



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Síntesis y evaluación de nuevas moléculas multidiarias en la prevención de enfermedades degenerativas

Jesús Miguel Roldán Peña

Sevilla, enero de 2020



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Síntesis y evaluación de nuevas moléculas multidiarias en la prevención de enfermedades degenerativas

Memoria presentada por el Graduado en Química
Jesús Miguel Roldán Peña para optar al grado de
Doctor en Química

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jesús Miguel Roldán Peña', is positioned below the text.

Fdo. Jesús Miguel Roldán Peña

Sevilla, enero de 2020



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

VºBº de los Directores de la Tesis Doctoral

Fdo.: José María Fernández-Bolaños Guzmán
Catedrático de la Universidad de
Sevilla

Fdo.: Inés Maya Castilla
Catedrática de Escuela Universitaria
de la Universidad de Sevilla

Fdo.: Óscar López López
Profesor Titular de la Universidad de Sevilla

Merecen un profundo agradecimiento las siguientes personas:

A mi familia, y amigos, por estar siempre ahí, en lo bueno y en lo malo.

A mi padre. Gracias por demostrarme lo inmenso que puede ser el amor que un padre puede tener hacia su hijo.

A mi mujer, Irene. Gracias por todo y mucho más. Tú más que nadie sabes lo duro que ha sido realizar todo este trabajo. El que haya conseguido llegar donde estoy es gracias a ti y una parte importantísima de este trabajo también es tuyo.

Cabe añadir otros agradecimientos en referencia a esta Tesis Doctoral:

A la Fundación Cámara por la concesión de una beca para la realización de la presente Tesis Doctoral, y al Ministerio de Educación, por la concesión de la Beca de Formación para Profesorado Universitario (FPU) también para la realización de la presente Tesis Doctoral.

Al Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación al grupo de investigación concedida al proyecto “Moléculas y Macromoléculas con Actividad Multidiana frente a enfermedades Degenerativas (CTQ2016-78703-P)” dentro del cual se ha realizado la presente Tesis.

A mis directores de Tesis, José M^a Fernández-Bolaños Guzmán, Inés Maya Castilla y Óscar López López por darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral dentro de su grupo de investigación.

Al personal del servicio de RMN del y al servicio de Espectrometría de Masas CITIUS por sus labor.

A los grupos de investigación del profesores José Manuel Padrón (Universidad de la Laguna, Canarias), María Laura Bolognesi, Manuela Bartolini y Bárbara Monti (Universidad de Bolonia), por su colaboración en la evaluación biológica de algunos de los compuestos sintetizados, así como al doctor Antonio Franconetti, actualmente investigador del CIC bioGUNE (Vizcaya) por su colaboración en los con los estudios de modelización molecular realizados.

Por último, agradecer a la Universidad de Sevilla dentro de la cual se ha realizado la presente Tesis Doctoral dentro de su programa de Doctorado en Química.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Abreviaturas y acrónimos | 1 |
| Reactivos y disolventes comerciales usados | 4 |
| 1. Resumen | 7 |
| 2. Relación de compuestos | 11 |
| 3. Introducción general | 18 |
| 4. Objetivos | 25 |
| 5. Síntesis y evaluación de nuevos derivados antioxidantes de tacrina | 28 |
| 5.1. Introducción y antecedentes | 29 |
| 5.1.1. Alzheimer, características y causas | 29 |
| 5.1.2. La tacrina y otros inhibidores de colinesterasas para el tratamiento del Alzheimer | 37 |
| 5.2. Resultados y discusión | 42 |
| 5.2.1. Síntesis y evaluación de nuevos tioderivados de tacrina | 42 |
| 5.2.1.1. Síntesis de nuevos tioderivados de tacrina | 42 |
| 5.2.1.2. Evaluación <i>in vitro</i> de nuevos tioderivados de tacrina | 45 |
| A) Ensayo de inhibición de colinesterasas (AChE y BuChE) | 45 |
| B) Ensayo de inhibición de autoagregación de polipéptidos β -amiloides | 50 |
| C) Ensayo de neurotoxicidad | 51 |
| D) Ensayo como miméticos de glutatión peroxidasa | 52 |
| E) Ensayo de capacidad antiproliferativa | 56 |
| 5.2.2. Síntesis y evaluación de nuevas moléculas duales obtenidas a partir de tacrina y derivados de fenoles | 59 |
| 5.2.2.1. Síntesis de nuevas moléculas duales a partir de tacrina y derivados de fenoles | 59 |
| 5.2.2.2. Evaluación <i>in vitro</i> y modelización molecular de nuevas moléculas duales obtenidas a partir de tacrina y derivados de fenoles | 68 |

| | |
|--|-----|
| A) Ensayo de DPPH | 68 |
| B) Ensayo de inhibición de colinesterasas (AChE y BuChE) | 69 |
| C) Modelización molecular | 76 |
| D) Ensayo de inhibición de autoagregación de polipéptidos β -amiloides | 80 |
| E) Ensayo de neurotoxicidad | 81 |
| F) Ensayo de hepatotoxicidad | 83 |
| G) Ensayo de neuroprotección | 84 |
| H) Ensayo de estabilidad en plasma sanguíneo | 85 |
| | |
| 6. Síntesis de nuevos derivados organocalcógenos y evaluación de su actividad anticancerígena | 86 |
| 6.1. Introducción y antecedentes | 87 |
| 6.1.1. El cáncer. Causas y características | 87 |
| 6.1.2. Interés de los derivados fenólicos y derivados calcógenos frente al cáncer y búsqueda de selectividad en fármacos | 88 |
| 6.1.3. Interés biológico del selenio y aplicación de compuestos organoselénicos como inhibidores de HADC frente al cáncer | 93 |
| 6.2. Resultados y discusión | 98 |
| 6.2.1. Síntesis y evaluación de nuevos tio- y selenoderivados de tirosol e hidroxitirosol | 98 |
| 6.2.1.1. Síntesis de nuevos tio- y selenoderivados de tirosol e hidroxitirosol | 98 |
| 6.2.1.2. Evaluación de capacidad antiproliferativa | 101 |
| 6.2.2. Síntesis y evaluación de nuevos tio- y selenoderivados de biotina | 103 |
| 6.2.2.1. Síntesis de nuevos tio- y selenoderivados de biotina | 103 |
| 6.2.2.2. Evaluación de capacidad antiproliferativa | 117 |
| | |
| 7. Conclusiones | 121 |
| | |
| 8. Parte experimental | 124 |
| 8.1. Métodos generales | 125 |
| 8.1.1. Ensayo de inhibición de AChE y BuChE en derivados organocalcógenos empleando enzimas modelo de origen animal | 126 |
| 8.1.2. Ensayo de inhibición de AChE y BuChE en compuestos sin calcógenos empleando enzimas modelo de origen animal | 131 |

| | | |
|----------------|---|-----|
| 8.1.3. | Ensayo inhibición de AChE y BuChE empleando enzimas humanas | 134 |
| 8.1.4. | Ensayo de inhibición de autoagregación de polipéptidos β -amiloides | 134 |
| 8.1.5. | Ensayo de DPPH | 135 |
| 8.1.6. | Ensayo de evaluación de compuestos como miméticos de GPx | 135 |
| 8.1.7. | Ensayo de neurotoxicidad | 136 |
| 8.1.8. | Ensayo de hepatotoxicidad | 137 |
| 8.1.9. | Ensayo de neuroprotección | 138 |
| 8.1.10. | Ensayo de estabilidad en plasma sanguíneo | 138 |
| 8.1.11. | Estudio de modelización molecular | 139 |
| 8.1.12. | Ensayo de antiproliferación | 140 |
| 8.1.13. | Análisis estadístico | 142 |
| 8.2. | Síntesis de materias primas | 143 |
| 8.3. | Síntesis por una nueva ruta de compuestos conocidos | 154 |
| 8.4. | Síntesis de nuevos compuestos | 163 |
| 9. | Espectros de RMN representativos | 217 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- 5-FU 5-Fluorouracilo
- A β β -amiloides
- AChE Acetilcolinesterasa
- Ala Alanina
- AMPc Adenosín monofosfato cíclico
- Anh. Anhidro/a
- AOVE Aceite de oliva virgen extra
- APP Proteína precursora amiloidea
- Asn Asparagina
- Asp Ácido aspártico
- BuChE Butirilcolinesterasa
- BHT Butilhidroxitolueno
- BSSE Error por superposición de la base
- Cat. Catalizador
- CCF Cromatografía de capa fina
- CE₅₀ Concentración efectiva para lograr un 50% de la máxima respuesta
- ChAT Colina acetiltransferasa
- CI₅₀ Concentración para inhibir un proceso al 50%
- Desc. Descomposición
- DMF *N,N*-Dimetilformamida
- DFT Density functional theory
- DO Densidad óptica
- DPPH Radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo
- DTNB Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
- Esq. Esquema
- Equiv. Equivalente
- ESI Electrospray ionization
- FA Ácido fórmico
- FDA Food and Drug Administration

- Fig. Figura
- 5-FU 5-Fluorouracilo
- GI₅₀ Concentración para inhibir el crecimiento celular un 50%
- Gln Glutamina
- GPx Glutación peroxidasa
- GR Glutación reductasa
- GSH Glutación
- HDAC Histona desacetilasa
- His Histidina
- HFIP Hexafluoroisopropanol
- IEFPCM Modelo del continuo polarizable con el formalismo de la ecuación integral
- iHDAC Inhibidor de histona desacetilasa
- Ile Isoleucina
- INC Instituto Nacional del Cáncer
- IS Índice de selectividad
- LC-MS Cromatografía líquida - espectrometría de masas
- MAO Monoamino oxidasa
- MEP Molecular electrostatic potential
- MTT Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio
- NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
- NADP⁺ Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NGC Neuronas granulares del cerebelo
- NMDA Ácido *N*-metil-D-aspártico
- OMS Organización Mundial de la Salud
- PCM Modelo del continuo polarizable
- PBS Buffer fosfato salino
- PDB Protein Data Bank
- ppm Partes por millón
- PS Poliestireno
- RCF Fuerza centrífuga relativa
- R_f Rate factor

- rpm Revoluciones por minuto
- SAHA Ácido suberoilánido hidroxámico
- SEOM Sociedad Española de Oncología Médica
- Ser Serina
- SIM Selected ion monitoring
- S_NAr Sustitución nucleofílica aromática
- TEA Trietilamina
- Pf Punto de fusión
- Trp Triptófano

REACTIVOS Y DISOLVENTES COMERCIALES USADOS

- 1,4-Dibromobutano (P = 99%, Sigma-Aldrich)
- 1,4-Fenilendiamina (P=97%, Sigma-Aldrich)
- 1,5-Dibromopentano (P = 97%, Sigma-Aldrich)
- 1,6-Dibromohexano (P = 96%, Sigma-Aldrich)
- 2-Feniletanol (P ≥ 99%, Sigma-Aldrich)
- 2-(3,4-Dimetoxifenil)etanol (P = 98%, Sigma-Aldrich)
- 2-(4-Metoxifenil)etanol (P = 98%, Sigma-Aldrich)
- 3,4-Dihidroxibenzaldehído (P > 98%, Merck)
- 3,4-Dimetoxibenzaldehído (P = 99%, Sigma-Aldrich)
- 3,4,5-Trihidroxibenzaldehído (P > 98%, TCI)
- 4-Hidroxibenzaldehído (P = 98%, Sigma-Aldrich)
- Acetato de *p*-nitrofenilo (Sigma-Aldrich)
- Acetilcolinesterasa (*Electrophorus electricus*) (>1000 unidades/mg, Sigma-Aldrich)
- Acetona anhídrida (P≥99.5%, Sigma-Aldrich)
- Acetonitrilo ((P≥99.95%, VWR)
- Ácido 5-aminovalérico (P = 97 %, Sigma-Aldrich)
- Ácido antranílico (P=98%, Sigma-Aldrich)
- Ácido L-ascórbico(P≥ 99%, Sigma-Aldrich)
- AcOEt (P≥99.5%, VWR)
- AcOH glacial (P=99.5%, PanReac)
- Anhídrido acético (P=98%, PanReac)
- Anhídrido de Boc (P=100%, Merck)
- Bencenotiol (P≥ 99%, Sigma-Aldrich)
- BnBr (P = 98%, Sigma-Aldrich)
- BnCl (P= 99%, Sigma-Aldrich)
- Butirato de *p*-nitrofenilo (P≥ 98%, Sigma-Aldrich)
- Butirilcolinesterasa (suero equino) (10.9 unidades/mg, Sigma-Aldrich)
- CaCO₃ (P≥99%, PanReac)
- CDCl₃ (P=99.80%, VWR)
- (CD₃)₂CO (P=99.8%, VWR)
- CD₃OD (P=99.8%, VWR)
- (CD₃)₂SO (P=99.8%, VWR)
- Celita[®] 545 (Merck)
- CF₃COOH (P = 99%, Sigma-Aldrich)
- CH₂Cl₂ (P≥99.8%, VWR)
- Ciclohexano (P≥99.5%, VWR)
- Ciclohexanona (P≥99%, TCI)

- Cloroformiato de isobutilo (P = 98 %, Sigma-Aldrich)
- Clorohidrato de R-epinefrina (Sigma-Aldrich)
- D-Biotina (P = 100%, Sigma-Aldrich)
- Difenildiselenuro (P ≥ 99%, Sigma-Aldrich)
- Dioxano (P=99.5%, PanReac)
- DMF (P ≥ 99.8, Honeywell)
- DMSO (P=100%, VWR)
- DPPH (Sigma-Aldrich)
- DTNB (P= 99%, Sigma-Aldrich)
- Etilendiamina (P ≥ 99.5%, Sigma-Aldrich)
- Et₂NH (P ≥ 99.5%, Sigma-Aldrich)
- Et₂O (P = 100%, VWR)
- EtOH (P=96%, VWR)
- Etoximetilenmalonato de dietilo ((P = 97 %, Fluka)
- Fenol (P=100%, Sigma-Aldrich)
- Formiato de etilo (P = 97%, Sigma-Aldrich)
- Gel de sílice (0.040-0.063 mm, Merck)
- HCl (P=37%, PanReac)
- Hidracina monohidratada (Sigma-Aldrich)
- Hidrocloruro de 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina hidratado (P ≥ 99%, Sigma-Aldrich)
- Hidrocloruro de dopamina (P=100%, VWR Sigma-Aldrich)
- H₂O₂ (P=30%, Sigma-Aldrich)
- H₂SO₄ (P=97%, PanReac)
- K₂CO₃ (P ≥ 99%, Fluka)
- KOH (P=85%, Merck)
- KSCN (P = 99%, Sigma-Aldrich)
- KSeCN (P ≥ 99%, Sigma-Aldrich)
- MeOH (P ≥ 99.8%, VWR; P ≥ 99.5%, Sigma-Aldrich)
- NaBH₄ (P=97%, Sigma-Aldrich)
- NaCl (P ≥ 99%, PanReac)
- NaH (P=95%, Sigma-Aldrich)
- NaHCO₃ (P=100%, Sigma-Aldrich)
- NaH₂PO₄ · 2H₂O (P ≥ 99%, Fluka)
- Na₂HPO₄ · 2H₂O (P = 99.5%, Merck)
- NaI (P = 100%, Sigma-Aldrich)
- NaN₃ (P = 99 %, Sigma-Aldrich)
- NaOH (P ≥ 97%, Fluka)
- Na₂SO₄ anhidro (P ≥ 99.5%, VWR)
- NH₃ (P=28% en H₂O, PanReac)

- Pd/C (P = 10 %, Sigma-Aldrich)
- Pd(OH)₂/C (P = 20 %, Sigma-Aldrich)
- Piridina (P = 97 %, Sigma-Aldrich)
- *p*-Metoxianilina (P = 98%, Sigma-Aldrich)
- POCl₃ (P≥98%, TCI)
- Resina básica IRA 400 (Sigma-Aldrich)
- Rojo de fenol (Sigma-Aldrich)
- *S*-Butiriltocolina (P = 98%, Sigma-Aldrich)
- THF (P≥99.0%, Honeywell)
- Tiofosgeno (P = 97 %, Sigma-Aldrich)
- Tolueno (P≥99.5%, Fluka)
- Trietilamina (P ≥ 99%, Sigma-Aldrich)
- Yoduro de acetiltocolina (P≥ 98%, Sigma-Aldrich)

1. RESUMEN

Entre las enfermedades más preocupantes actualmente en cuanto al número de casos así como a la importancia de los efectos producidos por las mismas están las enfermedades crónicas degenerativas tales como el cáncer, el Alzheimer o el Parkinson. La etiología compleja y multifactorial de estas enfermedades es el principal problema que existe a la hora de combatirlas, sobre todo cuando se comienza su tratamiento en fases ya avanzadas de la enfermedad. Es por ello que el desarrollo de fármacos multidiana es una posible solución que ha emergido en la Química Medicinal como forma de hacer frente a dichas enfermedades de manera más eficaz que empleando la concepción clásica de fármacos que interactúan con una única diana terapéutica.

Esta Tesis Doctoral se encuadrada dentro del proyecto de título “Moléculas y Macromoléculas con Actividad Multidiana frente a enfermedades Degenerativas” (CTQ2016-78703-P) concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España.

En la presente Tesis se sintetizaron y evaluaron nuevos compuestos orgánicos como fármacos multidiana con objeto de combatir el Alzheimer y el cáncer como alternativa al tratamiento de estas enfermedades con cócteles de fármacos. De manera clara se distinguen en esta Tesis Doctoral los dos bloques descritos a continuación:

- En primer lugar, se describe la síntesis de diferentes moléculas orgánicas derivadas del compuesto denominado tacrina, usado durante cierto tiempo como fármaco para combatir el Alzheimer en determinadas fases de la enfermedad.

Dentro de los nuevos derivados sintetizados podemos distinguir dos familias: por un lado una serie de tioderivados de tacrina heterodiméricos y homodiméricos, y por otro lado una familia de compuestos con tacrina obtenidos a partir de moléculas derivadas de fenoles que presentan distinto número de grupos hidroxilos libres y protegidos. Además, en esta segunda familia se buscó alterar la naturaleza y la longitud del espaciador empleado entre los dos farmacóforos, estudiándose como afectan estas modificaciones estructurales a la actividad biológica de las nuevas moléculas.

Dichos compuestos se evaluaron frente a determinadas dianas terapéuticas relacionadas con el Alzheimer, midiéndose su capacidad como inhibidores de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, su actividad como inhibidores de la formación de placas β -amiloides, su capacidad para reducir especies oxidantes y su capacidad neuroprotectora, así como su neurotoxicidad, hepatotoxicidad y

estabilidad en plasma sanguíneo, demostrando en dichos ensayos resultados para algunas de las moléculas obtenidas mejores a los de la tacrina usada de partida, obteniéndose con ello prometedores posibles fármacos para combatir el Alzheimer. Además de ello y debido a la conocida capacidad antiproliferativa frente a células cancerosas de moléculas con un grupo calcógeno en su estructura, se realizaron también este tipo de ensayos en los nuevos tioderivados de tacrina sintetizados, obteniéndose resultados de interés en dichos compuestos en lo que a capacidad antitumoral se refiere.

- En un segundo capítulo se desarrolló la síntesis de nuevos tio- y selenoderivados y se evaluó su actividad contra determinados tipos de cáncer.

Por un lado se sintetizaron diferentes homodímeros y heterodímeros a partir de tirosol e hidroxitirosol en los que los grupos fenólicos estaban metilados con objeto de tener una menor polaridad en dichos compuestos y una mayor biodisponibilidad que si dichos hidroxilos se encontrasen libres. En los compuestos sintetizados se observó la importancia del número de metoxilos presentes en el anillo aromático con respecto a la actividad antiproliferativa frente a células tumorales. Además, se observó también la importancia de la presencia de un fragmento calcógeno en la estructura de dichos compuestos, destacando la actividad de aquellos que presentaban selenio en su estructura. Dichos compuestos no solo destacaron en cuanto a su potente actividad frente a células tumorales, sino en cuanto a su selectividad hacia las mismas, no afectando de manera apreciable al crecimiento de células sanas.

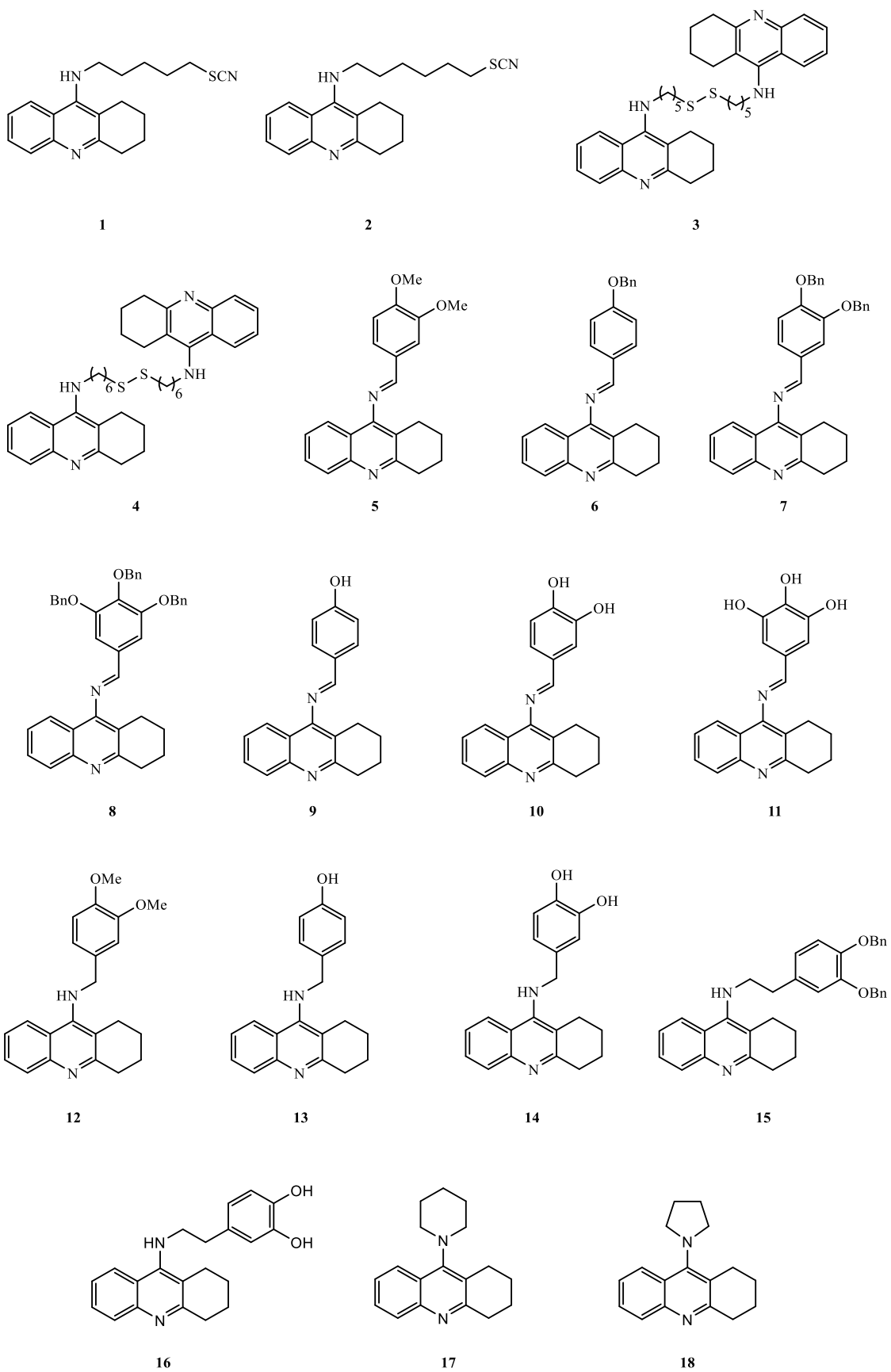
Por otro lado, basándonos en que determinadas células tumorales presentan sobreexpresados ciertos receptores, debido a la necesidad de un mayor aporte de ciertas especies entre las que se encuentran determinadas vitaminas como la D-biotina (vitamina H), se sintetizaron de manera exitosa diferentes derivados organocalcógenos de D-biotina con grupos funcionales de tipo isotiocianato, tiosemicarbazona, tiourea, tiocianato, disulfuro, selenourea y selenocianato.

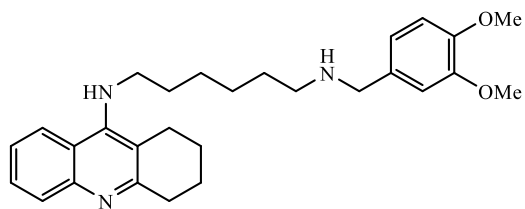
Una vez medida la actividad antiproliferativa de dichas moléculas, se encontraron en varias de ellas valores frente a determinadas líneas celulares tumorales situados en el rango nanomolar, superándose ampliamente los valores obtenidos en dichos ensayos para los fármacos quimioterápicos cisplatino y 5-fluorouracilo. Unido a ello, se realizaron ensayos de antiproliferación en células sanas en aquellos

compuestos con valores de actividad más relevante, observándose en varios ellos valores muy elevados de selectividad, destacando dos de los selenocianatos sintetizados en esta familia con valores de selectividad muy superiores a los antes mencionados cisplatino y 5-fluorouracilo tomados como referencia. Todo ello supone un conjunto de resultados prometedores para los compuestos cabeza de serie como posibles fármacos anticancerígenos.

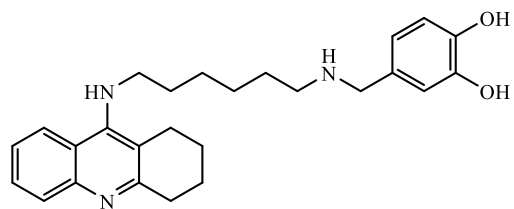
2. RELACIÓN DE COMPUESTOS

Derivados de tacrina e intermedios de su síntesis

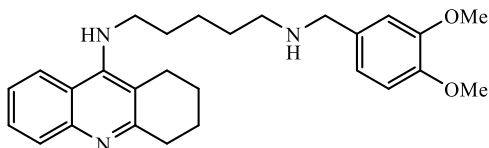




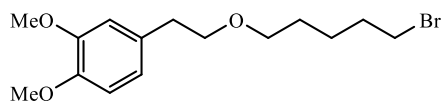
19



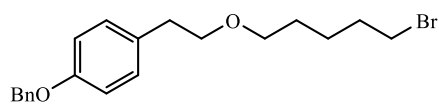
20



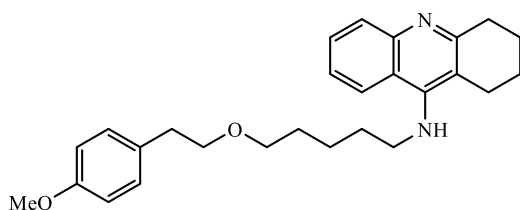
21



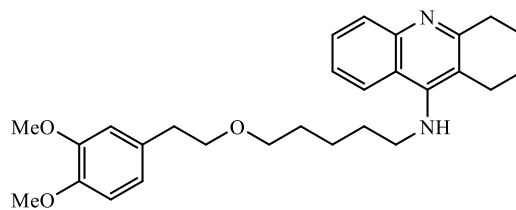
22



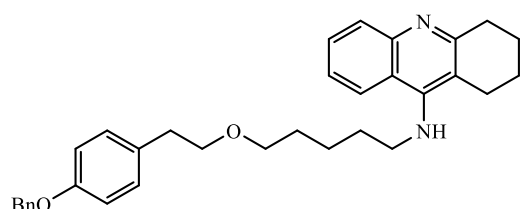
23



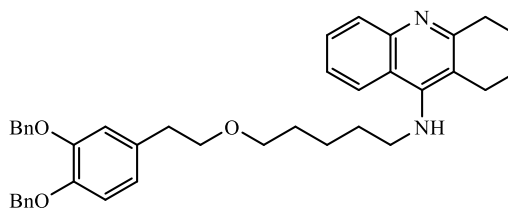
24



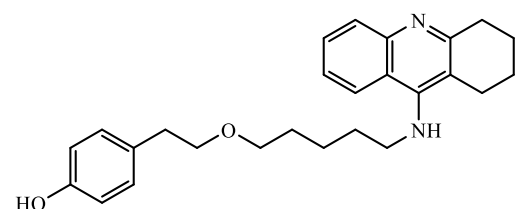
25



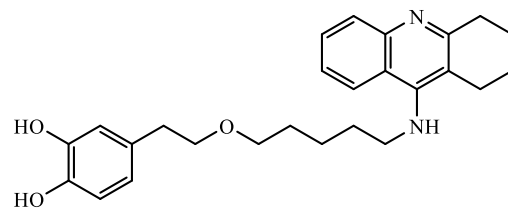
26



27

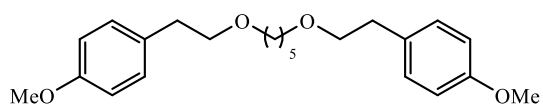


28

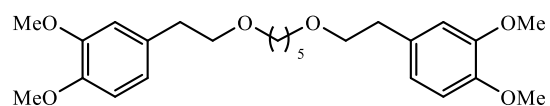


29

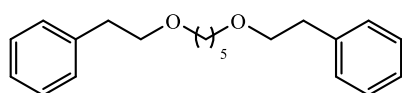
Derivados de 2-feniletanol, tirosol e hidroxitirosol



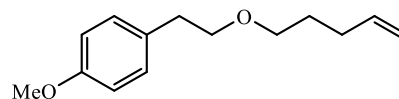
30



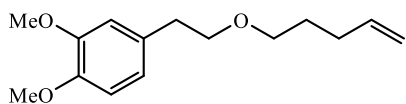
31



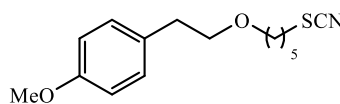
32



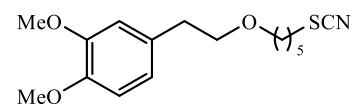
33



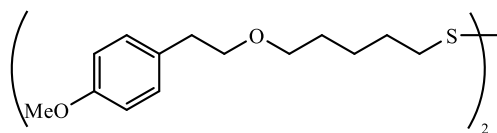
34



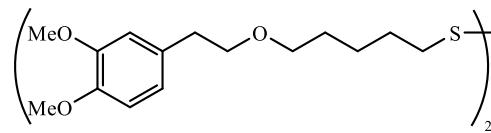
35



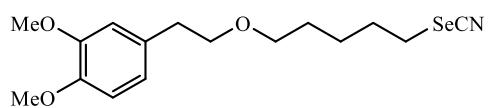
36



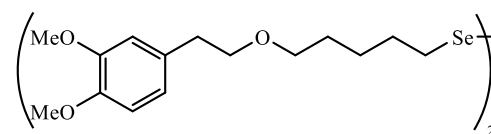
37



38

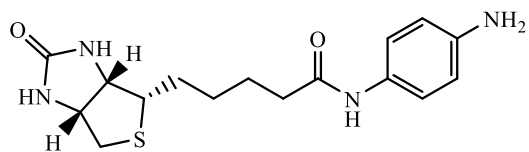


39

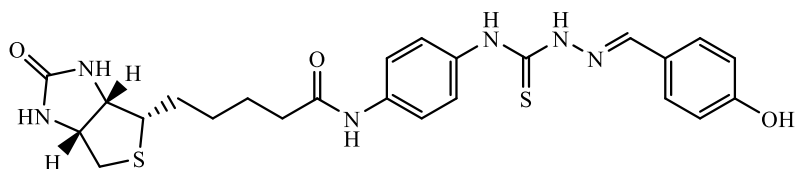


40

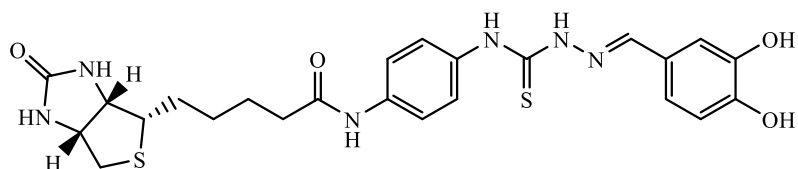
Derivados organocalcógenos de biotina intermedios de su síntesis



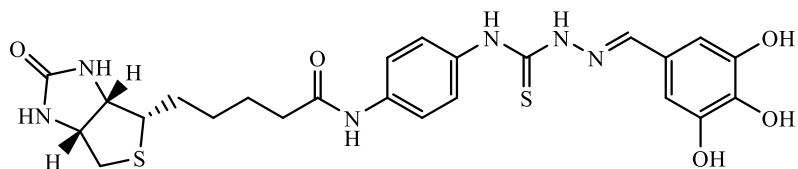
41



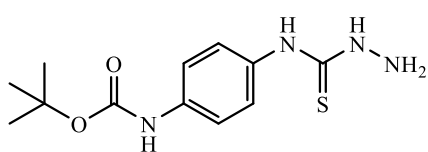
42



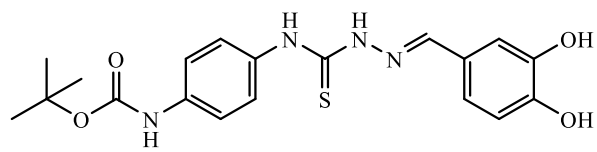
43



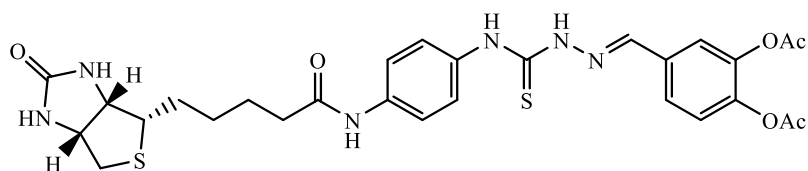
44



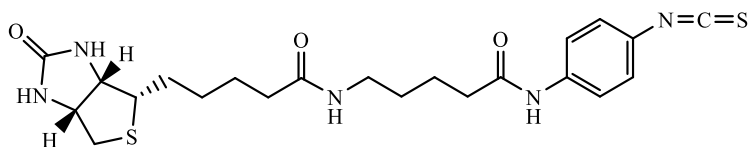
45



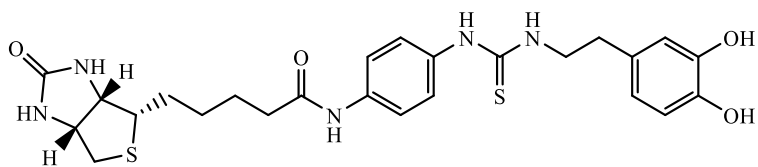
46



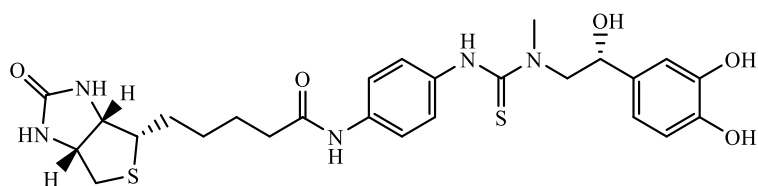
47



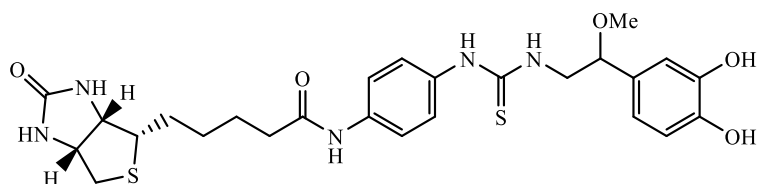
48



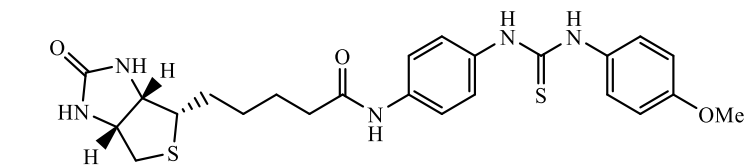
49



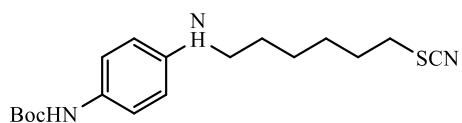
50



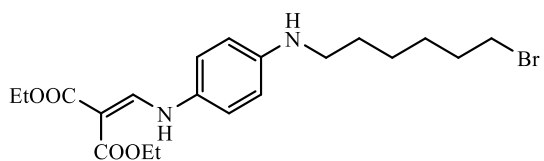
51



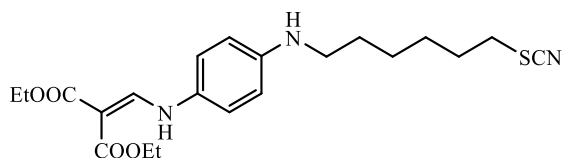
52



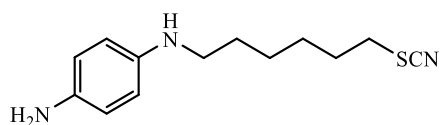
53



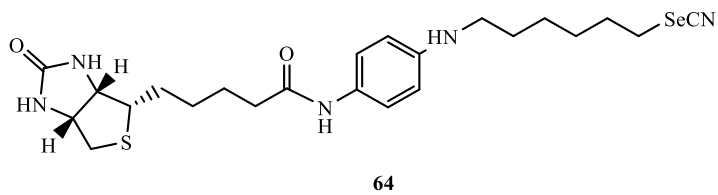
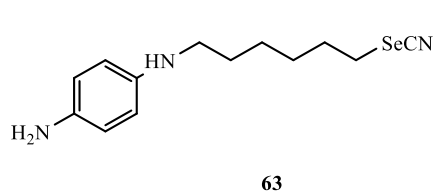
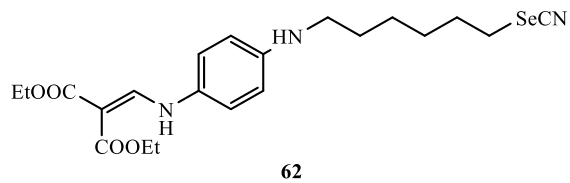
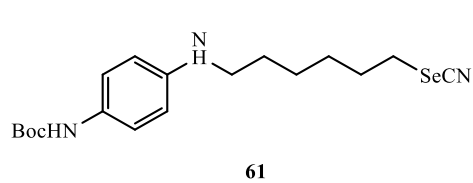
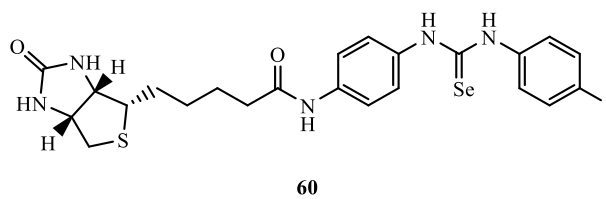
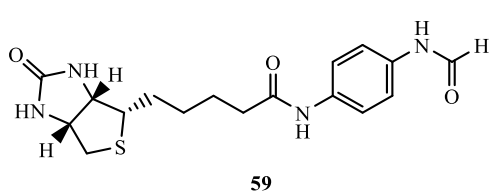
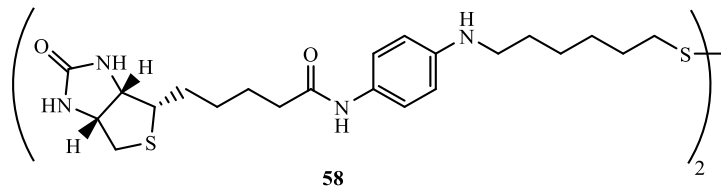
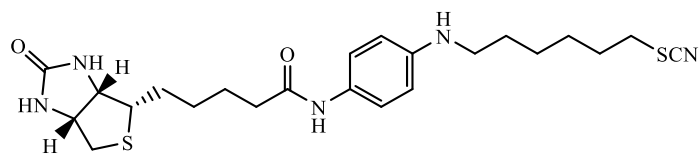
54



55



56



3. INTRODUCCIÓN GENERAL

La búsqueda de la mejora de la calidad de vida, así como de la esperanza de vida han sido inquietudes que han estado presentes en el ser humano desde tiempos inmemoriales. En un origen se partió de la experiencia para conseguir dicho objetivo, surgiendo así la medicina tradicional en distintas regiones, mediante el uso de determinadas especies vegetales y los componentes orgánicos que estas poseen.

