144.9 (C-4), 138.1 (C-1'), 135.6 (C-3' y C-5'), 131.6 (C-1 y C-4'), 126.2 (C-2' y C-6'), 121.5 (C-6), 117.0 y 116.5 (C-2 y C-5),

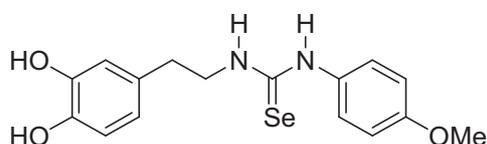
49.9 (CH₂NH), 35.2 (CH₂Ar), 21.0 (Me), ppm.

FABMS m/z 351 ([M+H]⁺, 43%), 373 ([M+Na]⁺, 39%).

HRFABMS Calc. para C₁₆H₁₈N₂O₂⁸⁰SeNa ([M+Na]⁺): 373.0421.

Encontrado: 373.0431

8.6.2.3. 1-(3,4-Dihidroxifenil)-3-(*p*-metoxifenil) selenourea (27).



Se obtuvo a partir del isoselenocianato de *p*-metoxifenilo **131**. Se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂-MeOH 20:1), obteniéndose **27** como un sólido amarillento.

Rendimiento 561 mg, 97 %. R_f : 0.42 CH₂Cl₂-MeOH (10:1). p.f.: 144-146 °C.

IR (KBr): ν_{\max} : 1508, 3309, 3061, 2843, 1590, 1547, 1466, 1342, 1275, 1238, 1170, 1104, 1024, 828 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, MeOH-*d*₄): δ 6.98 (m, 2H, H-3' y H-5'), 6.88 (m, H-2' y H-6'), 6.67 (m, 2H, H-2 y H-6), 6.50 (d, $J_{5,6}$ 7.9 Hz, 1H, H-5), 3.77 (m, 5H, CH₂NH y OMe), 2.75 (t, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 7.1 Hz, 2H, CH₂Ar) ppm.

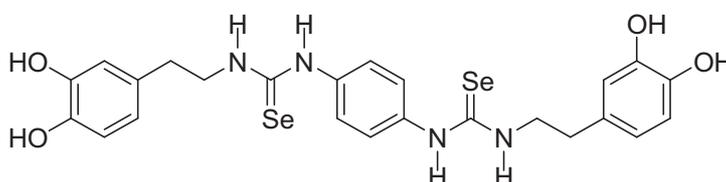
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): 178.7 (C=Se), 146.4 (C-3), 144.9 (C-4), 160.1 (C-4'), 131.6 (C-1), 130.7 (C-1'), 128.6 (C-2' y

C-6'), 121.1 (C-6), 117.0 y 116.5 (C-2 y C-5), 116.0 (C-3' y C-5'), 56.0 (OMe), 49.9 (CH₂NH), 35.3 (CH₂Ar) ppm.

FABMS *m/z* 367 ([M+H]⁺, 20%), 389 ([M+Na]⁺, 39%)

HRFABMS Calc. para C₁₆H₁₈N₂O₃⁸⁰SeNa ([M+Na]⁺): 389.0394.
Encontrado: 389.0380

8.6.2.4. 1,1'-(1,4 Fenileno)bis[3-(3,4-dihidroxifenetil) selenouréido] (28).



A una disolución de benceno 1,4-diisosenocianato **134** (50 mg, 0.174 mmol) y clorhidrato de dopamina (0.367 mmol, 70.3 mg) en metanol (5 mL) se añadió trietilamina (0.367 mmol, 51.4 μ L) y la mezcla se agitó en oscuridad a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón durante una hora. Se concentró a sequedad, y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂-MeOH 20:1), obteniéndose **28** como un sólido amarillento.

Rendimiento 36 mg, 33 %. *R_F*: 0.23 CH₂Cl₂-MeOH (10:1). p.f.: 202-204 °C.

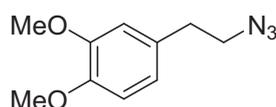
IR ν_{\max} : 3292, 3131, 2928, 2850, 1599, 1555, 1511, 1390, 1342, 1279, 1250, 1177, 813 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.92 (sa, 2H, NHAr), 8.78 y 8.66 (2 s, 4H, OH), 7.95 (sa, 2H, NH-CH₂), 7.21 (s, 4H, H-2', H-

3', H5' y H-6'), 6.65 (m, 4H, H-2 y H-5), 6.47 (dd, $J_{2,6}$ 1.4 Hz, $J_{5,6}$ 7.9 Hz, 2H, H-6), 3.67 (m, 4H, CH_2NH), 2.69 (m, 4H, CH_2Ar), ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 178.3 (C=Se), 145.1 (C-3), 147.3 (C-4), 135.4 (C-1' y C-4'), 129.8 (C-1), 124.5 (C-2', C-3', C-5' y C-6'), 119.3 (C-6), 116.0 y 115.5 (C-2 y C-5), 48.6 (CH_2NH), 33.9 (CH_2Ar) ppm.

8.6.2.5. 4-(2-Azidoetil)-1,2-dimetoxibenceno (29)



A una disolución de bromuro de 3,4-dimetoxifenetilo (650 mg, 2.573 mmol) en dimetilformamida (6 mL), se añadió NaN_3 (3.859 mmol, 250.8 mg, 1.5 equiv) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Se concentró a sequedad, y el residuo obtenido se disolvió en 100 mL de agua desionizada y se extrajo con 3x50 mL de CH_2Cl_2 . Los extractos orgánicos se unieron, se lavaron con 2x50 mL de una disolución de NaCl saturado, se secaron sobre MgSO_4 , y se concentraron a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (hex \rightarrow AcOEt-hex 1:10), dando **29** como un aceite amarillo.

Rendimiento 475 mg, 89 %. R_F 0.31 AcOEt/hexano (1:5).

IR ν_{max} : 2938, 2839, 2089, 1594, 1517, 1264, 1235, 1026, 804,

765 cm^{-1} .

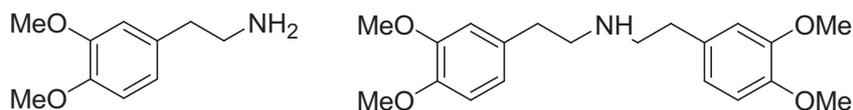
^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 6.80 (d, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 1H, H-6), 6.74 (m, 2H, H-3 y H-5), 3.86 y 3.84 (2s, 2x3H, OMe), 3.46 (t, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 7.2 Hz, 2H, CH_2N_3), 2.82 (t, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 7.2 Hz, 2H, CH_2Ar) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 149.0 (C-2), 147.9 (C-1), 130.6 (C-4), 120.7 (C-5), 112.0 y 111.4 (C-6 y C-3), 56.5 (2 OMe), 52.6 (CH_2N_3), 35.0 (CH_2Ar) ppm.

CIMS m/z 207 ($[\text{M}]^+$, 75%), 151 ($[\text{M} - \text{CH}_2\text{N}_3]^+$, 100%).

HRCIMS Calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ (M^+): 207.1008 Encontrado: 207.1003.

8.6.2.6. 4-(2-Aminoetil)-1,2-dimetoxibenceno (30) y Bis(3,4-dimetoxifenetil)amina (31).



A una disolución de la 4-(2-azidoetil)-1,2-dimetoxibenceno **29** (500 mg, 2.412 mmol) en etanol (10 mL) se añadió paladio sobre carbón al 10 % (250 mg), se desoxigenó la mezcla con nitrógeno y se hidrogenó a temperatura ambiente durante 5 horas. Se filtró sobre celita, lavando con etanol y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:1), obteniéndose **30** como un aceite amarillento y **31** como un sólido marrón.

30. Rendimiento 219 mg, 50 %. R_F 0.06 (CH_2Cl_2 :MeOH 5:1).

IR ν_{max} : 2995, 2914, 2836, 1683, 1574, 1512, 1400, 1240, 1026, 804, 653 cm^{-1} .

^1H -RMN (300 MHz, MeOH- d_4): δ 6.91 (d, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 1H, H-6), 6.88 (d, $J_{3,5}$ 2.0 Hz, 1H, H-3), 6.81 (dd, $J_{3,5}$ 2.0 Hz, 1H $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 1H, H-5), 3.83 y 3.80 (2s, 2x3H, OMe), 3.13 (m, 2H, CH_2NH_2), 2.89 (m, 2H, CH_2Ar) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, MeOH- d_4): 150.7 (C-2), 149.6 (C-1), 130.8 (C-4), 122.2 (C-5), 113.6 y 113.4 (C-6 y C-3), 55.9 (2 OMe), 42.1 (CH_2NH_2), 34.4 (CH_2Ar) ppm.

CIMS m/z 181 ($[\text{M}]^+$, 18%).

HRCIMS Calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ (M^+): 181.1098 Encontrado: 181.1103

31. Rendimiento 167 mg, 40 %; R_F 0.73 CH_2Cl_2 /MeOH (5:1); p.f.: 76-78 $^\circ\text{C}$.

IR (KBr): ν_{max} : 3314, 2995, 2934, 2829, 2360, 1699, 1590, 1517, 1451, 1334, 1260, 1141, 1028, 807, 764 cm^{-1} .

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ 6.81 (d, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 2H, H-5), 6.78 (d, $J_{2,6}$ 1.9 Hz, 2H, H-2), 6.67 (dd, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, $J_{3,5}$ 1.9 Hz, 2H, H-6), 3.71 y 3.70 (2 s, 12H, OMe), 2.74 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 7.0 Hz, 4H, CH_2NH), 2.71 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 7.0 Hz, 4H, CH_2Ar), 1.24

(s.a., 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 148.9 (C-3), 147.4 (C-4), 132.4 (C-1), 120.5 (C-6), 111.9 (C-5), 111.3 (C-2), 55.9 y 55.8 (OMe), 51.2 (CH₂NH), 35.8 (CH₂Ar) ppm.

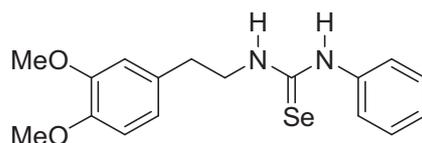
FABMS *m/z* 346 ([M+H]⁺, 89%), 368 ([M+Na]⁺, 46%).

HRFABMS Calc. para C₂₀H₂₇NO₄Na ([M+Na]⁺): 368.1838. Encontrado: 368.1827.

Procedimiento general para la obtención de las selenoureas *O*-metiladas derivadas de hidroxitirosol 32-34.

A una disolución de 4-(2-aminoetil)-1,2-dimetoxibenceno **30** (100 mg, 0.552 mmol) en diclorometano (5 mL) se añadió el isosenocianato correspondiente (1.01 equivalentes), la mezcla se agitó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos y se concentró a sequedad.

8.6.2.7. 1-(3,4-Dimetoxifenil)-3-fenil selenourea (32)



Se obtuvo a partir de isosenocianato de fenilo **129**. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂-MeOH 80:1), obteniéndose un sólido de color rosa pálido.

Rendimiento 158 mg, 79 %; R_F 0.33 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (80:1); p.f.: 128-132 °C.

IR (KBr): ν_{max} : 3346, 3151, 2997, 2834, 1591, 1541, 1516, 1451, 1398, 1291, 1265, 1158, 1140, 1028, 885 cm^{-1}

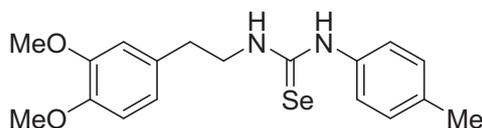
^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.02 (s.a., 1H, NHAr), 7.30 (m, 3H, H-3', H-4' y H-5'), 6.98 (m, 2H, H-2' y H-6'), 6.74 (d, $J_{5,6}$ 7.8 Hz, 1H, H-5), 6.64 (m, 2H, H-2 y H-6), 6.23 (s.a., 1H, NHCH_2), 3.95 (c, $J_{\text{CH}_2,\text{NH}}$ 6.3 Hz, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.6 Hz, 2H, CH_2NH), 3.86 y 3.81 (2 s, 2x3H, OMe), 2.87 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.6 Hz, 2H, CH_2Ar), ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 178.7 (C=Se), 149.2 (C-3), 147.9 (C-4), 130.6 (C-1), 130.2 (C-3' y C-5'), 127.7 (C-1' y C-4'), 125.1 (C-2' y C-6'), 120.6 (C-6), 111.8 y 111.4 (C-2 y C-5), 56.0 y 55.8 (2xOMe), 49.1 (CH_2NH), 34.3 (CH_2Ar) ppm.

FABMS m/z 365 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 32%), 387 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 25%).

HRFABMS Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2^{80}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 365.0768.
Encontrado: 365.0765.

8.6.2.8. 1-(3,4-Dimetoxifenetil)-3-(*p*-tolil) selenourea (33).



Se obtuvo a partir de isoselenocianato de *p*-metilfenilo **130**. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 40:1), obteniéndose un sólido de color blanco.

Rendimiento 175 mg, 84 %; R_F : 0.35 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (80:1); p.f.: 114-118 °C.

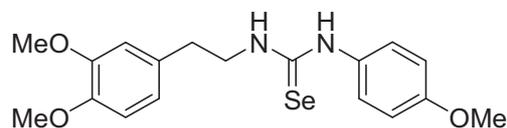
IR (KBr): ν_{max} : 3491, 3342, 3146, 2979, 2834, 1591, 1540, 1459, 1256, 1158, 1026, 809 cm^{-1}

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.43 (s.a., 1H, NHAr), 7.08 (m, $J_{o,m}$ 8.1 Hz, 2H, H-3' y H-5'), 6.86 (m, $J_{o,m}$ 8.1 Hz, 2H, H-2' y H-6'), 6.71 (d, $J_{5,6}$ 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.62 (m, 2H, H-2 y H-6), 6.17 (s.a., 1H, NHCH_2), 3.89 (c, $J_{\text{CH}_2,\text{NH}}$ 6.3 Hz, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.4 Hz, 2H, CH_2NH), 3.87 y 3.82 (2 s, 2x3H, OMe), 2.82 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.4 Hz, 2H, CH_2Ar), ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 178.2 (C=Se), 149.0 (C-3), 147.7 (C-4), 137.6 (C-1'), 132.7 (C-1), 130.6 (C-3', C-1 y C-5'), 125.1 (C-2' y C-6'), 120.5 (C-6), 111.7 y 111.3 (C-2 y C-5), 55.8 y 55.7 (2xOMe), 48.8 (CH_2NH), 34.3 (CH_2Ar), 20.9 (CH_3Ar) ppm.

FABMS m/z 379 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 42%), 401 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 33%)

HRFABMS Calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2^{80}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 379.0925.
Encontrado: 379.0928.

8.6.2.9. 1-(3,4-Dimetoxifenil)-3-(*p*-metoxifenil) selenourea (34).

Se obtuvo a partir del isoselenocianato de *p*-metoxifenilo **131**. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 40:1), obteniéndose un sólido amarillento.

Rendimiento 180 mg, 83 %; R_F 0.15 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (40:1); p.f.: 124-126 °C.

IR (KBr): ν_{max} : 3485, 3343, 3150, 2962, 2837, 1691, 1514, 1461, 1241, 1147, 1029, 806 cm^{-1} .

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.03 (s.a., 1H, NHAr), 6.93 (m, $J_{o,m}$ 8.8 Hz, 2H, H-3' y H-5'), 6.82 (m, $J_{o,m}$ 8.8 Hz, 2H, H-2' y H-6'), 6.71 (d, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 1H, H-5), 6.63 (s, 1H, H-2), 6.60 (d, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 1H, H-6) 6.01 (s.a., 1H, NHCH₂), 3.90 (c, $J_{\text{CH}_2,\text{NH}}$ 6.3 Hz, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.4 Hz, 2H, CH₂NH), 3.84, 3.81 y 3.79 (3 s, 2x3H, 3OMe), 2.84 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.4 Hz, 2H, CH₂Ar), ppm.

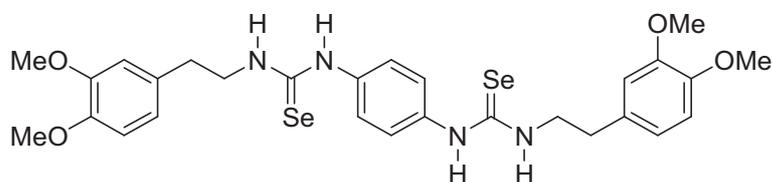
$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): 178.9 (C=Se), 159.1 (C-4'), 149.1 (C-3), 147.8 (C-4), 130.6 (C-1'), 127.7 (C-1), 127.4 (C-2' y C-6'), 120.6 (C-6), 115.2 (C-3' y C-5'), 111.7 y 111.3 (C-2 y C-5), 55.9, 55.8 y 55.4 (3xOMe), 48.8 (CH₂NH), 34.4

(CH₂Ar) ppm.

FABMS m/z 395 ([M+H]⁺, 29%), 417 ([M+Na]⁺, 34%).

HRFABMS Calc. para C₁₈H₂₃N₂O₃⁸⁰SeNa ([M+H]⁺): 379.0874.
Encontrado: 379.0872.

8.6.2.10. 1,1'-(1,4 Fenileno)bis[3-(3,4-dimetoxifenetil) selenoureido] (35)



A una disolución de 4-(2-aminoetil)-1,2-dimetoxibenceno **30** (100 mg, 0.483 mmol) en diclorometano (5 mL), se añadió benceno 1,4-diisosenocianato **134** (0.215 mmol, 61.6 mg) y la mezcla se agitó en oscuridad a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón durante 3 horas. Se concentró a sequedad, y el bruto de reacción se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂/MeOH 20:1), obteniéndose **35** como un sólido amarillento.

Rendimiento 93 mg, 67 %. R_F 0.28 CH₂Cl₂/MeOH (20:1). p.f.: 167-169 °C.

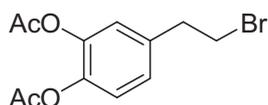
IR ν_{\max} : 3258, 3136, 2936, 2830, 1700, 1593, 1536, 1512, 1463, 1337, 1241, 1158, 1129, 1027, 804 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.93 (sa, 2H, NHAr), 7.96 (sa, 2H, NHCH₂), 7.18 (s, 4H, H-4'y H-5'), 6.88 (d, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 2H,

H-5), 6.86 (d, $J_{2,6}$ 1.3 Hz, 2H, H-2), 6.75 (dd, $J_{2,6}$ 1.3 Hz, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 2H, H-6), 3.74 (m, 16H, CH_2NH y 4 OMe), 2.83 (m, 4H, CH_2Ar), ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, DMSO- d_6): 178.5 (C=Se), 148.7 (C-3), 147.3 (C-4), 135.4 (C-1' y C-4'), 131.5 (C-1), 124.3 (C-2', C-3', C-5' y C-6'), 120.6 (C-6), 112.5 y 111.0 (C-2 y C-5), 55.4 y 55.6 (OMe), 48.2 (CH_2NH), 34.0 (CH_2Ar) ppm.

8.6.2.11. 1,2-Diacetoxi-4-(2-bromoetil) benceno (36).



A una disolución del 4-(2-bromoetil)benceno-1,2-diol **1** (250 mg, 0.856 mmol) en piridina (2 mL) a 0 °C, se fue añadiendo gota a gota anhídrido acético (2 mL). Se agitó a 0 °C durante una hora, y se dejó en congelador toda la noche. Se concentró a sequedad a presión reducida, se disolvió en agua destilada (40 mL) y se extrajo con 3x40 mL de diclorometano. La fracción orgánica se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:20→AcOEt-hexano 1:5), obteniéndose **36** como un aceite amarillento.

Rendimiento 237.1 mg, 92 %. R_F : 0.42 AcOEt/hex (1:2).

IR ν_{max} : 2925, 2848, 1766, 1591, 1507, 1427, 1368, 1256, 1203,

1175, 1107, 1010, 901 cm^{-1} .

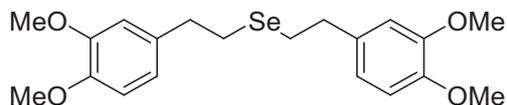
^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.14 (d, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 1H, H-6), 7.10 (d, $J_{3,5}$ 1.7 Hz, 1H, H-3), 7.06 (dd, $J_{3,5}$ 1.7 Hz, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 1H, H-5), 3.54 (t, $J_{1,2}$ 7.6 Hz, 2H, CH_2Br), 3.15 (t, $J_{1,2}$ 7.6 Hz, 2H, CH_2Ar), 2.28 (2 s, 2 x 3H, OAc) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 168.2 y 168.1 (2 C=O, OAc) 142.0 (C-2), 140.9 (C-1), 137.6 (C-4), 126.7 (C-5), 123.6 y 123.4 (C-3 y C-6), 38.6 (CH_2Br), 32.0, (CH_2Ar) 20.6 (2 CH_3 , OAc) ppm.

FABMS m/z 301 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 45%), 221 ($[\text{M}-\text{Br}]^+$, 20%).

HRFABMS Calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{14}^{79}\text{BrO}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 301.0075. Encontrado: 301.0078.

8.6.2.12. Selenuro de bis(3,4-dimetoxifenilo) (37)



A una suspensión enfriada a 0 °C de selenio negro (150 mg, 1.90 mmol) y NaOH (4.18 mmol, 167.2 mg) en tetrahidrofurano-agua 100:1 (12 mL), bajo atmósfera de argón, se fue añadiendo borohidruro sódico (4.18 mmol, 158.7 mg) en pequeñas porciones. Finalizada la adición se agitó a 0 °C durante 45 minutos, y otros 45 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó bromuro de 3,4-dimetoxifenilo (1.726 mmol, 436.4 mg) y la reacción se agitó en oscuridad a temperatura ambiente en atmósfera de

argón durante 3 horas. Se concentró a sequedad, se disolvió en agua (75 mL) y diclorometano (75 mL). Se separó la capa orgánica, y la acuosa se extrajo con 2x75 mL de CH₂Cl₂. La fracción orgánica se lavó con 75 mL de cloruro sódico saturado, se secó con sulfato magnésico y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:20→AcOEt-hexano 1:3), obteniéndose **37** como un sólido amarillento.

Rendimiento 311 mg, 90 %. R_F 0.22 AcOEt-hex (1:3). p.f.: 69-72 °C.

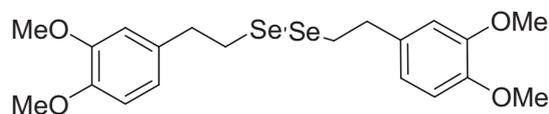
IR ν_{\max} : 2926, 2838, 1587, 1510, 1441, 1240, 1138, 1024, 857, 807, 765 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6.80 (d, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 2H, H-5), 6.73 (m, 4H, H-2 y H-6), 3.87 y 3.85 (2 s, 4x3H, OMe), 2.90 (m, 4H, CH₂Ar), 2.78 (m, 4H, CH₂Se), ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 148.9 (C-3), 147.6 (C-4), 133.9 (C-1), 120.2 (C-6), 111.7 y 111.3 (C-5 y C-2), 55.9 (OMe), 36.8 (CH₂Ar), 25.4, (CH₂Se) ppm.

EIMS m/z 409 ([M - H]⁺, 10%), 433 ([M+Na]⁺, 30%).

HREIMS Calc. para C₂₀H₂₆O₄Se ([M+Na]⁺): 433.0888. Encontrado: 433.0894.

8.6.2.13. Diselenuro de bis(3,4-dimetoxifenetilo) (38).

A una suspensión enfriada a 0 °C de selenio negro (300 mg, 3.800 mmol) y NaOH (8.360 mmol, 334.4 mg) en tetrahidrofurano-agua 100:1 (13.5 mL), bajo atmósfera de argón, se fue añadiendo borohidruro sódico (8.360 mmol, 316.2 mg) en pequeñas porciones. Finalizada la adición se agitó a 0 °C durante 30 minutos, y otros 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregó selenio negro (3.800 mmol, 300 mg), y se continuó la agitación en oscuridad durante 3 horas. Se añadió el bromuro de 3,4-dimetoxifenetilo (1.902 mmol, 480.1 mg) disuelto en tetrahidrofurano (9 mL) y se agitó a temperatura ambiente en oscuridad y atmósfera inerte 2 horas más. Se concentró a sequedad, se disolvió en agua (75 mL) y diclorometano (75 mL), se separó la capa orgánica, y la acuosa se extrajo con 2x75 mL de CH₂Cl₂. La fracción orgánica se lavó con 75 mL de cloruro sódico saturado, se secó con sulfato magnésico y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:20→AcOEt-hexano 1:3), obteniéndose **38** como un sólido amarillento.

Rendimiento 437 mg, 94 %. R_F : 0.22 AcOEt-hexano (1:3). p.f.: 74-76 °C.

IR ν_{\max} : 2938, 2838, 1587, 1515, 1451, 1418, 1233, 1140, 1025, 852, 814, 766 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6.80 (d, $J_{5,6}$ 7.9 Hz, 2H, H-5), 6.74 (m,

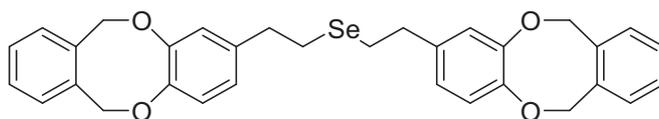
4H, H-2 y H6), 3.87 y 3.85 (2s, 4x3H, OMe), 3.15 (m, 4H, CH₂Se), 2.99 (m, 4H, CH₂Ar), ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 148.9 (C-3), 147.6 (C-4), 133.4 (C-1), 120.4 (C-6), 111.8 y 111.3 (C-2 y C-5), 55.9 (OMe), 37.2 (CH₂Ar), 31.1, (CH₂Se) ppm.

FABMS *m/z* 491 ([M+H]⁺, 5%), 513 ([M+Na]⁺, 18%).

HRFABMS Calc. para C₂₄H₂₆O₈⁸⁰Se₂Na ([M+Na]⁺): 513.0054.
Encontrado: 513.0059.

8.6.2.14. Selenuro de bis[3,4-(*o*-xililenodioxi)fenetilo] (39).



A una suspensión enfriada a 0 °C de selenio negro (50 mg, 0.633 mmol) y NaOH (1.392 mmol, 45.3 mg) en tetrahidrofurano-agua 100:1 (4 mL), bajo atmósfera de argón, se fue añadiendo borohidruro sódico (1.392 mmol, 52.7 mg) en pequeñas porciones. Finalizada la adición se agitó a 0 °C durante 45 minutos, y otros 45 minutos a temperatura ambiente. Se añadió el 4-(2-bromoetil)-1,2-(*o*-xililenodioxi)benceno **5** (0.844 mmol, 268.4 mg) disuelto en tetrahidrofurano (4 mL) y se agitó a temperatura ambiente en oscuridad y atmósfera inerte 3 horas más. Se concentró a sequedad, se disolvió en agua (25 mL) y diclorometano (25 mL). Se separó la capa orgánica, y la acuosa se extrajo con 2x25 mL de CH₂Cl₂. La fracción orgánica se lavó con 25 mL de cloruro sódico saturado, se secó con sulfato

magnésico y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:20→AcOEt-hexano 1:30), obteniéndose **39** como un sólido amarillento.

Rendimiento 87 mg, 37 %. R_F 0.23 AcOEt/hexano (1:10). p.f.: 118-120 °C.

IR 2938, 2850, 1575, 1502, 1444, 1284, 1244, 1177, 1109, 988, 823, 741 cm^{-1} .

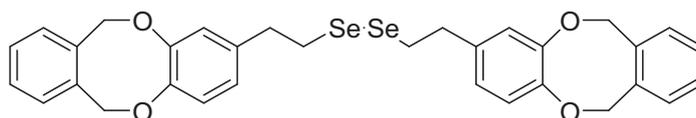
^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.25 (m, 2H, H-3' y H-6'), 7.16 (m, 2H, H-4' y H-5'), 6.92 (d, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 1H, H-5), 6.79 (d, $J_{2,6}$ 2.1 Hz, 1H, H-2), 6.70 (dd, $J_{2,6}$ 2.1 Hz, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 1H, H-6), 5.40 y 5.36 (2 s, 2x2H, CH_2O), 2.79 (m, 2H, CH_2Se), 2.66 (m, 2H, CH_2Ar), ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 149.7 (C-3), 148.1 (C-4), 136.9 (C-1), 136.0 y 135.6 (C-1' y C-2'), 129.2, 128.7, 128.5 y 128.4 (C-3', C-4', C-5' y C-6'), 123.3 (C-6), 121.8 y 121.5 (C-2 y C-5), 75.5 y 75.0 (2x CH_2O), 36.5 (CH_2Ar), 24.8 (CH_2Se) ppm.

CIMS m/z 558 ($[\text{M}]^+$, 10%).

HRCIMS Calc. para $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{O}_4\text{Se}$ ($[\text{M}]^+$): 558.1309. Encontrado: 558.1312.

8.6.2.14. Diselenuro de bis[3,4-(*o*-xililenodioxi)fenetilo] (**40**).



A una suspensión enfriada a 0 °C de selenio negro (50 mg, 0.633 mmol) y NaOH (1.392 mmol, 45.3 mg) en tetrahidrofurano-agua 100:1 (4 mL), bajo atmósfera de argón, se fue añadiendo borohidruro sódico (1.392 mmol, 52.7 mg) en pequeñas porciones. Finalizada la adición se agitó a 0 °C durante 45 minutos, y otros 45 minutos a temperatura ambiente. Se agregó selenio negro (0.633 mmol, 50 mg), y se continuó la agitación en oscuridad durante 3 horas. Se añadió el 4-(2-bromoetil)-1,2-(*o*-xililenodioxi)benceno **5** (0.844 mmol, 268.4 mg) disuelto en tetrahidrofurano (4 mL) y se agitó a temperatura ambiente en oscuridad y atmósfera inerte 3 horas más. Se concentró a sequedad, se disolvió en agua (25 mL) y diclorometano (25 mL), se separó la capa orgánica, y la acuosa se extrajo con 2x25 mL de CH₂Cl₂. La fracción orgánica se lavó con 25 mL de cloruro sódico saturado, se secó con sulfato magnésico y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:20→AcOEt-hexano 1:30), obteniéndose **40** como un sólido amarillento.

Rendimiento 148 mg, 55 %. R_F 0.23 AcOEt/hexano (1:10). p.f.: 86-90 °C.

IR ν_{\max} : 2933, 2826, 1575, 1497, 1449, 1385 1284, 1182, 1129, 988, 818, 745 cm⁻¹.

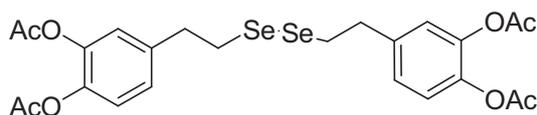
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.25 (m, 2H, H-3' y H-6'), 7.17 (m, 2H, H-4' y H-5'), 6.92 (d, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 1H, H-5), 6.82 (d, $J_{3,5}$ 2.1 Hz, 1H, H-2), 6.72 (dd, $J_{2,6}$ 2.1 Hz, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 1H, H-6), 5.40 y 5.36 (2 s, 2x2H, CH₂O), 3.04 (m, 2H, CH₂Ar), 2.89 (m, 2H, CH₂Se), ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): 149.7 (C-3), 148.2 (C-4), 136.5 (C-1), 136.0 y 135.7 (C-1' y C-2'), 129.3, 128.8, 128.5 y 128.4 (C-3', C-4', C-5' y C-6'), 123.4 (C-6), 122.0 y 121.6 (C-2 y C-5), 75.5 y 75.0 ($2\times\text{CH}_2\text{O}$), 36.8 (CH_2Ar), 30.6 (CH_2Se) ppm.

CIMS m/z 638 ($[\text{M}]^+$, 1%), 225 ($[\text{M}/2+\text{H}]^+$, 21%).

HRCIMS Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{Se}$ ($[\text{M}/2+\text{H}]^+$): 320.0316. Encontrado: 320.0318.

8.6.2.15. Diselenuro de bis (3,4-diacetoxifenetilo) (41).



A una disolución de selenio negro (150 mg, 1.901 mmol) en etanol (11 mL), bajo atmósfera de argón, se fue añadiendo borohidruro sódico, en pequeñas porciones, hasta que el color de la disolución cambió a blanco y además persistió. El exceso de basicidad se neutralizó con CO_2 sólido, y a continuación se adicionó 1,2-diacetoxi-4-(2-bromoetil)benceno **36** (520.2 mg, 1.728 mmol) disuelto en tetrahidrofurano (11 mL) y se agitó en oscuridad a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 2.5 horas. Se concentró a sequedad. Se disolvió en agua destilada (75 mL) y diclorometano (75 mL). Se separó la capa orgánica y la acuosa se extrajo con 2×75 mL de diclorometano. La fracción orgánica se lavó con 2×75 mL de cloruro sódico saturado, se secó sobre MgSO_4 y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:20 \rightarrow AcOEt-hexano 1:3), obteniéndose **41** como un sólido amarillo.

Rendimiento 265 mg, 51 %; R_F : 0.22 AcOEt-Hex (1:2); p.f.: 98-100 °C.

IR ν_{\max} : 2914, 2851, 1768, 1502, 1427, 1368, 1258, 1192, 1124, 10107, 894, 825, 669 cm^{-1} .

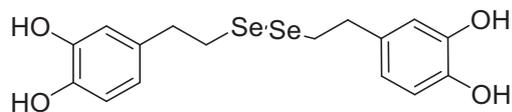
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.11 (d, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, 2H, H-5), 7.09 (d, $J_{2,6}$ 1.6 Hz, 2H, H-2), 7.05 (dd, $J_{5,6}$ 8.1 Hz, $J_{2,6}$ 1.7 Hz, 2H, H-6), 3.12 (m, 4H, CH_2Se), 3.03 (t, 4H, CH_2Ar), 2.28 (2 s, 4x3H, OAc) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): 168.3 y 168.2 (C=O, OAc) 142.0 (C-3), 140.5 (C-4), 139.6 (C-1), 126.6 (C-6), 123.3 (C-2 y C-5), 36.9 (CH_2Ar), 29.9, (CH_2Se), 20.6 (4 CH_3 , OAc) ppm.

FABMS m/z 521 ($[\text{M} - \text{H}]^+$, 12%), 545 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 5%).

HRFABMS Calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_2^{80}\text{SeNa}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$): 545.0688
Encontrado: 545.0691.

8.6.2.16. Diselenuro de bis(3,4-dihidroxifenilo) (42).



Procedimiento A:

A una disolución de diselenuro de bis(3,4-diacetoxifenilo) **41** (150 mg, 0.25 mmol) en diclorometano-metanol 1:1 (7 mL) se añadió una

cantidad catalítica de K_2CO_3 , y la mezcla se agitó a temperatura ambiente, en oscuridad y en atmósfera de argón durante 1h. Se neutralizó el medio de reacción con ácido acético diluido hasta pH 6 y se concentró a sequedad. Rendimiento 55 mg, 51 %.

Procedimiento B:

A una disolución enfriada a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ de diselenuro de bis(3,4-dimetoxifenilo) **38** (250 mg, 0.512 mmol), en diclorometano seco (8.5 mL), en atmósfera de argón y con tamiz molecular de 4 \AA , se añadió tribromuro de boro (2.046 mmol, 193 μL) y la mezcla se agitó en oscuridad a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, y una hora a temperatura ambiente. Se adicionó entonces 1 mL de agua y se agitó 15 minutos más. Se concentró a sequedad y el residuo obtenido se disolvió en metanol y se filtró sobre celita, evaporando posteriormente el disolvente en el rotavapor. Rendimiento 122 mg, 55 %.

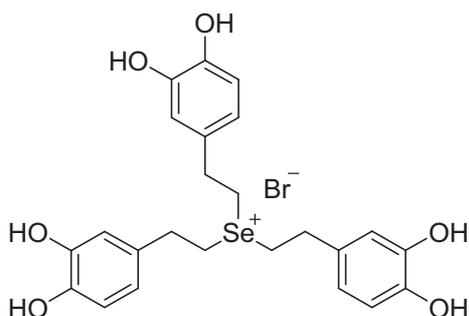
El residuo obtenido por cualquiera de los dos métodos se purificó mediante cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH } 25:1$), obteniéndose un sólido amarillento. R_F 0.39 $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH } (10:1)$; p.f.: $104\text{-}108\text{ }^\circ\text{C}$.

IR ν_{max} : 3451, 3249, 2918, 1605, 1524, 1439, 1374, 1281, 1253, 1179, 1119, 927, 864, 812, 786, 656 cm^{-1} .

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): δ 6.68 (d, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 2H, H-5), 6.64 (d, $J_{3,5}$ 2.0 Hz, 2H, H-2), 6.51 (dd, $J_{3,5}$ 2.0 Hz, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 2H, H-6), 3.09 (m, 4H, CH_2Se), 2.56 (m, 4H, CH_2Ar), ppm.

^{13}C -RMN	(75.5 MHz, MeOH- d_4): 146.3 (C-3), 144.8 (C-4), 134.0 (C-1), 120.6 (C-6), 111.6 y 111.4 (C-2, C-5), 38.0 (CH ₂ Ar), 32.3, (CH ₂ Se) ppm.
CIMS	m/z 435 ([M + H] ⁺ , 2%, 217 ([M/2] ⁺ , 30%).
HRCIMS	Calc. para C ₈ H ₉ O ₂ ⁸⁰ Se ([M/2] ⁺): 216.9776. Encontrado: 216.9768.

8.6.2.17. Bromuro de tris(3,4-dihidroxifenetil)selenonio (43).

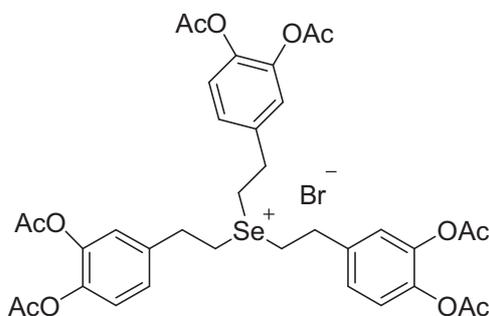


A una disolución enfriada a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ de selenuro de bis(3,4-dimetoxifenetil) **37** (250 mg, 0.623 mmol) en diclorometano seco (8.5 mL), en atmósfera de argón y con tamiz molecular de 4 Å, se añadió tribromuro de boro (2.489 mmol, 235 μL) y la mezcla se agitó en oscuridad a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, y una hora a temperatura ambiente. Se adicionó 1 mL de agua y se agitó 15 minutos más. Se concentró a sequedad y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂-MeOH 25:1), obteniéndose **43** como un aceite marrón muy viscoso.