Surge el concepto de Química moderna tal como la entendemos en el siglo XVII. Desde entonces hasta nuestros días, la Química ha estudiado a la materia con objeto de comprender el mundo que nos rodea así como mejorar la calidad de vida de las personas y el resto de seres vivos que habitan en él.

La Química Medicinal o Química Terapéutica busca, como su propio nombre indica, la obtención de sustancias capaces de sanar o paliar los efectos de distintas enfermedades que afectan a los seres vivos y de manera más concreta al ser humano.

En su origen, la Química Terapéutica buscó a través de los conocimientos en medicina tradicional la obtención de nuevos fármacos a partir de ligeras modificaciones en compuestos de origen vegetal de los que se conocían ciertos efectos beneficiosos para la salud. Con el desarrollo de la Química Orgánica durante todos estos años, han aumentado los métodos utilizados tanto para la síntesis de nuevas moléculas como para el análisis de las interacciones entre moléculas y su diana en el organismo,¹ llegándose a lo que hoy conocemos como Química Terapéutica moderna.

De entre las múltiples enfermedades presentes actualmente en la sociedad, el cáncer y la enfermedad de Alzheimer, localizadas dentro de las enfermedades crónicas degenerativas, afectan a un amplio sector de la sociedad. El aumento de la población mundial así como de la esperanza de vida ha supuesto un crecimiento en el número de casos en lo referente a estas enfermedades.

1. A. Delgado, C. Minguillón, J. Joglar. *Introducción a la Química Terapéutica*, 2ª edición, editorial Ediciones Díaz de Santos, **2003**.

Estas enfermedades se caracterizan por poseer etiologías complejas y multifactoriales,²⁻⁴ lo cual dificulta enormemente la aplicación de tratamientos con fármacos orientados a una única diana terapéutica.

Como alternativa al empleo de estos fármacos, existe el tratamiento mediante la administración de un *cocktail* de fármacos que actúan de manera independiente en diversas dianas terapéuticas, en una aproximación conocida como polifarmacia.⁵

No obstante, el suministro de un *cocktail* de fármacos puede provocar varios efectos negativos en el paciente. Por un lado, aparece cierto rechazo por parte del mismo hacia la ingesta de un elevado número de fármacos y por otro lado, es muy común que los distintos fármacos suministrados tengan diferente comportamiento en cuanto a la biodisponibilidad, farmacocinética, y metabolismo, con lo que puede provocarse una disminución del efecto farmacológico deseado, incluso pudiéndose dar interacciones fármaco-fármaco que conducen a una multiplicación de los efectos toxicológicos de los mismos.³

Desde hace unos años se comenzó a trabajar en el diseño de nuevos fármacos que incorporasen distintos farmacóforos en la misma molécula, con objeto de actuar simultáneamente sobre distintos receptores biológicos. Surge en base a estos nuevos fármacos el término polifarmacología⁶ y fármaco multidiana,⁷ compuestos capaces de

-
2. M. Obulesu, M.J. Lakshmi. Apoptosis in Alzheimer's disease: an understanding of the psychology, pathology and therapeutic avenues. *Neurochem. Res.* **2014**, 39, 2301-2312.
 3. C. Rochais, C. Lecoutey, F. Gaven, P. Giannoni, K. Hamidouche, D. Hedou, E. Dubost, D. Genest, S. Yahiaoui, T. Freret, V. Bouet, F. Dauphin, J. Sopkova de Oliveira Santos, C. Ballandonne, S. Corvaisier, A. Malzert-Fréon, R. Legay, M. Boulouard, S. Claeysen, P. Dallemagne. Novel multitarget-directed ligands (MTDLs) with acetylcholinesterase (AChE) inhibitory and serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) agonist activities as potential agents against Alzheimer's disease: the design of donecopride. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 3172-3187.
 4. R.S. Keri, C. Quintanova, S. Chaves, D.F. Silva, S.M. Cardoso, M.A. Santos. New tacrine hybrids with natural-based cysteine derivatives as multitargeted drugs for potential treatment of Alzheimer's disease. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2016**, 87, 101-111.
 5. C.M. Hughes, K.L. Lapane. Pharmacy interventions on prescribing in nursing homes: from evidence to practice. *Ther. Adv. Drug. Saf.* **2011**, 2, 103-112.
 6. M.L. Bolognesi, A. Cavalli. Multitarget drug discovery and polypharmacology. *ChemMedChem.* **2016**, 11, 1190-1192.
 7. Y. Bansal, O. Silakari. Multifunctional compounds: smart molecules for multifactorial diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 76, 31-42.

interaccionar simultáneamente con varios receptores biológicos. Estos están cobrando un interés creciente en las áreas de Química Medicinal y Farmacología como herramienta útil para combatir las enfermedades multifactoriales. Desde la aparición del concepto en los años 90, han sido multitud los estudios realizados de dichos compuestos. Entre las dianas buscadas en muchas de estas enfermedades, aparecen especies oxidantes que conducen a la degradación oxidativa de biomoléculas esenciales,⁸ siendo por ello estas especies oxidantes en multitud de casos unas de las dianas terapéuticas perseguidas al usar fármacos multidiana.

Del éxito de este tipo de fármacos existe ya constancia, siendo numerosos los ejemplos en los que se ha demostrado una mejora de su acción terapéutica, así como una disminución de efectos secundarios producidos. Varios de ellos se encuentran ya aprobados o en fase clínica para el tratamiento de diferentes males entre los que se encuentran la depresión, alergias, enfermedades metabólicas, hipertensión e inflamación entre otros.⁹

En este contexto, son numerosas las investigaciones encaminadas al desarrollo de fármacos multidiana para el tratamiento de enfermedades complejas como el Alzheimer o el cáncer.⁶

En el caso del Alzheimer son muchas las causas que podrían ser responsables de la aparición y desarrollo de dicha enfermedad. Entre dichas causas, se encuentran la reducción significativa de los niveles normales de la concentración del neurotransmisor acetilcolina (responsable de funciones cognitivas), la formación de placas β -amiloides en el cerebro,¹⁰ la aparición de estrés oxidativo,¹¹ la neuroinflamación,¹² concentraciones

8. J.F. Engelhardt, C.K. Sen, L. Oberley. Redox-modulating gene therapies for human diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **2001**, *3*, 341-346.

9. F.J.B. Mendonca, Jr., L. Scotti, H. Ishiki, S.P.S. Botelho, M.S. Da Silva, M.T. Scotti. Benzo- and thienbenzo- diazepines: multi-target drugs for CNS disorders. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2015**, *15*, 630-647.

10. U. A. Cevik, B. N. Saglik, S. Levent, D. Osmaniye, B. K. Cavuşoglu, Y. Ozkay, Z. A. Kaplancikli. Synthesis and AChE-inhibitory activity of new benzimidazole derivatives. *Molecules.* **2019**, *24*, 861.

11. J. Wei, F. Yang, C. Gong, X. Shi, G. Wang. Protective effect of daidzein against streptozotocin-induced Alzheimer's disease via improving cognitive dysfunction and oxidative stress in rat model. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2019**, e22319.

12. A. Tsoy, T. Salieva, E. Abzhanova, A. Turgambayeva, A. Kaiyrylykyzy, M. Akishev, S. Saparbayev, B. Umbayev, S. Askarova. The effects of mobile phone radiofrequency electromagnetic fields on β -amyloid-induced oxidative stress in human and rat primary astrocytes. *Neuroscience.* **2019**, *408*, 46-57.

anormales de ciertos metales de transición (hierro, cinc y cobre por ejemplo),¹³ la formación de ovillos neurofibrilares debido a la hiperfosforilación de proteínas tau en el cerebro,¹⁴ la excesiva liberación de glutamato que produce axonopatía al acumularse péptidos β -amiloides en los sinaptosomas glutamatérgicos¹⁵ y el aumento de proteínas monoamino oxidasas (MAOs) que en diversos estudios ha demostrado jugar un papel determinante en la enfermedad de Alzheimer aunque aún no se conoce con un alto grado de detalle como afecta a la patogénesis de esta enfermedad.^{16,17}

En un principio, la teoría más aceptada en cuanto al tratamiento del Alzheimer era la hipótesis colinérgica¹⁸, empleándose para combatirlo fármacos que buscaban el aumento de los niveles de acetilcolina, lo cual únicamente servía para actuar sobre una diana terapéutica, haciendo que dicho tratamiento no fuera del todo efectivo. Sin embargo con el tiempo surgieron otras teorías cada vez más aceptadas como son la teoría de las placas β -amiloides, la hipótesis de la cascada tau¹⁹ o la hipótesis glutamatérgica.²⁰ Estos factores junto con los otros antes mencionados dan cuenta de la elevada complejidad de esta enfermedad, lo que ocasiona la búsqueda de medios más eficaces para combatirla, estudiándose moléculas con varios fragmentos farmacóforos con objeto de obtener

-
13. S. Ayton, A.A. Belaidi, P. Lei, A.I. Bush. Targeting transition metals for neuroprotection in Alzheimer's disease. *Neuroprotection in Alzheimer's Disease*. I. Gozes (Ed.), Elsevier Inc. **2017**, pp. 193-215.
 14. A. Zengin, U. Tamer, T. Caykara. A SERS-based sandwich assay for ultrasensitive and selective detection of Alzheimer's tau protein. *Biomacromolecules*. **2013**, *14*, 3001-3009.
 15. C. Annweiler, B. Brugg, J.-M. Peyrin, R. Bartha, O. Beauchet. Combination of memantine and vitamin D prevents axon degeneration induced by amyloid-beta and glutamate. *Neurobiol. Aging*. **2014**, *35*, 331-335.
 16. D. Kim, S.H. Baik, S. Kang, S.W. Cho, J. Bae, M.-Y. Cha, M.J. Sailor, I. M.-J., K.H. Ahn. Close correlation of monoamine oxidase activity with progress of Alzheimer's disease in mice, observed by in vivo two-photon imaging. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2*, 967-975.
 17. S. Schedin-Weiss, M. Inoue, L. Hromadkova, Y. Teranishi, N.G. Yamamoto, B. Wiehager, N. Bogdanovic, B. Winblad, A. Sandebring-Matton, S. Frykman, L.O. Tjernberg. Monoamine oxidase B is elevated in Alzheimer disease neurons, is associated with γ -secretase and regulates neuronal amyloid β -peptide levels. *Alzheimers Res. Ther.* **2017**, *9*, 57.
 18. P.T. Francis, A.M. Palmer, M. Snape, G.K. Wilcock. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry*. **1999**, *66*, 137-147.
 19. M. Girek, P. Szymański. Tacrine hybrids as multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease: influence of chemical structures on biological activities. *Chem. Pap.* **2019**, *73*, 269-289.
 20. H.J. Koch, G. Uyanik, D. Fischer-Barnicol. Memantine: A therapeutic approach in treating Alzheimer's and vascular dementia. *Curr. Drug. Targets CNS Neurol. Disord.* **2005**, *4*, 499-506.

compuestos que interaccionen con diferentes dianas terapéuticas relacionadas con el Alzheimer.²¹

Por otro lado, en el cáncer existe una situación parecida en cuanto al elevado número de factores que pueden desencadenar el desarrollo de la enfermedad, alguno de los cuales ni siquiera es conocido, siendo además diferentes para cada tipo de cáncer, lo cual complica la situación debido a la gran diversidad de tipos de cánceres existentes. Sin embargo en los diferentes tipos encontramos ciertos factores comunes que podemos abordar para combatirlos, buscándose en todos ellos inhibir el crecimiento celular y producir la apoptosis de las células cancerosas de manera selectiva, así como combatir el estrés oxidativo generado en dicha enfermedad.²²

En la **figura 1** se incluyen diferentes dianas sobre las que pueden actuar los fármacos que buscan combatir el cáncer.²³

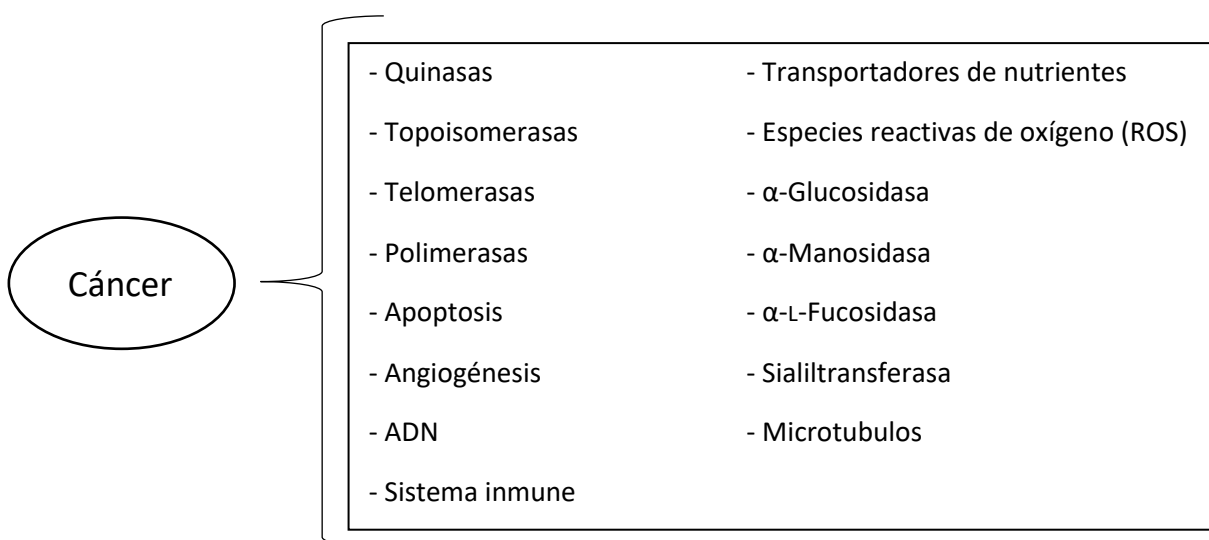


Figura 1. Potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer

Los múltiples factores observados en este tipo de enfermedades hacen por tanto muy complicado su tratamiento, pero precisamente la capacidad de los fármacos

21. D. Volpato, U. Holzgrabe. Designing hybrids targeting the cholinergic system by modulating the muscarinic and nicotinic receptors: a concept to treat Alzheimer's disease. *Molecules*. **2018**, *23*, 3230.

22. A. Sahebkar. Curcumin: a natural multitarget treatment for pancreatic cancer. *Integr. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 333-334.

23. Ó. López, A. Franconetti, J.G. Fernández-Bolanos. Carbohydrates: potencial sweet tools against cancer. *Curr. Med. Chem.* **2018**, doi: 10.2174/0929867325666180719114150.

multidiana de abarcar varios de esos factores simultáneamente los hace prometedores como futuros fármacos para combatir dichas enfermedades multifactoriales.

4. OBJETIVOS

La búsqueda de soluciones más exitosas que las actuales para combatir la enfermedad de Alzheimer y el cáncer mediante la síntesis de nuevos fármacos supone el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral, abordándose la obtención y evaluación de nuevas moléculas con diversos farmacóforos en su estructura, de manera que actúen como fármacos multidiana frente a estas enfermedades.

En este contexto se elaboró el primer capítulo de esta Tesis en el que se planteó la obtención de compuestos derivados de la tacrina, molécula usada durante un tiempo para combatir el Alzheimer en las primeras etapas de la enfermedad. De manera específica, los objetivos en este primer capítulo se pueden describir como:

- Síntesis de nuevas moléculas derivadas de tacrina con fragmentos organocalcógenos en su estructura de tipo tiocianato y disulfuro.
- Síntesis de nuevas moléculas duales de tacrina con derivados de fenoles en las que ambos fragmentos están unidos mediante enlaces de tipo imino y amino de longitud corta, empleándose para su obtención reacciones de formación de iminas y de aminación reductiva entre la tacrina y aldehídos aromáticos con sustituyentes hidroxílicos, metoxilicos y de tipo benciloxi.
- Síntesis de moléculas duales empleando los dos farmacóforos anteriores (tacrina y fragmentos derivados de fenoles), alargando la longitud del espaciador usado, así como variando la naturaleza del mismo.
- Valoración de capacidad inhibitoria de los nuevos compuestos sintetizados frente a las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), relacionadas con la enfermedad de Alzheimer, y estudio de cómo influye la estructura de las diferentes moléculas obtenidas en dicha actividad inhibitoria.
- Evaluación de los compuestos cabezas de serie con respecto a otros factores que también influyen en la aparición y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer o que son relevantes a la hora de tratarla, tales como la inhibición de la deposición de placas β -amiloides en el cerebro, reducción de especies oxidantes, capacidad neuroprotectora, neurotoxicidad y hepatotoxicidad.
- Evaluación de la capacidad antiproliferativa de los derivados calcógenos frente a determinadas líneas celulares tumorales.

Posteriormente, en un segundo capítulo se planteó como objetivo la búsqueda de nuevos derivados sintéticos organocalcógenos para evaluar su capacidad antiproliferativa, basándonos en resultados obtenidos en otros compuestos ya estudiados de azufre y selenio.

De manera más concreta, los objetivos perseguidos en este segundo capítulo pueden describirse como:

- Síntesis de nuevos compuestos organocalcógenos obtenidos a partir de derivados metilados de tirosol e hidroxitorosol de carácter monomérico y dimérico.
- Síntesis de nuevos derivados organocalcógenos de D-biotina con objeto de obtener compuestos con capacidad antiproliferativa selectiva frente a determinadas líneas celulares cancerosas.
- Evaluación de la actividad antiproliferativa de los nuevos compuestos obtenidos frente a diferentes líneas celulares tumorales y comprobación de sus efectos sobre células sanas en aquellos que presentan mayor actividad.

5. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS DERIVADOS ANTIOXIDANTES DE TACRINA

5.1. Introducción y antecedentes

5.1.1. Alzheimer, características y causas

Se entiende por enfermedades crónicas aquellas enfermedades de larga duración y por lo general de progresión lenta. En cuanto al concepto de enfermedades degenerativas se entiende por aquellas enfermedades en las que se producen alteraciones de los tejidos o elementos anatómicos con cambios químicos de las sustancias constituyentes y pérdidas de los caracteres esenciales y funcionales.²⁴

Dentro de este grupo podríamos encuadrar algunas como las enfermedades cardíacas, el cáncer, la diabetes o el Alzheimer.

Cabe añadir también que estas enfermedades son las principales causas de mortalidad en el mundo, siendo responsables del 63% de las muertes. Según la OMS, en 2008, 36 millones de personas murieron de una enfermedad crónica.²⁵

La enfermedad de Alzheimer es el tipo más frecuente de demencia en la actualidad, descubierta y descrita por Alois Alzheimer en el año 1907,²⁶ caracterizada por un fuerte deterioro cognitivo, acompañado de otros síntomas, como son confusión, retraimiento, alucinaciones, e incluso características Parkinsonianas. Según el *World Alzheimer Report 2018*, se estima que unos 50 millones de personas en todo el mundo sufren algún tipo de demencia. Cada año que pasa, es mayor el número de afectados por estas enfermedades, siendo las estimaciones de padecerlas en el futuro cada vez mayores. Mientras que en 2015 se estimaba que para 2050, el número de afectados por estas enfermedades sería de 131.5 millones de personas,²⁷ en el último *World Alzheimer Report (2018)* se elevó la estimación del número de afectados sería de 152 millones de personas en 2050,²⁸ constituyendo un aumento alarmante. Según este informe de 2018 cada 3 segundos una persona en el mundo desarrolla algún tipo de demencia. Cabe

24. Diccionario Médico, Ed. Masson, 4ª edición, 2005.

25. http://www.who.int/topics/chronic_diseases/es/ Última consulta el 11/1/2020.

26. A. Tanovic, V. Alfaro. Glutamate-related excitotoxicity neuroprotection with memantine, an uncompetitive antagonist of NMDA-glutamate receptor, in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Rev. Neurol.* 2006, 42, 607-616.

27. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf> Última consulta el 11/1/2020.

28. <https://www.alz.co.uk/research/worldalzheimerreport2018-spanish.pdf> Última consulta el 11/1/2020.

destacar además que ya es una enfermedad que incluso en países como Gales o Inglaterra se ha convertido en la principal causa de mortalidad. Actualmente sólo existen cuatro fármacos usados frente al Alzheimer: donepezilo, rivastigmina, galantamina y memantina. (Fig. 2).

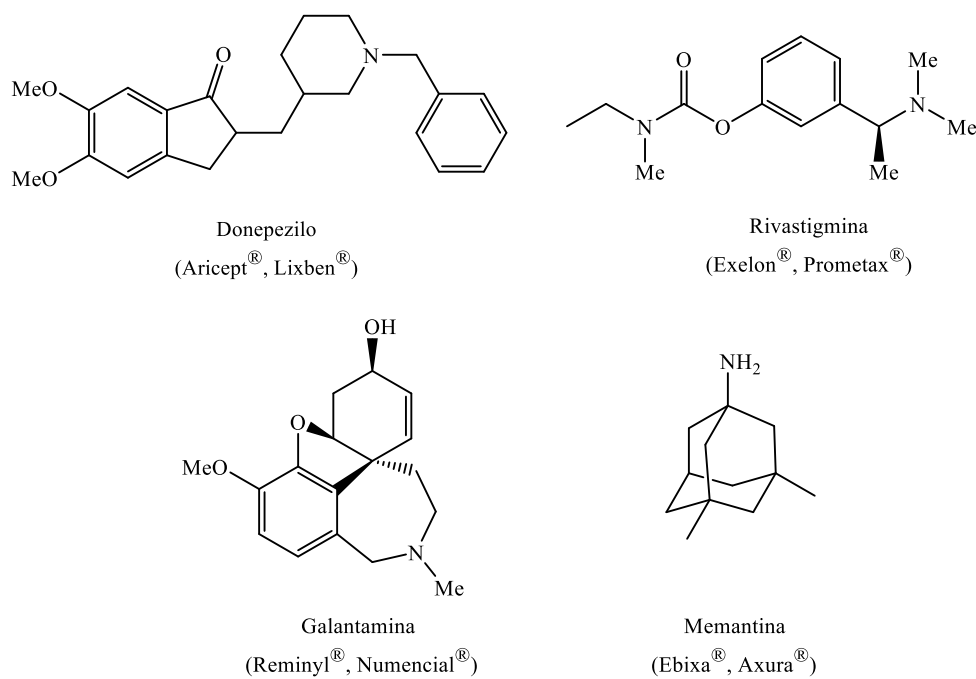


Figura 2. Estructura química de los fármacos donepezilo, galantamina, rivastigmina y memantina.

Los tres primeros, fundamentados en la hipótesis colinérgica, buscan la inhibición de las colinesterasas AChE y BuChE para evitar la reducción de los niveles de acetilcolina en el cerebro.²⁸

La memantina por otro lado se basa en la hipótesis glutamatérgica, según la cual en el Alzheimer se dan niveles de glutamato superiores a los normales que ocasionan por interacción con el receptor glutamatérgico NMDA unos niveles también anormalmente altos de calcio que producen daños neuronales. El bloqueo de estos receptores NMDA para reducir estos niveles de calcio constituye una diana terapéutica para combatir esta enfermedad, siendo este el mecanismo de acción de la memantina.²⁹

29. D. Bowie. Iontropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. **2008**, 7, 129-143.

En los pacientes con Alzheimer son diversos los efectos observados, tales como un daño progresivo en las fibras colinérgicas. Esto produce alteraciones en la actividad de enzimas como la colina acetiltransferasa (ChAT) y la acetilcolinesterasa (AChE),³⁰ así como de la butirilcolinesterasa (BuChE).³¹ La alteración de estas dos enzimas colinesterasas produce un descenso de la concentración del neurotransmisor acetilcolina (**Fig. 3**), molécula que interactúa con los denominados receptores muscarínicos (receptores acoplados a la proteína G) y nicotínico (canales iónicos).²¹ El descenso de dicho neurotransmisor está muy relacionado con la pérdida de funciones cognitivas y muy particularmente de la memoria.



Figura 3. Hidrolisis de acetilcolina catalizada por enzimas colinesterasas.

La hipótesis colinérgica surgida hace varias décadas, constituyó una revolución, pues fue la primera en explicar las posibles causas del Alzheimer y como influía el descenso de la acetilcolina en la pérdida de funciones cognitivas del cerebro (**Fig. 4**).³² Sin embargo esta teoría resultó escasa pues se observó que mantener los niveles de acetilcolina en rangos normales sólo servía para paliar los efectos de la enfermedad al comienzo de la misma, produciéndose aún así la evolución de la enfermedad.

-
30. E. Orta-Salazar, C.A. Cuellar-Lemus, S. Díaz-Cintra, A.I. Feria-Velasco. Cholinergic markers in the cortex and hippocampus of some animal species and their correlation to Alzheimer's disease. *Neurologia*. **2014**, 29, 497-503
31. M.A. Santos, K. Chand, S. Chaves. Recent progress in repositioning Alzheimer's disease drugs based on a multitarget strategy. *Future Med. Chem.* **2016**, 8, 2113-2142
32. H. Hampel, M.-M. Mesulam, A.C. Cuello, M.R. Farlow, E. Giacobini, G.T. Grossberg, A. S. Khachaturian, A. Vergallo, E. Cavedo, P.J. Snyder, Z.S. Khachaturian. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. **2018**, 141, 1917-1933.

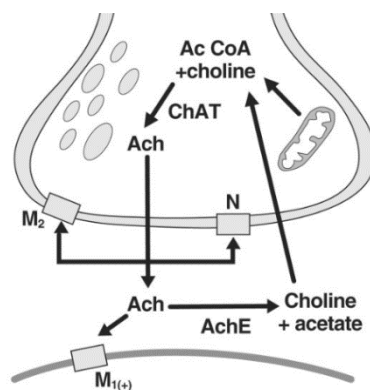


Figura 4. Fisiología de la sinapsis colinérgica.³²

Por otro lado, también se observa el depósito y la acumulación anormal de placas β -amiloides,³³ que son polipéptidos constituidos por unos 40 o 42 aminoácidos originados a partir de la APP (proteína precursora amiloidea). La acumulación del polipéptido de 42 aminoácidos $A\beta$ -42 es la que está asociada a daños neuronales, creyéndose que la β - y γ -secretasa y su regulación son importantes para evitar la deposición de estos polipéptidos en el cerebro.³⁴ Sin embargo, ciertos estudios han observado que la inhibición de estas enzimas conduce a efectos secundarios tóxicos, observados en ensayos clínicos, los cuales se creen que son debidos al hecho de que las secretasas procesan gran multitud de sustratos (la γ -secretasa por ejemplo entorno a 100 sustratos diferentes) además de la APP.¹⁷ Por ello se cree necesario inhibir la formación de placas β -amiloides sin afectar de manera significativa a la actividad de las enzimas secretasas, siendo una posible opción la inhibición de MAOs, ya que ciertos estudios defienden que dichas enzimas están relacionadas con los niveles de placas β -amiloides.¹⁷

33. Z. Wang, Y. Wang, B. Wang, W. Li, L. Huang, X. Li. Design, synthesis, and evaluation of orally available clioquinol-moracin M hybrids as multitarget-directed ligands for cognitive improvement in a rat model of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8616-8637.

34. D. Galimberti, E. Scarpini. New perspectives for the treatment of Alzheimer's disease. *Open Geriatr. Med. J.* **2008**, *1*, 33-42.

Además de estas enzimas, también se cree que la región aniónica periférica de la acetilcolinesterasa tiene un papel relevante en la acumulación de los polipéptidos β -amiloides.^{35,36}

Se han observado también incrementos de los niveles de las enzimas MAOs, mencionadas anteriormente, como otro de los factores determinantes en dicha enfermedad y de manera más concreta con la MAO-B (monoamino oxidasa B) de la que se observan niveles anormalmente elevados en el cerebro y plaquetas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.¹⁷ Dicha enzima produce la desaminación oxidativa generando el aldehído correspondiente, amoníaco y peróxido de hidrogeno (**Figura 5**), encontrándose entre los sustratos de dicha enzima la epinefrina, norepinefrina, dopamina, serotonina y la feniletilamina.³⁷

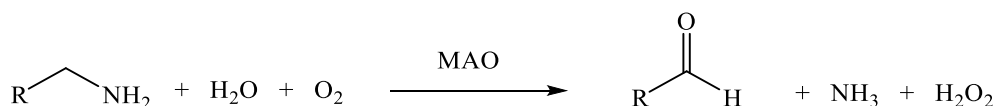


Figura 5. Reacción de desaminación oxidativa de aminas primarias catalizada por MAO

Mientras que en el caso de la inhibición de colinesterasas se ha demostrado su utilidad para el tratamiento del Alzheimer durante el transcurso de la enfermedad, aliviando sus síntomas, la inhibición de la MAO-B ha demostrado carácter preventivo frente a esta enfermedad,³⁸ ya que ha observado en recientes estudios de neuroimagen que el aumento de la expresión de MAO-B en el cerebro de personas con Alzheimer comienza varios años antes del inicio de la enfermedad.¹⁷ Además se ha detectado la

35. N.C. Inestrosa, A. Alvarez, C. A. Pérez, R.D. Moreno, M. Vicente, C. Linker, O.I. Casanueva, C.

Soto, J. Garrido. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral Site of the Enzyme. *Neuron*, **1996**, *16*, 881–891.

36. G.V. Ferrari, M.A. Canales, I. Shin, L.M. Weiner, I. Silman, N.C. Inestrosa. Structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid β -peptide fibril formation. *Biochemistry* **2001**, *40*, 10447-10457.

37. Z. Cai. Monoamine oxidase inhibitors: promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review). *Mol. Med. Rep.* **2014**, *9*, 1533-1541.