Rendimiento 238 mg, 67 %. R_F : 0.39 CH₂Cl₂-MeOH (10:1).

IR	ν_{\max} : 3325, 2928, 2825, 1701, 1604, 1507, 1438, 1347, 1278, 1182, 1104, 1012, 783 cm^{-1} .
^1H -RMN	(300 MHz, MeOD): δ 6.67 (d, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 3H, H-5), 6.63 (d, $J_{3,5}$ 2.0 Hz, 3H, H-2), 6.50 (dd, $J_{3,5}$ 2.0 Hz, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 3H, H-6), 2.76 (m, 6H, CH_2Se), 2.68 (m, 6H, CH_2Ar), ppm.
^{13}C -RMN	(75.5 MHz, MeOD): 146.1 (C-3), 144.6 (C-4), 134.6 (C-1), 120.7 (C-6), 116.6 y 116.3 (C-2 y C-5), 37.9 (CH_2Ar), 26.1, ($\text{CH}_2\text{-Se}$) ppm.
CIMS	m/z 491 ($[\text{M}^+]$, 10%).
HRFABMS	Calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_6$ ^{80}Se ($[\text{M}]^+$): 491.0967. Encontrado: 491.0973.

8.6.2.18. Bromuro de tris(3,4-diacetoxifenetil)selenonio (44).



A una disolución de bromuro de tris(3,4-diacetoxifenetil)selenonio **43** (50 mg, 0.0877 mmol) y en piridina (1 mL), enfriada a 0 °C se añadió anhídrido acético (1 mL) y la mezcla se agitó en oscuridad a durante 15 minutos. Se guardó en el congelador durante toda la noche. Se añadió 1 mL

de H₂O y se concentró a sequedad. Se purificó por cromatografía en columna (hexano→AcOEt-hexano 1:3), obteniéndose **44** como un aceite viscoso amarillento.

Rendimiento 55 mg, 76 %. R_F 0.50 AcOEt-hexano (1:1).

IR ν_{\max} : 2928, 2851, 1763, 1502, 1426, 1370, 1254, 1203, 1173, 1104, 1008, 828 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.09 (m, 6H, H-5 y H-2), 7.02 (m, 3H, H-6), 2.94 (m, 6H, CH₂Ar), 2.78 (m, 6H, CH₂Se), 2.28 (s, 6x3H, OAc) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 168.3 y 168.2 (2 C=O, OAc) 141.9 (C-3), 140.5 (C-4), 140 (C-1), 126.6 (C-6), 123.3 (C-2 y C-5), 36.5 (CH₂Ar), 24.6 (CH₂Se) 20.6 (6 CH₃, OAc) ppm.

CIBMS m/z 743 ([M]⁺, 10%).

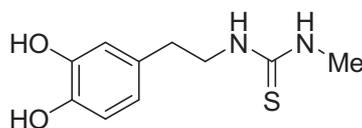
HREIMS Calc. para C₃₆H₃₉O₁₂⁸⁰Se ([M]⁺): 743.1607. Encontrado: 743.1660

8.6.3. TIOUREAS DERIVADAS DE DOPAMINA. REACCIONES CON DDQ Y FORMACIÓN DE 2-AMINO-1,3-BENZOTIAZEPINAS.

Procedimiento general para la obtención de las tioureas derivadas de dopamina 45-49.

A una disolución de clorhidrato de dopamina (300 mg, 1.582 mmol) y del isotiocianato comercial correspondiente (1.2 equivalentes) en metanol (20 mL) se añadió trietilamina (1.582 mmol, 220 μ L) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón durante una hora. Se concentró a sequedad, y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna.

8.6.3.1. 1-(3,4-Dihidroxifenetil)-3-metiltiourea (45).



Se obtuvo a partir de metilisotiocianato comercial. Se purificó por cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1), obteniéndose **45** como un sólido blanco.

Rendimiento 226 mg, 63 %. R_F 0.16 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20:1). p.f.: 105-107 °C.

IR ν_{max} : 3326, 3258, 2928, 2860, 1696, 1604, 1560, 1519, 1439, 1352, 1284, 1187, 1114, 1017, 813 cm^{-1} .

^1H -RMN (300 MHz, MeOD): δ 6.68 (m, 2H, H-2 y H-5), 6.54 (dd, $J_{2,6}$ 2.0 Hz, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 1H, H-6), 3.60 (sa, 2H, CH_2NH), 2.89

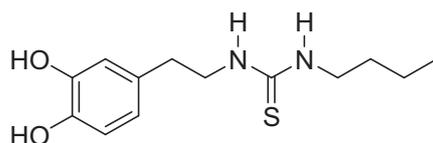
(sa, 3H, CH₃), 2.72 (m, 2H, CH₂Ar), ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOD): 183.2 (C=S), 146.3 (C-3), 144.8 (C-4), 132.0 (C-1), 121.1 (C-6), 116.9 y 116.4 (C-2 y C-5), 47.0 (CH₂NH), 35.7 (CH₂Ar), 30.7 (CH₃) ppm.

CIMS *m/z* 227 ([M+H]⁺, 24%), 211 ([M-CH₃]⁺, 22%).

HRCIMS Calc. para C₁₀H₁₅N₂O₂S ([M+H]⁺): 227.0854. Encontrado: 227.0856

8.6.3.2. 1-Butil-3-(3,4-dihidroxifenetil)tiourea (46).



Se obtuvo a partir de butilisotiocianato comercial. Se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂/MeOH 25:1), obteniéndose **46** como un sólido blanco.

Rendimiento 177 mg, 42 %. *R_F*: 0.16 CH₂Cl₂-MeOH (20:1). p.f.: 95-96 °C.

IR ν_{\max} : 3220, 3055, 2959, 2923, 2866, 1607, 1571, 1514, 1455, 1347, 1278, 1199, 966, 781 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, MeOH-*d*₄): δ 6.68 (m, 2H, H-2 y H-5), 6.54 (dd, *J*_{2,6} 2.0 Hz, *J*_{5,6} 8.0 Hz, 1H, H-6), 3.62 (m, 2H, ArCH₂CH₂NH), 3.38 (m, 2H, CH₃(CH₂)₂CH₂), 2.71 (t, *J*_{CH₂,CH₂} 7.2 Hz, 2H, CH₂Ar), 1.51 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂,

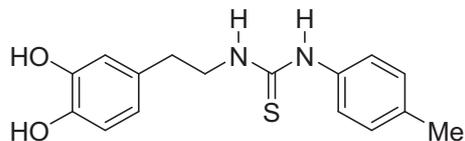
1.34 (m, 2H, CH₃-CH₂), 0.94 (t, 3H, *J*_{CH₃,CH₂} 7.3 Hz, CH₃) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): 182.8 (C=S), 146.3 (C-3), 144.8 (C-4), 132.0 (C-1), 121.1 (C-6), 116.9 y 116.4 (C-2 y C-5), 46.9 (ArCH₂CH₂NH), 44.9 (NHCH₂-Alifático), 35.7 (CH₂Ar), 32.9 (CH₂-CH₂-CH₃), 21.1 (CH₂-CH₃) ppm.

CIMS *m/z* 269 ([M+H]⁺, 100%), 211 ([M-Bu]⁺, 3%).

HRCIMS Calc. para C₁₃H₂₁N₂O₂S ([M+Na]⁺): 269.1324. Encontrado: 269.1324

8.6.3.3. 1-(3,4-Dihidroxifenetil)-3-(*p*-tolil)tiourea (47).



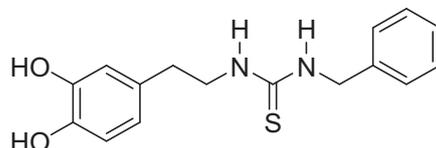
Se obtuvo a partir de *p*-tolilisotiocianato comercial. Se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂-MeOH 25:1), obteniéndose **47** como un sólido blanco.

Rendimiento 354 mg, 74 %. *R*_F.: 0.25 CH₂Cl₂-MeOH (20:1). p.f.: 151-153 °C.

IR (KBr): *v*_{max}: 3351, 3190, 2971, 2922, 2870, 1598, 1542, 1509, 1448, 1349, 1276, 1188, 781 cm⁻¹.

$^1\text{H-RMN}$	(300 MHz, MeOH- d_4): δ 7.13 (m, 2H, H-3'y H-5'), 6.99 (m, 2H, H-2'y H-6'), 6.67 (d, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 1H, H-5), 6.65 (d, $J_{2,6}$ 2.0 Hz, 1H, H-2), 6.50 (dd, $J_{2,6}$ 2.0 Hz, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 1H, H-6), 3.72 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 7.0 Hz, 2H, CH_2NH), 2.74 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 7.0 Hz, 2H, CH_2Ar), 2.31 (s, 3H, CH_3) ppm.
$^{13}\text{C-RMN}$	(75.5 MHz, MeOH- d_4): 181.7 (C=Se), 146.4 (C-3), 144.9 (C-4), 137.3 (C-1'), 136.2 (C-4'), 131.8 (C-1), 131.0 (C-3' y C-5'), 126.0 (C-2' y C-6'), 121.1 (C-6), 116.9 y 116.5 (C-2 y C-5), 47.2 (CH_2NH), 35.2 (CH_2Ar) 21.0 (CH_3), ppm.
CIMS	m/z 303 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 18%.
HRCIMS	Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 303.1167. Encontrado: 303.1156

8.6.3.4. 1-Bencil-3-(3,4-dihidroxifenetil)tiourea (48).

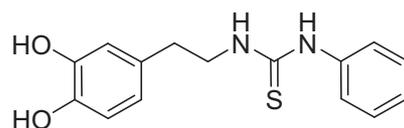


Se obtuvo a partir de bencilisotiocianato comercial. Se purificó por cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 25:1), obteniéndose **48** como un sólido blanco.

Rendimiento 297 mg, 62 %. R_f : 0.25 $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (20:1). p.f.: 136-138 °C.

IR	ν_{\max} : 3319, 3267, 2929, 2860, 1599, 1572, 1510, 1450, 1337, 1281, 1107, 1013, 804 cm^{-1} .
^1H -RMN	(300 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): δ 7.28 (m, 5H, Ph), 6.68 (m, 2H, H-2 y H-5), 6.52 (dd, $J_{2,6}$ 1.8 Hz, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 1H, H-6), 4.66 (sa, 2H, PhCH_2NH) 3.66 (sa, 2H, CH_2NH), 2.71 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 7.2 Hz, 2H, CH_2Ar), ppm.
^{13}C -RMN	(75.5 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 183.4 (C=S), 146.3 (C-3), 144.8 (C-4) 139.9 (C-1'), 131.9 (C-1), 129.5 y 128.4 (C-2', C-3', C-5' y C-6'), 128.2 (C-4'), 121.1 (C-6), 116.9 y 116.4 (C-2 y C-5), 48.2 (PhCH_2NH), 46.9 (CH_2NH), 35.7 (CH_2Ar) ppm.
CIMS	m/z 303 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 27%)
HRCIMS	Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 303.1167. Encontrado: 303.1167.

8.6.3.5. 1-(3,4-dihidroxifenil)3-feniltiourea (49).

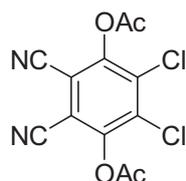


Se obtuvo a partir de fenilisotiocianato comercial. Se purificó por cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 40:1), obteniéndose **49** como un sólido blanco.

Rendimiento 420 mg, 92 %. R_F : 0.30 $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (20:1). p.f.: 98-100 °C.

IR	ν_{\max} : 3340, 3220, 2938, 1706, 1599, 1517, 1493, 1444, 1351, 1279, 1177, 1109, 1022, 809 cm^{-1} .
$^1\text{H-RMN}$	(300 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): δ 7.31 (m, 2H, H-3' y H-5'), 7.16 (m, 3H, H-2', H-4' y H-6'), 6.68 (m, 2H, H-2 y H-5), 6.53 (dd, $J_{2,6}$ 2.0 Hz, $J_{5,6}$ 8.0 Hz, 1H, H-6), 3.74 (t, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 7.0 Hz, 2H, CH_2NH), 2.76 (t, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 7.0 Hz, 2H, CH_2Ar) ppm.
$^{13}\text{C-RMN}$	(75.5 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 181.8 (C=Se), 146.4 (C-3), 144.9 (C-4), 139.2 (C-1'), 131.9 (C-1), 130.4 (C-3' y C-5'), 126.9 (C-2' y C-6'), 125.7 (C-4'), 121.1 (C-6), 117.0 y 116.5 (C-2 y C-5), 47.3 (CH_2NH), 35.2 (CH_2Ar) ppm.
CIMS	m/z 289 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 14%), 271 ($[\text{M} - \text{OH}]^+$, 2%).
HRCIMS	Calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 289.1011. Encontrado: 289.1008

8.6.3.6. 3,6-diacetoxi-4,5-diclorofaltonitrilo (50).



A una disolución de 2,3-diciano-5,6-diclorobenceno-1,4-diol **152** (25 mg, 0.109 mmol) en piridina (300 μL) enfriada a 0 $^\circ\text{C}$, se añadió anhídrido acético (300 μL), y la mezcla se agitó a 0 $^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, y posteriormente se dejó en el congelador toda la noche. Se concentró a

sequedad, y el residuo obtenido se suspendió en agua desionizada (10 mL) y se extrajo con 3x10 mL de CH₂Cl₂. Los extractos orgánicos se unieron, se secaron sobre MgSO₄, y se concentraron a sequedad, obteniéndose **50** como sólido blanco que no necesitó purificación adicional.

Rendimiento 25 mg, 58 %. *R_F* 0.82 AcOEt-Hex (2:1).

IR 2938, 2243, 1793, 1415, 1371, 1318, 1139, 1134, 1012, 915, 828, 789, 687 cm⁻¹.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 2.49 (s, 6H, OAc) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 166.2 (C=O, OAc), 148.7 (C-3 y C-6), 135.3 (C-4 y C-5), 110.6 (C-1 y C-2), 20.3 (CH₃, OAc) ppm.

CIMS *m/z* 312 ([M+H]⁺, 20 %),

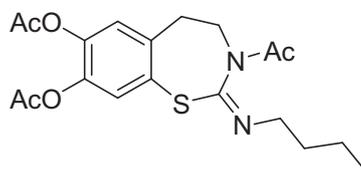
HRCIMS Calc. para C₁₂H₇N₂O₄Cl₂ (M⁺): 312.9783 Encontrado: 312.9778.

Procedimiento general para la obtención de las 3-acetil-7,8-diacetoxibenzo[*f*][1,3]tiazepinas.

A una disolución de las tioureas **45-49** (0.500 mmol) en THF (5 mL) se añadió dicloro-diciano-quinona (0.625 mmol, 141.9 mg, 1.25 equivalentes) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se siguió mediante cromatografía en capa fina, y cuando fue necesario se añadió más DDQ hasta consumir todo el producto de partida. El medio de reacción se concentró a sequedad y se disolvió en piridina (3 mL) y anhídrido acético (3 mL), la mezcla se agitó a 0°C durante

30 minutos y se mantuvo en el congelador durante toda la noche. Se concentró a sequedad en bomba de aceite, el residuo se suspendió en agua destilada (50 mL) y se extrajo con 3x50 mL de CH₂Cl₂. Las fracciones orgánicas de unieron y se secaron sobre sulfato magnésico. El disolvente se eliminó a presión reducida.

8.6.3.7. 3-Acetil-7,8-diacetoxi-2-(butilimino)-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,3]tiazepina (51).



Se obtuvo a partir de la tiourea **46**. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂-MeOH 40:1), obteniéndose **51** como un aceite amarillento.

Rendimiento 186 mg, 95 %; *R_F* 0.47 CH₂Cl₂/MeOH (20:1).

IR ν_{\max} : 2955, 2937, 2870, 1770, 1678, 1623, 1482, 1366, 1269, 1168, 1134, 1012, 910, 859 cm⁻¹

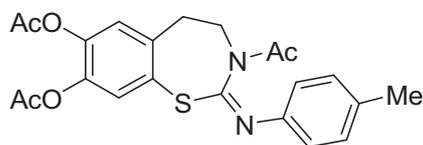
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.26 (s, H-6), 7.16 (s, H-9), 4.03 (t, *J*_{CH₂,CH₂} 6.8 Hz, 2H, H-4), 3.44 (t, *J*_{CH₂,CH₂} 6.9 Hz, 2H, CH₂N=C) 3.06 (t, *J*_{CH₂,CH₂} 6.8 Hz, 2H, H-5), 2.27 y 2.26 (2s, 2x3H, OAc), 1.92 (s, NAc), 1.73 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.45 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.97 (t, 3H, CH₃) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, MeOH- d_4): 168.8 (C=O, NAc), 167.7, (C=O, OAc), 152.1 (C=N), 142.6 (C-8), 140.8 (C-7), 139.2 (C-11), 127.6 (C-10), 126.1 (C-9), 124.7 (C-6), 52.2 (CH₂N=C), 46.6 (C-4), 31.8 (C-5 y CH₂CH₂CH₃), 21.7 (CH₃, NAc), 20.9, 20.4 y 20.2 (2 CH₃ OAc y CH₂CH₃) 13.8 (CH₃) ppm.

CIMS m/z 393 ([M+H]⁺, 100%), 392 ([M]⁺, 47%).

HRCIMS Calc. para C₁₉H₂₄N₂O₅S ([M]⁺): 392.1406. Encontrado: 392.1412.

8.6.3.8. 3-Acetil-7,8-diacetoxi-2,3,4,5-tetrahidro-2-(*p*-tolilimino)-benzo [f][1,3]tiazepina (52).



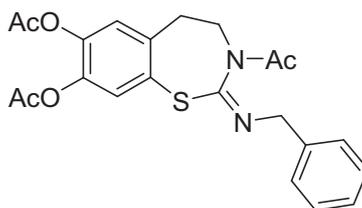
Se obtuvo a partir de la tiourea **47**. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂-MeOH 40:1), obteniéndose **52** como un aceite amarillento.

Rendimiento 245 mg, 92 %; R_F 0.55 CH₂Cl₂/MeOH (20:1).

IR ν_{max} : 2928, 2860, 1762, 1683, 1614, 1483, 1368, 1265, 1201, 1013, 899, 818, 731 cm⁻¹.

- ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.24 (m, $J_{o,m}$ 8.3 Hz, 2H, H-2' y H-6'), 7.19 (m, 2H, H-6 y H-9), 6.91 (m, $J_{o,m}$ 8.3 Hz, 2H, H-3' y H-5'), 4.16 (t, J_{CH_2,CH_2} 6.8 Hz, 2H, H-4), 3.16 (t, J_{CH_2,CH_2} 6.8 Hz, 2H, H-5), 2.39 (s, 3H, Me), 2.28 y 2.26 (2s, 2x3H, OAc), 2.09 (s, NAc), ppm.
- ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): 168.9 (C=O, NAc), 167.8 y 167.6, (C=O, OAc), 155.4 (C=N), 144.6 (C-1'), 142.8 (C-8), 140.9 (C-7), 139.1 (C-11), 135.4 (C-4'), 130.1 (C-2' y C-6'), 128.0 (C-10), 126.2 (C-9), 124.6 (C-6), 119.3 (C-3' y C-5'), 46.8 (C-4), 31.8 (C-5), 22.1 (CH₃), 21.0 (CH₃, NAc), 20.6 y 20.5, (CH₃ OAc), ppm.
- CIMS m/z 426 ([M]⁺, 38 %), 427 ([M+H]⁺, 22 %)
- HRCIMS Calc. para C₂₂H₂₃N₂O₅S ([M+H]⁺): 427.1328. Encontrado: 427.1333.