38. U. Košak, D. Knez, N. Coquelle, B. Brus, A. Pišlar, F. Nachon, X. Brazzolotto, J. Kos, J.P. Colletie, S. Gobec. *N*-Propargylpiperidines with naphthalene-2-carboxamide or naphthalene-2-sulfonamide moieties: Potential multifunctional anti-Alzheimer's agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 633-645.

existencia de relación entre la proteína MAO-B y la formación placas β -amiloides en el cerebro y ovillos neurofibrilares.^{16,17,37} Con todo ello se han observado mediante la inhibición de MAO-B efectos positivos frente a la enfermedad de Alzheimer.^{39,40}

Otro efecto significativo observado es un apreciable estrés oxidativo,⁴¹ considerado un factor desencadenante, capaz de provocar como se mencionó con anterioridad, la degradación de biomoléculas esenciales y tejidos celulares entre los que se encuentran las neuronas.⁴² Uno de los causantes de la aparición de esas especies oxidativas son los altos niveles observados de MAO-B en este tipo de enfermedad, que en el proceso de desaminación de la dopamina y otros neurotransmisores da lugar a la formación de peróxido de hidrogeno que en presencia de trazas de ciertos metales da lugar a radicales altamente tóxicos.⁴⁰

Además, también se ha observado la desregulación de iones metálicos,⁴¹ produciéndose la acumulación excesiva de ciertos biometales (cobre, cinc y/o hierro) en el cerebro de pacientes con Alzheimer, que según estudios realizados son capaces de inducir agregación de polipéptidos β -amiloides en el cerebro.⁴³

De manera adicional a los factores anteriores, es relevante la hiperfosforilación de las proteínas tau, observándose en pacientes con Alzheimer concentraciones más elevadas

-
39. B. Evranos-Aksoz, G. Ucar, K. Yelekci. Design, Synthesis and hMAO inhibitory screening of novel 2-pyrazoline analogues. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2017**, *20*, 510-521.
40. S. Sturm, A. Forsberg, S. Nave, P. Stenkrona, N. Seneca, A. Varrone, R.A. Comley, P. Fazio, C. Jamois, R. Nakao, Z. Ejduk, N. Al-Tawil, U. Akenine, C. Halldin, N. Andreasen, B. Ricci. Positron emission tomography measurement of brain MAO-B inhibition in patients with Alzheimer's disease and elderly controls after oral administration of sembragiline. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2017**, *44*, 382-391.
41. E. Nepovimova, J. Korabecny, R. Dolezal, K. Babkova, A. Ondrejicek, D. Jun, V. Sepsova, A. Horova, M. Hrabanova, O. Soukup, N. Bukum, P. Jost, L. Muckova, J. Kassa, D. Malinak, M. Andrs, K. Kuca. Tacrine-trolox hybrids: a novel class of centrally active, nonhepatotoxic multi-target-directed ligands exerting anticholinesterase and antioxidant activities with low in vivo toxicity. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8985-9003.
42. P.F. Good, P. Werner, A. Hsu, C. W. Olanow, D.P. Perl. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. **1996** *Am. J. Pathol.* *149*, 21-28.
43. M. A. Greenough, J. Camakaris, A.I. Bush. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **2013**, *62*, 540-555.

de proteínas tau fosforiladas que en pacientes sanos.⁴⁴ Mediante la aglomeración de proteínas tau fosforiladas se produce la formación de ovillos neurofibrilares.¹⁴ Existen evidencias de que los responsables de dicha hiperfosforilación son factores exógenos, habiendo pruebas claras de que el formaldehído presente en el medioambiente,⁴⁵ pueda ser considerado uno de las causas de dicha anomalía.⁴⁶ Además de ello, existen evidencias de que las proteínas tau son responsable mediante interacciones con los receptores muscarínicos de niveles anormales de calcio intracelular que producen muerte neuronal.⁴⁷

La excesiva formación de glutamato en el cerebro es otro factor observado en la enfermedad de Alzheimer. El glutamato actúa como neurotransmisor excitatorio, pero durante la enfermedad de Alzheimer se observa un aumento anormal de sus niveles y alteraciones en los receptores NMDA, produciéndose un aumento del calcio en las neuronas que lleva al deterioro de las mismas,⁴⁸ estando dicho deterioro relacionado con enfermedades neurodegenerativas entre las que se encuentran el Alzheimer.⁴⁹

Por último, otro de los factores observados en la enfermedad de Alzheimer es la neuroinflamación, la cual según diversos estudios, es impulsora de la enfermedad y no una consecuencia de la misma.⁵⁰

En resumen, puede observarse que son múltiples los factores relacionados con la enfermedad de Alzheimer (**Fig. 6**), dotando a la misma de una elevada complejidad.

-
44. I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski, L.I. Binder. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 4913-4917.
45. R. He, J. Lu, J. Miao. Formaldehyde stress. *Sci. China: Life Sci.* **2010**, *53*, 1399-1404.
46. W. Fei, C. Danqi, W. Peipei, C. Klein, J. Chunyuan Jin. Formaldehyde, Epigenetics, and Alzheimer's disease. *Chem. Res. Toxicol.* **2019**, *32*, 820-830.
47. A. Gomez-Ramos, M. Diaz-Hernandez, R. Cuadros, F. Hernandez, J. Avila. Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 4842-4850.
48. W.-Y. Ong, K. Tanaka, G.S. Dawe, L.M. Ittner, A.A. Farooqui. Slow excitotoxicity in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *35*, 643-668.
49. M.O. Chohan, K. Iqbal. From tau to toxicity: Emerging roles of NMDA receptor in Alzheimer's disease. *J Alzheimers. Dis.* **2006**, *10*, 81-87.
- 50 D. Gomez-Nicola, D. Boche. Post-mortem analysis of neuroinflammatory changes in human Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* **2015**, *7*, 1-8.

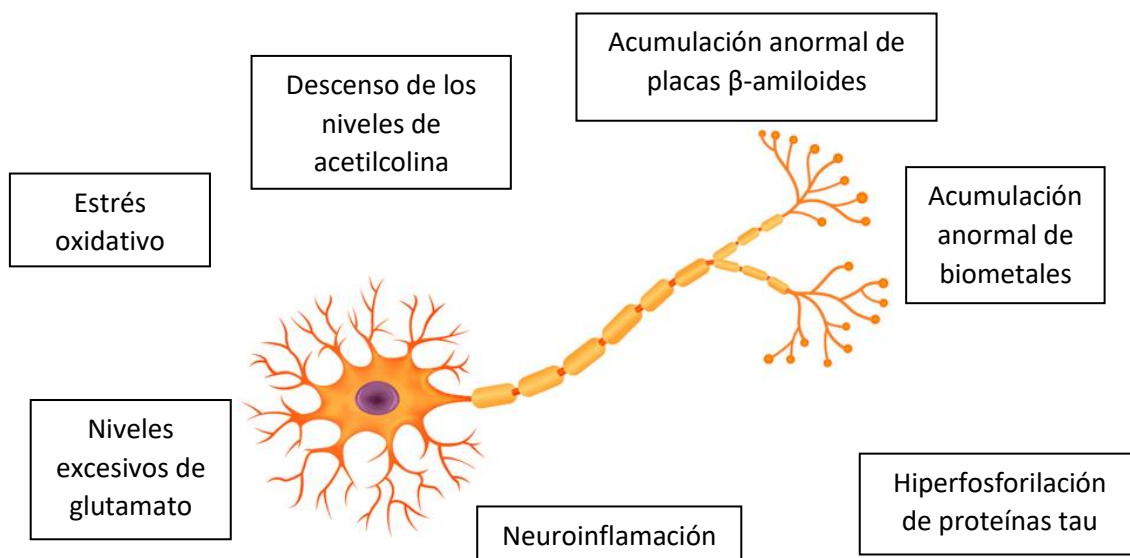


Fig. 6. Resumen de las causas estudiadas de la enfermedad de Alzheimer (imagen adaptada de la página web del NIH).

Es por ello que para combatir dicha enfermedad no podemos solo centrarnos en interactuar contra una única diana terapéutica, sino que debemos abarcar a más de una para su tratamiento. Dicha estrategia es primordial para el desarrollo de nuevos fármacos y es seguida hoy en día por diversidad de investigadores,⁵¹⁻⁵³ siendo muy prometedora para combatir el Alzheimer.

-
51. E. Viayna, R. Sabate, D. Muñoz-Torrero. Dual inhibitors of β -amyloid aggregation and acetylcholinesterase as multi-target anti-Alzheimer drug candidates. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1820-1842.
52. S. Sestito, S. Wang Q. Chen, J. Lu, S. Bertini, C. Pomelli, G. Chiellini, X. He, R. Pi, S. Rapposelli. Multi-targeted ChEI-copper chelating molecules as neuroprotective agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *174*, 216-225.
53. L. Piazzzi, A. Cavalli, F. Colizzi, F. Belluti, M. Bartolini, F. Mancini, M. Recanatini, V. Andrasino, A. Rampa. Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 423-426.

5.1.2. La tacrina y otros inhibidores de colinesterasas para el tratamiento del Alzheimer

Entre las diversas estrategias en la creación de fármacos para combatir el Alzheimer, una de las más efectivas ha sido la búsqueda de compuestos inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). El primero de todos en ser aprobado por la FDA fue la tacrina o 1,2,3,4-tetrahidro-9-acridinamina (Cognex[®]) (**Fig. 7**), en el año 1993. Es un potente inhibidor de la AChE y BuChE, pero sin embargo, su uso como fármaco fue eliminado del mercado poco tiempo después de su aprobación, debido a sus efectos secundarios, entre los que se encuentran náuseas, vómitos, mareos y diarreas. Además de ello, presenta el problema de tener una vida media corta, por lo que debe administrarse varias veces al día, pero sin duda el efecto secundario más problemático del tratamiento de pacientes con este fármaco es la hepatotoxicidad generada por el mismo,⁵⁴ atribuida en algunos estudios al estrés oxidativo que provoca.⁵⁵

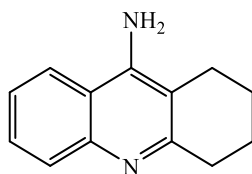


Figura 7. Estructura química de la tacrina

Con posterioridad, otros fármacos fueron aprobados por la FDA, tales como el donepezilo, galantamina y rivastigmina. Sin embargo, estos también presentan ciertos problemas de falta de especificidad, observándose efectos adversos tales como anorexia o insomnio en todos ellos, así como dolores de cabeza, estreñimiento, confusión y mareos en el donepezilo.⁵⁶

54. M. Mehta, A. Adem, M. Sabbagh. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* **2012**, 728983.

55. S.M. Park, S.H. Ki, N.R. Han, I.J. Cho, S.K. Ku, S.C. Kim, R.J. Zhao, Y.W. Kim. Tacrine, an oral acetylcholinesterase inhibitor, induced hepatic oxidative damage, which was blocked by liquiritigenin through GSK3-beta inhibition. *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, 38, 184-192.

56 P.P. Babitha, M.M. Sahila, S. Bandaru, A. Nayariseri, S. Sureshkumar. Molecular docking and pharmacological investigations of rivastigmine-fluoxetine and coumarin-tacrine hybrids against acetyl choline esterase. *Bioinformation.* **2015**, 11, 378-386.

Debido a los problemas presentes en los fármacos anteriormente mencionados, algunos autores han descrito la preparación de derivados de estos compuestos con objeto de mejorar su actividad biológica y reducir sus efectos secundarios.

Debido a la buena capacidad inhibitoria de colinesterasas que presenta la tacrina, múltiples autores han buscado sintetizar híbridos de la misma con un fragmento antioxidante, tales como cisteína,⁴ cumarinas,⁵⁶ trolox,^{41,57} o flavonoides⁵⁸ (**Fig. 8**) con objeto de conservando la actividad inhibitoria de la tacrina, reducir su hepatotoxicidad mediante el uso del fragmento antioxidante que a su vez reduzca el estrés oxidativo producido por la enfermedad.

-
57. S.-S. Xie, J.-S. Lan, X.-B. Wang, N. Jiang, G. Dong, Z.-R. Li, K.D.G. Wang, P.-P. Guo, L.-Y. Kong. Multifunctional tacrine-trolox hybrids for the treatment of Alzheimer's disease with cholinergic, antioxidant, neuroprotective and hepatoprotective properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *93*, 42-50.
58. S.-Y. Li, X.-B. Wang, S.-S. Xie, N. Jiang, K.D.G. Wang, H.-Q. Yao, H.-B. Sun, L.-Y. Kong. Multifunctional tacrine-flavonoid hybrids with cholinergic, β -amyloid-reducing, and metal chelating properties for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 632-646.

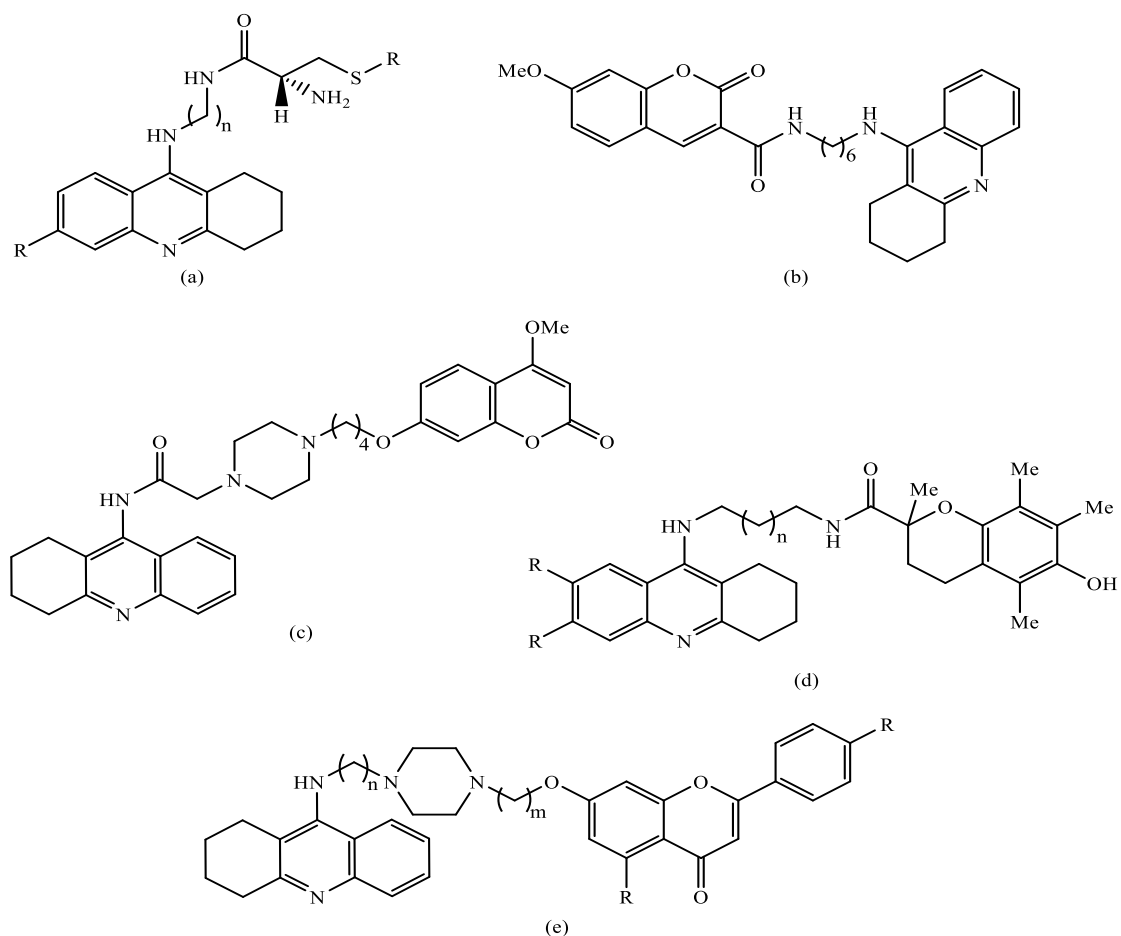


Figura 8. Estructura química de híbridos de tacrina con derivados de cisteína (a), cumarinas (b y c), trolox (d) y flavonoides (e)

Uno de los posibles fragmentos que puede adicionarse a la molécula de tacrina sería un fragmento fenólico. Los polifenoles destacan por lo general por su buena actividad biológica como antioxidantes, agente microbianos⁵⁹ y agentes antiinflamatorios⁶⁰ entre otras propiedades.

59. S.M. Mandal, R.O. Dias, O.L. Franco. Phenolic compounds in antimicrobial therapy. *J. Med. Food.* **2017**, *20*, 1031-1038

60. E.A. Miles, P. Zoubouli, P.C. Calder. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition.* **2005**, *21*, 389-394.

Algunos de los múltiples fenoles y polifenoles bioactivos que podemos encontrar en la naturaleza son el hidroxitirosol, compuesto presente en el aceite de oliva virgen extra,⁶¹ la quercetina⁶² o la punicalagina,⁶³ esta última presente en la granada y que ha demostrado cierta capacidad antitumoral,^{64,65} o algunos isocromanos,⁶⁶ presentes en fuentes de origen vegetal como el aceite de oliva virgen extra (AOVE)⁶⁷, así como en fuentes de origen animal, como la especie de escarabajo *Blaps japonensis*⁶⁶ (**Fig. 9**).

-
61. J.G. Fernández-Bolaños, Ó. López, M.Á. López-García, A. Maset. Biological properties of hydroxytyrosol and its derivatives in Olive oil – Constituents, quality, health properties and bioconversions. Boskou Dimitrios (Ed.), Intech. **2012**, 375-396.
62. A.S. Dias, M. Porawski, M. Alonso, N. Marroni, P.S. Collado, J. González-Gallego. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2299-2304.
63. F. Aqil, R. Munagala, M.V. Vadhanam, H. Kausar, J. Jeyabalan, D.J. Schultz, R.C. Gupta. Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Res. Int.* **2012**, *49*, 345-353.
64. X. Cheng, X. Yao, S. Xu, J. Pan, H. Yu, J. Bao, H. Guan, R. Lu, L. Zhang. Punicalagin induces apoptosis-independent autophagic cell death in human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells. *RSC Advances.* **2016**, *6*, 68485-68493.
65. Y. Li, T. Ye, F. Yang, M. Hu, L. Liang, H. He, Z. Li, A. Zeng, Y. Li, Y. Yao, Y. Xie, Z. An, S. Li. *Punica granatum* (pomegranate) peel extract exerts potent antitumor and anti-metastasis activity in thyroid cancer. *RSC Advances.* **2016**, *6*, 84523-84535.
66. Y.-M. Yang, H.Q. Da, Y. Du, B. Schneider, H. Guo, D.P. Li, L.X. Zhang, H. Fu, X.P. Dong, Y.X. Cheng. Identification of blapsins A and B as potent small-molecule 14-3-3 inhibitors from the insect *Blaps japonensis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4179-4181.
67. A. Bianco, F. Caccioli, M. Guiso, C. Marra. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy isochromans. *Food Chem.* **2001**, *77*, 405-411.

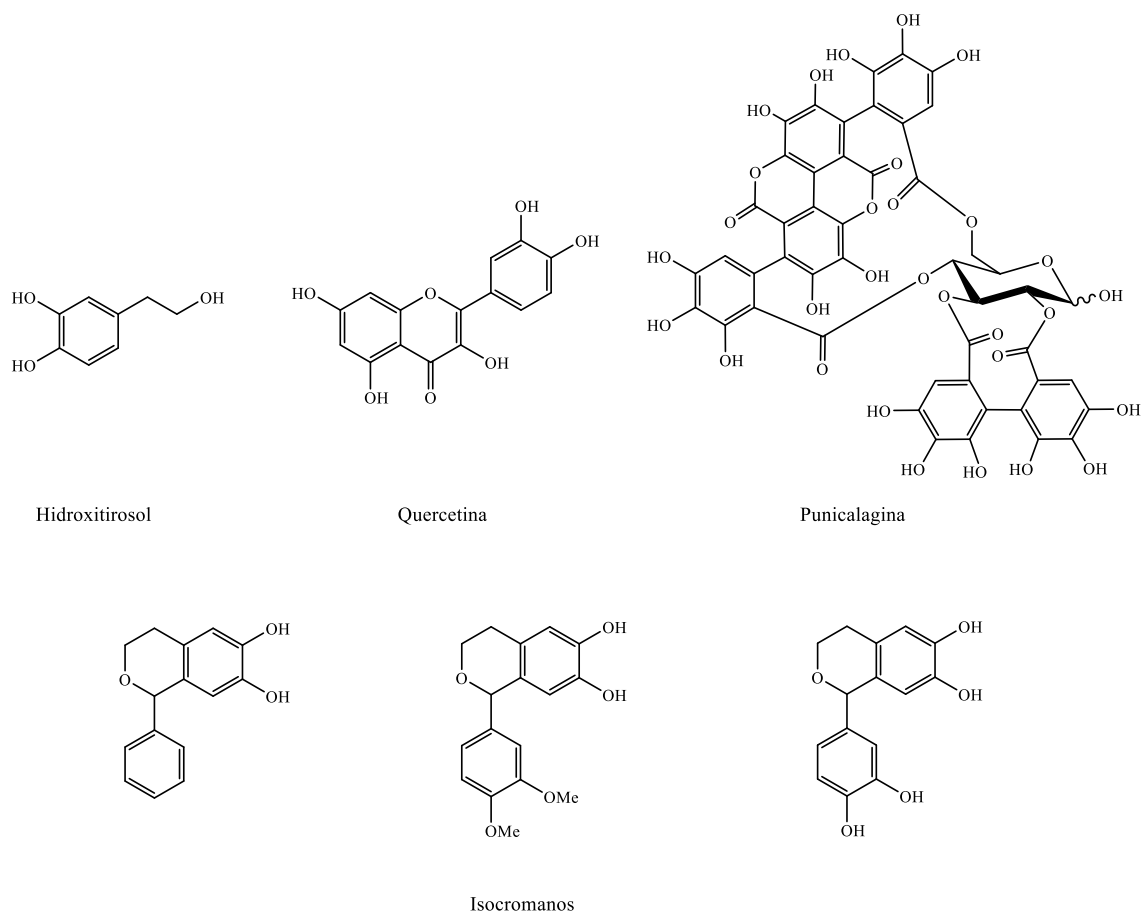


Figura 9. Estructuras de diversos fenoles y polifenoles naturales

Además, estudios recientes han demostrado el interés de algunos polifenoles para el tratamiento del Alzheimer debido a la actividad antioxidante y antiinflamatoria presente en ellos, habiéndose encontrado también en algunos actividad como inhibidores en la formación de placas β -amiloides.^{31,68}

68. C. Angeloni, M. Malaguti, M.C. Barbalace, S. Hrelia. Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2230

5.2. Resultados y discusión

En el presente capítulo de la Tesis Doctoral se ha planteado la preparación de dos nuevas familias de derivados de tacrina como moléculas multidiana frente a la enfermedad de Alzheimer.

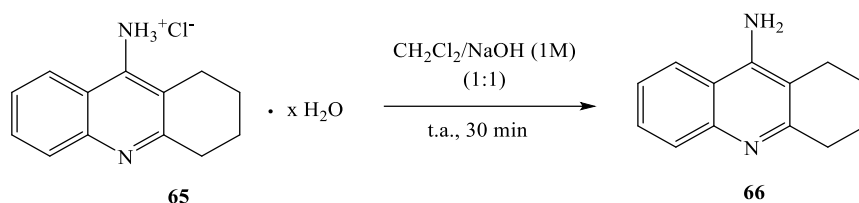
En la primera de estas familias se ha llevado a cabo la preparación de tioderivados de tacrina, y la evaluación de los mismos como agentes anti-Alzheimer. En dichos compuestos, el fragmento con azufre (tiocianato, disulfuro), debido a su carácter antioxidante podría combatir el estrés oxidativo asociado al Alzheimer a la par que reducir el carácter hepatotóxico de la tacrina, consecuencia del carácter pro-oxidante de dicho fármaco. Además se ha evaluado la toxicidad del compuesto cabeza de serie con objeto de comprobar que la misma es inferior a la de su análogo con selenio previamente sintetizado en nuestro grupo de investigación. Simultáneamente se evaluó la actividad antiproliferativa frente a diferentes tipos de cáncer de los nuevos tioderivados obtenidos, debido a que se preveían valores significativamente relevantes.

Por otro lado, también se abordó la preparación de híbridos de tacrina con compuestos derivados de fenoles. En esta familia se ha modificado el tipo y posición de los sustituyentes en el anillo aromático, así como la naturaleza y longitud del espaciador entre los dos farmacóforos, pudiéndose establecer tras realizar diferentes ensayos de actividad anti-Alzheimer una relación estructura-actividad entre las nuevas moléculas obtenidas.

5.2.1. Síntesis y evaluación de nuevos tioderivados de tacrina

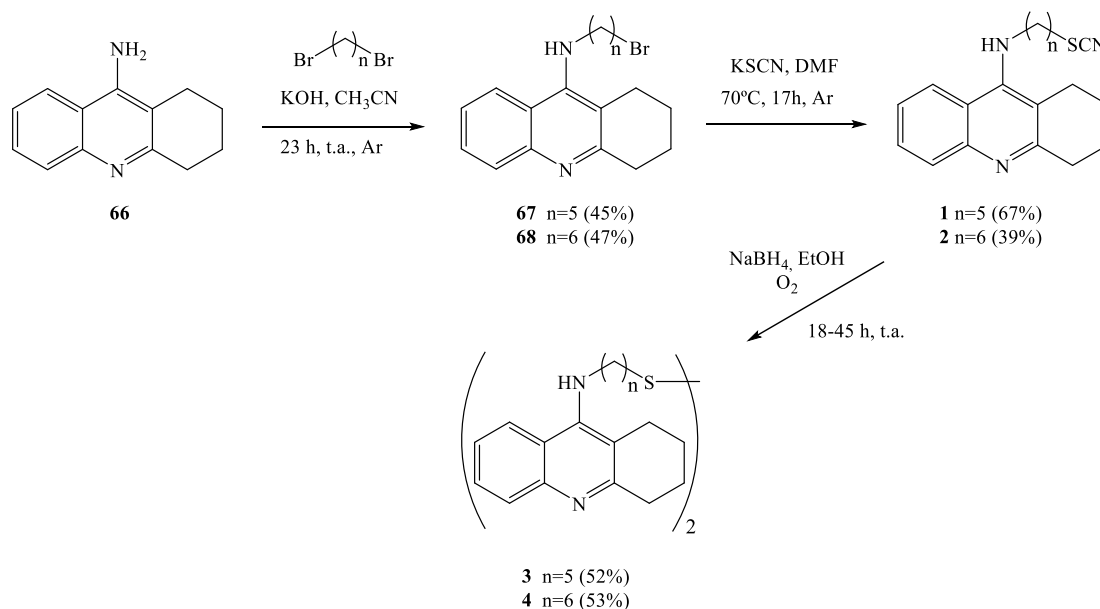
5.2.1.1. Síntesis de nuevos tioderivados de tacrina

En este apartado se llevó a cabo la síntesis de dos tipos de tioderivados de tacrina (tiocianatos y disulfuros), utilizando espaciadores de diferente longitud entre la tacrina y el fragmento calcógeno. En este capítulo dedicado a fármacos anti-Alzheimer derivados de tacrina, se empleó la misma en su forma de amina neutra en las reacciones realizadas, obtenida por desprotonación del hidrocloreto de tacrina polihidratado comercial (**65**) (**Esq. 1**).



Esquema 1. Desprotonación de hidrocloruro de tacrina polihidratado

La síntesis de los nuevos tioderivados de tacrina se llevo a cabo mediante una reacción de tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ entre el grupo amino de la tacrina y el α,ω -dibromoalcano correspondiente, utilizando el procedimiento descrito por Y. Suna *et al.*⁶⁹ Se empleó un exceso de dibromoalcano con objeto de favorecer la monosustitución. Tras dicha reacción y obtenidos **67** y **68**, se substituyó el bromo restante en ambas moléculas por la función tiocianato (compuestos **1** y **2**), y mediante el posterior tratamiento con NaBH_4 , que permitió la reducción del grupo tiocianato a un tiolato intermedio, y posterior oxidación espontánea en presencia de oxígeno atmosférico, se originaron los correspondientes disulfuros **3** y **4** (Esq. 2).



Esquema 2. Síntesis de tiocianatos y disulfuros derivados de tacrina

69. Y. Suna, J. Chena, X. Chenb, L. Huang, X. Lia. Inhibition of cholinesterase and monoamine oxidase-B activity by tacrine-homoisoflavonoid hybrids. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7406-7417.

La síntesis de los nuevos tioderivados de tacrina preparados en el presente capítulo se realizó en base a una serie de estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación de obtención de selenoderivados de tacrina (**Fig. 10**),⁷⁰ en alguno de los cuales se obtuvo una muy buena actividad como inhibidores de acetilcolinesterasa, superándose en algunos casos los valores de inhibición obtenidos para la tacrina usada de referencia.

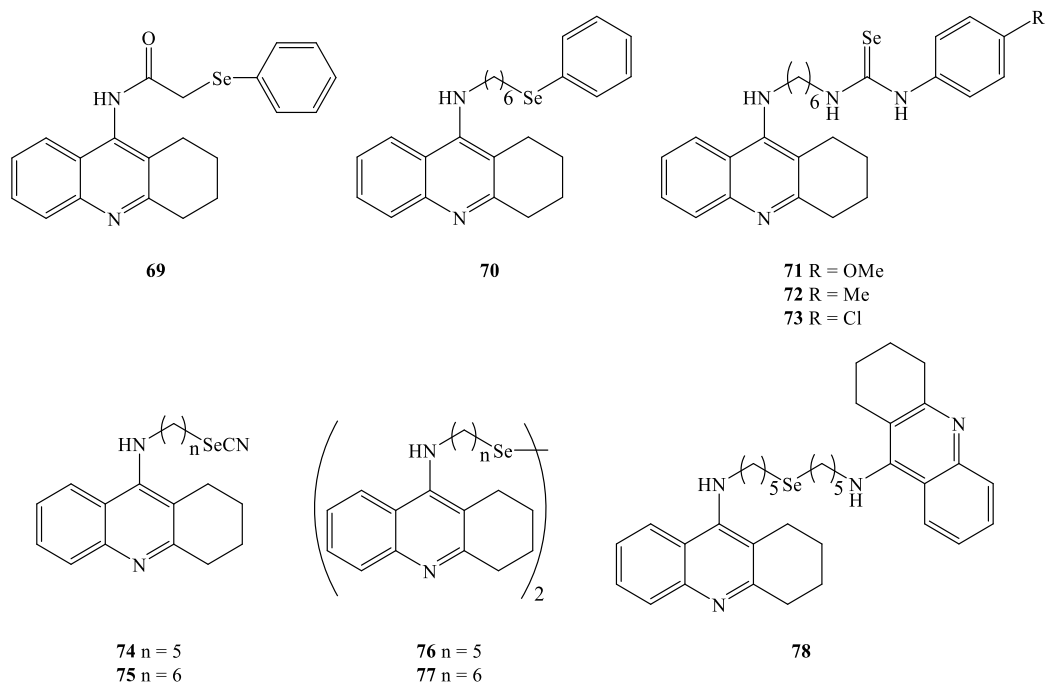


Figura 10. Estructura de selenoderivados de tacrina

Se observaron valores muy buenos para los diselenuros y selenocianatos, pero sin embargo, conocida la toxicidad presente en compuestos de selenio y con objeto de analizar la influencia de un cambio en el calcógeno usado, se planteó y realizó la síntesis de los derivados con azufre descritos con anterioridad.

70. J.M. Roldán-Peña, D. Alejandro-Ramos, Ó. López, I. Maya, I. Lagunes, J. M. Padrón, L.E. Peña-Altamira, M. Bartolini, Barbara Monti, M.L. Bolognesi, J.G. Fernández-Bolaños. New tacrine dimers with antioxidant linkers as dual drugs: anti-Alzheimer's and antiproliferative agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 138, 761-773.

Obtenidos los compuestos **1-4** de manera exitosa, se realizaron con los mismos diferentes ensayos de actividad biológica en relación a la enfermedad de Alzheimer, resultando de elevado interés los compuestos diméricos puesto que en estudios previos se han descrito dímeros de tacrina que interactúan simultáneamente con el sitio activo de la enzima AChE, así como con su región aniónica periférica,⁷¹ relacionada con la acumulación de placas β -amiloides.^{35,36} Para interactuar con dicha región periférica, se ha observado la importancia de compuestos con fragmentos aromáticos que interactúen con la misma, inhibiendo su capacidad para inducir la agregación de péptidos β -amiloides.⁷²

5.2.1.2. Evaluación *in vitro* de nuevos tioderivados de tacrina

Se llevó a cabo un amplio estudio de las propiedades biológicas que los derivados **1-4** exhiben en relación con el Alzheimer: capacidad inhibitoria de colinesterasas (acetil y butirilcolinesterasa), tanto en enzimas modelo (anguila eléctrica y suero equino, respectivamente) como en enzimas humanas, capacidad de inhibición de la autoagregación de placas amiloides, neurotoxicidad y actividad antioxidante.

A) Ensayo de inhibición de colinesterasas (AChE y BuChE)

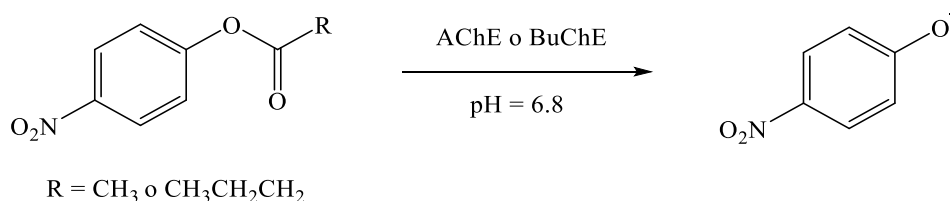
Como se mencionó con anterioridad, la enfermedad del Alzheimer está relacionada con una alteración de la actividad de las enzimas colinesterasas encargada de desacetilar el neurotransmisor acetilcolina para formar colina, produciéndose un descenso anormal de la concentración de dicho neurotransmisor implicado en procesos cognitivos. Es por ello que una de las estrategias en la búsqueda de un tratamiento para la enfermedad de Alzheimer sea el uso de compuestos capaces de inhibir estas enzimas con objeto de incrementar los niveles de acetilcolina en el cerebro. No en vano, tres de los cuatro fármacos aprobados en la actualidad contra el Alzheimer son inhibidores de dichas enzimas.

71. D. Muñoz-Torrero, P. Camps. Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 399-422.

72. N. Khunnawutmanotham, N. Chimnoi, P. Saparpakorn, S. Techasakul. Synthesis and anti-acetylcholinesterase activity of scopoletin derivatives. *Bioorg. Chem.* **2016**, *65*, 137-145.

Para la evaluación como inhibidores de dichas enzimas de los compuestos sintetizados en esta Tesis Doctoral, empleándose en primer lugar las enzimas de modelos animales, se utilizó el ensayo de Ellman⁷³ con algunas modificaciones para su uso con compuestos con azufre y selenio.⁷⁴

En el ensayo de Ellman tradicional, la cinética enzimática es seguida de manera indirecta usándose yoduro de acetiltiocolina o de butiriltiocolina que al hidrolizarse forma un tiolato que ataca al reactivo DTNB (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)), obteniéndose la especie química que es medida por espectrofotometría. Sin embargo al usar como inhibidor un compuesto con azufre o selenio, este puede actuar como nucleófilo sobre el reactivo DTNB, dando lugar a la degradación del mismo antes incluso de añadir la enzima a la mezcla usada en el ensayo. Es por ello que el método de Ellman es modificado, usándose para compuestos con azufre o selenio una medida espectrofotométrica directa, usándose acetato de *p*-nitrofenilo y butirato de *p*-nitrofenilo, trabajándose con un buffer de pH 6.8, a 25 °C y usando AChE procedente de *Electrophorus electricus* como modelo por su similitud con esta enzima en mamíferos⁷⁵ y BuChE procedente de suero equino. La inhibición es evaluada mediante la medida de la formación de *p*-nitrofenolato, midiéndose la absorbancia a 400 nm del anión formado (Esq. 3).



Esquema 3. Hidrolisis enzimática de ésteres de *p*-nitrofenilo

73. G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres jr., R.M. Featherstone. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88-95.

74. A. Forsberg, G. Puu. Kinetics for the inhibition of acetylcholinesterase from the electric eel by some organophosphates and carbamates. *Eur. J. Biochem.* **1984**, 140, 153-156.

75. S. Bon, M. Vigny, J. Massoulié. Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, 76, 2546-2550.

Para dicho ensayo se trabajó con entre 4 y 5 concentraciones diferentes de acetato de *p*-nitrofenilo (35-560 μM) y butirato de *p*-nitrofenilo (70-560 μM), analizándose la cinética enzimática mediante representaciones de Lineweaver-Burk o de dobles inversos ($1/v$ vs. $1/[S]$). A modo de ejemplo, en la **figura 11** se muestra la representación de Lineweaver-Burk para la inhibición de AChE por parte del compuesto **3**.

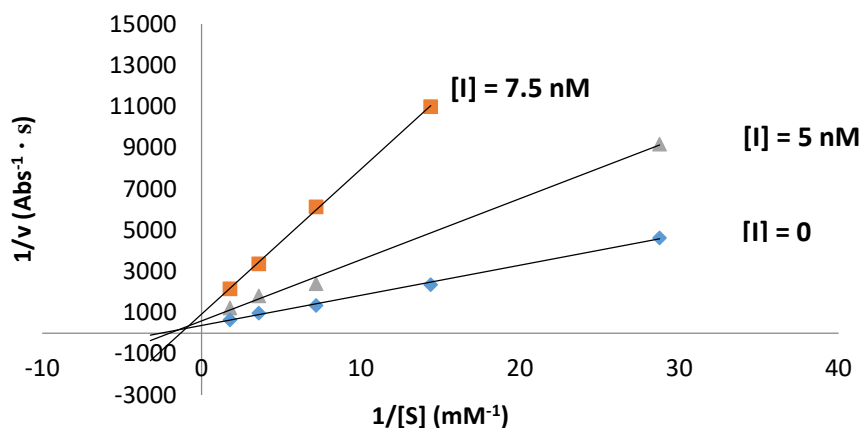


Figura 11. Representación de Lineweaver-Burk para la inhibición de AChE producida por el compuesto 3

La representación de Lineweaver-Burk, realizada para varias concentraciones del inhibidor, permite determinar el tipo de inhibición, así como la constante de Michaelis-Menten (K_M) y V_{max} , que a su vez se emplean para el cálculo de las constantes de inhibición. Una descripción más detallada de esta representación, así como de las ecuaciones empleadas para el cálculo de las constantes de inhibición puede encontrarse en la sección de Métodos Generales (capítulo 8.1.).

Así pues, a modo de ejemplo, a partir de la representación mostrada en la **figura 11** se puede observar que las líneas correspondientes a las distintas concentraciones de inhibidor se intersectan en el segundo cuadrante. Esto es indicativo de una inhibición de tipo mixto por parte del compuesto **3**, lo cual significa que este interacciona tanto con la enzima libre como con el complejo enzima-sustrato, haciéndolo en este último caso a través de una región distinta a la región del sitio catalítico de la enzima.

Tras analizar la capacidad inhibitoria de los tioderivados **1-4**, así como de los compuestos de selenio **74-77**, se obtuvieron los siguientes resultados de inhibición frente a AChE y BuChE (**Tabla 1**):

Tabla 1. Constantes de inhibición para AChE y BuChE e índices de selectividad para tio- y selenoderivados de tacrina

| Compuesto | Espaciador | Grupo funcional | AChE (<i>electrophorus electricus</i>) | | BuChE (suero equino) | | IS (BuChE)/(AChE) |
|----------------|------------|-----------------|--|------------------|----------------------|---------------|-------------------------|
| | | | K_{ia} (nM) | K_{ib} (nM) | K_{ia} (nM) | K_{ib} (nM) | |
| 1 | n = 5 | SCN | 50 ± 12 | 50 ± 12 | 228 ± 57 | - | 4.6 |
| 2 | n = 6 | SCN | 19 ± 7 | - | 252 ± 64 | 673 ± 249 | 13 |
| 3 | n = 5 | -S-S- | 3.1 ± 1.4 | 5.7 ± 1.5 | 166 ± 22 | 422 ± 104 | 54 74 |
| 4 | n = 6 | -S-S- | 15 ± 4 | 15 ± 4 | 243 ± 45 | 70 ± 16 | 16 4.7 |
| 74 | n = 5 | SeCN | 35 ± 8 | - | 206 ± 42 | - | 6.0 |
| 75 | n = 6 | SeCN | 6.5 ± 3.7 | - | 336 ± 131 | 672 ± 218 | 52 |
| 76 | n = 5 | -Se-Se- | 1.2 ± 0.3 | 1.2 ± 0.3 | 350 ± 72 | 92 ± 42 | 292 77 |
| 77 | n = 6 | -Se-Se- | 26 ± 10 | 26 ± 10 | 43 ± 9 | 73 ± 9 | 1.6 2.8 |
| Tacrina | - | - | 23 ± 10 | - | 17 ± 3 | - | 0.7 |

Como puede observarse en la tabla anterior, destacan los valores obtenidos para el disulfuro **3** y el diselenuro **76** que se comportan como potentes inhibidores de la acetilcolinesterasa, obteniéndose constantes de inhibición entorno al rango nanomolar bajo, siendo el valor obtenido para el compuesto **3** hasta 7 veces mejor al valor obtenido para la tacrina empleada como referencia. Se obtuvo además un alto índice de selectividad de AChE frente a BuChE.

Es por ello que se midió la inhibición de acetilcolinesterasa humana, en colaboración con la profesora M. Bartolini de la Universidad de Bolonia, de estos dos compuestos, comparándose los valores obtenidos con los de la tacrina de referencia, así como con el dímero cistamina-tacrina (**Fig. 12**).

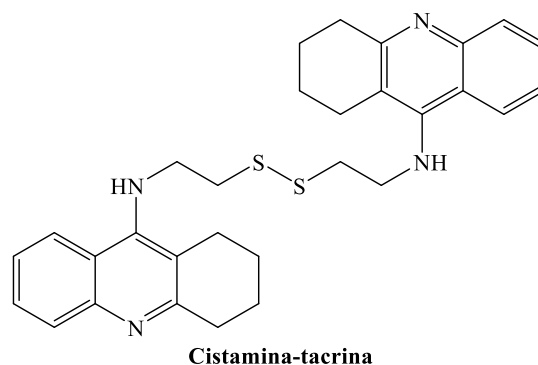


Figura 12. Estructura de cistamina-tacrina

Se obtuvo en el ensayo realizado los siguientes valores (**Tabla 2**):

Tabla 2. CI_{50} para tioderivados de tacrina usando AChE humana

| | AChE humana |
|--------------------------|-----------------------------------|
| Compuesto | CI_{50} (nM) |
| 3 | 1.62 ± 0.10 |
| 76 | 2.64 ± 0.15 |
| Tacrina | 412 ± 15 |
| Galantamina | 2010 ± 150^{76} |
| Cistamina-tacrina | 5.04 ± 0.48^{71} |

Se observa con los resultados obtenidos en esta última tabla que el compuesto **3** destaca sobre el resto también al medir su capacidad como inhibidor en este caso frente a AChE humana, obteniéndose un valor de CI_{50} de 1.6 nM, siendo 257 veces más potente que la tacrina, 1256 veces más que la galantamina y 3 veces más que el híbrido cistamina-tacrina.

76. M.L. Bolognesi, R. Banzi, M. Bartolini, A. Cavalli, A. Tarozzi, V. Andrisano, A. Minarini, M. Rosini, V. Tumiatti, C. Bergamini, R. Fato, G. Lenaz, P. Hrelia, A. Cattaneo, M. Recanatini, C. Melchiorre, Novel class of quinone-bearing polyamines as multi-target-directed ligands to combat Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4882-4897.

Ciertos investigadores defienden que es clave en el Alzheimer inhibir la AChE,⁷⁷ mientras que otros defienden la importancia de inhibir la BuChE en estados más avanzados de la enfermedad.⁷⁸ Es por ello que este dímero de azufre resulta de gran interés como posible fármaco para el Alzheimer en las primeras etapas de la enfermedad.

B) Ensayo de inhibición de autoagregación de polipéptidos β -amiloides

Puesto que la formación de placas β -amiloides en el cerebro es otra de las que se consideran causas del Alzheimer,³⁴ resulta de interés que los compuestos sintetizados tengan la capacidad de inhibir la deposición de las mismas en el cerebro. Es importante tener en cuenta que el daño producido por las placas β -amiloides en el cerebro es irreversible, por lo que se hace muy necesario evitar la formación de las mismas. En colaboración con la profesora M. Bartolini de la Universidad de Bolonia, se midió la capacidad de los nuevos compuestos sintetizados como inhibidores de la formación de placas β -amiloides mediante el ensayo de tioflavina T descrito por Naiki *et al.*⁷⁹ obteniéndose los porcentajes de inhibición autoagregación de polipéptidos β -amiloides $A\beta_{42}$, representados a continuación para concentraciones 50 μ M de cada compuesto (**Tabla 3**):

77. F.M. Abdel Bar, D.M. Elimam, A.S. Mira, F.F. El-Senduny F. A. Badria. Derivatization, molecular docking and in vitro acetylcholinesterase inhibitory activity of glycyrrhizin as a selective anti-Alzheimer agent. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *16*, 1-9.

78. Y. Tu, C. Wu, Y. Kang, Q. Li, C. Zhu, Y. Li. Bioactivity-guided identification of flavonoids with cholinesterase and β -amyloid peptide aggregation inhibitory effects from the seeds of *Millettia pachycarpa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 1194-1198.

79. H. Naiki, K. Higuchi, K. Nakakuki, T. Takeda, Kinetic analysis of amyloid fibril polymerization in vitro. *Lab. Invest.* **1991**, *65*, 104-110.

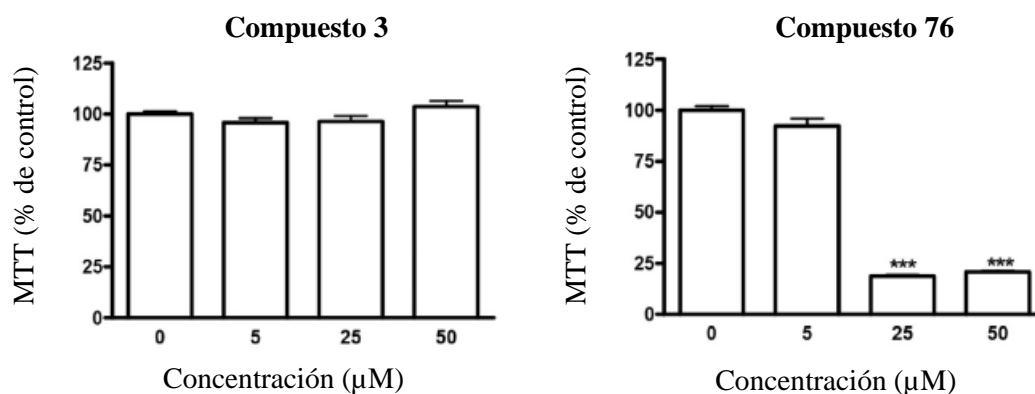
Tabla 3. Porcentaje de Inhibición de autoagregación del polipéptido A β ₄₂

| Compuesto | % de inhibición de autoagregación de A β ₄₂ |
|-------------------|--|
| 3 | 61.8 \pm 3.4 |
| 76 | 65.8 \pm 3.4 |
| Tacrina | <5 |
| Galantamina | <5 ⁷⁶ |
| Cistamina-tacrina | 66.3 \pm 0.3⁷¹ |

Como puede observarse, el valor obtenido para el disulfuro **3** es muy superior al del fármaco galantamina o al de la tacrina usados como referencia y muy similar al del derivado diselenuro **76** y a la cistamina-tacrina. Esto unido a su capacidad como inhibidor de colinesterasas convierte al disulfuro **3** en un compuesto prometedor como fármaco anti-Alzheimer.

C) Ensayo de neurotoxicidad

Además de los ensayos anteriores, se realizó la medida también de la neurotoxicidad del compuesto **3**, comparándose con la presente en su análogo de selenio (**77**), puesto que lo buscado al sustituir el selenio por azufre era la disminución de la toxicidad del posible fármaco. Para ello se utilizó el ensayo de viabilidad celular utilizando MTT. Los ensayos se realizaron en colaboración con la profesora B. Monti de la Universidad de Bolonia. Los resultados obtenidos se representan en los siguientes gráficos (**Fig. 13**):

**Figura 13. Resultados ensayo de viabilidad celular con MTT en compuestos 3 y 76**

Los resultados muestran claramente que la neurotoxicidad del compuesto de azufre (**3**) es significativamente menor a la de su seleno-isómero, ya que hasta una concentración de 50 μM no se observa muerte celular en el caso del compuesto **3**, mientras que para el derivado **76**, la viabilidad celular se encuentra por debajo del 25% para la misma concentración. Además, al comparar estos valores con los obtenidos para los dímeros cistamina-tacrina y bis(7)tacrina⁸⁰, observamos que el disulfuro **3** presenta también una menor toxicidad que estos compuestos (**Fig. 14**).

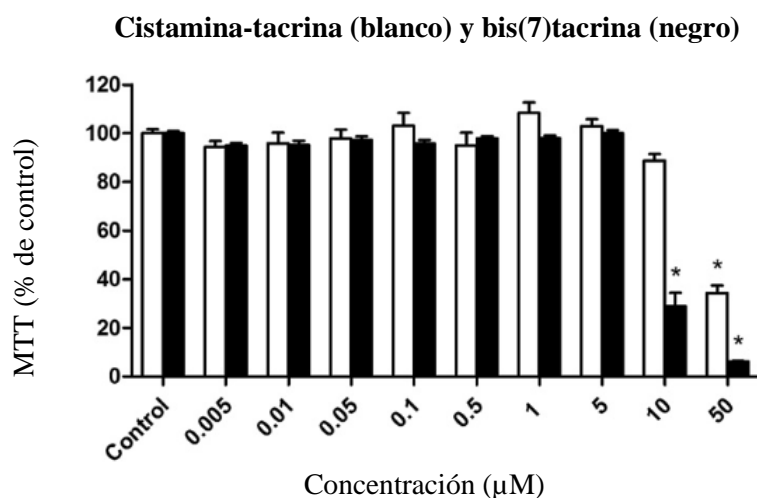


Figura 14. Resultados ensayo de viabilidad celular con MTT en cistamina-tacrina (blanco) y bis(7)tacrina⁸⁰

D) Ensayo como miméticos de glutatión peroxidasa

Ciertos compuestos organocalcógenos poseen la capacidad de actuar en el organismo mimetizando la enzima glutatión peroxidasa (GPx), la cual actúa como sistema de defensa antioxidante en el organismo, produciendo la reducción de las especies oxidantes hidroperóxidos y peroxinitritos.⁸¹

80. A. Minarini, A. Milelli, V. Tumiatti, M. Rosini, E. Simoni, M.L. Bolognesi, V. Andrisano, M. Bartolini, E. Motori, C. Angeloni, S. Hrelia. Cystamine-tacrine dimer: a new multi-target-directed ligand as potential therapeutic agent for Alzheimer's disease treatment. *Neuropharmacology*, **2012**, 62, 997-1003

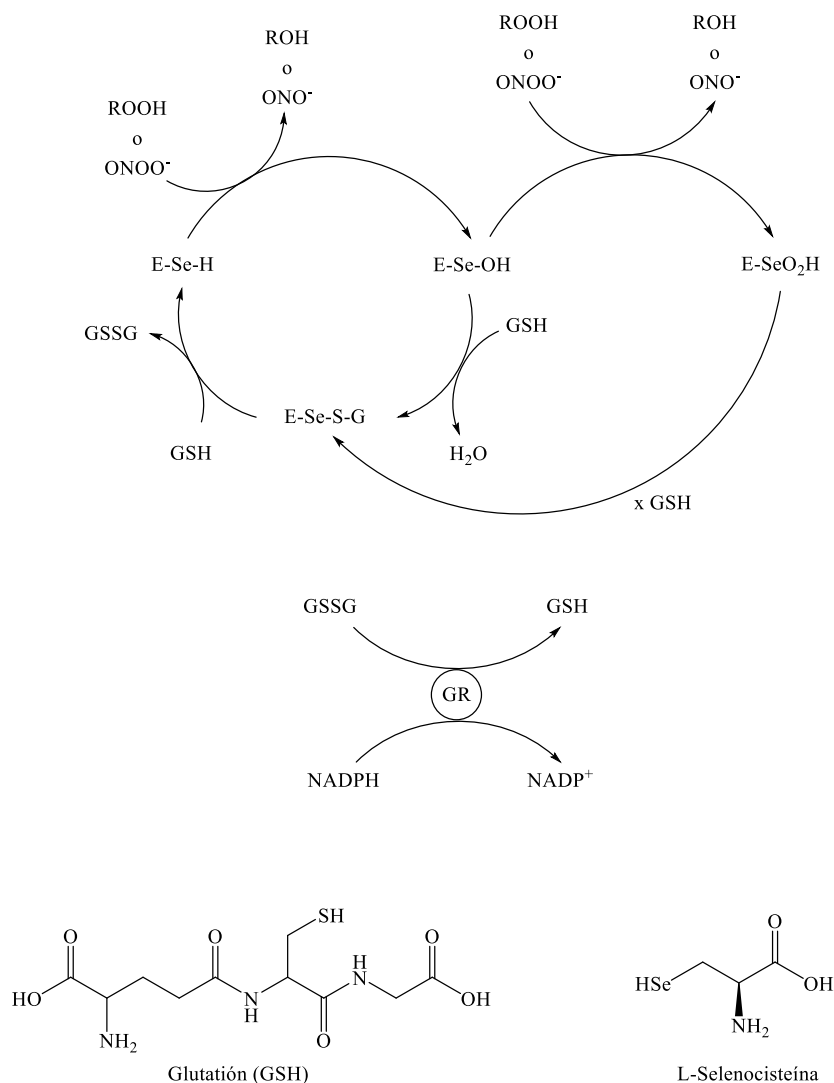
81. L.-O. Klotz, K.-D. Kröncke, D.P. Buchczyk, H. Sies. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Nutr.* **2003**, 133, 1448-1451.

Si bien es cierto que no se conoce del todo el mecanismo de acción de dicha enzima, un ciclo catalítico comúnmente aceptado es uno en el que la enzima glutatión peroxidasa (GPx) reduce a ciertas especies oxidantes a través del grupo selenol de la selenocisteína presente en su sitio activo. El selenolato reduciría la especie oxidante, oxidándose él mismo a ácido selenenico (E-SeOH), el cual al reaccionar con dos moléculas de glutatión (GSH) que actúa como cofactor, se transformaría de nuevo en grupo selenol, formándose glutatión oxidado (GSSG). Algunos autores además añaden que cuando se dan concentraciones elevadas de especies oxidantes, puede ocurrir la oxidación del ácido selenenico a ácido selenonico (E-SeO₂H), que posteriormente al reaccionar con glutatión vuelve a convertirse en un grupo selenol.⁸¹⁻⁸³ Esta última etapa sin embargo se cree que puede reducir la actividad catalítica de la GPx.⁸³ En cuanto al glutatión, vuelve a su forma reducida por reacción con NADPH y la enzima glutatión reductasa (GR)⁸⁴ (**Esq. 4**).

82. G. Mugesh, H.B. Singh. Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: glutathione peroxidase activity. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 347-357.

83. D. Bhowmick, G. Mugesh. Insights into the catalytic mechanism of synthetic glutathione peroxidase mimetics. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 10262-10272.

84. C. Santi, C. Tidei, C. Scalera, M. Piroddi, F. Galli. Selenium containing compounds from poison to drug candidates: a review on the GPx-like activity. *Curr. Chem. Biol.* **2013**, 7, 25-36.



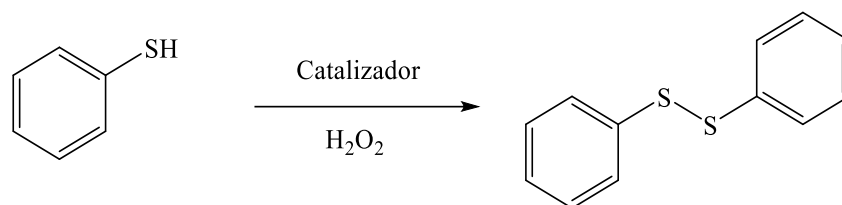
Esquema 4. Ciclo catalítico propuesto de la GPx de reducción de especies oxidantes

Es de interés evaluar la capacidad como miméticos de la GPx de los nuevos compuestos de azufre sintetizados, puesto que la reducción de los niveles de ROS puede permitir, por un lado, combatir el estrés oxidativo intrínseco en el Alzheimer, así como reducir la hepatotoxicidad causada por la tacrina y atribuida a que esta genera estrés oxidativo en el hígado como se dijo con anterioridad.

El método utilizado para realizar la medida de la capacidad de los nuevos compuestos como miméticos de GPx es el método descrito por Iwaoka y Tomoda⁸⁵, en el cual se emplea H₂O₂ como modelo de ROS, el compuesto calcógeno en cantidades

85. M. Iwaoka, S. Tomoda. A model study on the effect of an amino group on the antioxidant activity of glutathione peroxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2557-2561.

subestequiométricas a modo de mimético de la GPx y PhSH. En este ensayo se monitoriza la oxidación de PhSH hasta disulfuro de difenilo (**Esq. 5**).



Esquema 5. Reacción estudiada en el ensayo de mimético de GPx usando bencenotiol

Se obtuvieron mediante la representación de la variación de la concentración de PhSH (mM) (eje de ordenadas) en función del tiempo (s) (eje de abscisas) diferentes rectas cuyas pendientes representan la velocidad de reacción. Una mayor pendiente implica una mejor capacidad del compuesto organocalcógeno de actuar como mimético de GPx. Como ejemplo se muestra a continuación la gráfica obtenida para el compuesto **3** (**Fig. 15**):

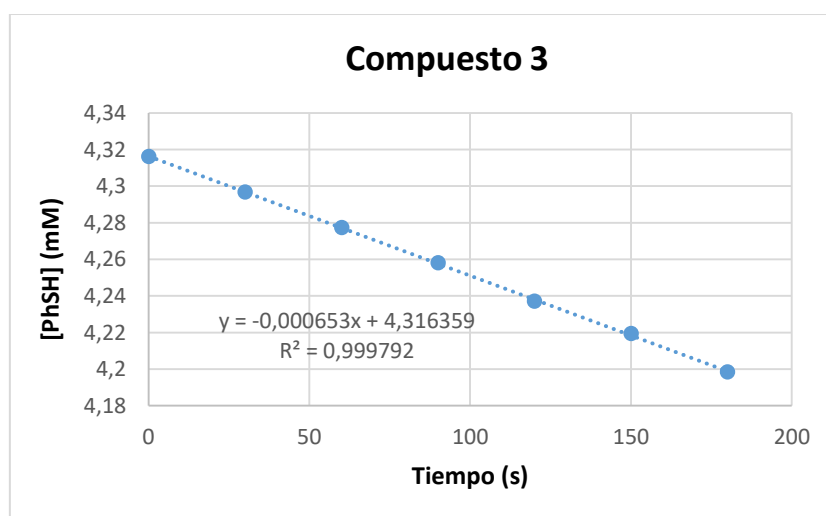


Figura 15. Variación de [PhSH] con respecto al tiempo. Evaluación del compuesto 3 como mimético de GPx

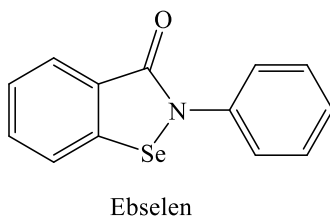
Tras realizar esto, se obtuvieron los valores para nuestros compuestos de azufre mostrados a continuación (**Tabla 4**):

Tabla 4. Actividad de tioderivados de tacrina como miméticos de GPx

| Compuesto | v ($\mu\text{M}/\text{min}$)* | t _{1/2} (min) |
|---------------------|----------------------------------|------------------------|
| 1 | 23.1 \pm 1.6 | 108.2 |
| 2 | 21.6 \pm 1.0 | 115.7 |
| 3 | 35.5 \pm 2.2 | 70.4 |
| 4 | 32.8 \pm 0.9 | 76.2 |
| (PhSe) ₂ | 14.8 \pm 0.3 | 168.9 |
| Ebselen | 2.0 \pm 0.7 | 1250 |

*La velocidad está corregida con respecto al valor de velocidad observado en el control

Como puede observarse en la tabla realizada a partir de dicho ensayo, destacan los dímeros **3** y **4**, obteniéndose en ellos valores sensiblemente mejores a los obtenidos para el (PhSe)₂ y ebselen (**Fig. 16**), dos potentes agentes antioxidante usados como compuestos de referencia.

**Figura 16. Estructura del ebselen**

E) Ensayo de capacidad antiproliferativa

Puesto que existen multitud de compuestos de azufre con capacidad anticancerígena, se evaluó en colaboración con el profesor J.M. Padrón de la Universidad de la Laguna (Tenerife), la capacidad antiproliferativa de los nuevos compuestos frente a 6 líneas celulares de diferentes tipos de cáncer, estudiándose si existía selectividad frente a células tumorales en lugar de hacia células sanas. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 5**. En dicha tabla se han representado los valores del GI₅₀, que es la concentración necesaria en el ensayo utilizado para inhibir el crecimiento celular en un 50%, en unidades de concentración μM .

Tabla 5. Ensayos antiproliferativos en tioderivados de tacrina

| Compuesto | A549 | HBL-100 | HeLa | SW1573 | T-47D | WiDr | BJ-hTert |
|-------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| 1 | 14 ± 2 | 15 ± 2 | 11 ± 1 | 15 ± 4 | 8.3 ± 1.7 | 4.1 ± 2.4 | NT* |
| 2 | 8.3 ± 3.3 | 11 ± 2 | 8.1 ± 2.9 | 5.1 ± 0.9 | 5.5 ± 2.0 | 2.4 ± 0.7 | NT* |
| 3 | 1.4 ± 0.1 | 1.2 ± 0.1 | 1.0 ± 0.2 | 0.29 ± 0.01 | 0.95 ± 0.11 | 0.30 ± 0.06 | 1.4 ± 0.3 |
| 4 | 1.1 ± 0.1 | 0.99 ± 0.10 | 0.33 ± 0.01 | 0.24 ± 0.01 | 0.37 ± 0.06 | 0.20 ± 0.03 | 0.22 ± 0.05 |
| Tacrina | >100 | 50 ± 4 | 51 ± 4 | 50 ± 6 | 46 ± 16 | 34 ± 1 | NT* |
| 5-FU | NT* | 5.5 ± 2.3 | 15 ± 4.7 | 4.3 ± 1.6 | 47 ± 18 | 49 ± 6.7 | 5.5 ± 0.5 |
| Cisplatino | 4.9 ± 0.2 | 1.9 ± 0.2 | 2.0 ± 0.3 | 3.4 ± 0.7 | 15 ± 2.3 | 26 ± 5.6 | 14 ± 2.4 |

*NT: no testado

A549: cáncer de pulmón

HBL-100: cáncer de mama

HeLa: cáncer cérvico-uterino

SW1573: cáncer de pulmón

T-47D: cáncer de mama

WiDr: cáncer de colon

BJ-hTert: fibroblasto humano (célula sana) inmortalizado

Se observa en los resultados descritos para los nuevos tioderivados de tacrina que los disulfuros **3** y **4** son los más activos frente a las células tumorales estudiadas, con valores de actividad en el rango micromolar y submicromolar, mejores a los de fármacos ampliamente usados como el cisplatino y el 5-fluorouracilo, haciendo a estos compuestos de interés no sólo frente al Alzheimer, sino también frente al cáncer, aunque desafortunadamente no se observa selectividad en ellos hacia las células tumorales.

La dualidad de compuestos inhibidores de colinesterasas y con capacidad antiproliferativa frente a ciertas líneas celulares tumorales ha sido observada previamente en otros compuestos como el tandutinib (**Fig. 17**), compuesto de interés para el tratamiento del glioblastoma y la leucemia mieloide que a su vez actúa como un inhibidor de tipo mixto de la AChE,⁸⁶ o el donepezilo, que además de presentar conocidas propiedades anti-Alzheimer se ha observado que posee la capacidad de inducir apoptosis en las células de leucemia HL-60 humanas.⁸⁷

86 Y. Chen, X. Xu, T. Fu, W. Li, Z. Liu, H. Sun. Discovery of new scaffolds from approved drugs as acetylcholinesterase inhibitors. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 90288-90294.

87 Y.S. Ki, E.Y. Park, H.-W. Lee, M.S. Oh, Y.-W. Cho, Y.K. Kwon, J.H. Moon, K.T. Lee. Donepezil, a potent acetylcholinesterase inhibitor, induces caspasedependent apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, *33* 1054-1059.

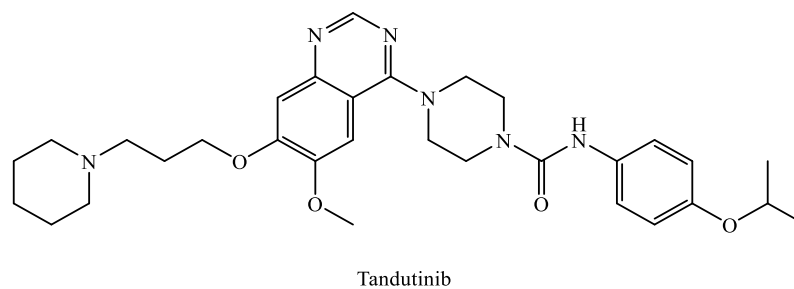


Figura 17. Estructura química de tandutinib

A partir de la estructura de los nuevos tioderivados de tacrina, podría correlacionarse su potente actividad antiproliferativa con la presencia de los siguientes elementos estructurales:

- En primer lugar, la presencia de un calcógeno como azufre en sus estructuras, ya que se ha observado con anterioridad que numerosos compuestos organocalcógenos presentan buenas propiedades antiproliferativas para ciertos tipos de cáncer.⁸⁸⁻⁹⁰
- La estructura aromática de 1,2,3,4-tetrahydro-9-acridinamina. Dicha estructura es muy similar a la 9-aminoacridina, que tiene la capacidad de intercalarse en el ADN, desorganizando la estructura de doble hélice, e impide su replicación y transcripción por inhibición de topoisomerasas y telomerasas.^{91,92}

-
88. E. Zeslawska, A. Kincses, V. Unger, V. Toth, G. Spengler, W. Nitek, W. Tejchman. Exocyclic sulfur and selenoorganic compounds towards their anticancer effects: crystallographic and biological studies. *Anticancer Res.* **2018**, 38, 4577-4584.
89. A. Marset, P. Begines, Ó. López, I. Maya, N. García-Aranda, S. Schwartz Jr, I. Abasolo, J.G. Fernández-Bolaños. Design of chalcogen-containing norepinephrines: efficient GPx mimics and strong cytotoxic agents against HeLa cells. *Future Med. Chem.* **2016**, 8, 2185-2195.
90. J.-L. Li, W. Zhao, C. Zhou, Y.-X. Zhang, H.-M. Li, Y.-L. Tang, X.-H. Liang, T. Chen, Y.-J. Tang. Comparison of carbon-sulfur and carbon-amine bond in therapeutic drug: 4β-S-aromatic heterocyclic podophyllum derivatives display antitumor activity. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 14814.
91. P. Belmont, J. Bosson, T. Godet, M. Tiano. Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where are we now? *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2007**, 7, 139-169.
92. F. Charmantray, M. Demeunynck, D. Carrez, A. Croisy, A. Lansiaux, C. Bailly, P. Colson. 4-Hydroxymethyl-3-aminoacridine derivatives as a new family of anticancer agents. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 967-77.

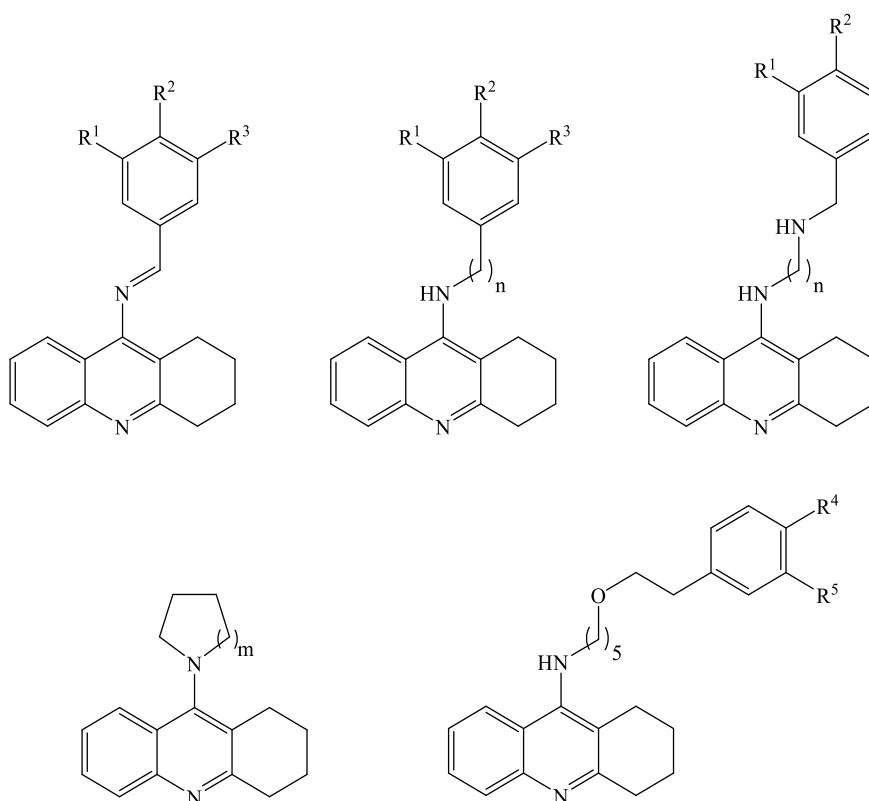
5.2.2. Síntesis y evaluación de nuevas moléculas duales obtenidas a partir de tacrina y derivados de fenoles

5.2.2.1. Síntesis de nuevas moléculas duales a partir de tacrina y derivados de fenoles

En este capítulo de la presente Tesis Doctoral, también se ha llevado a cabo la obtención de nuevas moléculas multidiana con actividad anti-Alzheimer, obtenidas a partir de tacrina y diferentes derivados de compuestos fenólicos como segundo farmacóforo.

La modificación del número, tipo y posición de los sustituyentes sobre el anillo aromático del derivado de compuesto fenólico, así como el tipo y longitud del espaciador que conecta ambas unidades bioactivas nos ha permitido establecer interesantes relaciones estructura-actividad.

Las distintas familias de compuestos sintetizadas en el presente apartado son las que se indican a continuación (**Fig. 18**):



R¹ - R⁵ = H, OBn, OMe, OH

Figura 18. Nuevos derivados fenólicos de tacrina

Las primeras dos familias se sintetizaron mediante reacciones de condensación entre el grupo amino de la tacrina y un aldehído fenólico *O*-protegido para formar diferentes iminas, y mediante reacciones de aminación reductiva (condensación+reducción) para formar las aminas correspondientes.

Tradicionalmente aparece descrita la formación de iminas en diferentes libros de texto mediante el uso de una catálisis ácida (pH = 4-5) o incluso en ausencia de catalizador.⁹³⁻⁹⁵ Sin embargo, se comprobó tras diversos ensayos utilizando ácido acético como catalizador, que el tiempo de reacción era muy prolongado y los rendimientos obtenidos bajos. Sin embargo, partiéndose del método descrito por Shutske y Kapples,⁹⁶ utilizando tolueno como disolvente y dietilamina como catalizador básico, se obtuvieron menores tiempos de reacción y mejores rendimientos.

Hay que tener en cuenta que los hidroxilos aromáticos son inestables en medio básico, por lo que los aldehídos utilizados en esta síntesis fueron el 3,4-dimetoxibenzaldehído (**79**), 4-benzoxibenzaldehído (**80**), 3,4-dibenzoxibenzaldehído (**81**) y 3,4,5-tribenzoxibenzaldehído (**82**).

Para la obtención de **80-82** se llevaron a cabo bencilaciones usando empleando el método descrito por S.J. Mills *et al.*⁹⁷ con ligeras variaciones (**Esq. 6**).