8.6.3.9. 3-Acetil-7,8-diacetoxi-2-(bencilimino)-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,3] tiazepina (53).



Se obtuvo a partir de 1-bencil-3-(3,4-dihidroxifenetil)tiourea **48**. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 40:1), obteniéndose **53** como un sólido de color marrón claro.

Rendimiento 242 mg, 91 %; R_F 0.53 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20:1). p.f. 156-158 °C.

IR ν_{max} : 2930, 2875, 1776, 1619, 1483, 1369, 1269, 1197, 1173, 1012, 915, 872, 745, 702 cm^{-1} .

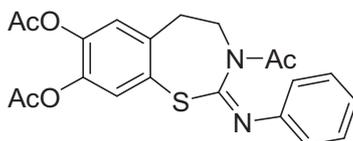
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.40 (m, 3H, H-2', H-4' y H-6'), 7.31 (m, 3H, H-9, H-3' y H-5'), 7.20 (s, 1H, H-6), 4.67 (s, 2H, CH_2 bencilo), 4.08 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.8 Hz, 2H, H-4), 3.17 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.8 Hz, 2H, H-5), 2.28 y 2.25 (2s, 2x3H, OAc), 2.14 (s, NAc), ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 168.9 (C=O, NAc), 167.8 y 167.7, (C=O, OAc), 153.2 (C=N), 142.8 (C-8), 140.9 (C-7), 139.2 (C-11), 137.8 (C-1'), 128.6 (C-2' y C-6'), 128.3 (C-10), 127.9 (C-3' y C-5'), 127.3 (C-4'), 126.2 (C-9), 124.6 (C-6), 56.1 (CH_2 , bencilo), 46.8 (C-4), 31.8 (C-5), 22.0 (CH_3 , NAc), 20.6 y 20.5, (CH_3 OAc), ppm.

CIMS m/z 427 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 87 %).

HRCIMS Calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 427.1328. Encontrado: 427.1327.

8.6.3.10. 3-Acetil-7,8-diacetoxi-2-(fenilimino)-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,3] tiazepina (54).



Se obtuvo a partir de la tiourea **49**. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 40:1), obteniéndose **54** como un sólido marrón.

Rendimiento 240 mg, 94 %; R_F 0.47 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20:1). p.f. 72-75 °C.

IR ν_{max} : 2924, 2845, 1764, 1677, 1626, 1591, 1482, 1371, 1269, 1196, 1010, 915, 769, 697 cm^{-1} .

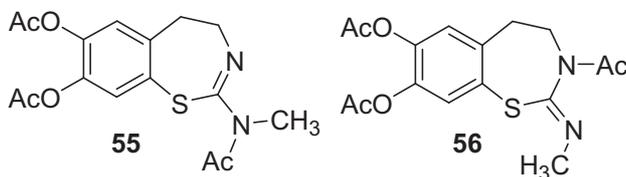
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.45 (m, 2H, H-2' y H-6'), 7.24 (m, 1H, H-4'), 7.19 (m, 2H, H-6 y H-9), 7.00 (m, H-3' y H-5'), 4.16 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.8 Hz, 2H, H-4), 3.17 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.8 Hz, 2H, H-5), 2.28 y 2.25 (2s, 2x3H, OAc), 2.14 (s, NAc), ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 168.8 (C=O, NAc), 167.8 y 167.7, (C=O, OAc), 155.8 (C=N), 147.2 (C-1'), 142.8 (C-8), 140.9 (C-7), 139.0 (C-11), 129.5 (C-2' y C-6'), 127.9 (C-10), 126.2 (C-9), 125.6 (C-4'), 124.6 (C-6), 119.3 (C-3' y C-5'), 46.8 (C-4), 31.8 (C-5), 21.0 (CH_3 , NAc), 20.6 y 20.5, (CH_3 OAc), ppm.

CIMS m/z 413 ($[M+H]^+$, 68 %).

HRCIMS Calc. para $C_{21}H_{20}N_2O_5S$ ($[M]^+$): 412.1093. Encontrado: 412.1083.

8.6.3.11. 7,8-Diacetoxi-4,5-dihidro-2-(*N*-metilacetamido)benzo[*f*][1,3]tiazepina (55) y 3-acetil-7,8-diacetoxi-2,3,4,5-tetrahidro-2-(metilimino)benzo[*f*][1,3]tiazepina (56).



Se obtuvieron a partir de la tiourea **45**. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ($CH_2Cl_2 \rightarrow CH_2Cl_2$ -MeOH 40:1), obteniéndose la mezcla 2:1 de **55** y **56** como un aceite amarillento.

Rendimiento 169 mg, 77 %; R_F 0.33 CH_2Cl_2 /MeOH (20:1);

IR ν_{max} : 2936, 2870, 1769, 1675, 1631, 1486, 1368, 1313, 1264, 1198, 1136, 1033, 991, 907, 727 cm^{-1}

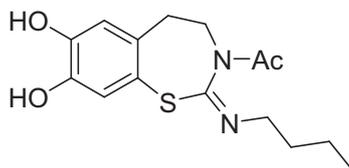
1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.28 (s, 1H, H-6 **56**), 7.18 (s, 1H, H-9 **56**) 7.17 (s, 1H, H-9 **55**), 7.00 (s, 1H, H-6, **55**), 4.15 (m, 2H, H-4 **55**) 4.03 (t, J_{CH_2,CH_2} 6.8 Hz, 2H, H-4 **56**), 3.34 (s, 3H, CH_3 **56**), 3.24 (m, 2H, H-5 **55**), 3.16 (s, 3H, CH_3 **55**), 3.07 (t, J_{CH_2,CH_2} 6.8 Hz, 2H, H-5 **56**), 2.29 (m, 12H, OAc **55** y **56**), 2.20 (s, 3H, NAc **55**), 1.92 (s, 3H, NAc **56**) ppm.

¹³ C-RMN	(75.5 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄): 170.2 (C=O, NAc 55), 169.0 (C=O, NAc 56), 168.1 y 168.0 (C=O, OAc 55), 167.8 (C=O, OAc 56), 154.2 (C=N 56), 147.3 (C=N, 55), 142.7 (C-8 56), 141.9 (C-7 55), 141.6 (C-8, 55), 141.0 (C-7 56), 140.3 (C-11 55), 139.2 (C-11 56), 128.4 (C-10 55), 127.6 (C-10 56), 126.1 (C-9 56), 124.7 (C-9 55 y C-6 56), 124.4 (C-6 55), 50.5 (C-4 55), 46.7 (C-4 56), 39.3 (CH ₃ 56), 34.0 (CH ₃ 55), 33.6 (C-5 56), 31.8 (C-5 56), 22.4 (CH ₃ , NAc 55), 21.8 (CH ₃ , NAc 56), 20.6 y 20.5 (4 CH ₃ , OAc, 55 y 56) ppm.
CIMS	<i>m/z</i> 351 ([M+H] ⁺ , 100%), 350 ([M] ⁺ , 47%).
HRCIMS	Calc. para C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₅ S ([M+H] ⁺): 351.1015. Encontrado: 351.1007.

Procedimiento general para la obtención de las 1,3-benzotiazepinas 57-61.

A una disolución de las tiazepinas **51-56** (0.25 mmol) en diclorometano:metanol 1:1 (8 mL) se añadió una cantidad catalítica de carbonato potásico, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Se neutralizó con ácido acético diluído y se concentró a sequedad.

8.6.3.12. 3-Acetil-2-(butilimino)-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,3]tiazepina-7,8-diol (57).



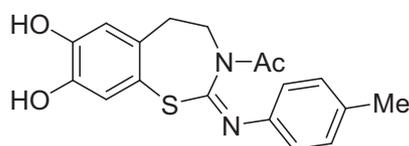
Se obtuvo a partir de la tiazepina **51**. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 30:1), obteniéndose **57** como un sólido de ligera tonalidad marrón.

Rendimiento 50 mg, 65 %; R_F 0.20 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20:1). p.f. 137-138 °C.

IR ν_{max} : 3297, 2947, 2912, 2864, 1653, 1614, 1581, 1512, 1426, 1386, 1357, 1318, 1270, 1215, 1138, 1037, 1003, 881, 819, 648 cm^{-1}

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): δ 6.84 (s, 1H, H-9), 6.79 (s, 1H, H-6), 3.96 (m, 2H, H-4), 3.46 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{N}=\text{C}$) 2.95 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.8 Hz, 2H, H-5), 1.88 (s, CH_3 NAc), 1.75 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.46 (m, 2H, CH_2CH_3), 0.99 (t, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 168.8 (C=O, NAc), 158.0 (C=N), 148.3 (C-8), 146.0 (C-7), 133.6 (C-11), 119.6 (C-9), 118.9 (C-10), 118.1 (C-6), 52.2 ($\text{CH}_2\text{N}=\text{C}$), 49.0 (C-4), 32.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 32.3 (C-5), 21.7 (CH_3 , NAc y CH_2CH_3) 14.1

(CH₃) ppm.CIMS m/z 308 ([M]⁺, 11 %).HRCIMS Calc. para C₁₅H₂₀N₂O₃S ([M]⁺): 308.1195. Encontrado: 308.1193.**8.6.3.13. 3-Acetil-2,3,4,5-tetrahidro2-(*p*-tolilimino)-benzo[*f*][1,3]tiazepina-7,8-diol (58).**

Se obtuvo a partir de la tiazepina **52**. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂-MeOH 30:1), obteniéndose un sólido marrón.

Rendimiento 37 mg, 43 %; *R*_F 0.23 CH₂Cl₂/MeOH (20:1). p.f. 96-100 °C.IR ν_{\max} : 3234, 2924, 2850, 1653, 1614, 1497, 1434, 1357, 1259, 1153, 1037, 1007, 869, 812, 629 cm⁻¹

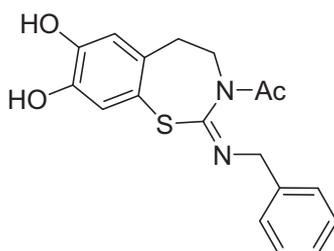
¹H-RMN (300 MHz, MeOH-*d*₄): δ 7.25 (m, *J*_{*o,m*} 8.1 Hz, 2H, H-2' y H-6'), 6.93 (m, *J*_{*o,m*} 8.1 Hz, 2H, H-3' y H-5'), 6.80 (s, 1H, H-6), 6.75 (s, 1H, H-9), 4.07 (t, *J*_{CH₂,CH₂} 6.7 Hz, 2H, H-4), 3.03 (t, *J*_{CH₂,CH₂} 6.7 Hz, 2H, H-5), 2.37 (s, 3H, CH₃Ar), 2.06 (s, CH₃ NAc) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, MeOH- d_4): 170.7 (C=O, NAc), 160.7 (C=N), 148.4 (C-8), 148.6 (C-1'), 145.9 (C-7), 136.6 (C-4'), 133.5 (C-11), 131.0 (C-2' y C-6'), 120.6 (C-10, C-3' y C-5'), 119.6 (C-9), 118.0 (C-6), 48.7 (CH₂NAc), 32.3 (CH₂Ar), 22.0 (CH₃ NAc), 21.0 (CH₃Ar) ppm.

CIMS m/z 342 ([M]⁺, 40 %), m/z 343 ([M+H]⁺, 42 %),

HRCIMS Calc. para C₁₈H₁₈N₂O₃S ([M]⁺): 342.1038. Encontrado: 342.1041.

8.6.3.14. 3-Acetil-2-(bencilimino)-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[*f*][1,3]tiazepina-7,8-diol (59).



Se obtuvo a partir de la tiazepina **53**. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂-MeOH 25:1), obteniéndose **59** como un sólido de ligera tonalidad marrón.

Rendimiento 69 mg, 65 %; R_F 0.21 CH₂Cl₂/MeOH (20:1). p.f. 167-168 °C.

IR ν_{max} : 3199, 2874, 1650, 1606, 1579, 1507, 1424, 1391, 1357, 1319, 1279, 1216, 1136, 1041, 1015, 876, 814, 735, 648 cm⁻¹

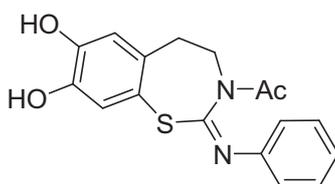
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, MeOH- d_4): δ 7.37 (m, 5H, Ph), 6.87 (s, 1H, H-9), 6.81 (s, 1H, H-6), 4.67 (s, 2H, CH₂ bencilo), 3.98 (m, 2H, H-4), 2.98 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.8 Hz, 2H, H-5), 1.88 (s, CH₃ NAc) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, MeOH- d_4): 171.0 (C=O, NAc), 158.8 (C=N), 148.4 (C-8), 146.0 (C-7), 139.3 (C-1'), 133.7 (C-11), 129.7 (C-2' y C-6'), 129.2 (C-3' y C-5'), 128.4 (C-4'), 119.5 (C-9), 118.8 (C-10), 118.1 (C-6), 59.6 (CH₂N=C), 48.7 (C-4), 32.3 (C-5), 21.8 (CH₃ NAc) ppm.

CIMS m/z 342 ($[\text{M}]^+$, 48 %).

HRCIMS Calc. para C₁₈H₁₈N₂O₃S ($[\text{M}]^+$): 342.1038. Encontrado: 342.1045.

8.6.3.15. 3-Acetil-2-(fenilimino)-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[*f*][1,3]tiazepina-7,8-diol (**60**).

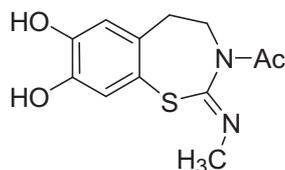


Se obtuvo a partir de la tiazepina **54**. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂-MeOH 40:1), obteniéndose **60** como un sólido anaranjado.

Rendimiento 49 mg, 60 %; R_F 0.21 CH₂Cl₂/MeOH (20:1). p.f. 185-188 °C.

IR	ν_{\max} : 3420, 3146, 2930, 1638, 1594, 1512, 1483, 1431, 1348, 1260, 1197, 1143, 1044, 1094, 1010, 915, 813, 692 cm^{-1}
$^1\text{H-RMN}$	(300 MHz, MeOH- d_4): δ 7.45 (m, 2H, H-2' y H-6'), 7.20 (m, H-4'), 7.03 (m, 2H, H-3' y H-5'), 6.81 (s, 1H, H-9), 6.75 (s, 1H, H-3), 4.08 (t, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 6.7 Hz, 2H, H-4), 3.03 (t, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2}$ 6.7 Hz, 2H, H-5), 2.08 (s, CH_3 NAc) ppm.
$^{13}\text{C-RMN}$	(75.5 MHz, MeOH- d_4): 170.9 (C=O, NAc), 160.7 (C=N), 148.6 (C-1'), 148.3 (C-8), 145.9 (C-7), 133.5 (C-11), 130.6 (C-2' y C-6'), 126.6 (C-3' y C-5'), 120.6 (C-10 y C-4'), 119.6 (C-9), 118.0 (C-6), 48.7 (C-4), 32.3 (C-5), 22.0 (CH_3 NAc) ppm.
CIMS	m/z 328 ($[\text{M}]^+$, 23 %), m/z 329 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 23 %),
HRCIMS	Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ($[\text{M}]^+$): 328.0882. Encontrado: 328.0886.

8.6.3.16. 3-Acetil-2,3,4,5-tetrahidro-2-(metilimino)benzo[*f*][1,3]tiazepina-7,8-diol (61)



Se obtuvo a partir de las tiazepinas **55** y **56**. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 30:1), obteniéndose **61** como un sólido marrón.

Rendimiento 31 mg, 46 %; R_F 0.23 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20:1). p.f. 184-188 °C.

IR ν_{max} : 3203, 2894, 1658, 1619, 1500, 1427, 1391, 1264, 1153, 1038, 1001, 871, 814, 628 cm^{-1}

^1H -RMN (300 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): δ 6.85 (s, 1H, H-6), 6.80 (s, 1H, H-9), 3.95 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.7 Hz, 2H, H-4), 3.30 (s, 3H, CH_3), 2.95 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}$ 6.7 Hz, 2H, H-5), 1.87 (s, CH_3 NAc) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): 171.0 (C=O, NAc), 159.9 (C=N), 148.4 (C-8), 146.0 (C-7), 133.7 (C-11), 119.6 (C-9), 118-9 (C-10) 118.1 (C-6), 48.7 (C-4), 39.1 (CH_3), 32.2 (C-5), 21.6 (CH_3 NAc) ppm.

CIMS m/z 266 ($[\text{M}]^+$, 21 %), m/z 267 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 30 %),

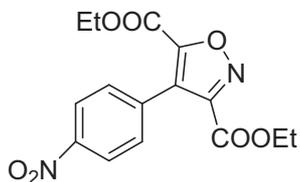
HRCIMS Calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 267.0803. Encontrado: 267.0809.

8.6.4. FORMACIÓN DE ISOXAZOLES CON EL CATALIZADOR $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{NaI-SiO}_2$

Preparación del catalizador $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{NaI-SiO}_2$

Una suspensión de $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (113 mg, 0.3 mmol), NaI (0.3 mmol, 46 mg) y SiO_2 (0.5 g) en acetonitrilo (7 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, y se evaporó el disolvente a sequedad. El sólido obtenido se almacenó en el desecador hasta su posterior uso.

8.6.4.1. 3,5-Dietoxicarbonil-4-(*p*-nitrofenil)isoxazol (**62**).



A una suspensión del catalizador previamente preparado de $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{NaI-SiO}_2$ en acetonitrilo (7 mL) se añadió *p*-nitrobenzaldehído (1 mmol, 154.2 mg) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El acetonitrilo se evaporó a sequedad y sobre el sólido resultante se añadió nitroacetato de etilo (2.2 mmol, 251.7 μL), agitando a 70 °C durante 24 horas, siguiendo el avance de la reacción por cromatografía en capa fina y cromatografía de gases-masas. Se añadió diclorometano (15 mL), se agitó durante 15 minutos, y posteriormente se adicionó HCl 1N (10 mL), agitando durante 1 horas más. El sistema bifásico se filtró sobre celita, se separó la fase orgánica que se lavó con 2x40 mL de HCl 1N, se neutralizó con 2x40 mL de una disolución de NaHCO_3 saturado, se secó sobre MgSO_4 y se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -hexano 1:2), obteniéndose **62** como un sólido blanco.

Rendimiento 78 mg, 23 %. p.f. 110-112 °C.

IR ν_{max} : 2923, 2724, 1732, 1604, 1455, 1377, 1317, 1211, 1169, 1109, 1018, 971, 866, 756 cm^{-1} .

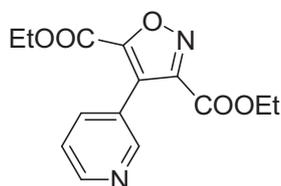
$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.30 (m, $J_{o,m}$ 8.2 Hz, 2H, H-3' y H-5'), 7.56 (m, $J_{o,m}$ 8.2 Hz, 2H, H-2' y H-6'), 4.36 (m, 4H, CH_2

Et), 1.29 (m, 6H, CH₃ Et) ppm.