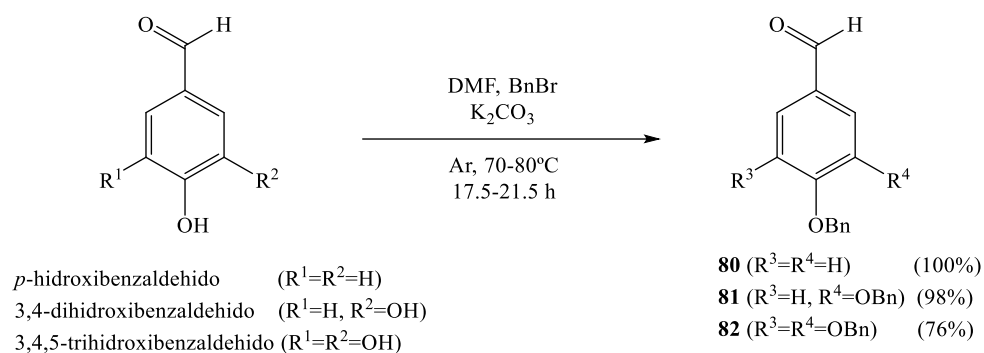
93. Wade L.G., Jr. Química Orgánica, 5ª edición, editorial Pearson Prentice Hall. **2007**.

94. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers. Organic Chemistry, editorial Oxford University Press. **2001**.

95. F.A. Carey, R.M. Giuliano. Química Orgánica, 9ª edición, editorial McGrawHill. **2014**.

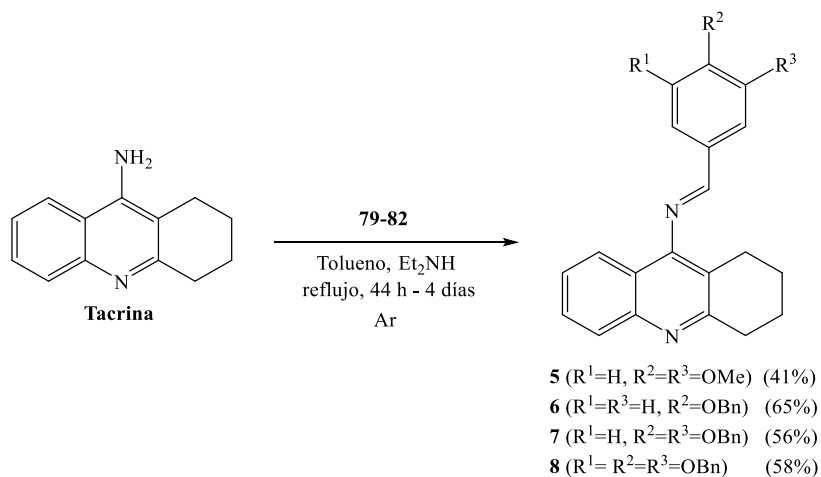
96. G.M. Shutske. K.J. Kapples. *N*-(substituted alkylidene)-1,2,3,4,-tetrahydro-9-acridinamines, a process for their preparation and their use as medicaments. EP0306825 B1, **1994**.

97 S.J. Mills, F. Vandeput, M.N. Trusselle, S.T. Safrany, C. Erneux, B.V.L. Potter. Benzene polyphosphates as tools for cell signalling: inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate 5-Phosphatase and interaction with the pH domain of protein kinase Ba. *ChemBioChem*. **2008**, 9, 1757-1766.



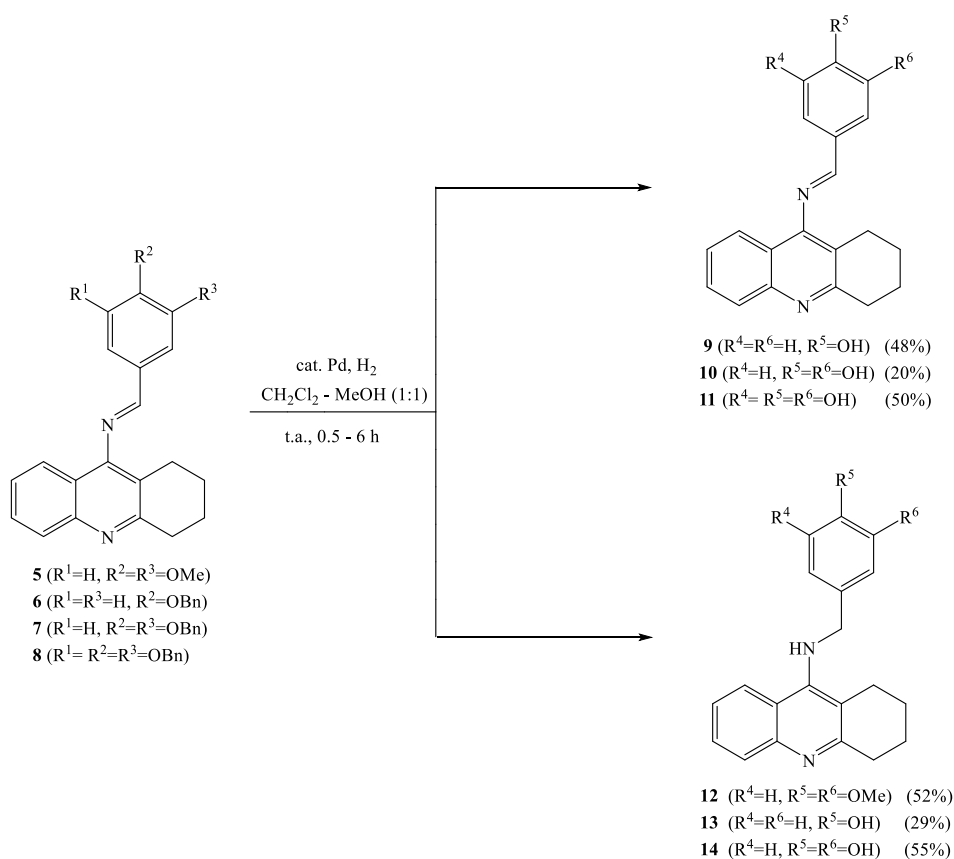
Esquema 6. Síntesis de benzoxibenzaldehidos

Una vez protegidos los alcoholes fenólicos, se pudo proceder con la formación de las iminas **5-8** (Esq. 7).



Esquema 7. Síntesis de nuevas iminas derivadas de tacrina

Con posterioridad, se obtuvieron mediante hidrogenolisis diferentes iminas con grupos alcoholes libres (**9-11**), y manteniendo las reacciones en dichas condiciones reductoras durante más tiempo, se obtuvieron también las correspondientes aminas (**12-14**) (Esq. 8):



Esquema 8. Síntesis de iminas y aminas derivadas de tacrina

Con ello pues, se pudo obtener de manera exitosa las nuevas moléculas **5-8**, **10**, **11**, **13** y **14**, así como **9** y **12** con metodologías distintas a las ya descritas.^{96,98} Los compuestos **10** y **14** se obtuvieron y aislaron tras una misma reacción de manera simultánea (rendimiento global = 75%).

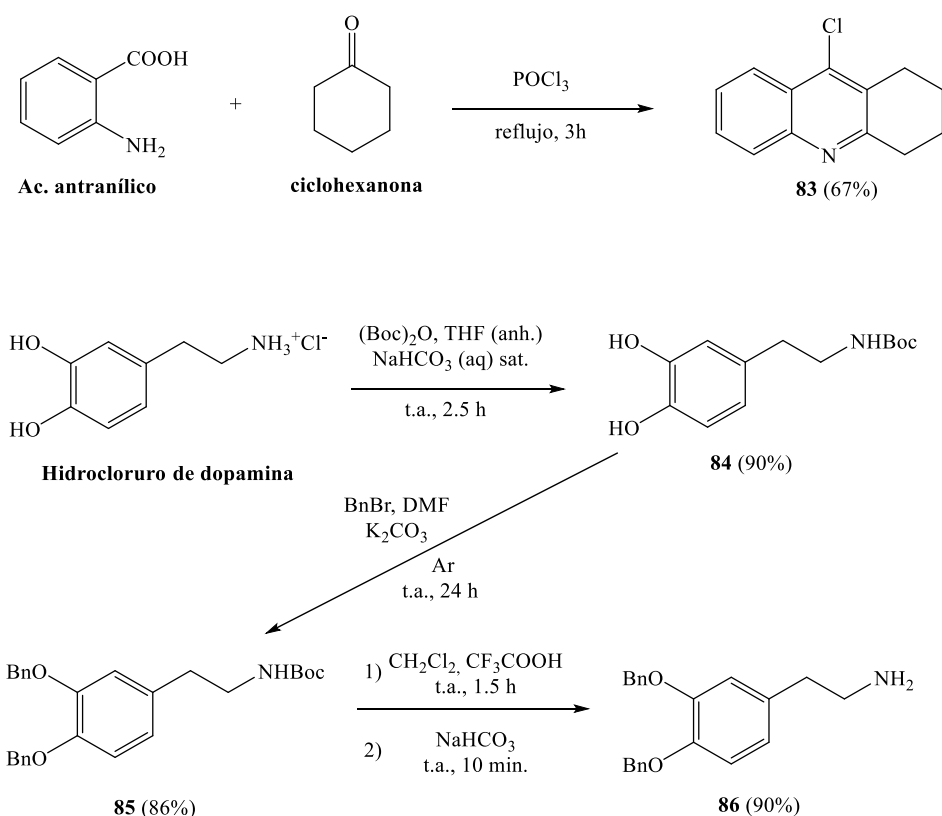
No se consiguió obtener la amina con tres hidroxilos libres derivada del compuesto **11**, debido que en su proceso de síntesis se observó la formación de mezclas complejas por CCP que impidió su obtención.

En cuanto a los catalizadores empleados, observamos que la velocidad de reacción era mayor al usar Pd(OH)₂/C en lugar de Pd/C. Cambiando el catalizador usado, así como el tiempo de reacción en los derivados bencilados, podemos obtener mayor o menor cantidad de la imina con hidroxilos libres o de la amina con hidroxilos libres.

98. W. Osman, T. Mohamed, V.M. Sit, M.S. Vasefi, M.A. Beazely, P.P.N. Rao. Structure-activity relationship studies of benzyl-, phenethyl-, and pyridyl-substituted tetrahydroacridin-9-amines as multitargeting agents to treat Alzheimer's disease. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2016**, 88, 710-723.

Con objeto de estudiar como afecta el espaciador entre los dos farmacóforos a la actividad de estos compuestos, se sintetizaron compuestos a partir de tacrina y derivados de fenoles, utilizando espaciadores de distinta longitud y naturaleza.

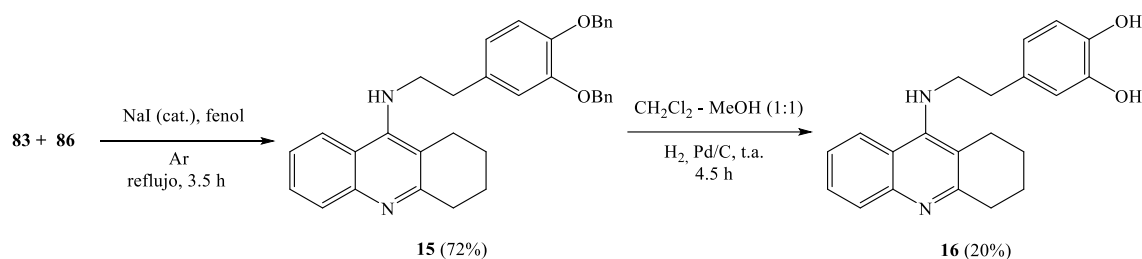
Los primeros derivados con ampliación de la longitud de cadena se sintetizaron a partir de las materias primas **83**, obtenida por el procedimiento descrito por R.S. Keri *et al.*⁹⁹ y **86**, a partir de las reacciones descritas por I.M. Khalil *et al.*¹⁰⁰ y H. Wang *et al.*¹⁰¹, y cuya síntesis se describe a continuación (**Esq. 9**):



Esquema 9. Síntesis de materias primas 83 y 86

99. R.S. Keri, C. Quintanova, S.M. Marques, A.R. Esteves, S.M. Cardoso, M.A. Santos. Design, synthesis and neuroprotective evaluation of novel tacrine–benzothiazole hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer’s disease. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4559-4569.
100. I.M. Khalil, D. Barker, B.R. Copp. Bioinspired syntheses of the pyridoacridine marine alkaloids demethyldeoxyamphimedine, deoxyamphimedine, and amphimedine. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 282-289.
101. H. Wang, T. B. Shrestha, M. T. Basel, M. Pyle, Y. Toledo, A. Konecny, P. Thapa, M. Ikenberry, K. L. Hohn, V. Chikan, D. L. Troyerb, S. H. Bossmann. Hexagonal magnetite nanoprisms: preparation, characterization and cellular uptake. *J. Mater. Chem. B.* **2015**, *3*, 4647-4653.

Una vez obtenidas las materias primas **83** y **86**, mediante una reacción de S_NAr se llegó al intermedio **15** basándonos en el procedimiento descrito por K. Czarnecka *et. al.*¹⁰² para sustituir el cloro de la 9-cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina empleando una amina como nucleófilo. Obtenido el compuesto **15**, tras realizar una posterior hidrogenolisis se obtuvo al compuesto buscado, **16** (Esq. 10).



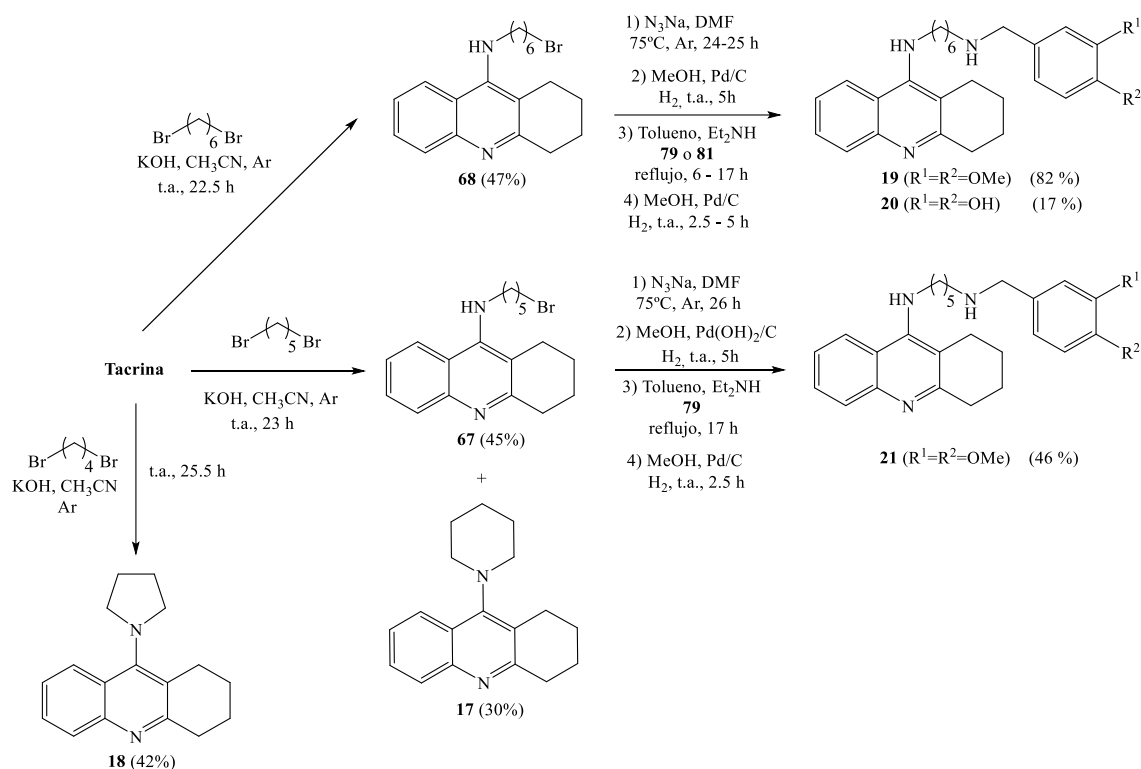
Esquema 10. Síntesis de nuevos derivados de dopamina con tacrina

Con objeto de incrementar la distancia entre los dos farmacóforos usados, se emplearon diferentes α,ω -dibromoalcanos, con intención de obteniendo los intermedios **67** y **68**, acceder a los derivados **19-21**. Al usar el dibromoalcano de 4 y 5 carbonos se obtuvieron además los compuestos **17** y **18** por una nueva ruta diferente a la descrita por E.T. Michalson *et al.*¹⁰³ Esta nueva ruta consiste en una reacción S_N2 intramolecular entre el grupo amino y el metileno terminal de los productos resultantes de la monoalquilación de la tacrina. Este tipo de derivados no se observó al usar el dibromoalcano de 6 átomos de carbono, ya que en ese caso se obtendría un anillo de 7 miembros mucho menos favorecido.

Una vez obtenidos los compuestos **67** y **68**, se sustituye el bromo por un grupo azido, y posteriormente dicho grupo es reducido a grupo amino mediante hidrogenación catalítica. Por último mediante aminación reductiva usándose diferentes aldehídos (**79** y **81**) se obtuvieron los compuestos **19-21** (Esq. 11).

102. K. Czarnecka, P. Szymanski, M. Girek, E. Mikiciuk-Olasik, R. Skibinski, J. Kabziński, I. Majsterek, B. Malawska, J. Jonczyk, M. Bajd. Tetrahydroacridine derivatives with fluorobenzoic acid moiety as multifunctional agents for Alzheimer's disease treatment. *Bioorg. Chem.* **2017**, *72*, 315-322.

103. E.T. Michalson, S. D'Andrea, J.P. Freeman, J. Szmuszkowicz. The synthesis of 9-(1-azetidiny)-1,2,3,4-tetrahydroacridine. *Heterocycles.* **1990**, *30*, 415-425.



Esquema 11. Síntesis de los derivados de tacrina 17-21

Con esta ruta se obtuvo el nuevo compuesto **20** y los compuestos **17**, **18**, **19** y **21** preparados por una nueva ruta sintética a otras descritas¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ con objeto de analizar su capacidad como inhibidores de colinesterasas y compararlos con los valores de los nuevos compuestos.

En cuanto a la última de las estructuras de los compuestos descritos en la **figura 18**, se trataron de obtener mediante la alquilación de la tacrina en primer lugar con un

104. E.T. Michalson, S. D'Andrea, J.P. Freeman, J. Szmuszkovicz. The synthesis of 9-(1-azetidiny)-1,2,3,4-tetrahydroacridine. *Heterocycles*. **1990**, *30*, 415-425.

105 P. Mignona, M. Tianob, P. Belmont, A. Favre-Réguillond, H. Chermettea, F. Fachee. Unusual reactivities of acridine derivatives in catalytic hydrogenation. A combined experimental and theoretical study. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2013**, *371*, 63-69.

106. W. Luo, Y.-P. Li, Y. He, S.-L. Huang, J.-H. Tan, T.-M. Ou, D. Li, L.-Q. Gu, Z.-S. Huang. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-multialkoxybenzene hybrids as dual inhibitors for cholinesterases and amyloid β aggregation. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 763-770.

107. W. Luo, Y.-P. Li, Y. He, S.-L. Huang, D. Li, L.-Q. Gu, Z.-S. Huang. Synthesis and evaluation of heterobivalent tacrine derivatives as potential multi-functional anti-Alzheimer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2609-2616.

dibromoalcano, produciéndose únicamente la sustitución de un bromo por la molécula de tacrina, y posteriormente sustituyendo el bromo restante usándose un alcóxido como nucleófilo. Para esta segunda etapa se emplearon diferentes disolventes (DMF, THF, CH₃CN y DMSO) así como diferentes bases para la obtención del alcóxido (NaH y KOH), empleándose diferentes temperaturas de trabajo y añadiéndose en varios ensayos NaI con objeto de sustituir el bromo del haloderivado de tacrina por yodo y tratar de promover la reacción de sustitución buscada empleándose un mejor grupo saliente. Pese a ello, todos los ensayos resultaron infructuosos.

Sin embargo, al invertir el orden y realizar primero una reacción de tipo S_N2 a partir de diferentes alcoholes (**Fig. 19**) y 1,5-dibromopentano, seguida de una segunda S_N2 utilizando esta vez tacrina como nucleófilo, se obtuvo de manera exitosa los compuestos buscados (**Esq. 12**). En la ruta de síntesis usada, los hidroxilos fenólicos de los compuestos deben estar protegidos, razón por la cual se bencilaron el tirosol y el hidroxitirosol utilizando los procedimientos descritos por N. Aberle *et al.*¹⁰⁸ y por E. Belmonte-Reche *et al.*¹⁰⁹ respectivamente para obtener los compuestos **89** y **90** (**Esq. 12**).

Las condiciones de reacción empleadas para la obtención de los compuestos **91**, **92** y **22-27** son las descritas en el **esquema 12**.

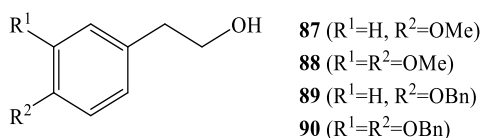
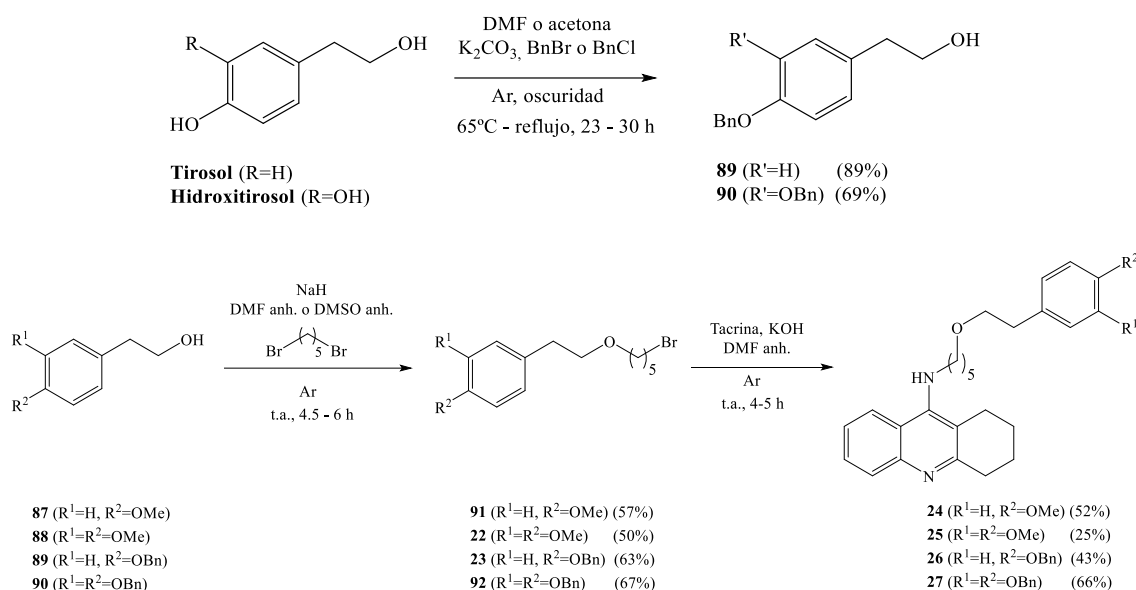


Figura 19. Estructura de diferentes derivados de 2-feniletan-1-ol

108. N. Aberle, J. Catimel, E.C. Nice, K.G. Watson. Synthesis and biological evaluation of analogues of the anti-tumor alkaloid naamidine A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 7, 3741-3744.

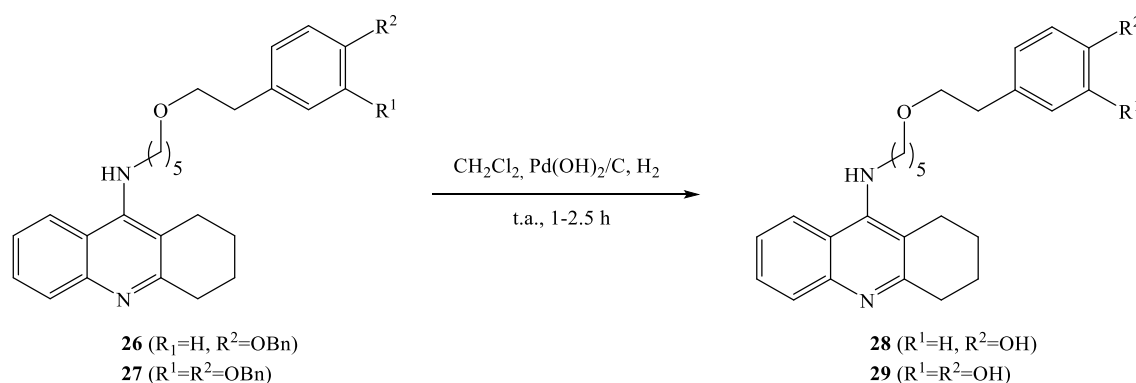
109. E. Belmonte-Reche, M. Martínez-García, P. Peñalver, V. Gómez-Pérez, R. Lucas, F. Gamarro, J.M. Pérez-Victoria, J.C. Morales. Tyrosol and hydroxytyrosol derivatives as antitrypanosomal and antileishmanial agents. *Eur. J. Med.Chem.* **2016**, 119, 132-140.



Esquema 12. Síntesis de nuevos compuestos híbridos de tacrina a partir de derivados de tirosol e hidroxitirosol

De esta manera se sintetizaron de manera exitosa los nuevos compuestos **22-27** y las moléculas **91** y **92** empleando una metodología diferente a la usada por otros autores.^{110, 111}

Los compuestos **26** y **27** se desprotegeron por hidrogenólisis para obtener sus derivados con los grupos hidroxilos libres (**Esq. 13**).



Esquema 13. Hidrogenólisis de los compuestos 26 y 27

110. I.F. Skidmore, H. Finch, A. Naylor, L.H.C. Lunts, I.B. Campbell. Dichloroaniline derivatives. GB 2165542 A, **1986**.

111. S. Montanari, P. Cavalleri, C. Fraire, G.C. Grancini, M. Napoletano, F. Santangelo. Derivatives of 2-amino-1,2,3,4-tetrahydro-naphthalene active on the cardiovascular system. WO 9608228 A2, **1996**.

Cabe matizar que el uso de 1,6-dibromohexano para obtener **19** y **20**, y de 1,5-dibromopentano para obtener los derivados **24-29**, nace de buscar el uso de espaciadores entre el fragmento de 1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina y el fragmento derivado de compuestos fenólicos, de una longitud aproximadamente igual.

Con todos estos nuevos compuestos se procedió con posterioridad a llevar a cabo diferentes ensayos con objeto de valorar la capacidad de los mismos para combatir el Alzheimer.

5.2.2.2. Evaluación in vitro y modelización molecular de nuevas moléculas duales obtenidas a partir de tacrina y derivados de fenoles

A) Ensayo de DPPH

El DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo) (**Fig. 20**), es un radical libre estable de coloración violeta intensa que presenta un máximo de absorción a 515 nm. En presencia de un compuesto con propiedades antiradicalarias, el DPPH es transformado por dicho compuesto, disminuyendo su absorbancia a 515 nm.

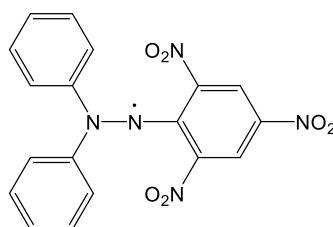


Figura 20. Estructura del radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH)

Para la medida de la capacidad de transformación del radical DPPH de los compuestos sintetizados se utilizó el método descrito por P. Merino-Montiel *et al.*,¹¹² obteniéndose valores significativos para los productos con dos o tres grupos hidroxilo libres, siendo dichos valores del mismo orden de magnitud que los obtenidos para un

112. P. Merino-Montiel, S. Maza, S. Martos, Ó. López, I. Maya, J.G. Fernández-Bolaños. Synthesis and antioxidant activity of *O*-alkyl selenocarbamates, selenoureas and selenohydantoins. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48*, 582-592.

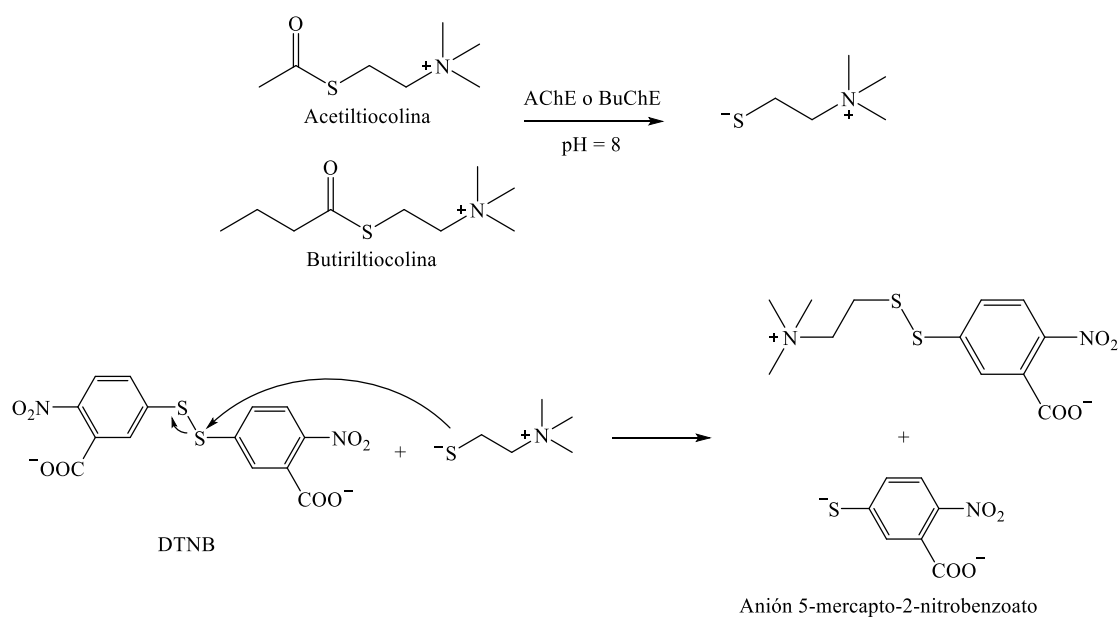
antioxidante natural como el ácido L-ascórbico (vitamina C) y mejores que el valor obtenido para un antioxidante sintético como es el BHT (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de CI_{50} para derivados fenólicos de tacrina, vit. C y BHT

| Compuesto | Ácido L-Ascórbico | BHT | 10 | 11 | 14 | 16 | 20 | 29 |
|-----------|-------------------|------------------|------------|------------|---------------|------------|------------|------------|
| CE_{50} | 13 ± 3^{112} | 70 ± 9^{112} | 11 ± 2 | 11 ± 2 | 9.1 ± 0.5 | 17 ± 1 | 11 ± 1 | 15 ± 1 |

B) Ensayo de inhibición de colinesterasas (AChE y BuChE)

Para la evaluación como inhibidores de colinesterasas de los compuestos sintetizados en este trabajo de investigación, se utilizó el ensayo de Ellman⁷³ con pequeñas modificaciones. Como reactivos se usan el acetato y butirato de tiocolina y DTNB (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)), que en presencia de la correspondiente enzima dan lugar a las siguientes reacciones (Esq. 14):



Esquema 14. Reacciones que tienen lugar en el ensayo de Ellman

En dicho ensayo se trabaja con un buffer de pH 8.0, a 25 °C y usando AChE procedente de *Electrophorus electricus* como modelo por su similitud con esta enzima en mamíferos⁷³ y BuChE procedente de suero equino.

La inhibición se evalúa en este método midiéndose como varía la absorbancia a 405 nm debida a la formación del anión 5-mercapto-2-nitrobenzoato.

Para dicho ensayo se trabajó con entre 4 y 5 concentraciones diferentes de acetiltiocolina (7.25-119.2 μM) y butiriltiocolina (9.15-73.16 μM), obteniéndose diferentes representaciones de Lineweaver-Burk o dobles inversos ($y = 1/v$; $x=1/[S]$). A continuación aparecen reflejados los valores de constantes de inhibición enzimática para a AChE (*Electrophorus electricus*) y BuChE (suero equino) obtenidos para los diferentes nuevos derivados de tacrina descritos en este apartado (**Tablas 7-10**):

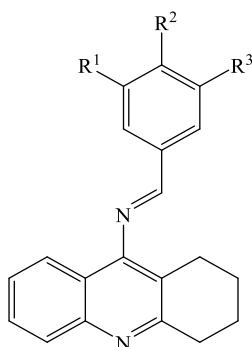


Tabla 7. Inhibición de colinesterasas producida por iminas derivadas de tacrina

| Compuesto | N° átomos espaciador | R ¹ | R ² | R ³ | AChE (<i>Electrophorus electricus</i>) | | BuChE (suero equino) | | IS* |
|----------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|--|-----------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| | | | | | K _{ia} (μM) | K _{ib} (μM) | K _{ia} (nM) | K _{ib} (nM) | |
| 5 | 2 | H | OMe | OMe | 2.5±0.6 | 1.9±0.3 | 271±36 | 35±8 | 9.2 54 |
| 6 | 2 | H | OBn | H | 39±10 | 23±6 | 2925±1183 | 643±327 | 13 36 |
| 7 | 2 | H | OBn | OBn | 25±4 | 19±1 | 637±79 | 173±42 | 39 110 |
| 8 | 2 | OBn | OBn | OBn | 2.3±0.7 | 3.0±0.8 | 704±82 | 192±74 | 3.3 16 |
| 9 | 2 | H | OH | H | 3.0±0.6 | 1.8±0.1 | - | 17±5 | 106 |
| 10 | 2 | H | OH | OH | 2.1±0.3 | 0.82±0.27 | 11±4 | 1,9±0,8 | 191 432 |
| 11 | 2 | OH | OH | OH | 0.40±0.19 | 0.17±0.04 | 51±17 | 5,8±1,5 | 7.8 29 |
| Tacrina | - | - | - | - | 0.12±0.03 | 0.035±0.005 | 12±1 | 3,0±0,5 | 10 12 |

*IS: índice de selectividad = K_i (AChE)/K_i (BuChE)

En esta primera familia de iminas, podemos observar como los sustituyentes de los anillos aromáticos de derivados fenólicos tienen una clara influencia en la actividad inhibitoria de AChE y BuChE.

En lo que a acetilcolinesterasa se refiere, observamos que la actividad es mayor cuando los grupos hidroxilos se encuentran libres, siendo dentro de los derivados

protegidos el compuesto con dos grupos metoxilos mejor al derivado con dos grupos bencilos. Además se observa una clara tendencia de que a mayor sustituyentes en el anillo fenólico (con grupos -OH protegidos y desprotegidos), mejor capacidad inhibitoria presentan los compuestos. Debido a estas dos características, el compuesto **11** es el mejor de este grupo de iminas, con valores de inhibición próximos a la tacrina usada como referencia.

En cuanto a inhibición de butirilcolinesterasa, observamos al igual que con la AChE que la actividad inhibitoria es mayor cuando los hidroxilos presentes en el compuesto se encuentran libres en lugar de protegidos, y dentro de los derivados protegidos nuevamente el compuesto con grupos metoxilos es más activo que los derivados con grupos bencilos. Además en todas las iminas sintetizadas se observa una selectividad desde moderada hasta elevada de dichos compuestos como inhibidores de BuChE frente a AChE, lo cual puede resultar de utilidad en fases avanzadas de la enfermedad de Alzheimer.⁷⁸

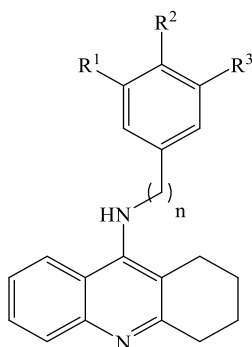


Tabla 8. Inhibición de colinesterasas producida por aminas derivadas de tacrina

| Compuesto | n | R ¹ | R ² | R ³ | AChE (<i>Electrophorus electricus</i>) | | BuChE (suero equino) | | IS* |
|----------------|---|----------------|----------------|----------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|
| | | | | | K _{ia} (μM) | K _{ib} (μM) | K _{ia} (nM) | K _{ib} (nM) | |
| 12 | 1 | H | OMe | OMe | 0.64±0.08 | 0.21±0.06 | 31±5 | 6.4±1.9 | 21 33 |
| 13 | 1 | H | OH | H | 0.37±0.06 | 0.081±0.011 | 12±2 | 3.2±0.5 | 31 25 |
| 14 | 1 | H | OH | OH | 0.19±0.06 | 0.19±0.06 | 25±6 | 3.2±1.2 | 7.6 59 |
| 15 | 2 | H | OBn | OBn | 1,6±0,4 | 0,61±0,22 | 22±7 | 1.1±0.6 | 73 554 |
| 16 | 2 | H | OH | OH | 0,87±0,43 | 0,59±0,38 | 128±20 | 28±9 | 6.8 21 |
| Tacrina | - | - | - | - | 0.12±0.03 | 0.035±0.005 | 12±1 | 3.0±0.5 | 10 12 |

*IS: índice de selectividad = K_i (AChE)/K_i (BuChE)

Dentro de esta segunda agrupación de compuestos en los que en el espaciador encontramos como grupo funcional únicamente un grupo amino, observamos en primer lugar en cuanto a su actividad como inhibidores de AChE que la actividad de las aminas **12-14** resulta mejor a la de las iminas de las que proceden (**5**, **9** y **10**). En cuanto a la longitud de cadena muestran mejores resultados los compuestos con un único fragmento de metilideno en su espaciador, destacando en esta tabla los compuestos **13** y **14** como inhibidores de AChE, con valores entorno al mismo orden de magnitud que la tacrina.

Como inhibidores de BuChE sin embargo no se observa una tendencia clara en estos compuestos en lo que se refiere a su relación estructura-actividad. Podemos destacar en cuanto a su actividad frente a esta enzima los valores obtenidos por **13**, y nuevamente una selectividad desde moderada hasta elevada en estos compuestos como inhibidores de BuChE.

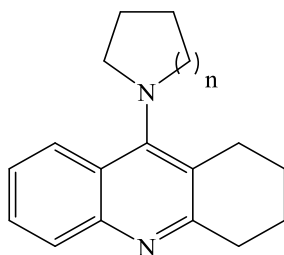


Tabla 9. Inhibición de colinesterasas producida por aminas cíclicas derivadas de tacrina

| Compuesto | n | AChE (<i>Electrophorus electricus</i>) | | BuChE (suero equino) | | IS* |
|----------------|---|--|---------------------|----------------------|---------------|-------------|
| | | K_{ia} (μ M) | K_{ib} (μ M) | K_{ia} (nM) | K_{ib} (nM) | |
| 17 | 2 | 1.8±1,2 | 2.5±1,5 | 1898±590 | 275±105 | 0.95 9.1 |
| 18 | 1 | 3.2±0.8 | - | 1203±130 | 304±81 | 2.7 |
| Tacrina | - | 0.12±0.03 | 0.035±0.005 | 12±1 | 3,0±0,5 | 10 12 |

*IS: índice de selectividad = K_i (AChE)/ K_i (BuChE)

En lo que a los derivados pirrolidinico y piperidinico de tacrina se refiere, no se observaron buenos valores de inhibición enzimática.

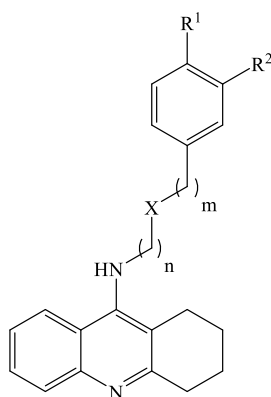


Tabla 10. Inhibición de colinesterasas producida por diaminas y éteres derivados de tacrina

| Compuesto | n | m | n+m | X | R ¹ | R ² | AChE (<i>Electrophorus electricus</i>) | | BuChE (suero equino) | | IS* |
|-----------|---|---|-----|----|----------------|----------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|------------|
| | | | | | | | K _{ia} (μM) | K _{ib} (μM) | K _{ia} (nM) | K _{ib} (nM) | |
| 19 | 6 | 1 | 7 | NH | OMe | OMe | 0.10±0.03 | 0.090±0.050 | 3.9±0.4 | 0.82±0.23 | 26 110 |
| 20 | 6 | 1 | 7 | NH | OH | OH | 0.12±0.05 | 0.058±0.023 | 7.9±1.0 | 1.7±0.4 | 15 34 |
| 21 | 5 | 1 | 6 | NH | OMe | OMe | 0.16±0.10 | 0.12±0.03 | 30±20 | 9.9±3.7 | 5.3 12 |
| 24 | 5 | 2 | 7 | O | OMe | H | 0.075±0.028 | 0.075±0.028 | 29±5 | 2.9±1.1 | 2.6 26 |
| 25 | 5 | 2 | 7 | O | OMe | OMe | 0.17±0.01 | 0.055±0.011 | 7.0±0.4 | 1.9±0.8 | 24 29 |
| 26 | 5 | 2 | 7 | O | OBn | H | 0.11±0.02 | 0.11±0.02 | 1.9±0.9 | 1.5±1.2 | 58 73 |
| 27 | 5 | 2 | 7 | O | OBn | OBn | 0.34±0.05 | 0.13±0.03 | 4.6±0.6 | 2.7±0.9 | 74 48 |
| 28 | 5 | 2 | 7 | O | OH | H | 0.13±0.02 | 0.10±0.05 | - | 4.5±1.5 | 22 |
| 29 | 5 | 2 | 7 | O | OH | OH | 0.21±0.02 | 0.077±0.016 | 43±7 | 9.0±2.2 | 4.9 8.6 |
| Tacrina | - | - | - | - | - | - | 0.12±0.03 | 0.035±0.005 | 12±1 | 3.0±0.5 | 10 12 |

*IS: índice de selectividad = K_i (AChE)/K_i (BuChE)

En esta última agrupación de compuestos en las que se empleó espaciadores de una mayor longitud, se observó en todos ellos una muy buena capacidad de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, obteniéndose valores de constantes de inhibición del mismo orden de magnitud que para la tacrina usada como referencia, y en la mayoría de ellos también valores como inhibidores de butirilcolinesterasa mejores a los obtenidos en la tacrina. Con ello queda patente la importancia del espaciador entre los dos farmacóforos, que pese a no ser exactamente el mismo en toda este grupo, presenta el mismo número de grupos metilidos (7) y heteroátomos (1) en todos los compuestos salvo el derivado **21**. Destaca todo este grupo descrito en la **tabla 10** sobre los otros al ser el de mejor

actividad inhibitoria de AChE y BuChE, observándose nuevamente una elevada selectividad de inhibición de esta segunda enzima. Destacan entre estos compuestos, los derivados **19**, **20** y **24-28**, todos ellos con valores de constantes de inhibición de la AChE próximos a los de la tacrina y constantes de inhibición de BuChE similares e incluso mejores a los de la tacrina.

A partir de todos los compuestos anteriores, aquellos que mostraron una mejor inhibición de las enzimas modelo se evaluaron también frente a las correspondientes enzimas humanas en colaboración con la profesora M. Bartolini de la Universidad de Bolonia, obteniéndose los siguientes resultados (**Tabla 11**):

Tabla 11. Inhibición enzimática de derivados de tacrina usando colinesterasas humanas

| Compuesto | Estructura | R ¹ | R ² | R ³ | hAChE CI ₅₀ (nM) | hBuChE CI ₅₀ (nM) | IS* |
|-------------|------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| 9 | | H | OH | H | 1475±311 | 194±15 | 7.6 |
| 10 | | H | OH | OH | 609±26 | 41.5±4.06 | 14.8 |
| 11 | | OH | OH | OH | 1040±40 | 120±49 | 8.7 |
| 14 | | H | OH | OH | 100±13 | 74.8±3.4 | 1.3 |
| 20 | | H | OH | OH | 29.0±1.3 | 22.9±1.2 | 1.3 |
| 24 | | H | OMe | H | 216±45 | 2.92±0.26 | 74.5 |
| 25 | | H | OMe | OMe | 168±37 | 0.515±0.050 | 323.1 |
| 26 | | H | OBn | H | 454±69 | 6.95±0.21 | 65.8 |
| 27 | | H | OBn | OBn | 506±64 | 0.497±0.059 | 1012 |
| 28 | | H | OH | H | 142±16 | 6.06±0.59 | 23.3 |
| 29 | | H | OH | OH | 542±16 | 35.6±2.1 | 15.2 |
| Tacrina | | - | - | - | 412±15 | 44.2±1.7 | 9.3 |
| Galantamina | | - | - | - | 2010 ± 150 ⁷⁶ | 20700 ± 1500 ⁷⁶ | 0.1 ⁷⁶ |

*IS: índice de selectividad = CI₅₀ (AChE)/CI₅₀ (BuChE)

Como puede observarse en la **tabla 11**, muchos de los compuestos obtuvieron mejores valores de CI_{50} que los de la molécula de tacrina y todos ellos mejores que los obtenidos por la galantamina. De este grupo, destacó como inhibidor de ambas enzimas el compuesto **20**, siendo 14 veces mejor inhibidor de AChE que la tacrina y 1.5 veces mejor inhibidor de BuChE que dicho fármaco. Esto resulta de interés para las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer.⁷⁷

En segundo lugar, cabe destacar los compuestos **24-29** como inhibidores altamente selectivos de la enzima BuChE. En ellos se obtuvieron valores de inhibición de la AChE del mismo orden de magnitud que el obtenido para la tacrina e incluso mejores (hasta 2.9 mejores), y valores como inhibidores de la BuChE muchos mejores que los obtenidos para este fármaco usado como referencia (hasta 88 veces mejores), alcanzándose valores de inhibición del orden del rango picomolar (515 y 497 pM) en los compuestos que presentan dos grupos metoxilos (**25**) y dos grupos becilo (**27**) e índices de selectividad de 323 y 1012 respectivamente. Dichos resultados presentan un elevado interés para etapas avanzadas de la enfermedad.⁷⁸

C) Modelización molecular

En colaboración con el Dr. A. Franconetti, actualmente investigador en el CIC bioGUNE (Vizcaya), se llevó a cabo un estudio en el que se analizaron las interacciones inhibidor-enzima dadas entre el sitio activo de la enzima butirilcolinesterasa y la tacrina y los derivados **25**, **27-29**. Las coordenadas cristalográficas código 4bds (PDB) se utilizaron como punto de partida para estudiar la conformación molecular de los compuestos **25**, **27-29** en el sitio de unión con la BuChE.

El análisis de las interacciones de la tacrina revela que la estabilización principal de esta molécula en el sitio activo de la enzima BuChE se debe a las interacciones de apilamiento de tipo π - π que involucran el residuo Trp82 (**Fig. 21**). Se encontraron dos estados diferentes, protonado y no protonado, para la tacrina. Estos estados modifican la fuerza de las interacciones π - π de - 18.5 (no protonada) a - 21.9 kcal / mol (protonada). Por ello, el estado protonado sería predominante a pH fisiológico.

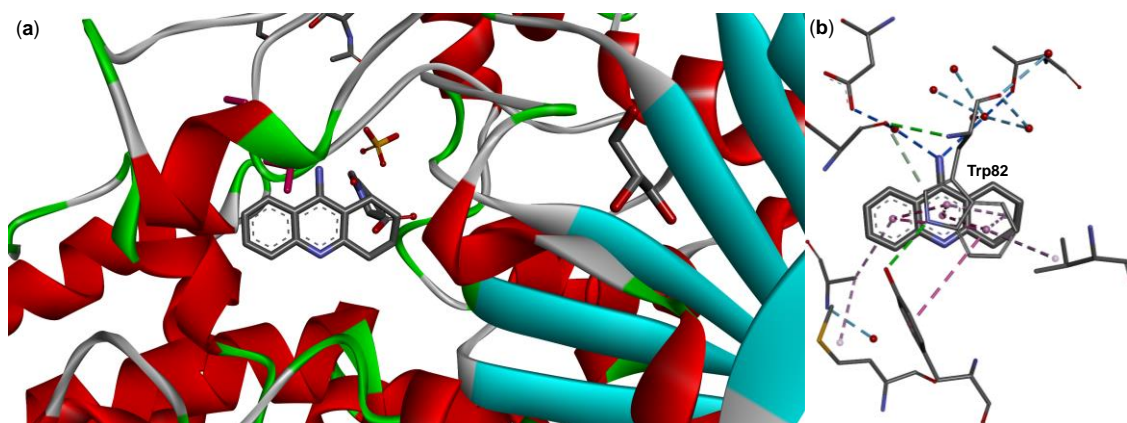


Figura 21. (a) *Coordenadas cristalográficas de la tacrina en el sitio activo de la BuChE* y (b) *interacciones moleculares implicadas en la interacción de la tacrina con el sitio activo de la BuChE*

El valor de estas energías de interacción es demasiado alto para un apilamiento individual de π - π (6 kcal / mol). Esto se debe a que la interacción de apilamiento π - π funciona junto con las interacciones CH- π en las que dos protones apuntan claramente hacia el anillo aromático del Trp. Esta interacción de apilamiento de tacrina también se encuentra en todos los derivados sujetos a modelización. Sin embargo, los valores de las energías de interacción se modifican ligeramente debido a los contactos hidrofóbicos adicionales y la unión de CH- π con His438.

Centrando nuestra atención en las otras interacciones que los derivados de tacrina podrían establecer, la introducción de una cadena de alquilo proporciona suficiente flexibilidad conformacional para maximizar las interacciones.

Para comprender el papel de ambos grupos hidroxilo del híbrido **29** ($IC_{50} = 35.6 \pm 2.1$ nM), se analizaron los contactos no covalentes que implican este resto. El fragmento de catecol permite interacciones adicionales de enlace de hidrógeno que involucran a Gln119 y Ser287 (**Fig. 22**). La estabilización (15.3 kcal / mol) de estos enlaces de hidrógeno combinados se estimó mediante modelos basados en DFT.

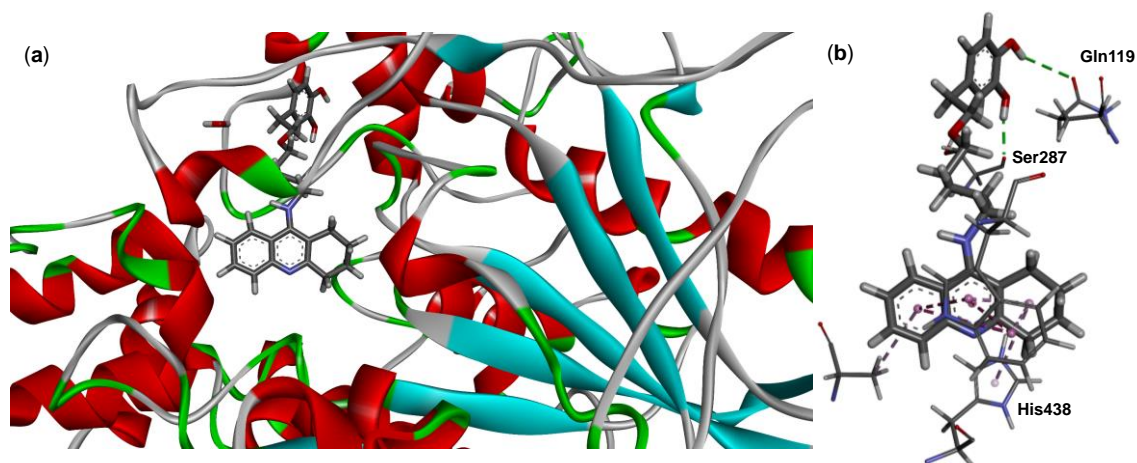


Figura 22. (a) Modelización molecular del heterodimero 29 en el sitio de unión de la BuChE e (b) interacciones moleculares involucradas

Los resultados del modelado molecular resaltaron el papel de los grupos hidroxilo del anillo aromático. Cuando estos grupos hidroxilo están protegidos (OBn, compuesto **27**), aunque se pierde el enlace de hidrógeno con Gln119 y Ser287, se observa un aumento en la potencia de inhibición ($IC_{50} = 0.50 \pm 0.06$ nM). De hecho, la flexibilidad conformacional permite que el anillo aromático se oriente hacia la superficie de la proteína, mostrando interacciones intramoleculares de tipo CH- π y dos contactos tipo CH- π intermoleculares ($\Delta E_{int} = -8.0$ kcal / mol para cada uno de ellos) con el residuo Ala277 (**Fig. 23**). Además, las interacciones de van der Waals con los residuos Ile69 y Asp70 y la cadena alquílica estabilizan el complejo.

Sorprendentemente, la potencia inhibitoria del compuesto **28** ($IC_{50} = 6.1 \pm 0.6$ nM) que tiene un solo grupo hidroxilo es significativamente mayor que la del derivado **29**. Aunque **28** no puede establecer el enlace de hidrógeno con Ser287 ($\Delta E_{corr} = -8,7$ kcal / mol), se encuentran interacciones entre dos enlaces de hidrógeno más fuertes ($\Delta E_{int} = -17.5$ kcal / mol) que involucran el carboxilato ($-COO^-$) cargado negativamente de Glu276 y Gln119, así como un nuevo contacto NH- π ($\Delta E_{int} = -14.1$ kcal / mol) entre el anillo de fenol y Asn68 (**Fig. 23**) las cuales son probablemente responsables de la actividad inhibitoria más fuerte de dicho compuesto, proporcionando dichas interacciones una mejor estabilización.

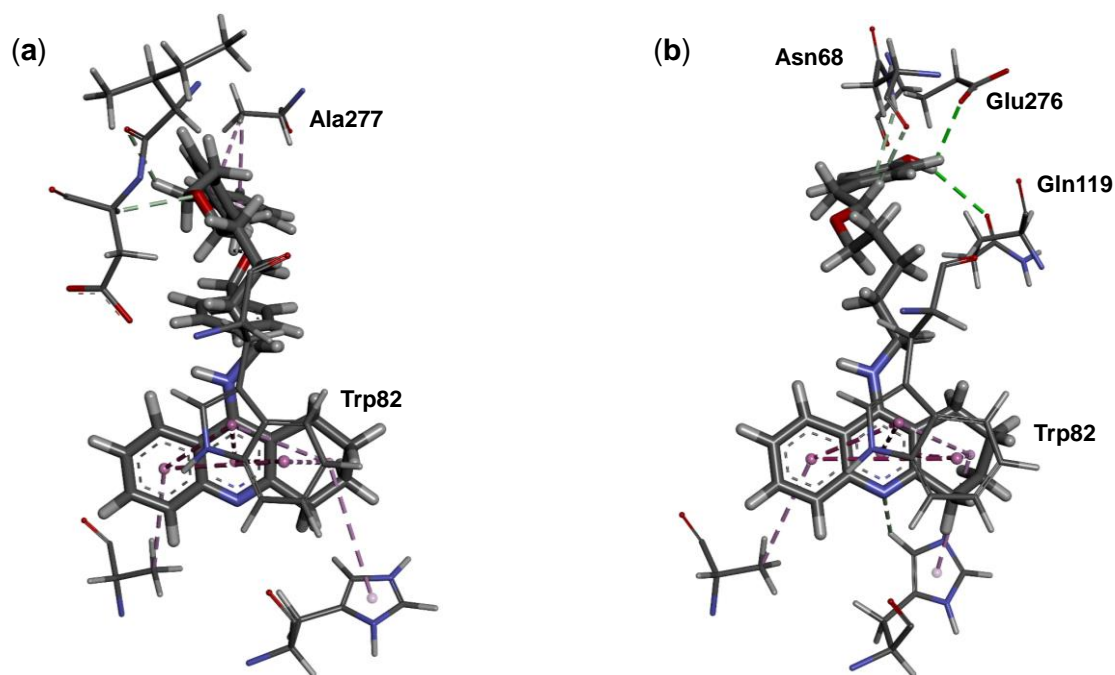


Figura 23. Interacciones enzima-inhibidor encontradas entre la BuChE y los compuestos 27 (a) y 28 (b)

La comparación entre el compuesto **27** y **25** ($R^1 = R^2 = \text{OMe}$, $\text{IC}_{50} = 0.515 \pm 0.050$ nM) proporciona información sobre diferencias sutiles. La penalización causada por los grupos bencilo de alto impedimento estérico en el compuesto **27** está equilibrada por las interacciones CH- π mencionadas anteriormente, pero sin embargo, este tipo de contactos faltan en el compuesto **25** que lleva sustituyentes metoxílicos. A pesar de esto, se observan dos nuevos contactos CH- π con restos de dipéptidos Gln69-Asn68 ($\Delta E_{\text{int}} = -8.5$ kcal / mol) y Leu88-Ser89 ($\Delta E_{\text{int}} = -2.3$ kcal / mol). Las diferencias significativas entre ambas energías de unión de los contactos CH- π pueden explicarse a partir de las diferencias de la superficie MEP (Potencial Electroestático Molecular) calculada (-19 frente a -17 kcal / mol, respectivamente para cada cara de 3,4-dimetoxifenilo).

Para obtener más información sobre la selectividad del compuesto **25** hacia BuChE en lugar de AChE, también se realizó un estudio de modelización de dicho compuesto con respecto al sitio activo de dicha enzima (código PDB: 4w63). Con ello se estimaron aproximadamente los valores globales calculados de energía de unión en los sitios de unión (**Fig. 24**) de la AChE ($\Delta E_{\text{int}} = -10.2$ kcal / mol) y BuChE ($\Delta E_{\text{int}} = -33.4$ kcal / mol), observándose una clara relación entre una mejor inhibición en cuanto a un valor de energía de unión más favorable.

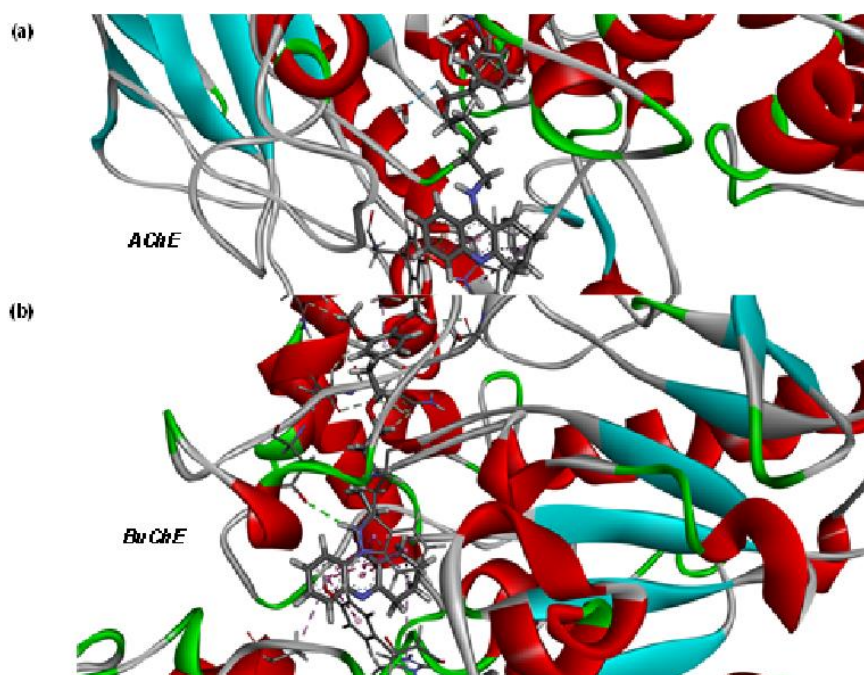


Figura 24. (a) Modelización molecular del derivado 25 en el sitio de unión con AChE y (b) en el sitio de unión de BuChE

D) Ensayo de inhibición de autoagregación de polipéptidos β -amiloides

Al igual que se hizo anteriormente con otros derivados de tacrina, se evaluó en aquellos compuestos sintetizados con una mayor actividad inhibitoria de colinesterasa su actividad como inhibidores de la formación de placas β -amiloides en colaboración con la profesora M. Bartolini, de la Universidad de Bolonia. En este caso, los compuestos tomados como cabeza de serie fueron los éteres **24-29**, que presentaron una alta selectividad como inhibidores de BuChE. Para ello se empleó nuevamente el ensayo de tioflavina T descrito por Naiki *et al.*⁷⁹ obteniéndose los siguientes resultados (**Tabla 12**):

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de autoagregación de polipéptidos A β ₄₂

| Compuesto | % de inhibición de autoagregación de A β ₄₂ |
|--------------------------|--|
| 24 | 63.5 ± 1.0 |
| 25 | 63.8 ± 4.8 |
| 26 | 70.0 ± 4.8 |
| 27 | 75.3 ± 0.4 |
| 28 | 54.4 ± 6.6 |
| 29 | (*) |
| Tacrina | <5 |
| Galantamina | <5 ⁷⁶ |
| Cistamina-tacrina | 66.3 ± 0.3 ⁷¹ |

*No testado debido a aparición de interferencia significativa observada en el ensayo de tioflavina T.

Como puede observarse, todos los derivados testados ejercieron una inhibición significativa de la autoagregación de A β ₄₂ con porcentajes de inhibición de interés (54.4-75.3%). A pesar del número limitado de compuestos probados, se podrían establecer algunas consideraciones, entre las que se encuentran el hecho de que el tipo de sustituyente en el anillo aromático parece influir en la actividad, observándose la siguiente tendencia: OBn > OMe > OH. Además, el patrón de mono o disustitución no parece influir en la actividad inhibitoria de manera significativa.

En conjunto, los derivados mono- y dibencilados **26** y **27** fueron los derivados más potentes, con una capacidad inhibitoria de la autoagregación de polipéptidos A β ₄₂ mejor a la de la tacrina y cistamina-tacrina usadas como referencia. Además, los derivados metoxilados **24** y **25** también presentaron muy buenos valores en este ensayo muy próximos a los de las cistamina-tacrina.

E) Ensayo de neurotoxicidad

En base a los ensayos anteriores, en los que destacaron los compuestos **25** (dimetoxilado) y **27** (dibencilado) tanto por su capacidad como inhibidores selectivos de BuChE a la vez que como inhibidores de formación placas β -amiloides, se estudió en dichos compuestos su neurotoxicidad. Para dicho estudio, se usó el ensayo de viabilidad

celular utilizando MTT, realizándose en colaboración con el grupo de investigación de la profesora B. Monti, de la Universidad de Bolonia. Los resultados obtenidos se representan a continuación (**Fig. 25**):

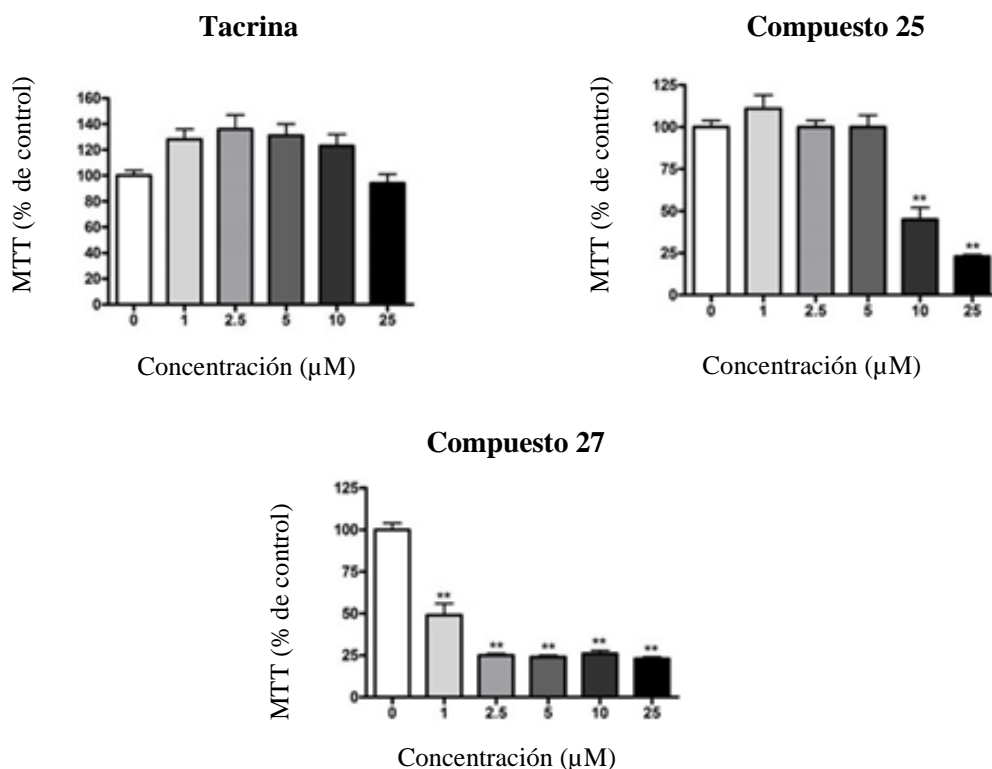


Figura 25. Resultados del ensayo de viabilidad celular con MTT en los compuestos 25, 27 y tacrina

Como podemos observar en los dos compuestos cabezas de serie, el compuesto **25** presenta menor toxicidad que el compuesto **27**. A concentraciones del orden de 5 µM e inferiores no se observa aparentemente neurotoxicidad alguna para el compuesto **25**. Teniendo en cuenta que esta molécula presenta valores de actividad en el rango subnanomolar para la inhibición de BuChE, una concentración muy inferior a la que comienza a mostrar toxicidad para las células neuronales, puede considerarse que este compuesto no resulta neurotóxico. Sin embargo, el derivado **27** es significativamente neurotóxico, observándose ya a una concentración 1 µM entorno a un 50% de viabilidad celular. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia del sustituyente sobre el anillo aromático.

F) Ensayo de hepatotoxicidad

Debido a la hepatotoxicidad inherente en la tacrina,⁵⁵ también se llevó a cabo un estudio *in vitro* de la hepatotoxicidad mostrada por los dos compuestos cabeza de serie (**25** y **27**). Para ello se llevó a cabo el ensayo de viabilidad celular para medir dicha hepatotoxicidad, en colaboración nuevamente con el grupo de investigación de la profesora B. Monti, obteniéndose los siguientes resultados (**Fig. 26**):

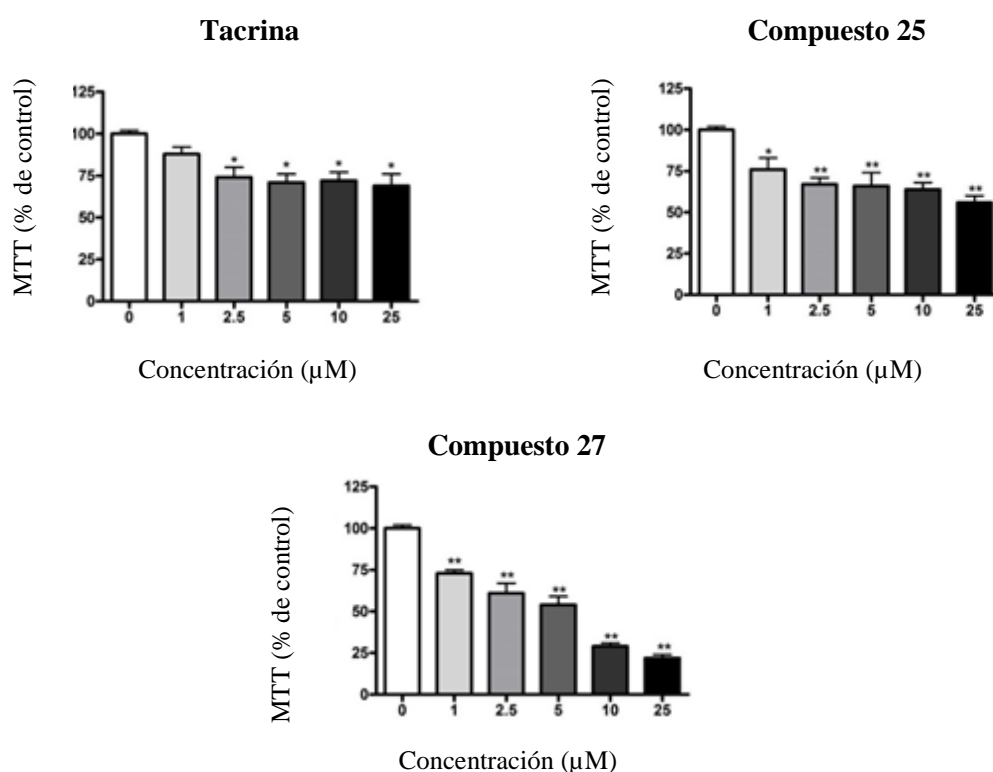


Figura 26. Resultados del ensayo de hepatotoxicidad en los compuestos 25, 27 y tacrina

Como se puede ver, el compuesto **27** presenta una hepatotoxicidad significativa, pero sin embargo en el caso del compuesto **25**, observamos un grado de hepatotoxicidad moderado para las concentraciones medidas (entorno a un 60% - 70% de supervivencia hepática). Al igual que en la medida de la neurotoxicidad, se pone de manifiesto la importancia de los sustituyentes en el anillo aromático.

G) Ensayo de neuroprotección

Además de los análisis anteriormente descritos, se evaluó también la capacidad de los compuestos cabeza de serie de este capítulo de actuar como agentes neuroprotectores

Para el ensayo de neuroprotección, realizado en colaboración con el grupo de la profesora B. Monti, se estudiaron los compuestos **25** y **27**. En dicho estudio se indujo neurodegeneración en neuronas primarias de ratas mediante suministro de suero y privación de K⁺, pues se observa que tras el agotamiento de ATP se produce estrés oxidativo y muerte neuronal a través de la vía apoptótica.¹¹³ Se obtuvieron los siguientes gráficos (**Fig. 27**):

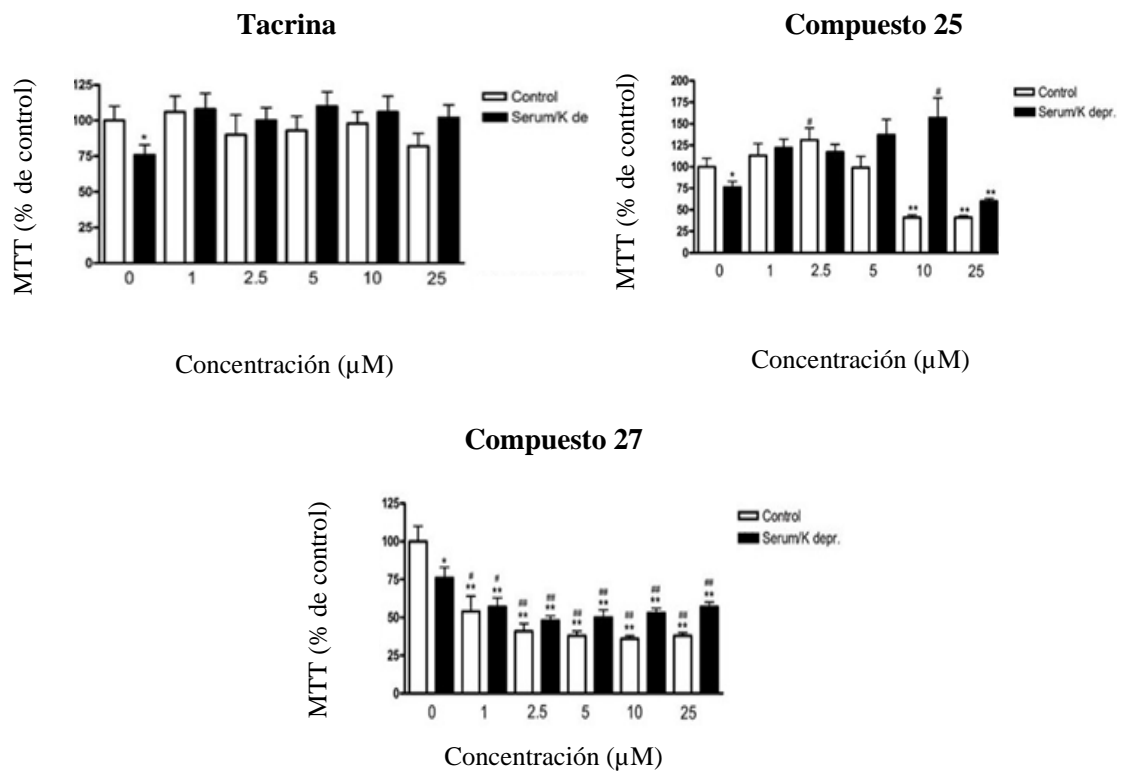


Figura 27. Resultados del ensayo de neuroprotección en los compuestos 25, 27 y tacrina

113. N. Nardi, G. Avidan, D. Daily, R. Zilkha-Falb, A. Barzilai. Biochemical and temporal analysis of events associated with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* **1997**, *68*, 750-759.