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): 158.8 y 157.7 (C=O), 155.9 (C-3), 154.9 (C-5), 133.6 (C-1' y C-4'), 131.3 (C-2' y C-6'), 123.0 (C-4, C-3' y C-5'), 63.0 (CH₂), 14.1 (CH₃) ppm.

CIMS *m/z* 334 ([M]⁺, 30 %),

8.6.4.2. 3,5-Dietoxicarbonil-4-(piridin-3-il)isoxazol (63).



A una suspensión del catalizador previamente preparado de CeCl₃·7H₂O/NaI-SiO₂ en acetonitrilo (7 mL) se añadió piridina-3-carboxaldehído (1 mmol, 96.3 μL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El acetonitrilo se evaporó a sequedad y sobre el sólido resultante se añadió nitroacetato de etilo (2.2 mmol, 251.7 μL), agitando a 70 °C durante 25 horas, siguiéndose el avance de la reacción por cromatografía en capa fina y cromatografía de gases-masas. Se añadió diclorometano (15 mL), se agitó durante 15 minutos, y posteriormente se adicionó HCl 1N (10 mL), agitando durante 1 horas más. El sistema bifásico se filtró sobre celita, se separó la fase orgánica que se lavó con 2x40 mL de HCl 1N, se neutralizó con 2x40 mL de una disolución de NaHCO₃ saturado, se secó sobre MgSO₄ y se concentró a sequedad. El residuo obtenido se

purificó por cromatografía en columna (AcOEt/hexano 1:2), obteniéndose **63** como un aceite.

Rendimiento 109 mg, 38 %.

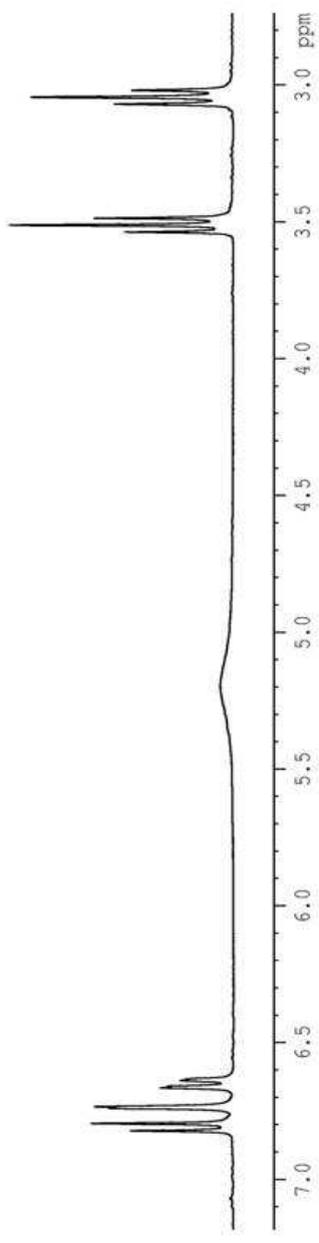
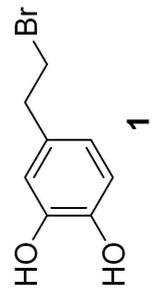
IR ν_{\max} : 2985, 2938, 1741, 1618, 1581, 1483, 1450, 1412, 1389, 1369, 1320, 1242, 1211, 1055, 1023, 996, 848 cm^{-1} .

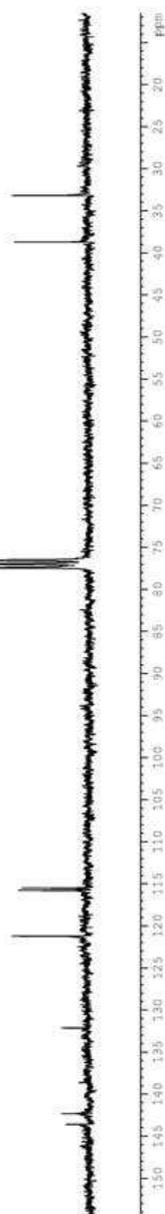
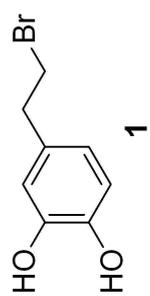
^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.67 (dd, $J_{2,6}$ 2.0 Hz, $J_{5,6}$ 4.8 Hz, 1H, H-6'), 8.59 (d, $J_{2,6}$ 2.0 Hz, 1H, H-2'), 7.74 (dd, $J_{2,4}$ 2.0 Hz, $J_{4,6}$ 2.0 Hz, $J_{4,5}$ 8.0 Hz, 1H, H-4'), 7.38 (ddd, $J_{4,5}$ 8.0, $J_{5,6}$ 4.8 Hz, 1H, H-5'), 4.36 (m, 4H, CH_2 Et), 1.28 (m, 6H, CH_3 Et) ppm.

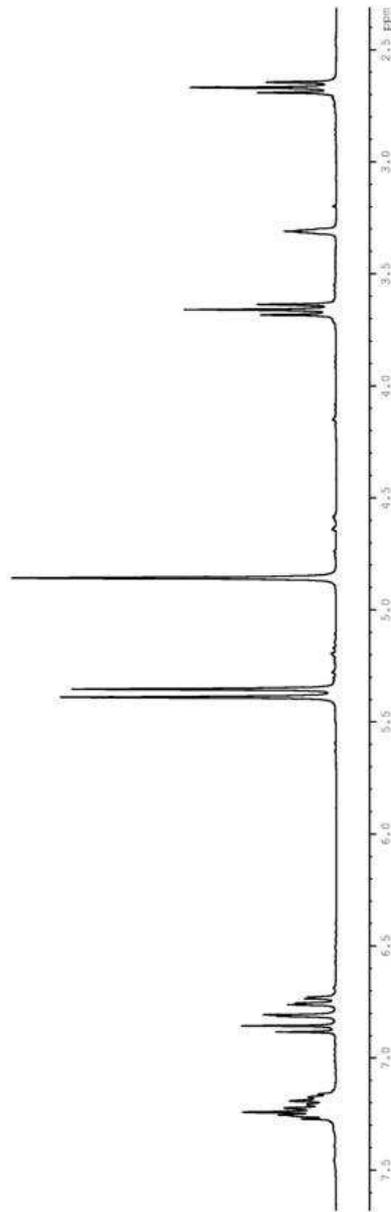
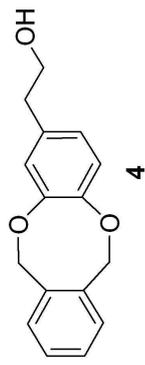
^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3): 159.0 y 158.1 (C=O), 156.3 (C-3), 155.4 (C-5), 150.6 (C-2'), 150.1 (C-6'), 137.8 (C-3' y C-4'), 123.6 (C-4), 122.8 (C-5'), 62.9 (CH_2), 14.1 (CH_3) ppm.

CIMS m/z 290 ($[\text{M}]^+$, 30 %),

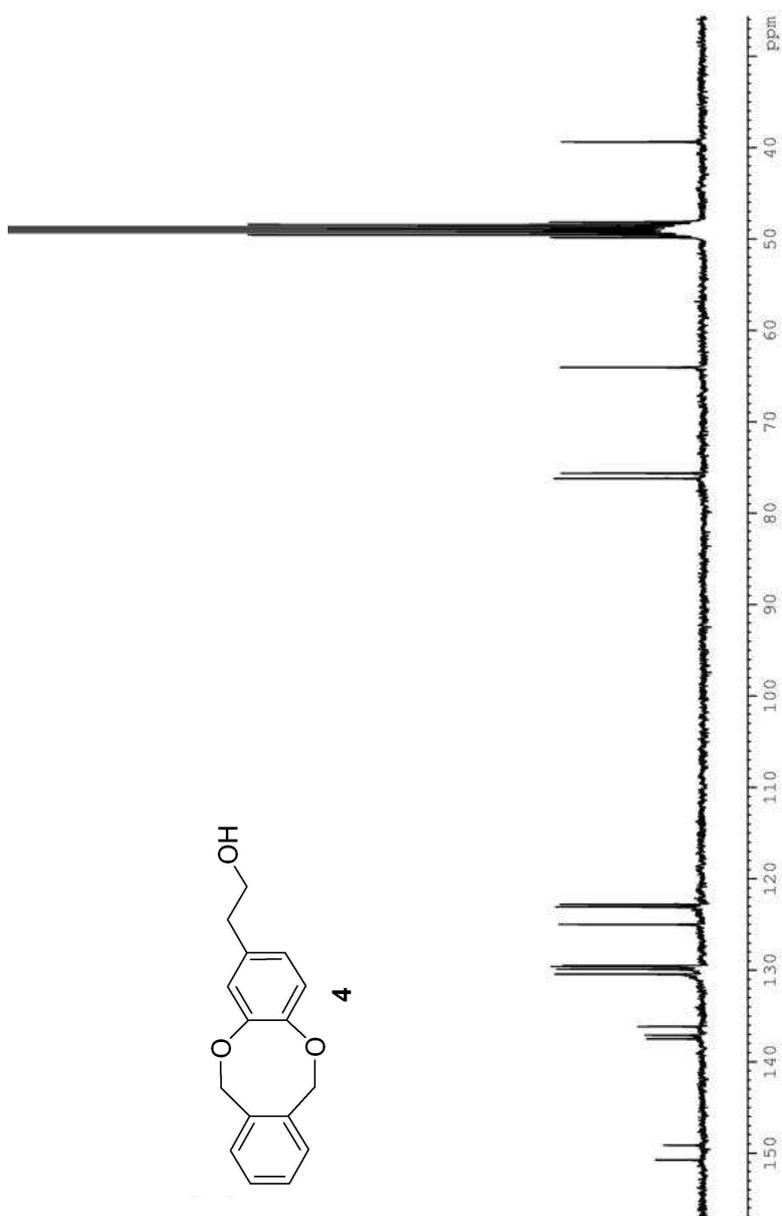
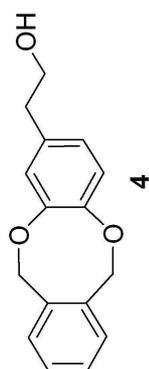
9. ESPECTROS REPRESENTATIVOS



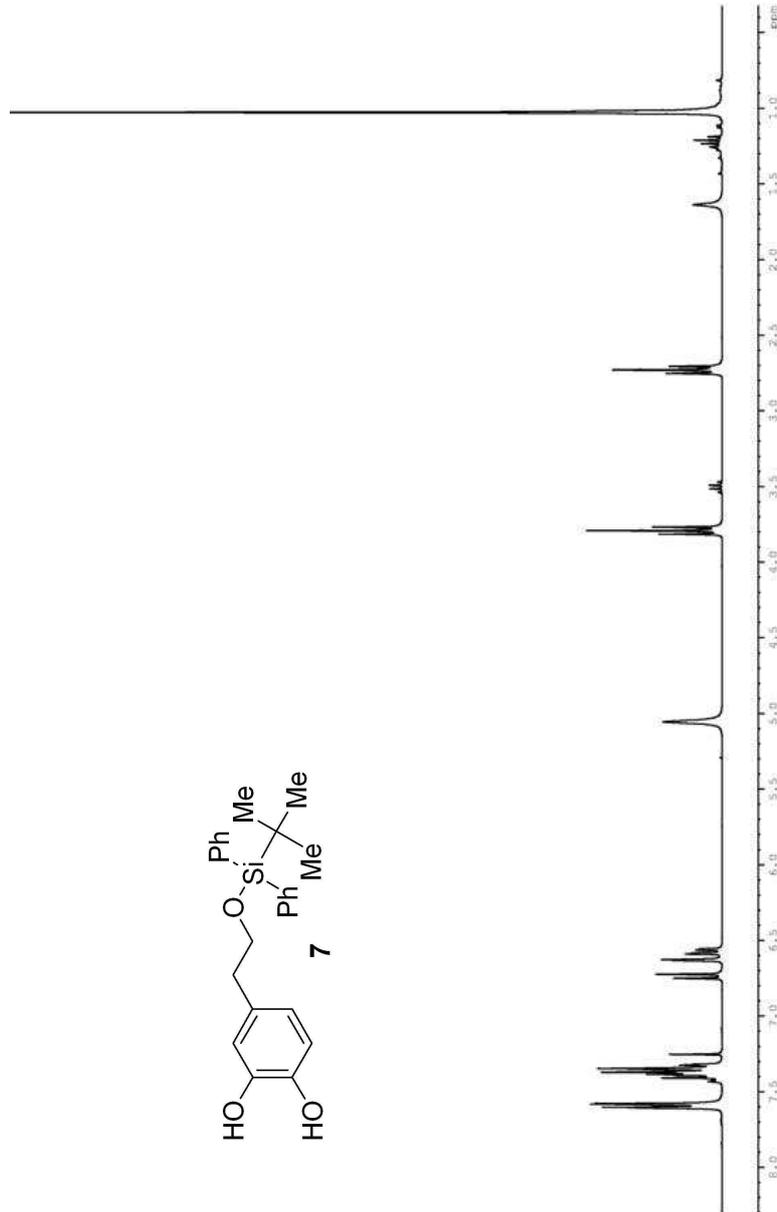
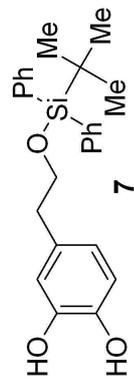




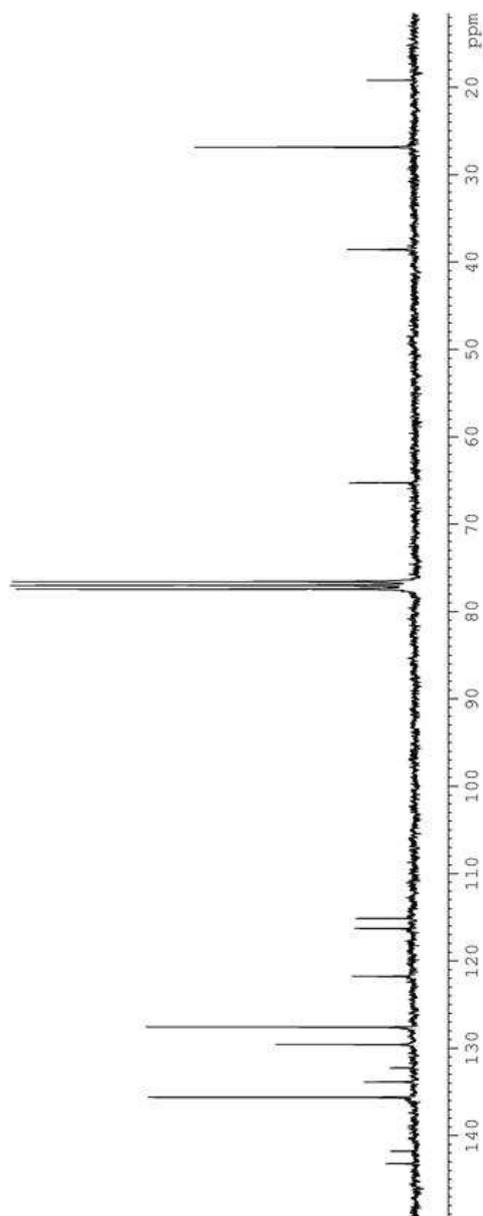
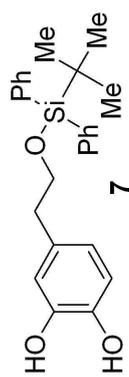
Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3)



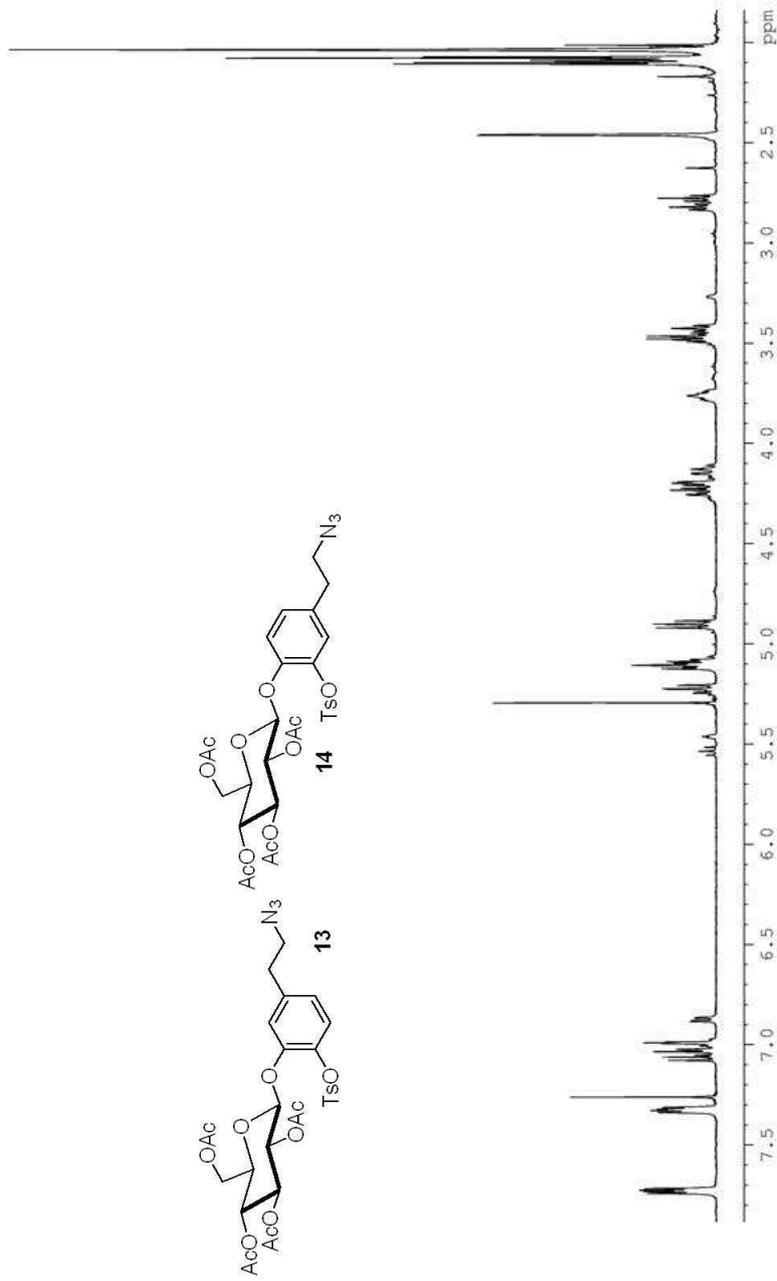
Espectro de ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3)