Como se puede observar, el derivado metoxilado **25** muestra una actividad neuroprotectora relevante hasta concentraciones del orden de 10 μM , siendo este compuesto el de mejor perfil neuroprotector de las dos nuevas moléculas evaluadas.

H) Ensayo de estabilidad en plasma sanguíneo

Por último para este apartado se planteó la medida de la estabilidad en plasma del compuesto cabeza de serie de toda esta familia (compuesto **25**), con objeto de estudiar la posible estabilidad del mismo en sangre.

Para ello, nuevamente en colaboración con la profesora B. Monti, se llevo a cabo la medida de la variación de concentración de dicho compuesto en plasma a 37 °C a través del tiempo, utilizándose como técnica la LC-MS para su medida (**Fig. 28**).

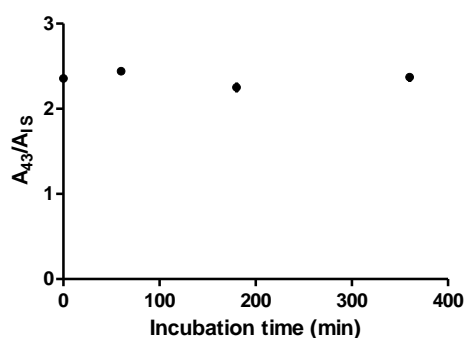


Figura 28. Resultados de ensayo de estabilidad en plasma del compuestos 25

Con estos resultados podemos concluir que no se observa degradación aparente de la molécula orgánica analizada y por tanto se puede confirmar su estabilidad en plasma sanguíneo.

En base a todos los demás ensayos realizados, se puede concluir que el compuesto **25** constituye un firme candidato como posible fármaco para combatir el Alzheimer.

**6. SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS
ORGANOCALCÓGENOS Y EVALUACIÓN DE SU
ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA**

6.1. Introducción y antecedentes

6.1.1. El cáncer. Causas y características

El cáncer es una enfermedad crónica degenerativa de tipo genético con un gran impacto negativo en la sociedad, siendo actualmente aún muy elevada la tasa de mortalidad de las personas afectadas por esta enfermedad. Dicha tasa, gracias a diferentes avances médicos ha ido en descenso, tomándose como ejemplo de dicha evolución el número de fallecimientos debidos a esta enfermedad en Estados Unidos, donde desde el año 1991 hasta el año 2015 el índice de mortalidad debido a esta enfermedad se redujo en un 26%.¹¹⁴ Pese a ello, esta enfermedad se sitúa como una de las principales causas de mortalidad en el mundo actualmente, ocupando junto con las enfermedades cardíacas las dos primeras causas de mortalidad en países desarrollados como Estados Unidos.¹¹⁵

La primera fecha de la que existe constancia por escrito de dicha enfermedad es entorno al año 3000 a.C. en el antiguo Egipto.¹¹⁶ Desde entonces hasta la actualidad se ha avanzado mucho en la lucha contra el cáncer, pero sin embargo aún es mucho el camino que hay que recorrer.

Cuando nos referimos a cáncer, hablamos realmente no de una enfermedad, sino de cientos de ellas, agrupadas normalmente dentro de seis categorías (carcinoma, sarcoma, mieloma, leucemia, linfoma y tipos mixtos),¹¹⁷ requiriéndose tratamientos diferentes para cada tipo de cáncer. Estas enfermedades están caracterizadas por la multiplicación descontrolada de células anormales que presentan alteraciones en su material genético y que son capaces de trasladarse y proliferar en otras partes del

114. Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas> Última consulta el 11/1/2020.

115. M. Heron, R.N. Anderson. Changes in the leading cause of death: recent patterns in heart disease and cancer mortality. *NCHS Data Brief*. **2016**, 254, 1-8.

116. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/what-is-cancer.html> Última consulta el 11/1/2020.

117. National Cancer Institute <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html> Última consulta el 11/1/2020.

organismo distintas de la de origen. Presenta diferentes orígenes, pudiendo ser las causas agentes físicos, así como químicos, genéticos e incluso víricos.^{118,119}

Al igual que en otras enfermedades crónicas degenerativas, el número de afectados por esta enfermedad va año tras año en aumento debido al crecimiento de la población mundial y de la esperanza de vida media de la misma. Así, la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) prevé que el número de nuevos casos anuales de cáncer en España aumente con los años, pasando de la cifra alcanzada en el año 2017 de 228482 nuevos casos de cáncer a más de 315000 nuevos casos en el año 2035.¹²⁰

Como se dijo anteriormente, el mayor factor de riesgo en lo que se refiere al cáncer es la edad. Esto se refleja en que la mayoría de los casos de cáncer los encontramos en la población mayores de 65 años (dos terceras partes). De todos los casos de cáncer, los más comunes son el cáncer de pulmón, próstata y cáncer de mama.¹²¹

Entre los posibles tratamientos contra el cáncer más usados en la actualidad, están la quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y la cirugía. En este segundo capítulo de la Tesis Doctoral se aborda la preparación y evaluación *in vitro* de nuevos derivados organocalcógenos como potenciales agentes quimioterápicos.

6.1.2. Interés de los derivados fenólicos y derivados calcógenos frente al cáncer y búsqueda de selectividad en fármacos

Como ya se mencionó, existen multitud de fenoles y polifenoles naturales que presentan una marcada capacidad anticancerígena, como sería el caso de la punicalagina,^{64,65} o algunos isocromanos.⁶⁶ Además de ellos, existen otros compuestos fenólicos de origen natural como el tirosol e hidroxitirosol (**Fig. 29**) que podemos

118. Asociación Española contra el Cáncer. <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer> Última consulta el 11/1/2020.

119. Manual de Enfermería Oncológica, Instituto Nacional del Cáncer (Argentina). <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000510cnt-38-ManualEnfermeriaOncologica2014.pdf> Última consulta el 11/1/2020.

120. <https://seom.org/es/noticias/106525-las-cifras-del-cancer-en-espana-2018> Última consulta el 11/1/2020.

121. A.S. Fauci, D.L. Karper, D.L. Longo, E. Braunwald, S. Hauser, J.L. Jameson, J.L. Loscalzo. Harrison. Principios de Medicina Interna. 17ª edición. Editorial McGrawHill. 2009.

encontrar en el aceite de oliva virgen, así como derivados de los mismos, que presentan diferentes propiedades biológicas de interés entre las que se encuentran la capacidad de combatir ciertos tipos de cáncer como la leucemia (HL-60) y el cáncer de páncreas (PaCa-2) entre otros.¹²²⁻¹²⁴

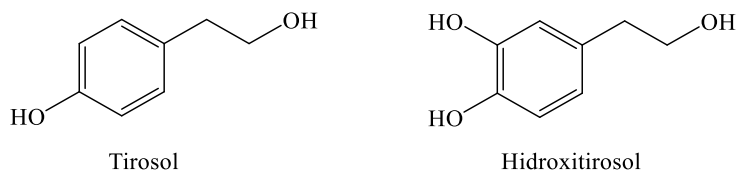


Figura 29. Estructura química de tirosol e hidroxitirosol

Es por ello que en diferentes fenoles y polifenoles se realizan actualmente modificaciones de su estructura mediante la unión a otros fragmentos farmacóforos con interés de evaluar la actividad biológica de los nuevos compuestos frente a células cancerosas.

Dentro de los compuestos que presentan un grupo organocalcógeno, se ha observado que ciertos tio-, seleno- y teluroderivados orgánicos presentan interesantes

122. R. Fabiani. Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: a systematic review of *in vivo* studies. *Food Funct.* **2016**, 7, 4145-4159.

123. J. Anter, I. Tasset, S. Demyda-Peyrás, I. Ranchal, M. Moreno-Millán, M. Romero-Jimenez, J. Muntané, M.D. Luque de Castro, A. Muñoz-Serrano, Á. Alonso-Moraga. Evaluation of potential antigenotoxic, cytotoxic and proapoptotic effects of the olive oil by-product "alperujo", hydroxytyrosol, tyrosol and verbascoside. *Mutat. Res.* **2014**, 772, 25-33.

124. C.D. Goldsmith, D.R. Bond, H. Jankowski, J. Weidenhofer, C.E. Stathopoulos, P.D. Roach, C.J. Scarlett. The olive biophenols oleuropein and hydroxytyrosol selectively reduce proliferation, influence the cell cycle, and induce apoptosis in pancreatic cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, 1937.

propiedades antiproliferativas frente a determinados tipos de cáncer,¹²⁵⁻¹²⁷ observándose en algunos de ellos, de manera concreta, citotoxicidad al inducir apoptosis en ciertas células tumorales.¹²⁸ Determinados estudios además demuestran el interés de su uso no solo de manera individual, sino en ocasiones en combinación con otras moléculas, dando lugar a una sinergia que produce una mejora significativa de la actividad anticancerígena de estos compuestos.^{129, 130}

Debido a lo anterior, la combinación de las propiedades de fenoles y derivados organocalcógenos resulta de elevado interés en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas, observándose buenos resultados en recientes estudios realizados por nuestro grupo de investigación con derivados organocalcógenos de diferentes fenoles entre los que se encuentran la (\pm)-norepinefrina,^{89,125} dopamina¹²⁵, *R*-epinefrina,¹²⁵ el hidroxitirosol,¹³¹ y diferentes aldehídos aromáticos¹³² (**Fig. 30**).

-
125. P. Begines, A. Oliete, Ó. López, I. Maya, G.B. Plata, J.M. Padrón, J.G. Fernández-Bolaños. Chalcogen-containing phenolics as antiproliferative agents. *Future Med. Chem.* **2018**, *10*, 319-334.
126. L.L. Romero-Hernández, P. Merino-Montiel, S. Montiel-Smith, S. Meza-Reyes, J.L.Vega-Báez, I. Abasolo, S. Schwartz Jr., Ó. López, J.G. Fernández-Bolaños. Diosgenin-based thio(seleno)ureas and triazolyl glycoconjugates as hybrid drugs. Antioxidant and antiproliferative profile. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *99*, 67-81.
127. L. Engman, N. Al-Maharik, M. McNaughton, A. Birmingham, G. Powis. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells. *Bioorg Med Chem.* **2003**, *11*, 5091-5100.
128. S. Khandelwal, M. Boylan, J.E. Spallholz, L. Gollahon. Cytotoxicity of selenium immunoconjugates against triple negative breast cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3352.
129. C Fan, W Zheng, X Fu, X Li, Y-S Wong, T. Chen. Enhancement of auranofin-induced lung cancer cell apoptosis by selenocystine, a natural inhibitor of TrxR1 in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1191.
130. P. Chakraborty, S. Singha Roy, S. Bhattacharya. Molecular mechanism behind the synergistic activity of diphenylmethyl selenocyanate and cisplatin against murine tumor model. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2015**, *15*, 501.
131. M.V. Sepporta, M.Á. López-García, R. Fabiani, I. Maya, J.G. Fernández-Bolaños. Enhanced chemopreventive activity of hydroxytyrosol on HL60 and HL60R cells by chemical conversion into thio derivatives. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48*, 790-798.
132. V. Calcaterra, Ó. López J.G. Fernández-Bolaños, G.B. Plata, J.M. Padrón. Phenolic thio- and selenosemicarbazones as multi-target drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *94*, 63-72.

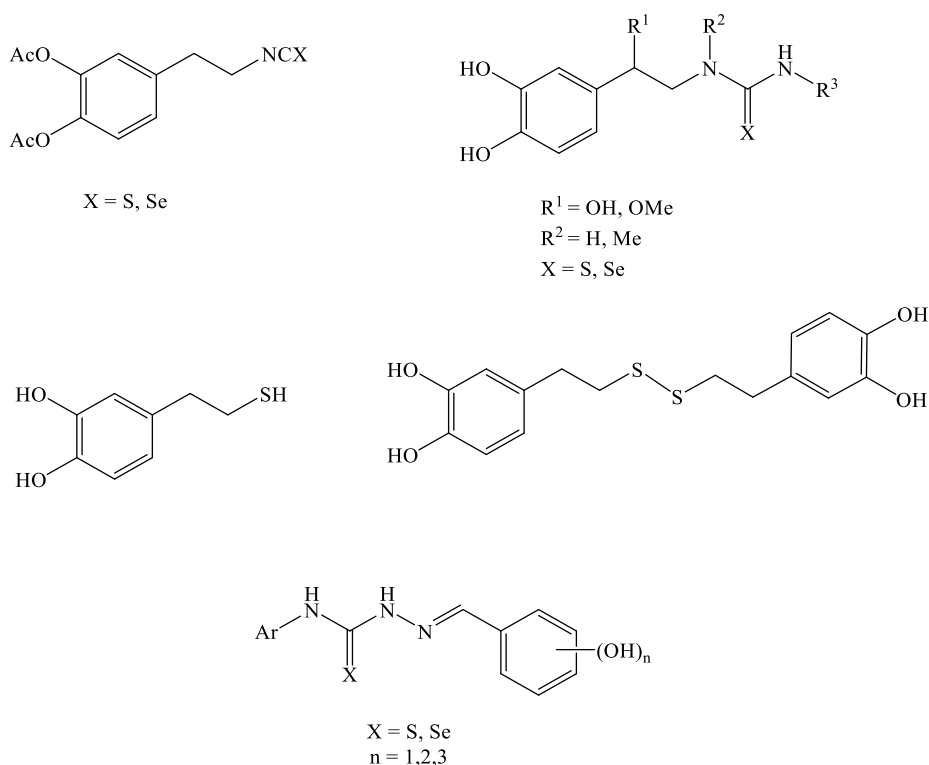


Figura 30. Estructura química de tio- y selenoderivados fenólicos

Sin embargo, pese a los buenos valores obtenidos en varios de estos compuestos en cuanto a actividad antiproliferativa y citotoxicidad, es frecuente la ausencia de selectividad, ya que muchos de estos compuestos no solo atacan a células cancerosas sino también a células sanas. El problema de selectividad ha estado presente desde los primeros fármacos quimioterápicos estudiados, tales como diferentes sulfuros de gas mostaza cuyo efecto se estudió a partir de la primera guerra mundial, hasta fármacos usados en la actualidad como es el cisplatino, carboplatino o 5-fluorouracilo (5-FU) (**Fig. 31**).^{70,133-135}

-
133. N. Rashtchizadeh, H. Argani, A. Ghorbanihaghjo, D. Sanajou, V. Hosseini, S. Dastmalchi, S.N. Soltan Ahmad. AMPK: A promising molecular target for combating cisplatin toxicities. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *163*, 94-100.
134. A. Ruggiero, G. Trombatore, S. Triarico, R. Arena, P. Ferrara, M. Scalzone, F. Pierri, R. Riccardi. Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anti-Cancer Drugs*, **2013**, *24*, 1007-1019.
135. Topics in Medicinal Chemistry, Cancer. R.H. Bradbury (Ed.), editorial Springer, **2007**.

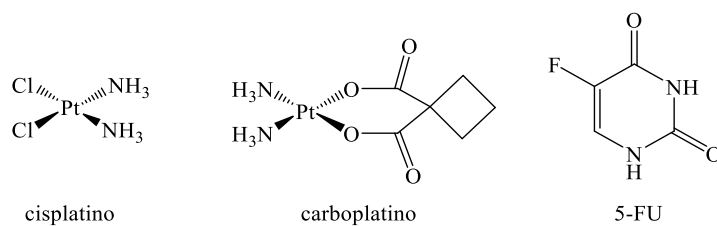


Figura 31. Estructura de cisplatino, carboplatino y 5-fluorouracilo

Teniendo en cuenta estos problemas, se hace necesario aumentar la selectividad de los posibles fármacos que vayan a ser empleados en el tratamiento contra el cáncer. Una manera de conseguir esto es mediante la introducción de fragmentos que actúen en nuestros derivados calcógenos dirigiéndolos de manera selectiva hacia las células tumorales. Para ello es necesario aprovechar las diferencias que existen entre las células tumorales y las células sanas

Es conocido que las células tumorales muestran un metabolismo mucho más activo que las células normales, multiplicándose mucho más rápidamente que estas en el organismo, lo que requiere en ellas un mayor aporte de ciertos nutrientes. Por ello, las células cancerosas requieren entre otras cosas un mayor aporte vitamínico que las sanas, como sería el caso de la vitamina H o D-biotina (**Fig. 32**), encontrándose en ciertos tipos de cáncer que aparecen sobreexpresados los receptores de dicha vitamina en las células tumorales.^{136,137}

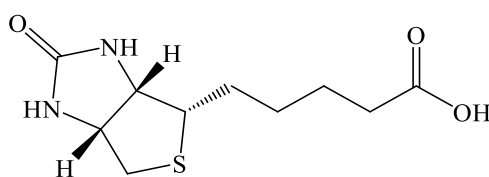


Figura 32. Estructura de la D-biotina (vitamina H)

136. G. Tripodo, D. Mandracchia, S. Collina, M. Rui, D. Rossi. New perspectives in cancer therapy: the biotin-antitumor molecule conjugates. *Med. Chem.* **2014**, S1:004.

137. S. Maiti. P. Paira. Biotin conjugated organic molecules and proteins for cancer therapy: a review. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 145, 206-223.

Es por ello que estos receptores se consideran en la actualidad interesantes dianas terapéuticas, pudiendo permitir una mejora de la selectividad de los fármacos antitumorales la presencia de un fragmento de D-biotina en su estructura.

6.1.3. Interés biológico del selenio y aplicación de compuestos organoselénicos como inhibidores de HADC frente al cáncer

Dentro de los organocalcógenos, al centrarnos en el selenio, observamos que pese a ser un elemento que durante mucho tiempo estuvo asociado a efectos tóxicos en lo que se refiere a su presencia en el organismo, tras en el año 1957 al identificarse como un micronutriente esencial en mamíferos,¹³⁸ cambió de alguna manera la concepción sobre dicho elemento, conociéndose hoy en día su importancia en determinados procesos del organismo como la reducción de especies oxidantes a través del ciclo catalítico de la enzima glutatión peroxidasa (GPx)⁸³ y los efectos perjudiciales que puede producir su déficit en el organismo, asociado a enfermedades como la enfermedad de Keshan, la enfermedad de Kashin–Beck o la enfermedad del corazón de mora.¹³⁹ Si bien durante el siglo XIX el selenio comenzó a usarse por sus propiedades fotoconductoras, con el tiempo comenzó a usarse en diferentes áreas como la industria del vidrio, pigmentos y metalurgia entre otras, adquiriendo durante las últimas décadas interés desde el punto de vista biológico.¹⁴⁰ En la actualidad son muchos los estudios de nuevas moléculas con selenio en las que se busca actividad anticancerígena, sintetizándose amplias familias de compuestos con diferentes grupos funcionales selénicos tales como selenoesteres,^{141,142}

138. K. Schwarz, C.M. Foltz. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Nutrition*. **1999**, *15*, 254-256.

139. H.J. Reich, R.J. Hondal. Why nature chose selenium. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 821-841.

140. V.K. Jain. An overview of Organoselenium Chemistry: from fundamentals to synthesis. *Organoselenium Compd. Biol. Med. Synth. Biol. Ther. Treat. The Royal Society of Chemistry*. **2018**, 1-34.

141. E. Domínguez-Álvarez, D. Plano, M. Font, A. Calvo, C. Prior, C. Jacob, J.A. Palop, C. Sanmartín. Synthesis and antiproliferative activity of novel selenoester derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *73*, 153-66.

142. D. Plano, D.N. Karelia, M.K. Pandey, J.E. Spallholz, S. Amin, A.K. Sharma. Design, synthesis, and biological evaluation of novel selenium (Se-NSAID) molecules as anticancer agents. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1946-1959.

6. Síntesis de nuevos derivados organocalcógenos y evaluación de su actividad anticancerígena

selenoamidas¹⁴³ y selenocarbamatos^{144,145} además de selenoureas y selenosemicarbazonas mencionadas con anterioridad^{125,132} (**Fig. 33**).

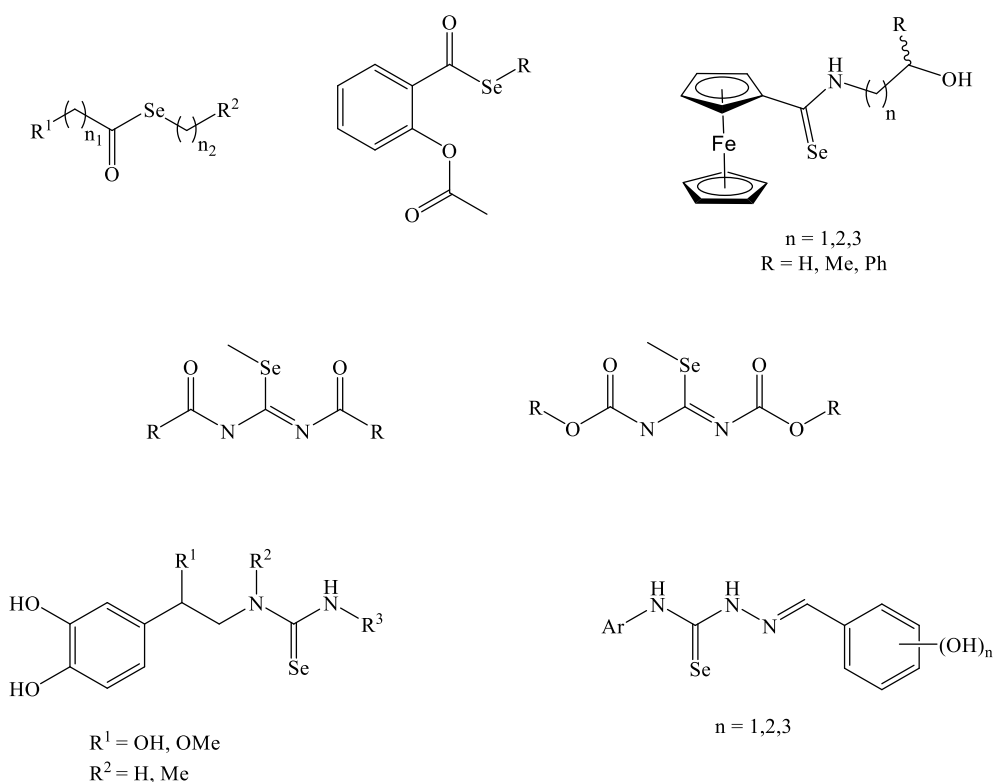


Figura 33. Estructura de compuestos organoselénicos con actividad antitumoral

Entre de los compuestos organoselénicos con actividad frente al cáncer, encontramos los inhibidores de histona desacetilasas (iHDAC). Estas enzimas tienen un papel relevante en la regulación de la transcripción genética, controlando junto con las

143. A.I. Gutiérrez-Hernández, J.G. López-Cortés, M.C. Ortega-Alfaro, M.T. Ramírez-Apan, J.J. Cázares-Marinero, R.A. Toscano. Ferrocenylselenoamides: synthesis, characterization and cytotoxic properties. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4652-4663.

144 M. Font, E. Lizarraga, E. Ibáñez, D. Plano, C. Sanmartín, J.A. Palop. Structural variations on antitumour agents derived from bisacylimidoselenocarbamate. A proposal for structure-activity relationships based on the analysis of conformational behaviour. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 66, 489-498.

145. B. Romano, M. Font, I. Encío, J. A. Palop, C. Sanmartín. Synthesis and antiproliferative activity of novel Methylselenocarbamates. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 83, 674-684.

histona acetilasas el estado de acetilación de las cadenas laterales de lisina de las proteínas histónicas de la cromatina.¹⁴⁶

Estas enzimas se agrupan en cuatro clases en función de su estructura, distinguiendo las de clase I que incluyen HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8, las de clase IIa que incluyen HDAC4, HDAC5, HDAC7 y HDAC9, las de clase IIb HDAC6 y HDAC10 y la clase IV en la que se encuentra HDAC11.¹⁴⁷ Además de estas clases, las cuales son Zn²⁺-dependientes, existen otras de clase III en las que encontramos enzimas desacetilasas Zn²⁺-independientes NAD⁺-dependientes, con proteínas no histonas como sustratos.¹⁴⁸

Desde hace ya varias décadas se han observado moléculas que presentaban actividad como como inhibidoras de HDAC y capacidad antitumoral como fue el caso del butirato.¹⁴⁹ Durante los últimos años multitud de inhibidores de HDAC has sido estudiados.^{150, 151} Varios de estos compuestos han sido aprobados durante los últimos años por la FDA, como sería el caso del SAHA (Vorinostat), Belinostat y la Romidepsina (**Fig. 34**). La actividad inhibitoria de los ácidos hidroxámicos esta basada en el efecto de estos como quelatantes con el ión Zn²⁺, fundamental en las enzimas HDAC de clase I, II y IV para que se produzca la reacción enzimática.¹⁵² En el caso de la Romidepsina sin embargo existen indicios que explican que la inhibición se produce por el grupo disulfuro,

146 N.L. Wiech, J.F. Fisher, P. Helquist, O. Wiest. Inhibition of histone deacetylases: a pharmacological approach to the treatment of non-cancer disorders. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 257-271.

147. S.Y. Choi, H.J. Kee, L. Jin, Y. Ryu, S. Sun, G.R. Kim, M.H. Jeong. Inhibition of class IIa histone deacetylase activity by gallic acid, sulforaphane, TMP269, and panobinostat. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *101*, 145-154.

148. D. Desai, U. Salli, K.E. Vrana, S. Amin. SelSA, selenium analogs of SAHA as potent histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2044-2047.

149. L.C. Boffa, G. Vidali, R.S. Mann, V.G. Allfrey. Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 3364-3366.

150. D.M. Vigushin, R.C. Coombes. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anti-Cancer Drugs.* **2002**, *13*, 1-13.

151. M. Huang, J. Zhang, C. Yan, X. Li, J. Zhang, R Ling. Histone deacetylase inhibitors as a novel targeted therapy against non-small cell lung cancer: Where are we now and what should we expect? *Anticancer Res.* **2018**, *38*, 37-43.

152. L. Zhang, J. Zhang, Q. Jiang, L. Zhang, Weiguo Song. Zinc binding groups for histone deacetylase inhibitors. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **2018**, *33*, 714-721.

el cual dentro de las células es reducido a tioles, siendo dicho grupo funcional el que interactúa con el Zn^{2+} , inhibiendo a estas enzimas.¹⁵³

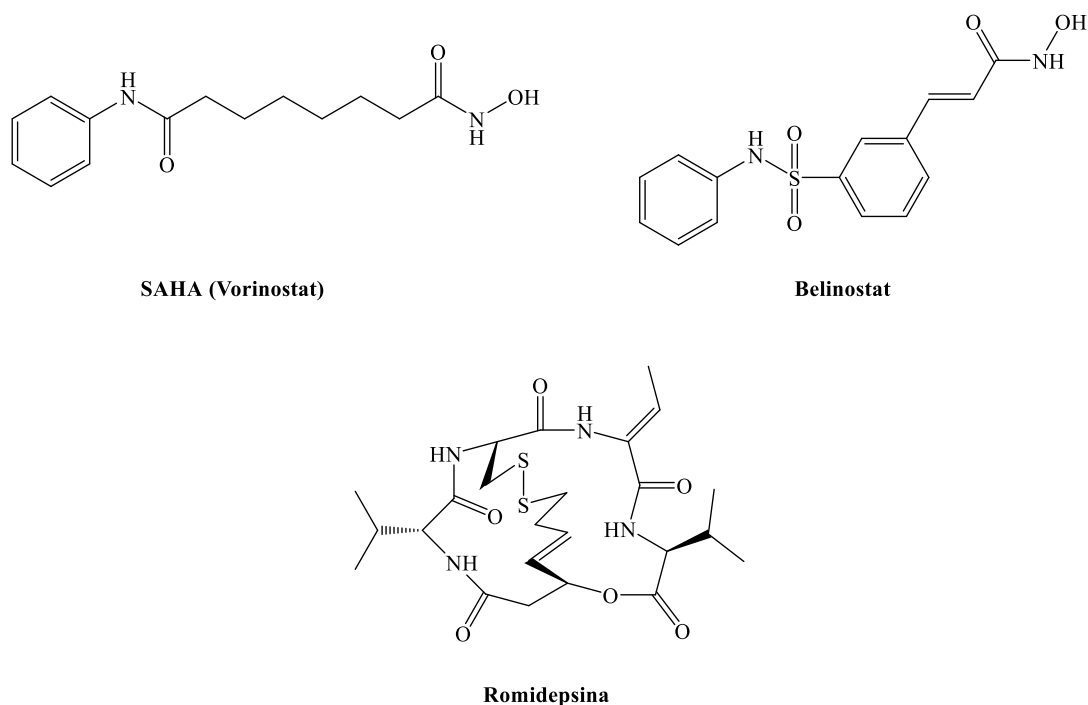


Figura 34. Estructura química de diferentes inhibidores de HDAC

El primero de ellos, en ser aprobado por la FDA fue el Vorinostat en el año 2006 para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T.¹⁵⁴

Además, el Vorinostat presenta cierta actividad también hacia otros tipos de cáncer.¹⁵⁵ Sin embargo tiene ciertas limitaciones debido a su toxicidad, produciéndose

153 R. Furumai, A. Matsuyama, N. Kobashi, K.-H. Lee, M. Nishiyama, H. Nakajima, A. Tanaka, Y. Komatsu, N. Nishino, M. Yoshida, S. Horinouchi. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res.* **2002**, 62, 4916-4921.

154. T. Eckschlager, J. Plch, M. Stiborova, J. Hrabeta. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 1414.

155. R. Gowda, S.V. Madhunapantula, D. Desai, S. Amin, G.P. Robertson. Selenium-containing histone deacetylase inhibitors for melanoma management. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, 13, 756-765.

resultados de interés, no solo observándose interesantes propiedades anticancerígenas frente a cáncer de piel, sino también hacia otro tipos de cáncer.^{148,155,158}

Es por todo esto que este tipo de moléculas presentan un creciente interés en el estudio de nuevos agentes anticancerígenos.

6.2. Resultados y discusión

6.2.1. Síntesis y evaluación de nuevos tio- y selenoderivados de tirosol e hidroxitirosol

6.2.1.1. Síntesis de nuevos tio- y selenoderivados de tirosol e hidroxitirosol

En este apartado se describe la síntesis de nuevos éteres a partir de derivados metoxilados de hidroxitirosol y tirosol, obteniéndose diferentes compuestos monoméricos y diméricos de los mismos. En varias de estas estructuras se añadieron tanto azufre como selenio con objeto de analizar cómo afectan estos a su capacidad de inhibición de la proliferación de células cancerosas.

El objeto de la síntesis de estos compuestos es la combinación de las propiedades citotóxicas del azufre y el selenio junto con la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos. Si bien es cierto que los compuestos presentan metoxilos en lugar de grupos hidroxilos en el anillo aromático, hipotetizamos la posibilidad de que dichos compuestos sean capaces de desalquilarse en el organismo mediante reacciones de *O*-desalquilación (reacciones de fase I) producidas por el citocromo P₄₅₀ (**Fig. 36**).¹

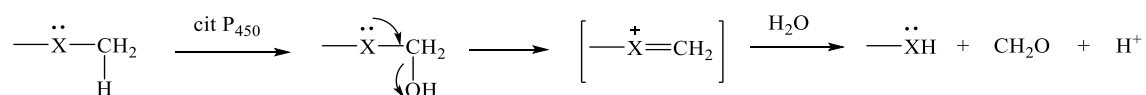


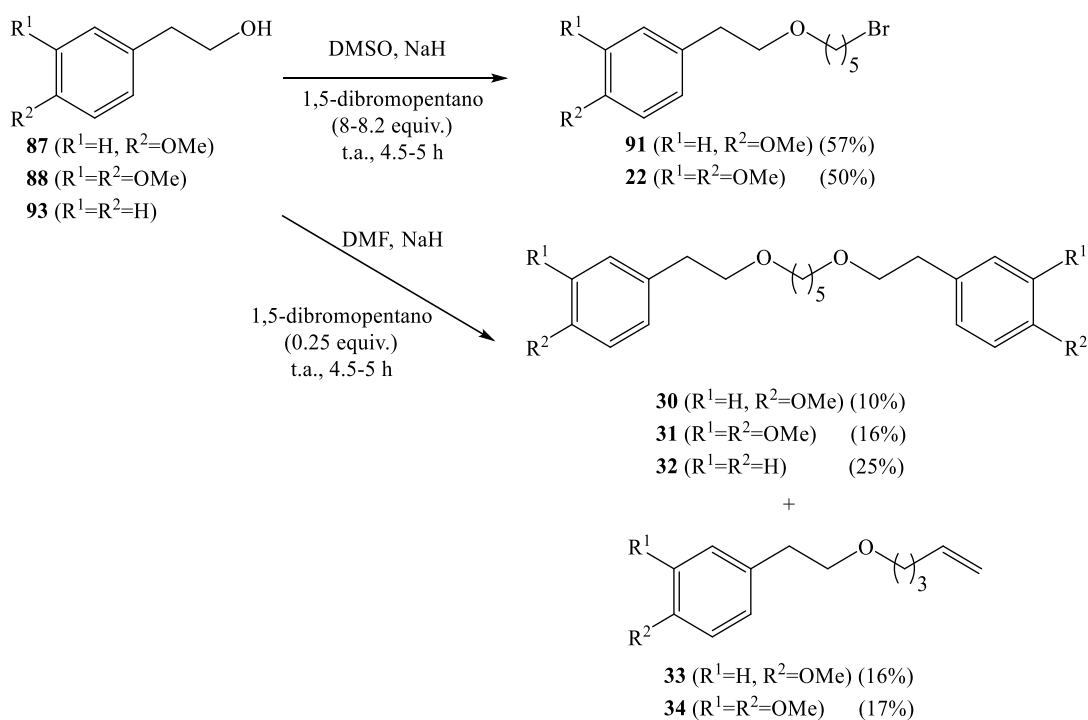
Figura 36. Mecanismo de desalquilación metabólica.¹

158. N. Karelia, D. Desai, J.A. Hengst, S. Amin, SV. Rudrabhatla, J. Yun. Selenium-containing analogs of SAHA induce cytotoxicity in lung cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6816-6819.

Los derivados de hidroxitirosol y tirosol en los cuales los hidroxilos fenólicos se encuentran metilados, presentan además el interés de poseer una mayor lipofilia que pueda conllevar una mayor biodisponibilidad.

Se partió pues de los compuestos **87** y **88**, con los que se trabajó en el capítulo anterior, así como del alcohol **93** con objeto de sintetizar dímeros de los mismos y comparar como influye la presencia de grupos metoxilos en los anillos aromáticos en relación a la capacidad antiproliferativa de estas moléculas frente a diferentes líneas celulares tumorales. Para ello se llevó a cabo una reacción de tipo S_N2 usando 1,5-dibromohexano como agente alquilante.