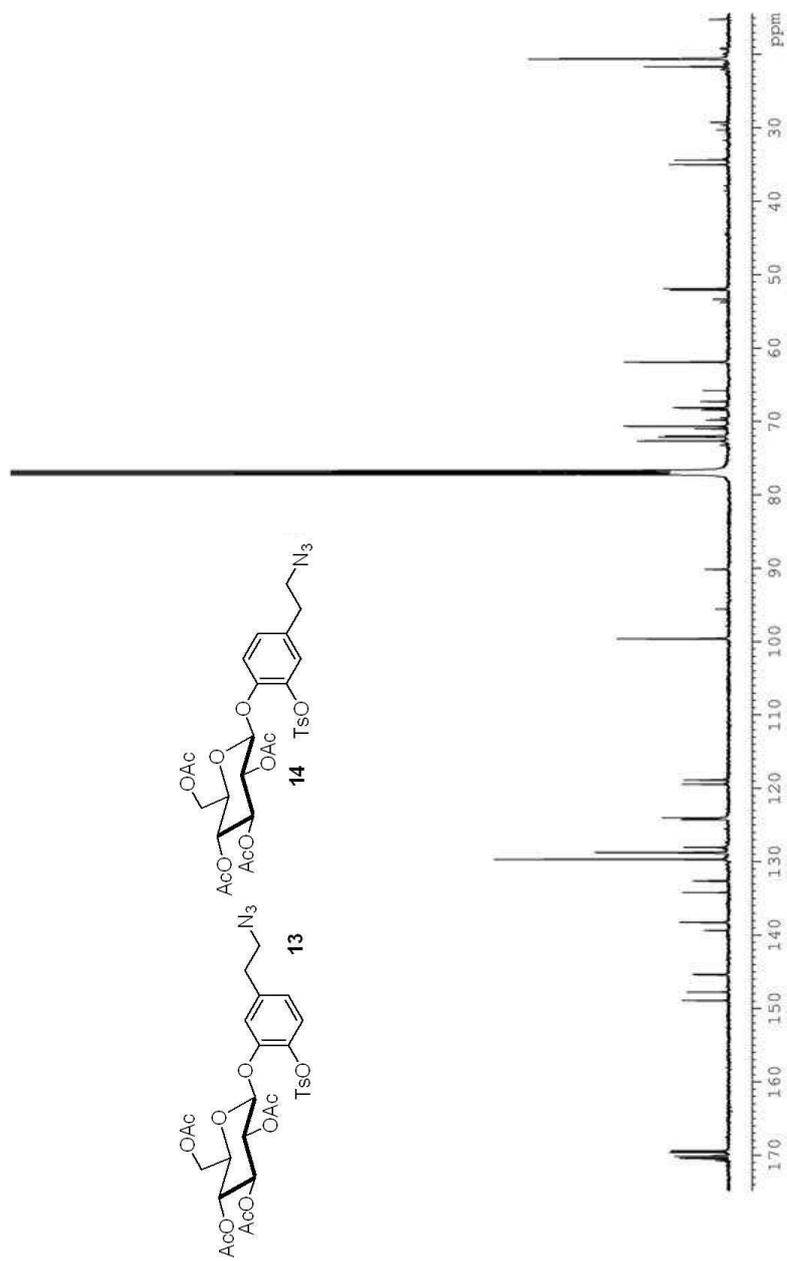


Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3)

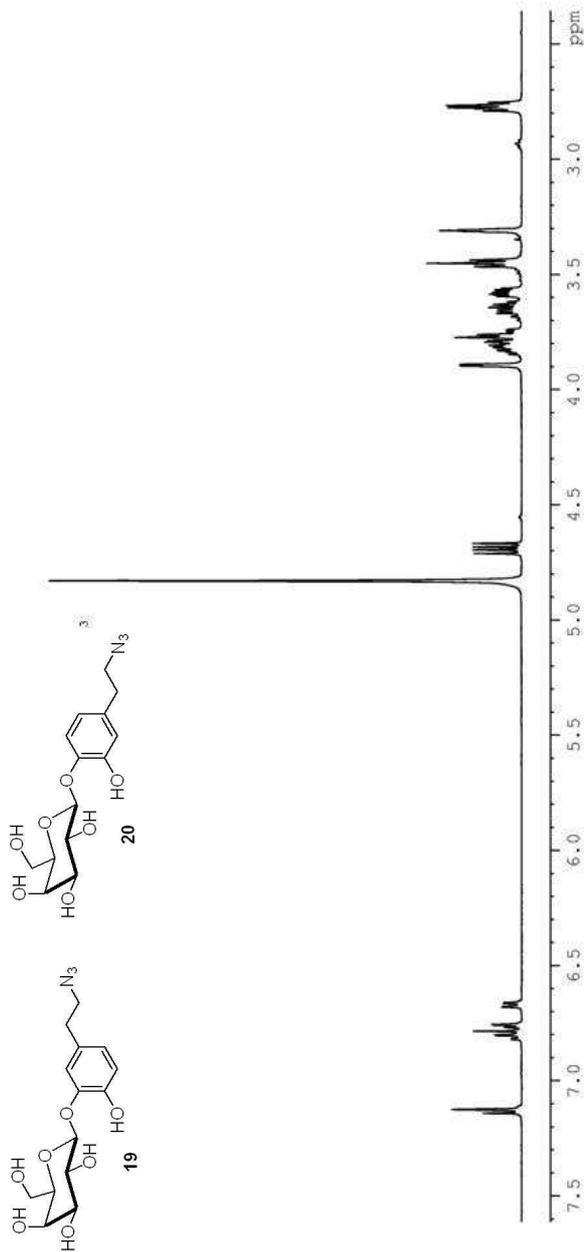


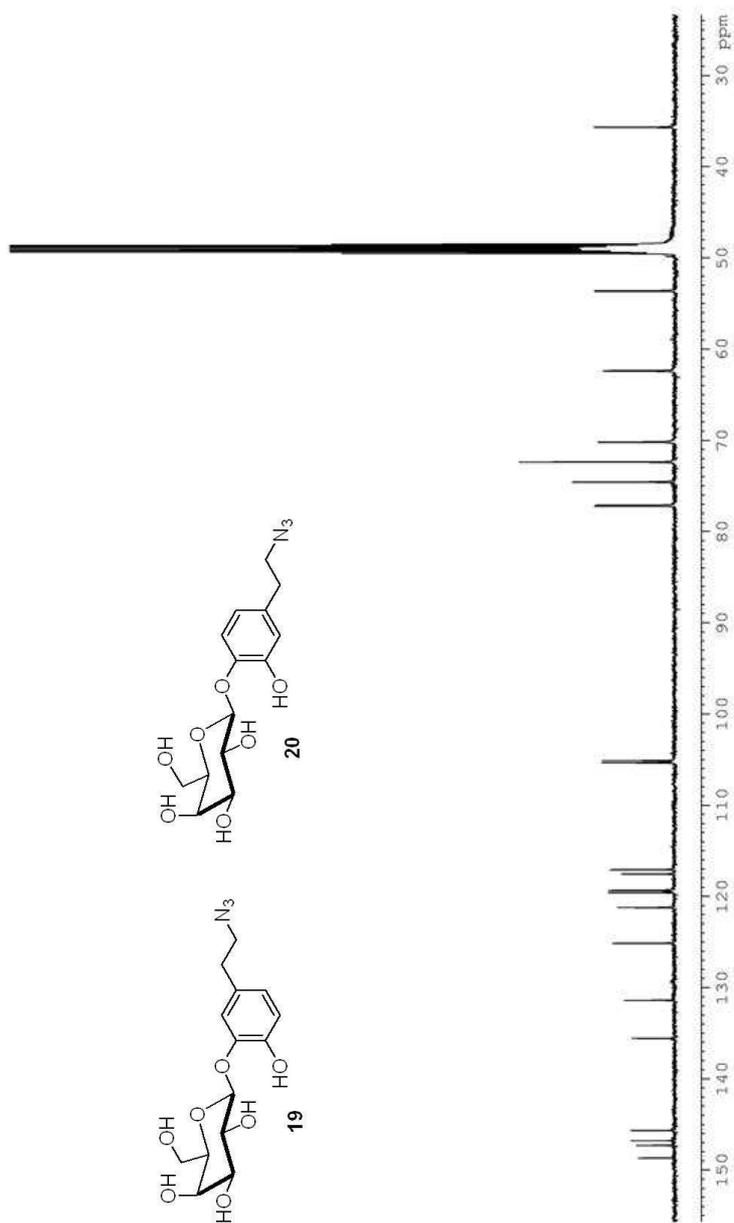
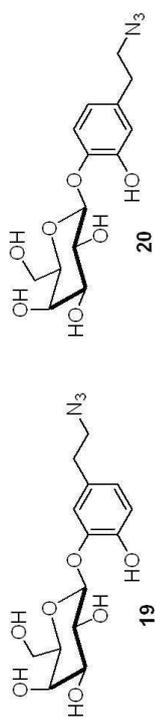
Espectro de ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3)

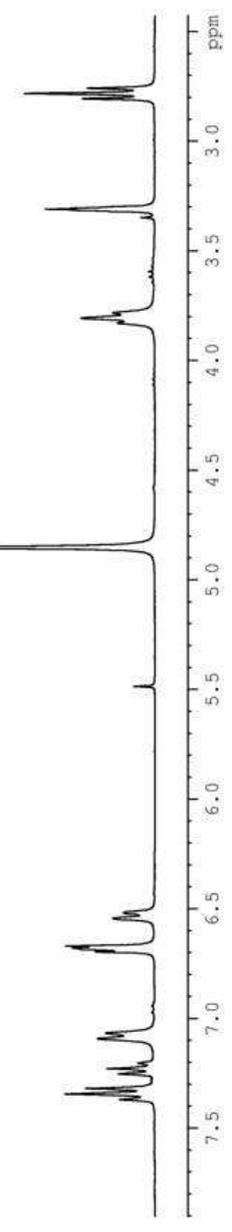
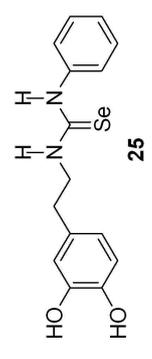




Espectro de ^{13}C -RMN (500 MHz, CDCl_3)

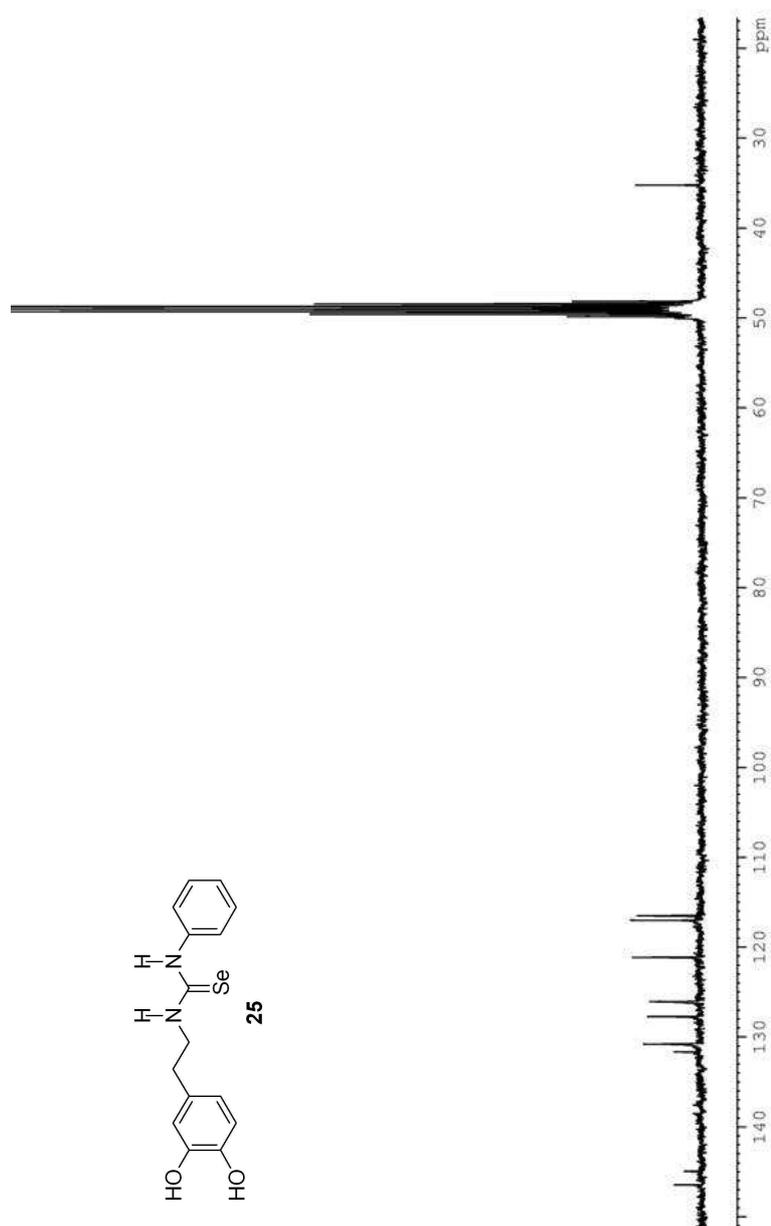


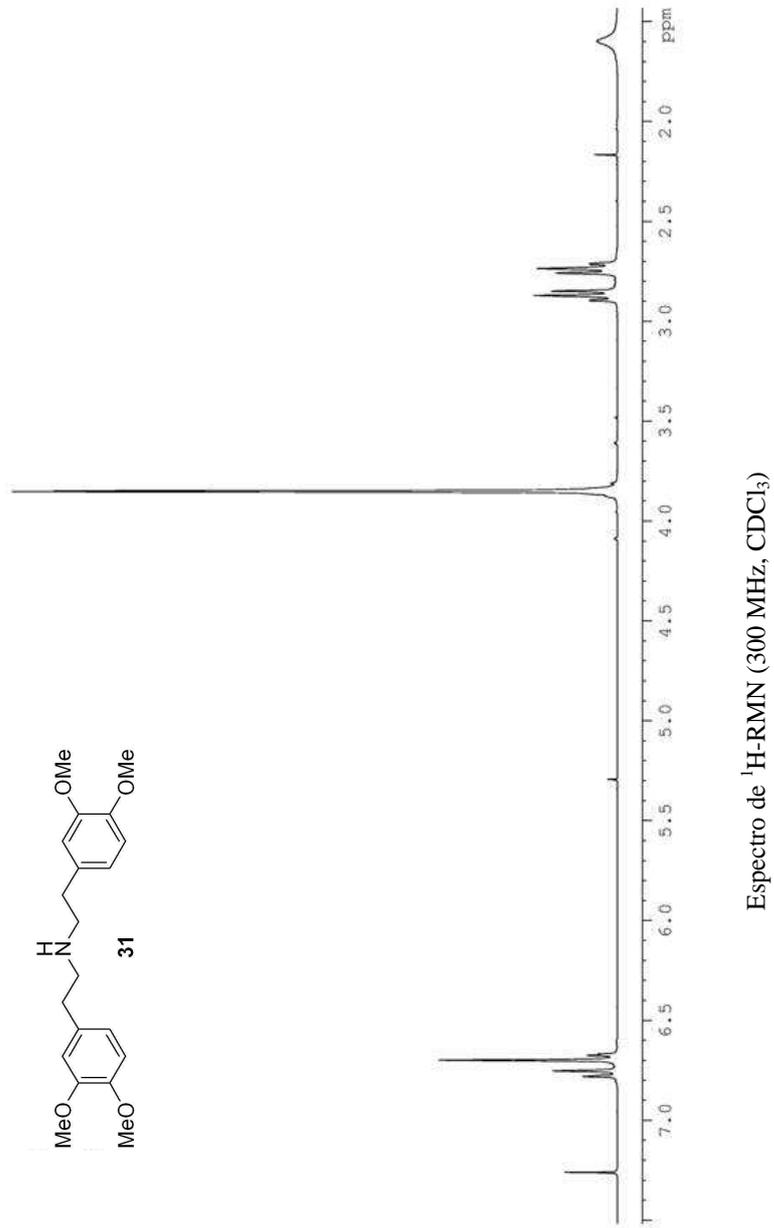




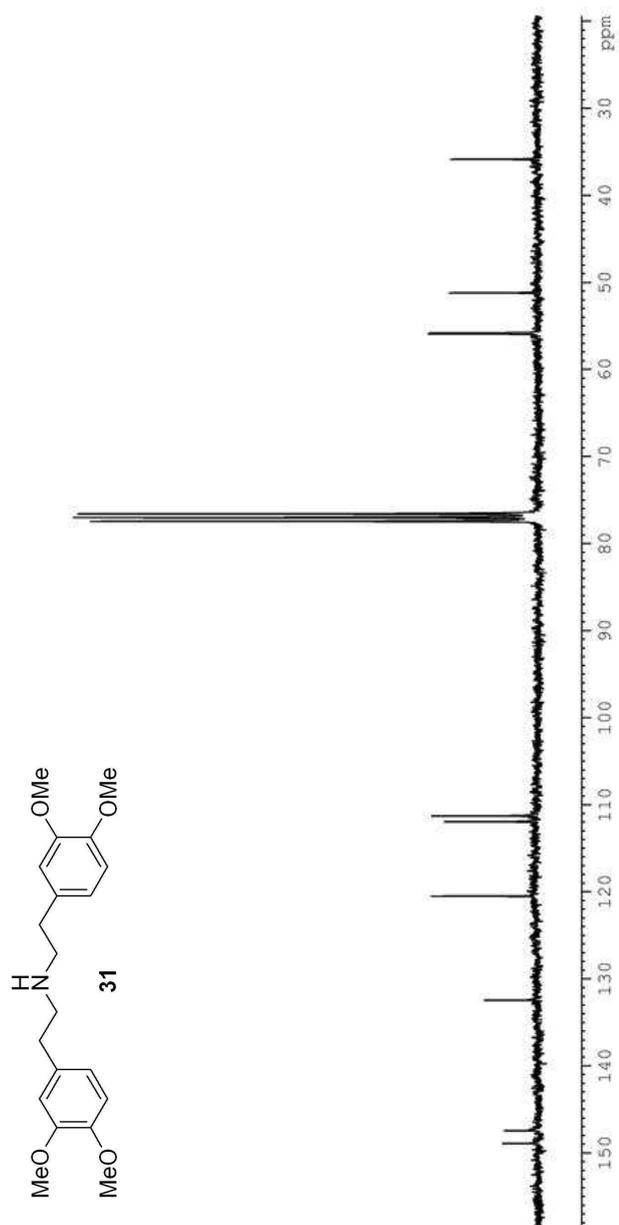
Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD)

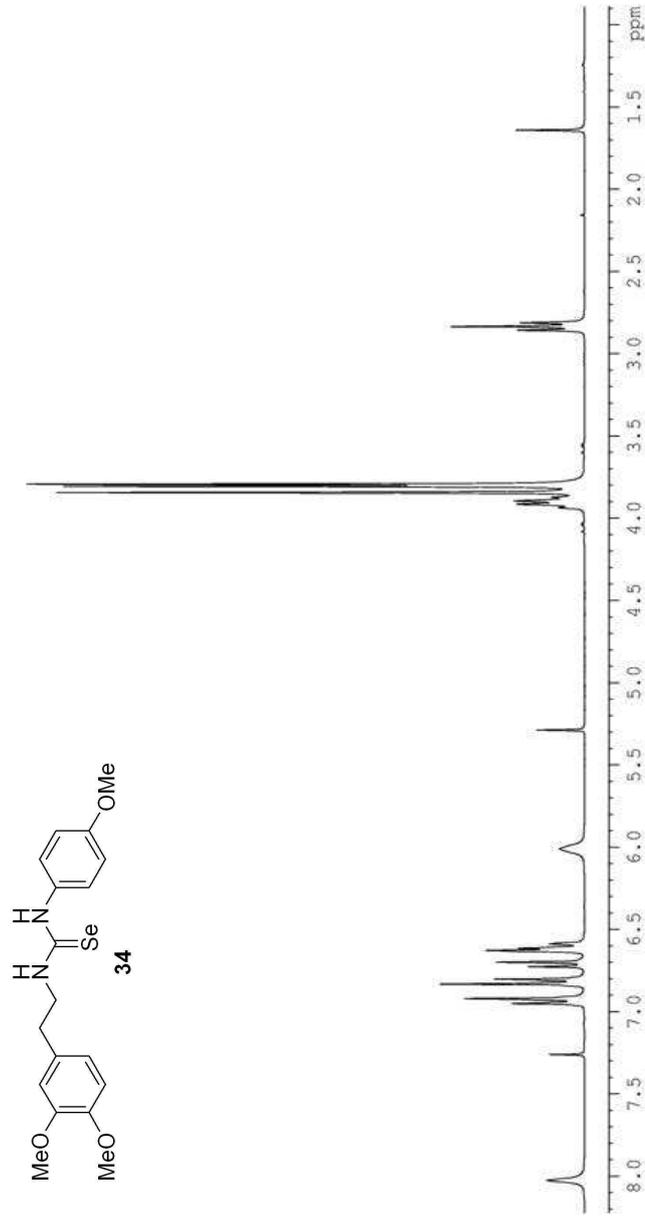
9. Espectros representativos

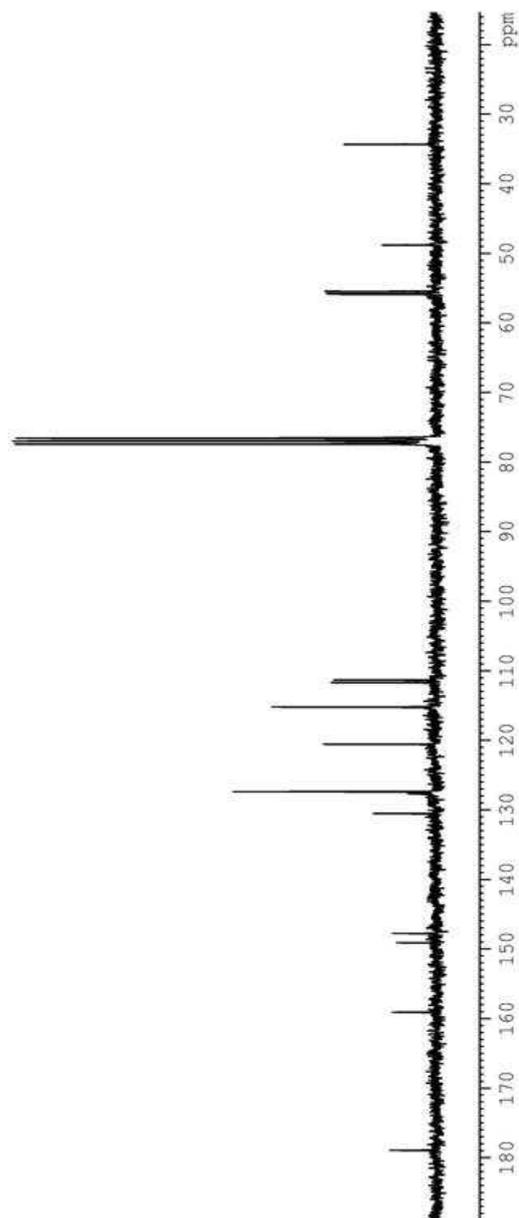
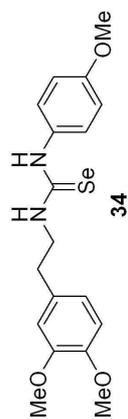




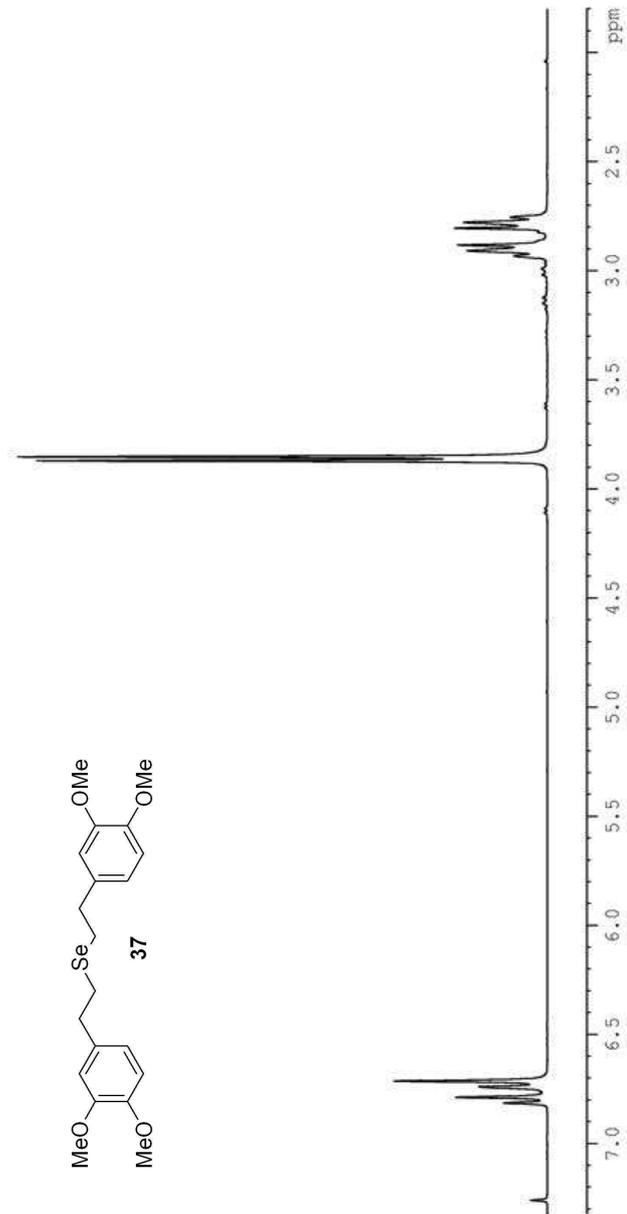
9. Espectros representativos

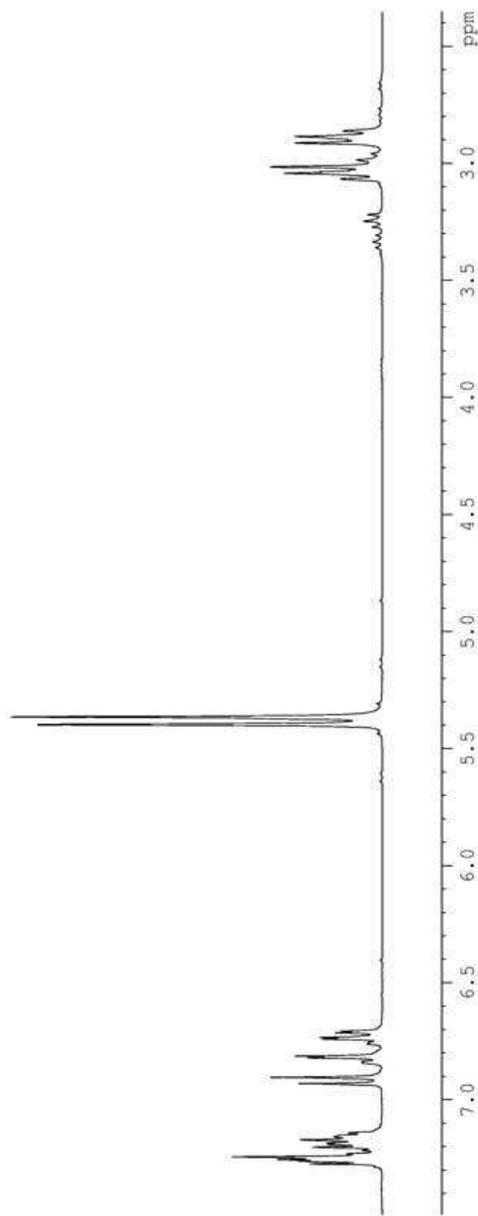
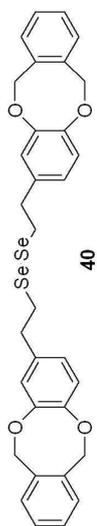




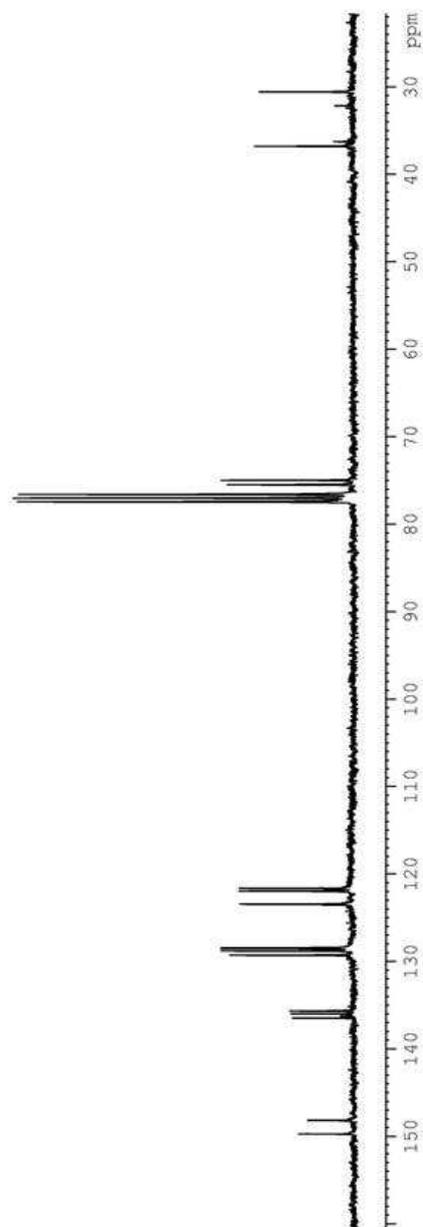
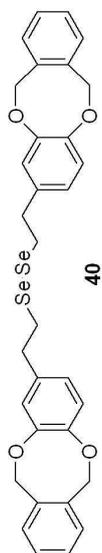


Espectro de ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3)

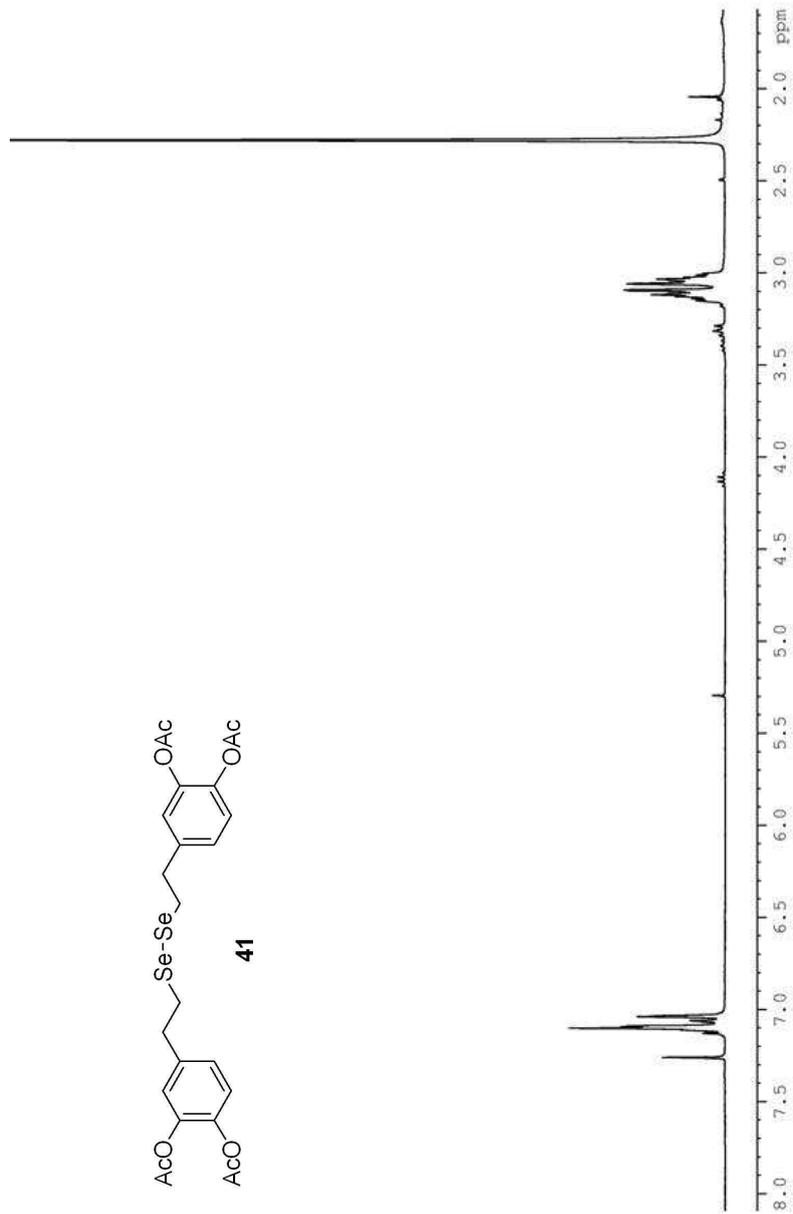


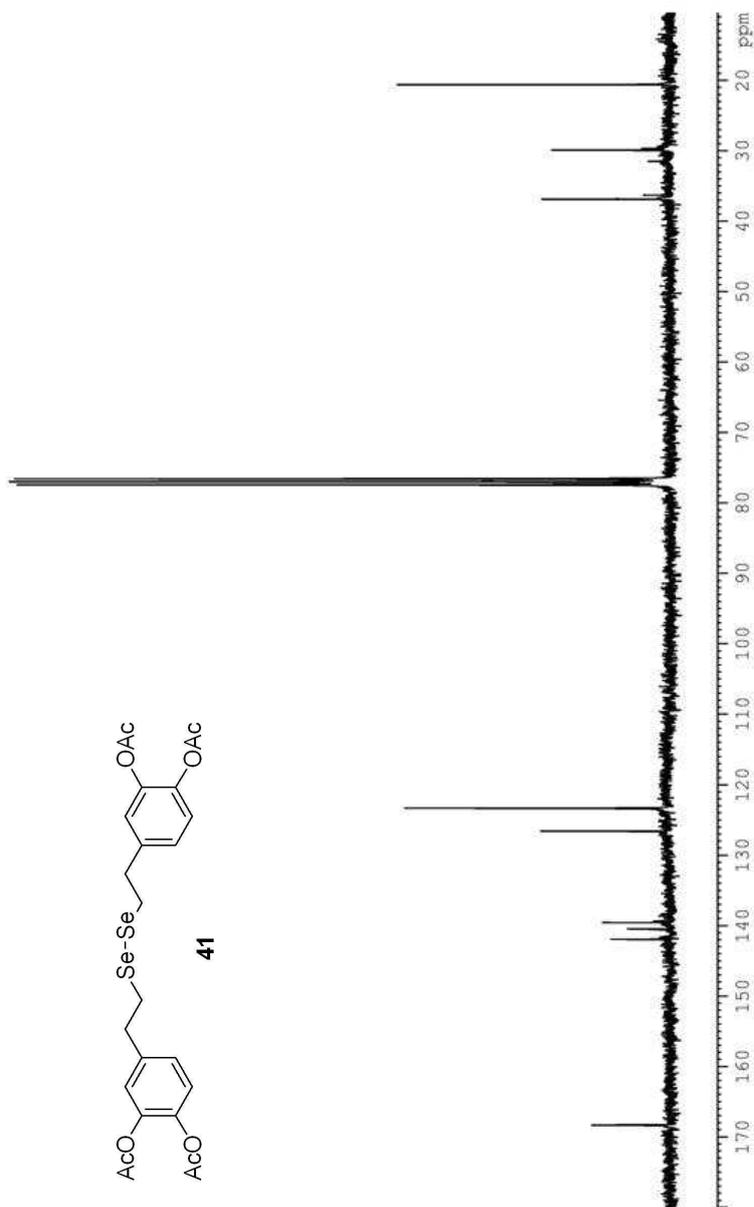


Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3)

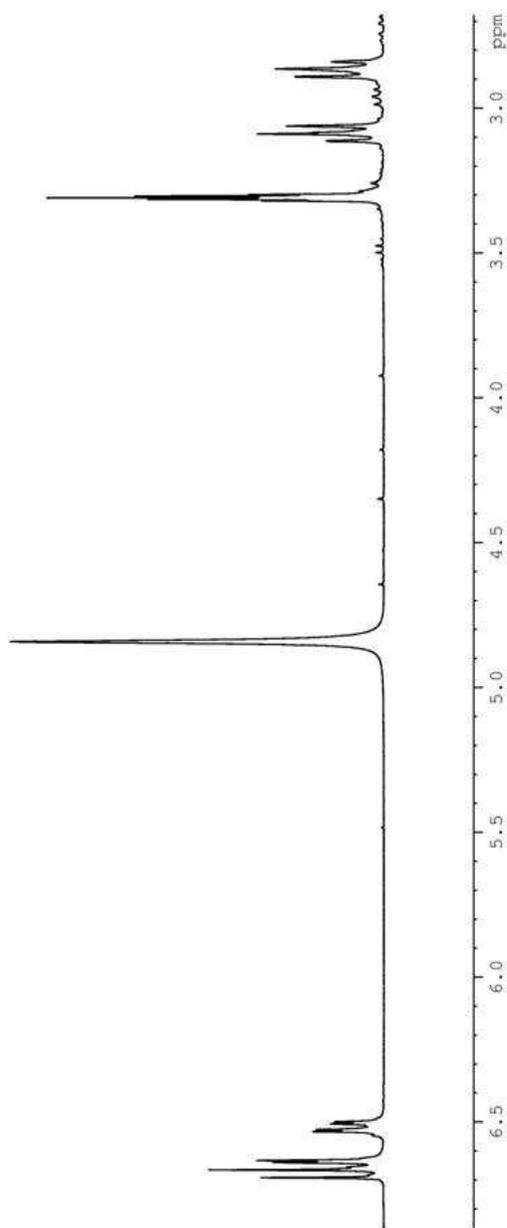
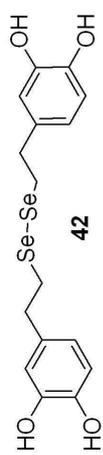


Espectro de ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3)



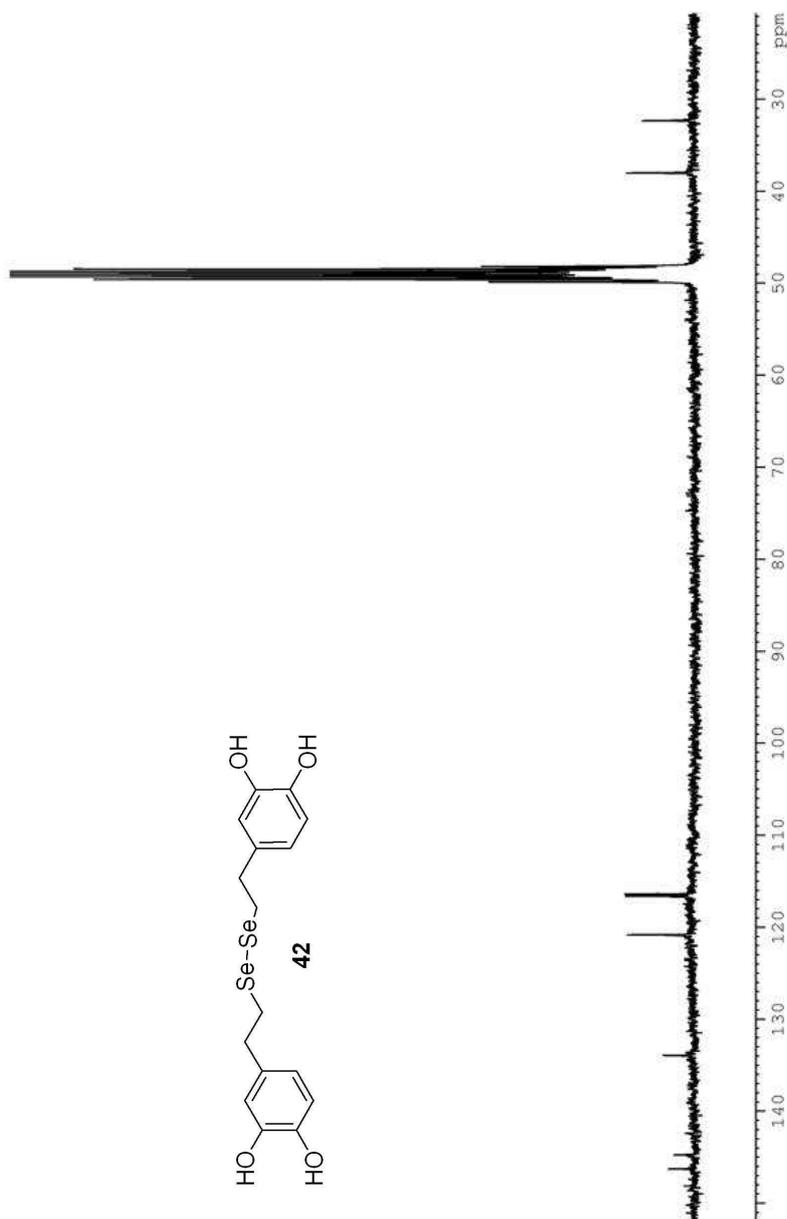


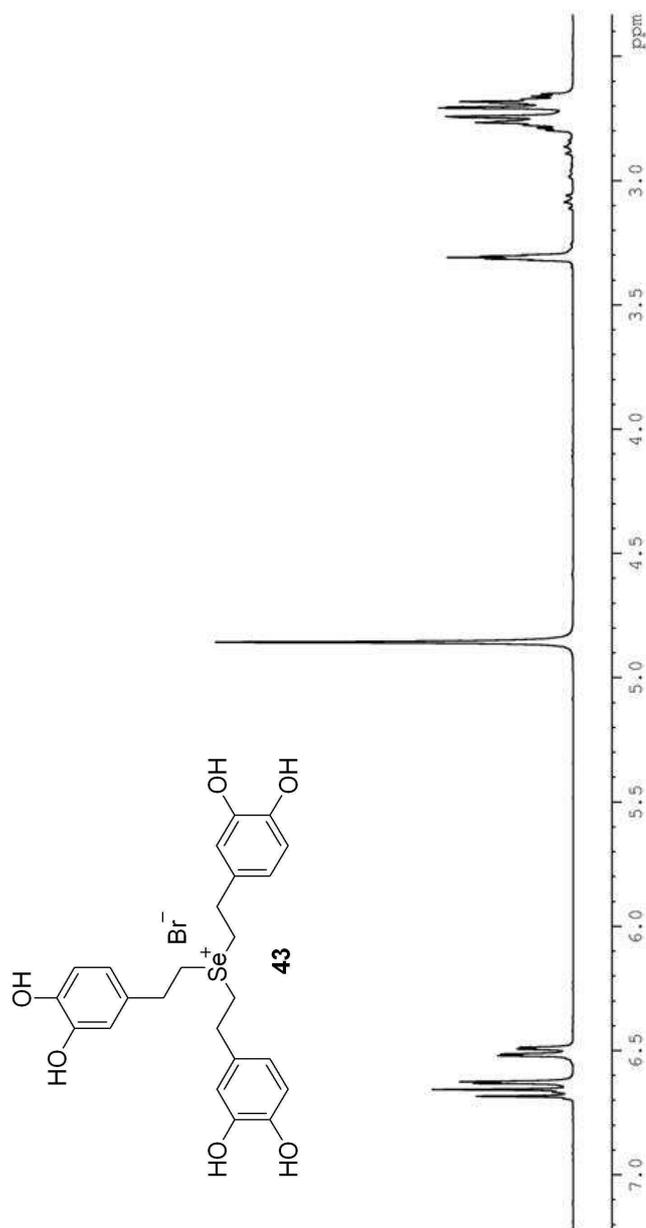
Espectro de ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3)



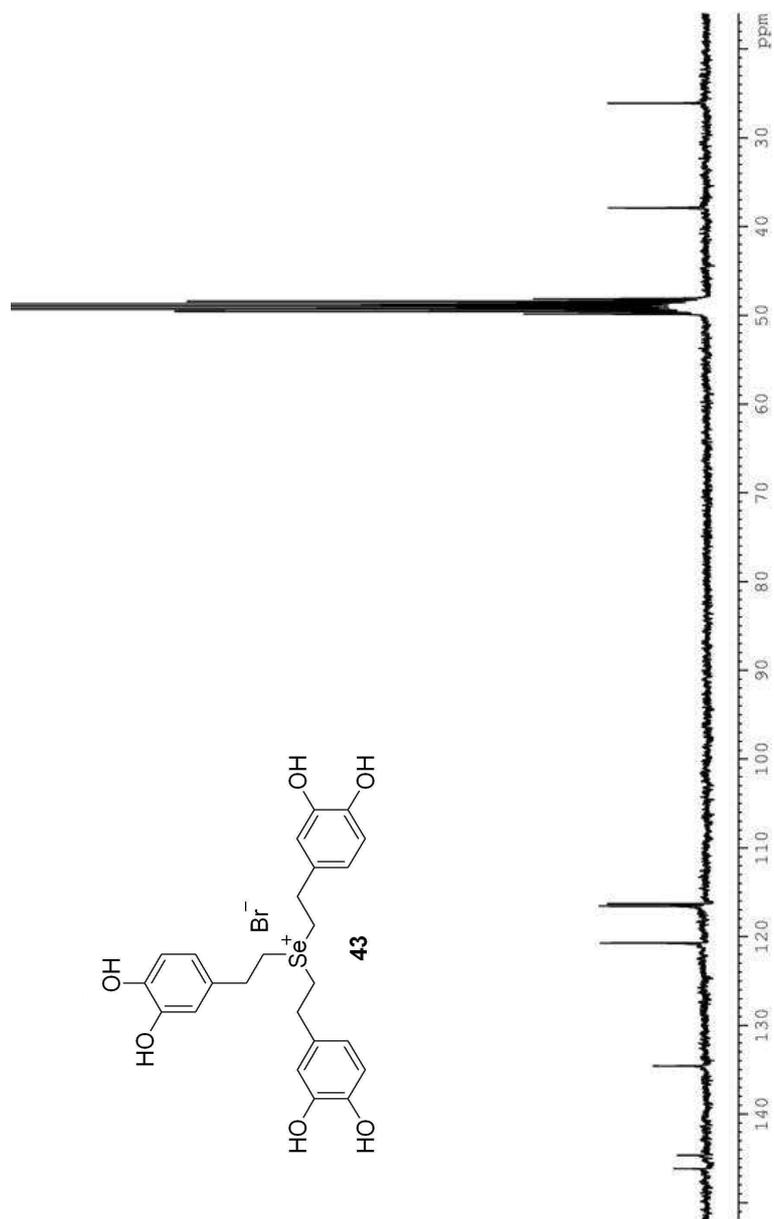
Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD)

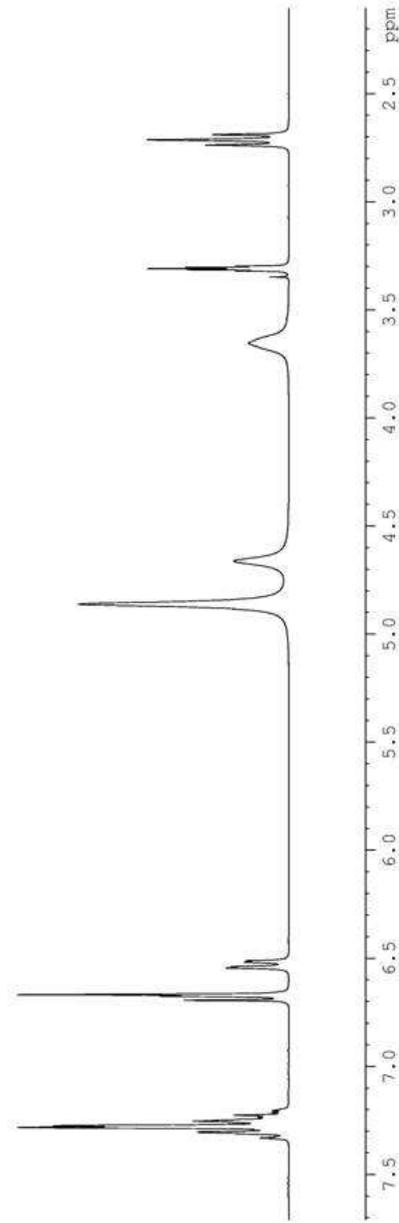
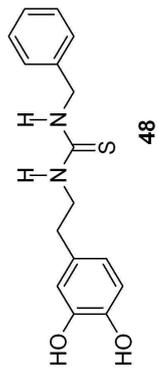
9. Espectros representativos



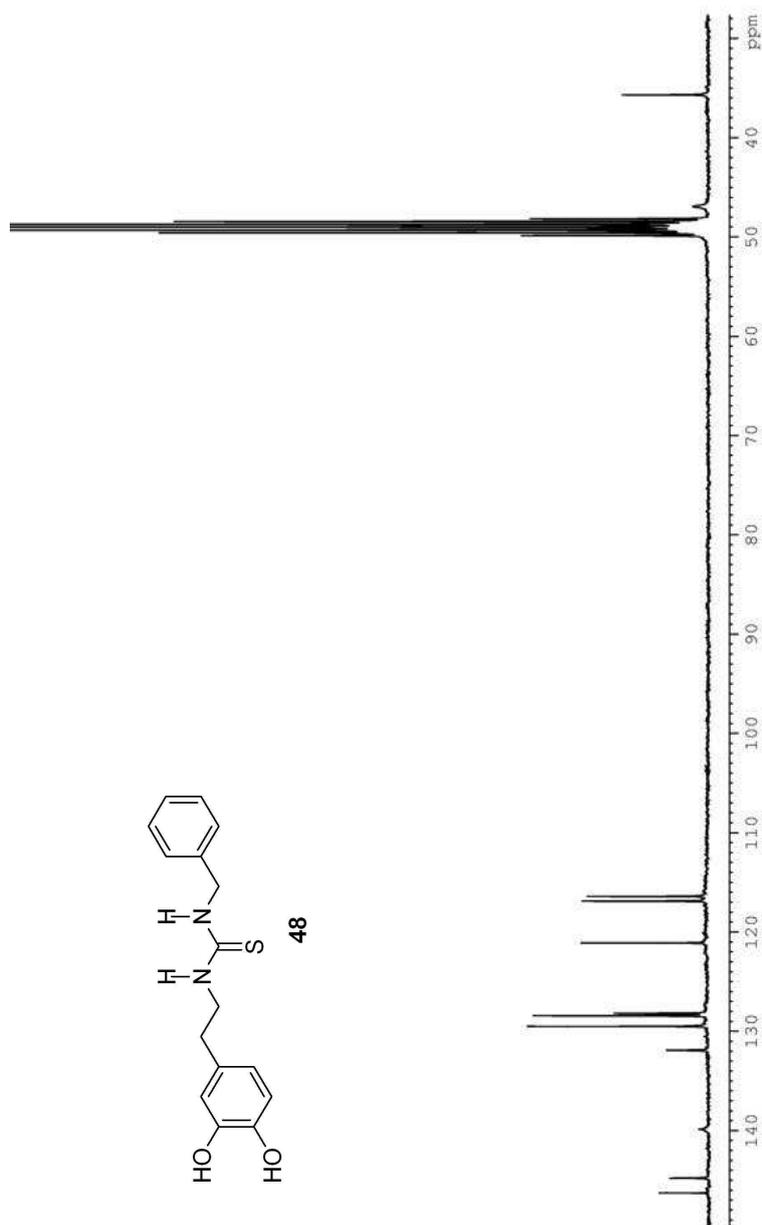
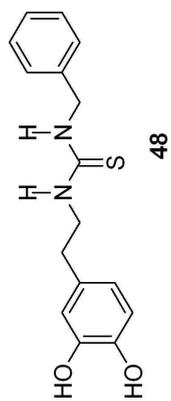


Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD)

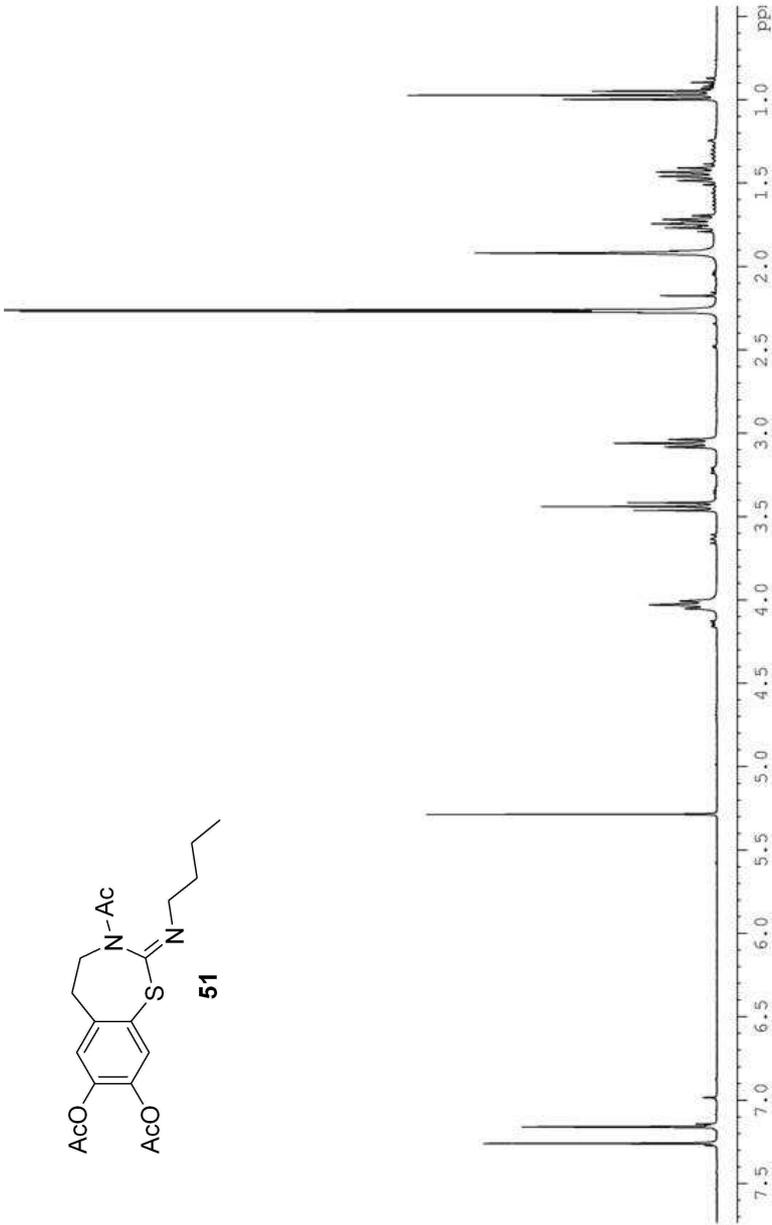
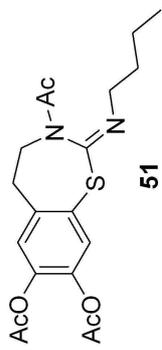




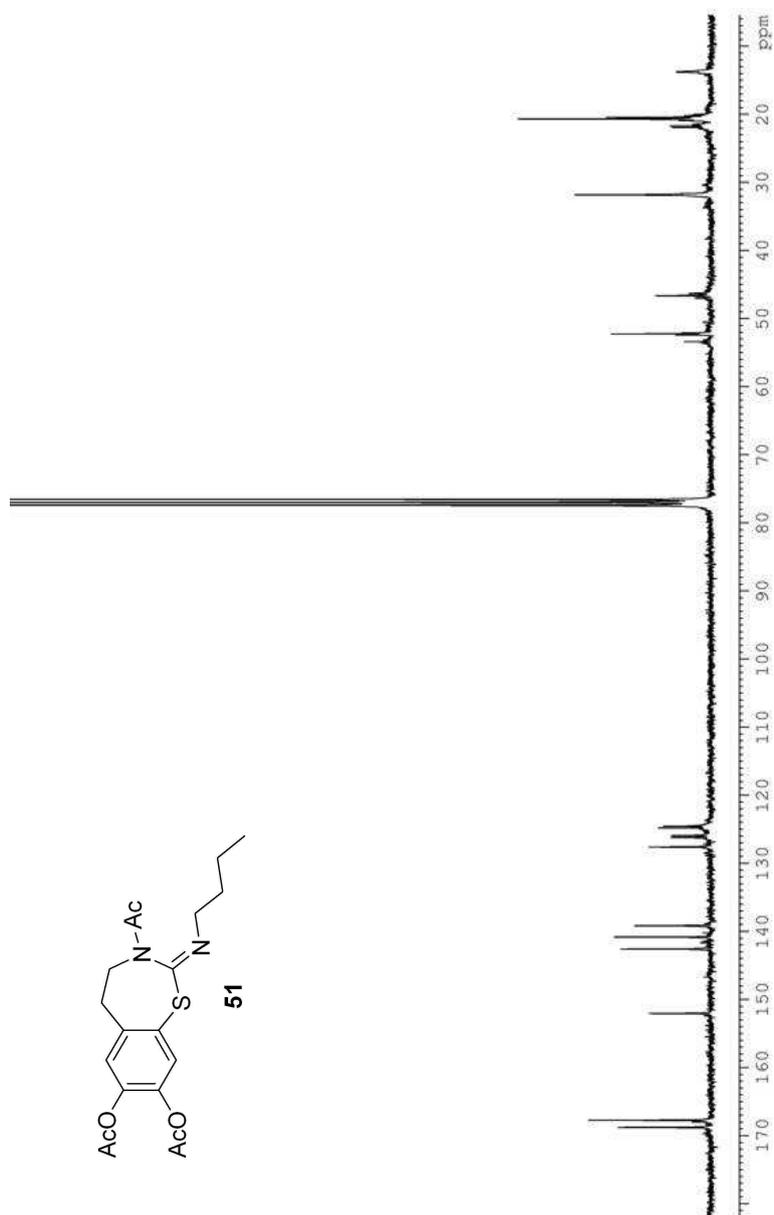
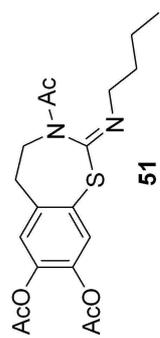
Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD)



Espectro de ^{13}C -RMN (300 MHz, CD_3OD)



Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃)



Espectro de ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3)