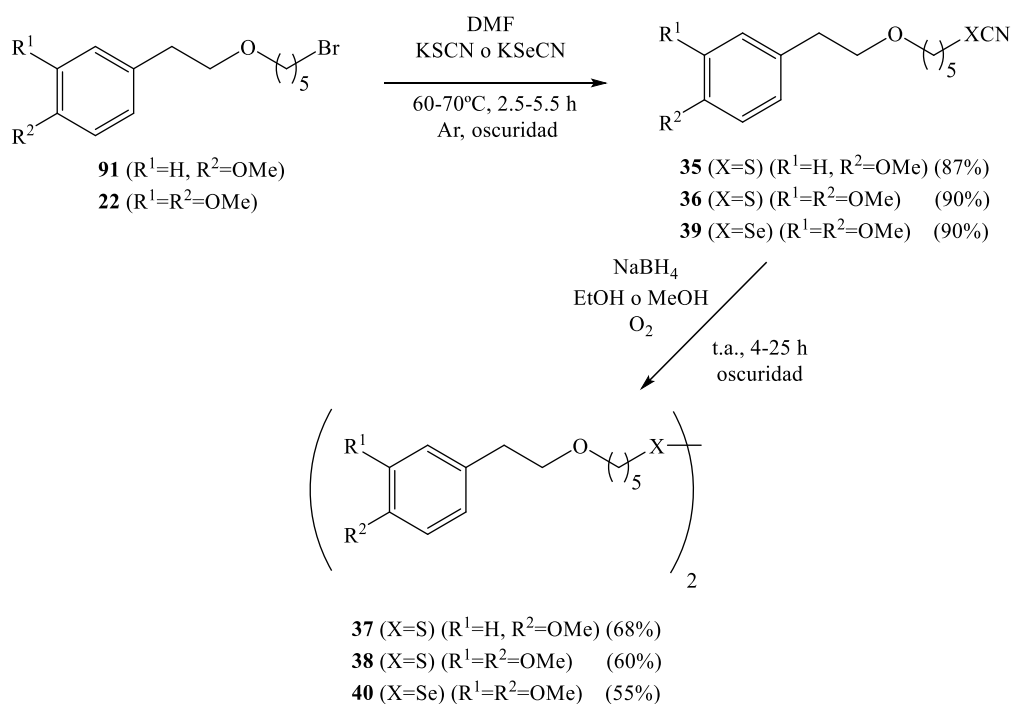
En cuanto a la relación de equivalentes del alcohol y del α,ω-dibromoalcano utilizados, se alteró en función del compuesto de sustitución que se deseara obtener, ya fueran derivados monoméricos (**91** y **22**) o diméricos (**30-32**). En el transcurso de estas reacciones además se observó otro producto que tras aislarse se identificó como un alqueno (**33** y **34**) procedente de una reacción de sustitución en un extremo del dibromoalcano, actuando el alcóxido como nucleófilo, y una reacción de eliminación en el otro extremo de dicha cadena (**Esq. 15**).



Esquema 15. Síntesis de nuevos éteres derivados de 2-(4-metoxifenil)etan-1-ol y 2-(3,4-dimetoxifenil)etan-1-ol

De esta manera se obtuvieron de manera exitosa los nuevos compuestos **30**, **31**, **33** y **34**, así como el compuesto **32** por un ruta sintética distinta a otra ya descrita,¹⁵⁹ con objeto de estudiar si presentan actividad antiproliferativa frente a células tumorales, como influye su diferente estructura con la misma en caso de presentarla y compararla en dicho caso con la de derivados calcogénicos provenientes de los alcoholes **87** y **88**, evaluando la importancia del azufre y el selenio en estas estructuras.

En base a esto se sintetizaron los siguientes tio- y selenoderivados a partir de los haluros de alquilo **91** y **22**. En primer lugar se obtuvieron los tio- y selenocianatos **35**, **36** y **39** mediante reacciones de tipo S_N2 en el cual el nucleófilo usado, KSCN o KSeCN, desplazó al bromo de los compuestos **91** y **22**. La posterior reducción del grupo tiocianato/selenocianato con NaBH₄, condujo al tiolato o selenolato correspondiente, que en presencia de oxígeno atmosférico experimentó una oxidación espontánea para dar lugar a los disulfuros **37** y **38** y al diselenuro **40** (Esq. 16):



Esquema 16. Síntesis de nuevos derivados calcógenos de 2-(4-metoxifenil)etan-1-ol y 2-(3,4-dimetoxifenil)etan-1-ol

159. N. Sakai, Y. Usui, T. Moriya, R. Ikeda, T. Konakahara. One-Pot sequential synthesis of ethers from an aliphatic carboxylic acid and an alcohol by indium-catalyzed deoxygenation of an ester. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 4603-4608.

6.2.1.2. Evaluación de capacidad antiproliferativa

En colaboración con el grupo de investigación del profesor J.M. Padrón, de la Universidad de la Laguna, se llevó a cabo el estudio de la capacidad antiproliferativa de los derivados **30-40** frente a 6 líneas tumorales diferentes, obteniéndose los siguientes resultados expresados en GI₅₀ en unidades μM (**Tabla 13**):

Tabla 13. Actividad antiproliferativa de nuevos derivados de tirosol e hidroxitirosol O-metilados

| Compuesto | A549 | HBL-100 | HeLa | SW1573 | T-47D | WiDr | BJ-hTert |
|-----------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|
| Tirosol | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | NT* |
| Hidroxitirosol | >100 | 82±18 | >100 | 50 ±25 | >100 | >100 | NT* |
| 87 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | NT* |
| 88 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | NT* |
| 30 | 94±9 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | NT* |
| 31 | 28±3 | 81±11 | 48±8 | 42±3 | 39±3 | 39±7 | NT* |
| 32 | >100 | >100 | 90±14 | >100 | >100 | >100 | NT* |
| 33 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | NT* |
| 34 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | NT* |
| 35 | 16±1 | 20±2 | 16±2 | 28±2 | 22±3 | 24±3 | NT* |
| 36 | 27±2 | 25±4 | 14±2 | 21±4 | 18±1 | 21±3 | NT* |
| 37 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | NT* |
| 38 | 31±12 | 80±35 | 37±15 | 91±13 | 48±12 | 75±2 | NT* |
| 39 | 0.74±0.24 | 0.86±0.12 | 0.36±0.07 | 0.96±0.28 | 0.50±0.06 | 0.42±0.06 | >100 |
| 40 | 0.28±0.14 | 0.34±0.08 | 0.068±0.040 | 0.22±0.04 | 0.19±0.08 | 0.16±0.01 | >100 |
| 5-FU | NT* | 5.5 ± 2.3 | 15 ± 4.7 | 4.3 ± 1.6 | 47 ± 18 | 49 ± 6.7 | 5.5 ± 0.5 |
| Cisplatino | 4.9 ± 0.2 | 1.9 ± 0.2 | 2.0 ± 0.3 | 3.4 ± 0.7 | 15 ± 2.3 | 26 ± 5.6 | 14 ± 2.4 |

*NT: no testado

A549: cáncer de pulmón

SW1573: cáncer de pulmón

BJ-hTert: fibroblasto humano (célula sana) inmortalizado

HBL-100: cáncer de mama

T-47D: cáncer de mama

HeLa: cáncer cérvico-uterino

WiDr: cáncer de colon

El análisis de las relaciones estructura-actividad permite arrojar las siguientes conclusiones:

Por un lado, resulta claro que es indispensable la presencia de selenio en estas estructuras para la existencia de buenas propiedades antiproliferativas. Así pues, pese a no presentar estructuras del todo similares, puede compararse la actividad del compuesto **31**, así como la del disulfuro **38** y el diselenuro **40**, observándose en los dos primeros una actividad moderada mientras que en el último podemos apreciar una actividad antiproliferativa muy marcada. El selenocianato **39** y su diselenuro **40** mostraron actividades comprendidas en el rango nanomolar-submicromolar para todas las líneas celulares ensayadas.

Además, la incorporación de un sistema o-dimetoxi en el anillo aromático de los dímeros permite incrementar sustancialmente la actividad, por ejemplo **30** vs. **31** y **37** vs. **38**, que pasan de poseer valores de GI₅₀ superiores a 100 µM a exhibir actividades moderadas.

Por otro lado, si bien para los tio-derivados se observa una disminución de la actividad al pasar del tiocianato al correspondiente disulfuro (**35**, **36** vs. **37**, **38**), se observó la tendencia contraria para el caso de los selenoisómeros **39** y **40**, donde para este último se obtuvo un incremento de actividad comprendido entre 2.5-5.3 veces.

Es importante destacar que los valores de actividad para los selenoderivados **39** y **40** son hasta 200 veces mejores a los obtenidos en los fármacos de referencia (5-FU, cisplatino). Además, a diferencia de estos dos fármacos de referencia, no producen inhibición del crecimiento celular de células humanas sanas (BJ-hTert) apreciable a una concentración de 100 µM, es decir, muestran una excelente selectividad hacia células tumorales (**tabla 14**).

Tabla 14. Índice de selectividad en ensayos antiproliferativos en los cabezas de serie 39 y 40

| Compuesto | IS* | | | | | |
|------------|------|---------|-------|--------|-------|------|
| | A549 | HBL-100 | HeLa | SW1573 | T-47D | WiDr |
| 39 | >135 | >116 | >278 | >104 | >200 | >238 |
| 40 | >357 | >294 | >1471 | >455 | >526 | >625 |
| 5-FU | NT** | 1.0 | 0.37 | 1.3 | 0.11 | 0.11 |
| Cisplatino | 2.9 | 7.4 | 7.0 | 4.1 | 0.93 | 0.54 |

*IS: índice de selectividad (GI₅₀ (célula sana)/ GI₅₀ (célula tumoral))

**NT: no testado

6.2.2. Síntesis y evaluación de nuevos tio- y selenoderivados de biotina

6.2.2.1. Síntesis de nuevos tio- y selenoderivados de biotina

Como se mencionó con anterioridad, la necesidad de un aporte vitamínico extra para las células tumorales debido a su rápida velocidad de multiplicación hace que en la membrana celular aparezcan sobreexpresado ciertos receptores. En determinados tipos de cáncer aparecen sobreexpresados receptores de D-biotina o vitamina H, como sería el caso en las células de cáncer de pulmón A549, cáncer cérvico-uterino HeLa, cáncer de colon Colo-26, ovario ID8 o riñón RD0995 entre otros.^{137,160,161}

En estudios realizados, mediante la unión de un fragmento fluoróforo (fluoresceína) a la biotina (**Fig. 37**), se ha demostrado que efectivamente la biotina es capaz de atravesar la membrana celular y entrar en determinadas células cancerosas via endocitosis, produciéndose con posterioridad la liberación de los fármacos unidos a esta molécula en el interior de dichas células.¹³⁷

160. D. Zhang, J. Zhang, P. Lv, Y. Zhao, X. Liao, C. Gao, B. Yanga. Biotin-functionalized targeting anti-tumor complex based on β -cyclodextrin and methotrexate. *J. Drug. Deliv. Sci. Techno.* **2019**, *49*, 152-161.

161. W.X. Ren, J. Han, S. Uhm, Y.J. Jang, C. Kang, J.-H. Kim, J.S. Kim. Recent development of biotin conjugation in biological imaging, sensing, and target delivery. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10403-10418.

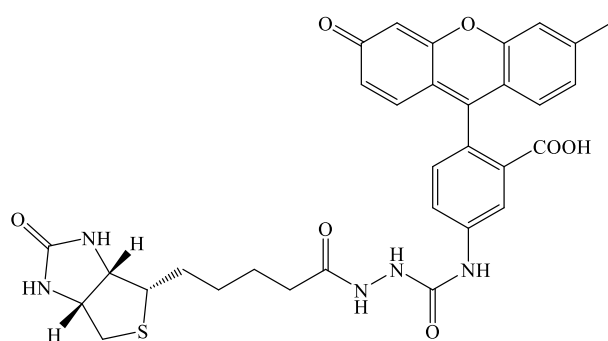


Figura 37. Derivado de biotina con fluoresceína

Estos resultados han estimulado en los últimos años la preparación de diferentes derivados de biotina que presentan propiedades anticancerígenas. Ejemplo de ellos serían los derivados del antineoplásico paclitaxel,^{162,163} como el sintetizado por S. Chen *et al.*¹⁶⁴, los derivados de la gemcitabina^{165,166} como los sintetizados por S. Maiti *et al.*¹⁶⁷ o los derivados de la doxorubicina¹⁶⁸ como los preparados por S. Park *et al.*¹⁶⁹ (**Fig. 38**).

162. <https://www.vademecum.es/principios-activos-paclitaxel-l01cd01> Revisado el 11/1/2020.

163. D. Gischewski, M. Manzano, V. Faria, L. Barbosa, L.E. Quintas. Antagonistic anticancer effect of paclitaxel and digoxin combination. *Anticancer Res.* **2018**, 38, 219-225.

164. S.Chen, X. Zhao, J. Chen, J. Chen, L. Kuznetsova, S.S. Wong, I. Ojima. Mechanism-based tumor-targeting drug delivery system. Validation of efficient vitamin receptor-mediated endocytosis and drug release. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 979-987.

165. <https://www.vademecum.es/principios-activos-gemcitabina-l01bc05> Revisado el 11/1/2020.

166. S. Noble, K.L. Goa. Gemcitabine. A review of its pharmacology and clinical potential in non-small-cell lung cancer and pancreatic cancer. *Drugs.* **1997**, 54, 447-472.

167. S. Maiti, N. Park, J.H. Han, H.M. Jeon, J.H. Lee, S. Bhuniya, C. Kang, J.S. Kim. Gemcitabine-coumarin-biotin conjugates: a target specific theranostic anticancer prodrug. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 4567-4572.

168. J. Armstrong, C.R. Dass. Doxorubicin action on mitochondria: relevance to osteosarcoma therapy? *Curr. Drug Targets.* **2018**, 19, 432-438.

169. S. Park, E. Kim, W.Y. Kim, C. Kang, J.S. Kim. Biotin-guided anticancer drug delivery with acidity-triggered drug release. *Chem. Comm.* **2015**, 51, 9343-9345.

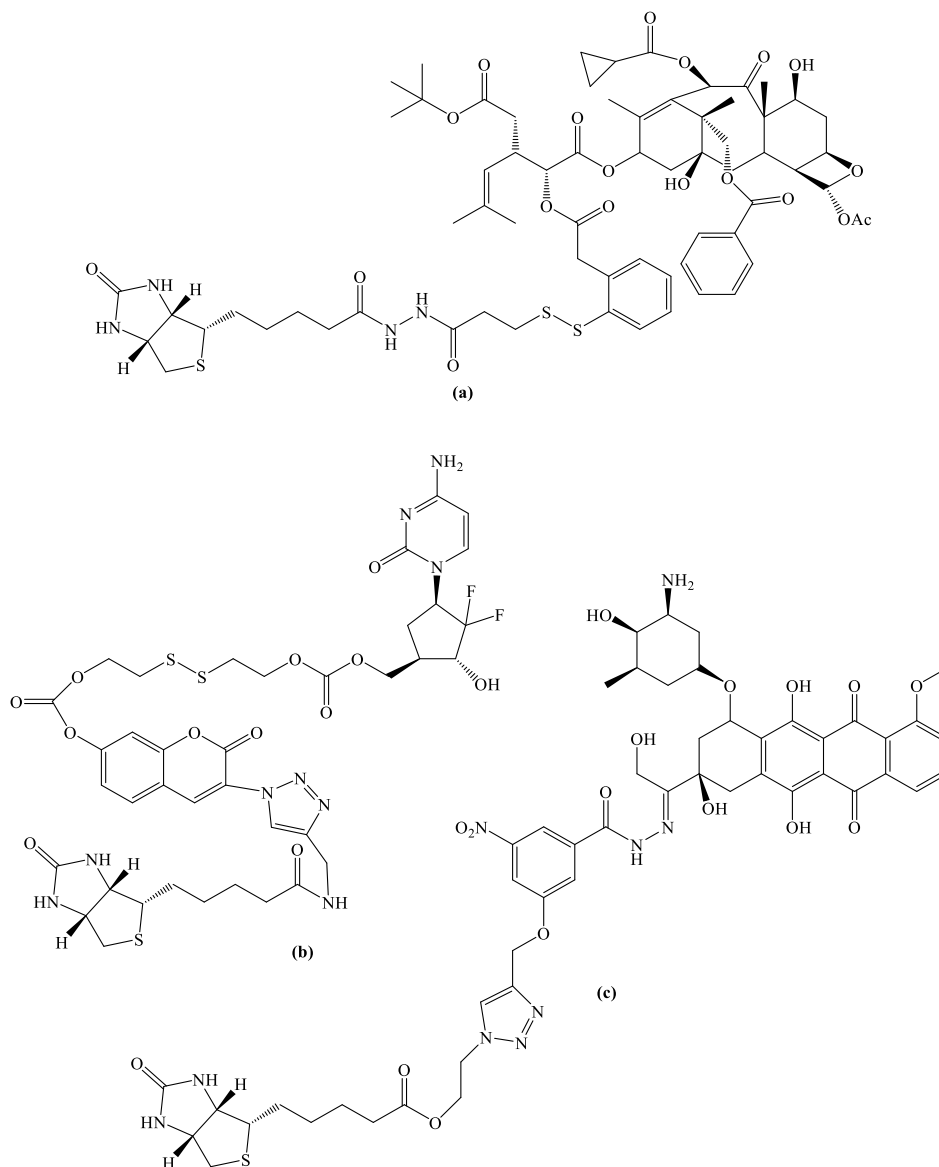


Figura 38. Derivado de biotina de paclitaxel (a), gemcitabina (b) y doxorubicina (c).

En base a estos estudios, en esta segunda parte del segundo capítulo de la presente Tesis Doctoral se sintetizaron una serie de derivados de biotina con el objetivo de desarrollar nuevos agentes antiproliferativos dotados de una mejor selectividad hacia las células tumorales. Debido a los excelentes valores de actividad antiproliferativa obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación en compuestos organocalcógenos, se decidió preparar híbridos de biotina con fragmentos que contuvieran azufre o selenio. De esta forma, la biotina actuaría como vehículo selectivo hacia las células tumorales, mientras que el fragmento organocalcógeno aportaría la actividad antiproliferativa (**Fig. 39**).

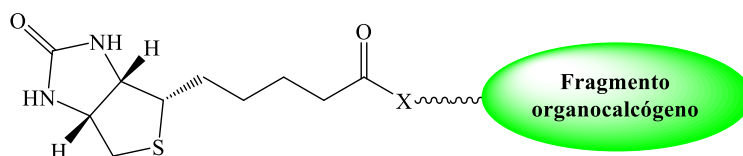


Figura 39. Estructura general de nuevos derivados de biotina

En el diseño de los derivados preparados se han incluido numerosas funciones organocalcógenas (isotiocianato, tiosemicarbazona, disulfuro, tio- y selenocianato y tio- y selenourea) modificándose en algunos casos el tipo y longitud del espaciador, así como ciertos sustituyentes del farmacóforo empleado. Todo esto nos permitió preparar una amplia librería de compuestos derivados de biotina.

Como inicio para nuestra familia de compuestos, se partió de las estructuras de diferentes tio- y selenosemicarbazonas preparadas en nuestro grupo de investigación previamente (**Fig. 40**). Este tipo de productos, han sido descritos en nuestro grupo como buenos agentes antiproliferativos, alcanzándose en algunos de ellos actividades en el rango micromolar bajo, obteniéndose mejores valores que los de los fármacos de referencia cisplatino y 5-FU.¹³²

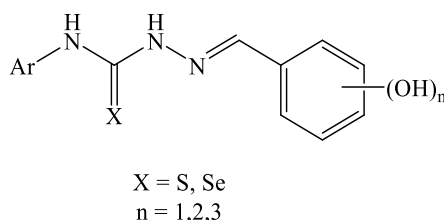
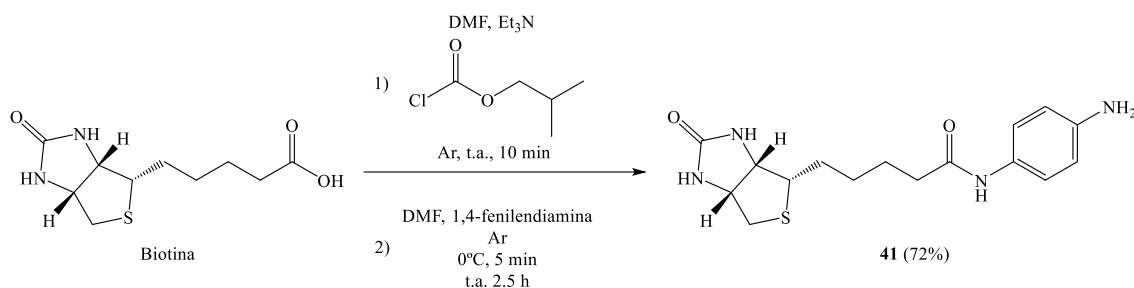


Figura 40. Estructura general de tio y selenosemicarbazonas tomadas como referencia

Debido a estos buenos resultados, se buscó sintetizar primero diferentes tio- y selenosemicarbazonas derivadas de biotina, comenzándose por los compuestos de azufre. Para ello se planteó en primer lugar usar como espaciador entre la D-biotina y el fragmento organocalcógeno la 1,4-fenilendiamina, siendo necesaria la formación de la amida correspondiente (**41**) mediante una reacción de tipo S_NAc . Dicha amida se obtuvo mediante una ruta sintética diferente a otra ya existente. La activación del grupo ácido de

la biotina transformándolo en un haluro de acilo fue descartado, pues al ser el derivado de ácido más reactivo es bastante inestable y resulta difícil trabajar con él. Por ello, se optó por formar un anhídrido mixto que posteriormente al recibir el ataque nucleofílico de la 1,4-fenilendiamina de manera selectiva sobre el carbono carbonílico de la biotina, daría lugar a la correspondiente amida. Se usó para ello el método empleado por Zheng *et al.*¹⁷⁰ para unir biotina y ácido γ -aminobutírico, obteniéndose en nuestro caso el compuesto **41** (Esq. 17).



Esquema 17. Síntesis de amida derivada de biotina a partir de fenilendiamina

Al formar el anhídrido mixto tras tratar la biotina con cloroformiato de isobutilo en presencia de Et₃N, este es adicionado a una de disolución de 1,4-fenilendiamina disuelta en DMF anhidra, dándose de manera regioselectiva la reacción de sustitución nucleofílica acílica sobre el carbono carbonílico de la biotina (carbono más electrófilo), obteniéndose el compuesto **41**, mediante una metodoligía diferente a las ya descritas,^{171, 172} con un rendimiento del 72%.

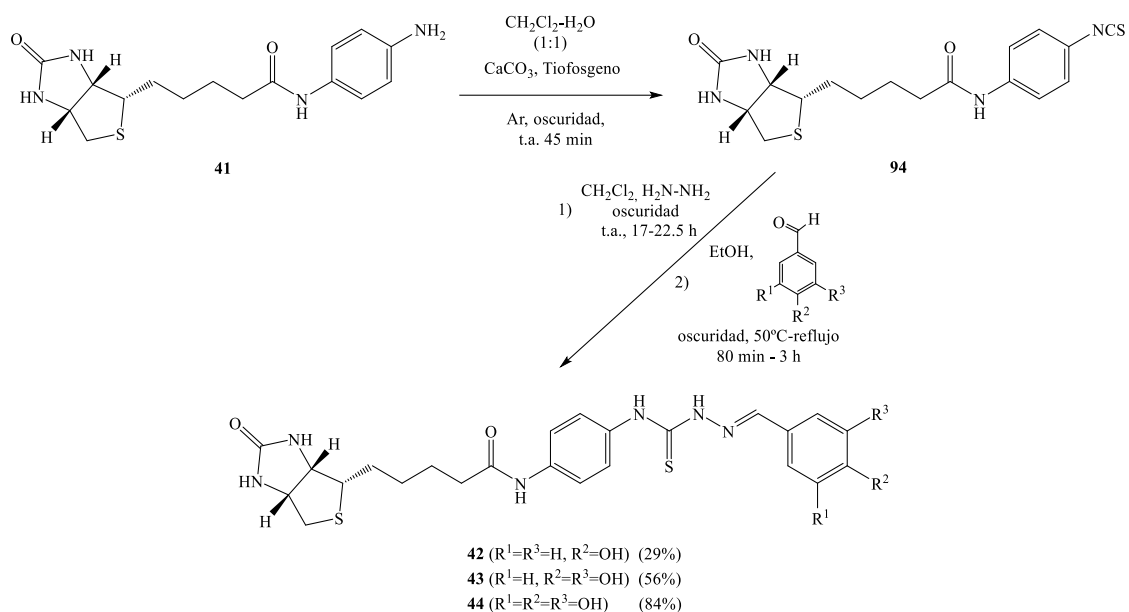
Cabe añadir además que no se produce una doble S_NAc en la que los dos grupos amino de la fenilendiamina actúen como nucleófilos, debido a que al formarse la amida en el compuesto **41**, el grupo amino libre de dicho compuesto reduce su nucleofilia por efecto -R.

170. Y.-G. Zheng, X.-Q. Wu, J. Su, P. Jiang, L. Xu, J. Gao, B. Cai, M. Ji. Design and synthesis of a novel photoaffinity probe for labelling EGF receptor tyrosine kinases. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 954-959.

171. H.-G. Lerchen, H.-U. Siegmund, D. Immler, A. Schumacher, D. Auriel. WO 2003040288 A2, **2003**.

172. A. Wibowo, E.C. Peters, L.C. Hsieh-Wilson. Photoactivatable glycopolymers for the proteome-wide identification of fucose- α (1-2)-galactose binding proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9528-9531.

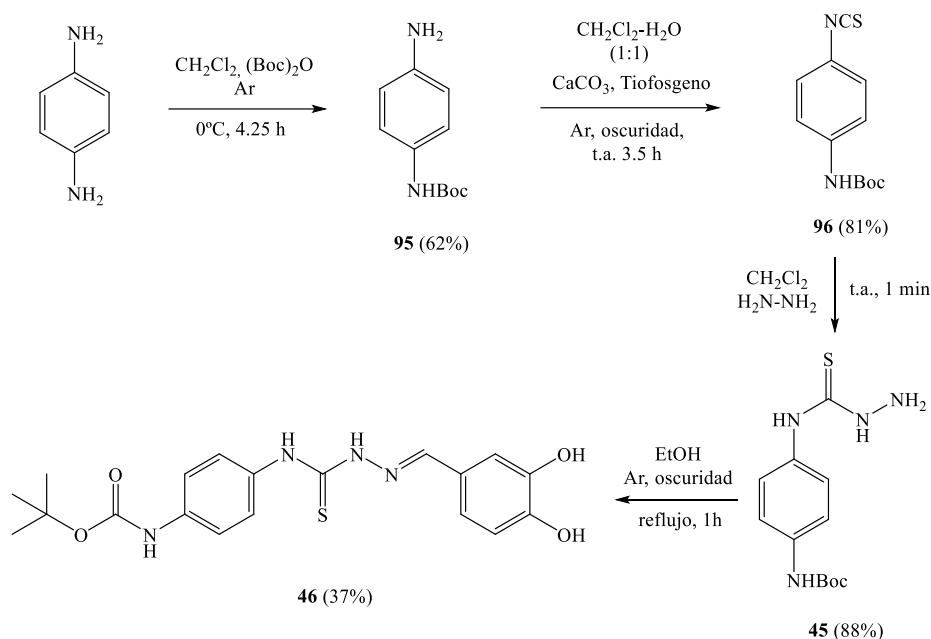
Una vez obtenido el compuesto **41**, se procedió a la obtención del correspondiente isotiocianato (**94**) mediante una metodología diferente a la ya descrita,¹⁷¹ tratando **41** con tiofosgeno en un medio trifásico (CH₂Cl₂-H₂O, CaCO₃). Tras ello, el compuesto **94** es tratado con hidracina dando lugar esta mediante un ataque nucleófilo a la correspondiente tiosemicarbazida no aislada, que mediante una reacción de condensación con diferentes aldehídos aromáticos dio lugar a las tiosemicarbazonas **42-44** (Esq.18).



Esquema 18. Síntesis de tiosemicarbazonas fenólicas derivadas de biotina

Con objeto de analizar la posible influencia del fragmento de biotina en las propiedades biológicas, se sintetizó también una tiosemicarbazona en la que el fragmento de biotina fue sustituido por un fragmento de Boc. Para ello en primer lugar se protegió la fenilendiamina de manera selectiva en uno de sus dos grupos aminos con anhídrido de Boc utilizando el método descrito por L. Yao *et al.*¹⁷³ Posteriormente se emplearon las mismas condiciones descritas en el **esquema 18** para obtener la correspondiente tiosemicarbazona **46** (Esq. 19).

173. L. Yao, N. Mustafa, E.C. Tan, A. Poulsen, P. Singh, M.-D. Duong-Thi, J.X.T. Lee, P.M. Ramanujulu, W.J. Chng, J.J.Y. Yen, S. Ohlson, B.W. Dymock. Design and synthesis of ligand efficient dual inhibitors of Janus kinase (JAK) and histone deacetylase (HDAC) based on ruxolitinib and vorinostat. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 8336-8357.

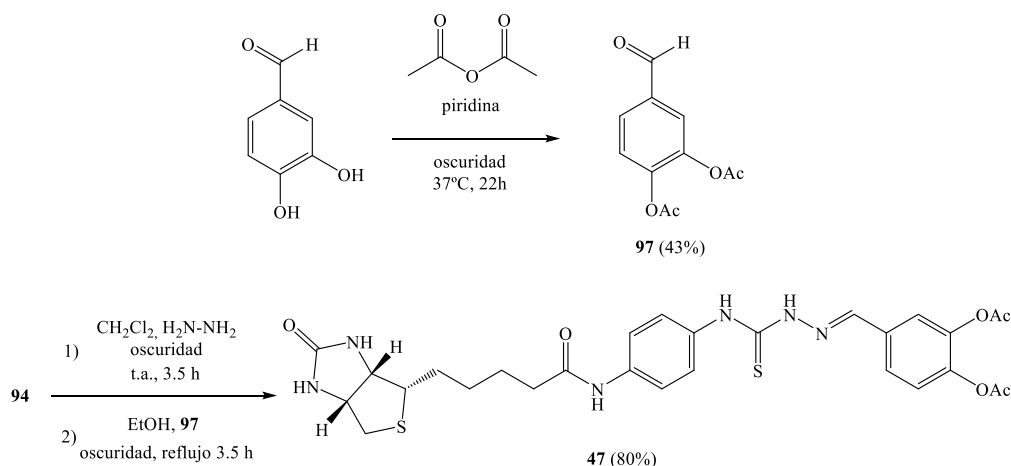


Esquema 19. Síntesis de la tiosemicarbazona 46

Tras la síntesis y evaluación de estos nuevos compuestos se observó que estos no presentaban actividad antiproliferativa en las líneas tumorales investigadas, salvo **46** con una actividad moderada, por lo que se procedió tras ello a sintetizar nuevos derivados cambiando su estructura con respecto a la de los compuestos ya sintetizados.

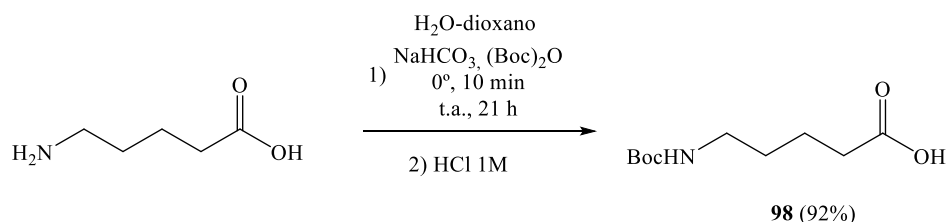
La primera alternativa planteada fue la acetilación de los hidroxilos fenólicos del 3,4-dihidroxibenzaldehído mediante el método descrito por Y. Zhu *et al.*¹⁷⁴ De esta manera tras obtenerse el aldehído **97** y mediante reacción con la tiosemicarbazida resultante de la reacción del isotiocianato **94** con hidracina, se sintetizó exitosamente la tiosemicarbazona **47** con un rendimiento del 80% (**Esq. 20**). Con ello se buscó evaluar si al reducir la polaridad de nuestro compuesto era posible mejorar la capacidad antiproliferativa en células tumorales de este tipo de compuestos, ya que la reducción de la polaridad del fragmento fenólico podría permitir una mayor biodisponibilidad de nuestro compuesto.

174 Y. Zhu, P. Wang, Y. Zhao, C. Yanga, A. Clark, T.C. Leung, X. Chen, S. Sang. Synthesis, evaluation, and metabolism of novel [6]-shogaol derivatives as potent Nrf2 activators. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, 95, 243-254.



Esquema 20. Síntesis de tiosemicarbazona derivada de biotina

Una segunda alternativa de modificación estructural fue la utilización de un espaciador de mayor longitud entre la biotina y el fragmento organocalcógeno que aportara una mayor flexibilidad a la molécula. Para ello se usó ácido 5-aminovalérico, protegiéndose su grupo amino con Boc¹⁷⁵ (**Esq. 21**).

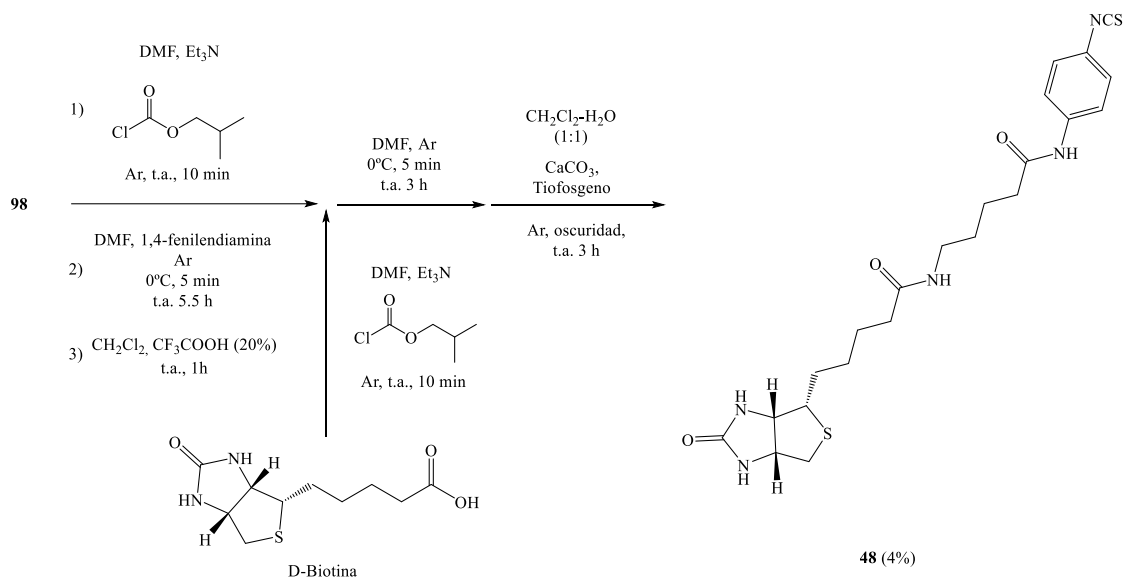


Esquema 21. Síntesis de compuesto 98

Posteriormente se forma la amida correspondiente mediante el uso del cloroformiato de isobutilo para crear un anhídrido mixto que a continuación es atacado de manera selectiva en el carbono carbonílico procedente del ácido aminovalérico por un grupo amino de la 1,4-fenilendiamina. En dicha amida se elimina posteriormente el grupo protector Boc, obteniéndose la 5-Amino-N-(4-aminofenil)pentanamida.

175. M. Grazia, P. Vitale, A. Panella, S. Ferorelli, M. Contino, A. Lavecchia, A. Scilimati. Isoxazole-based-scaffold inhibitors targeting cyclooxygenases (COXs). *Chem. Med. Chem.* **2016**, *11*, 1172-1187.

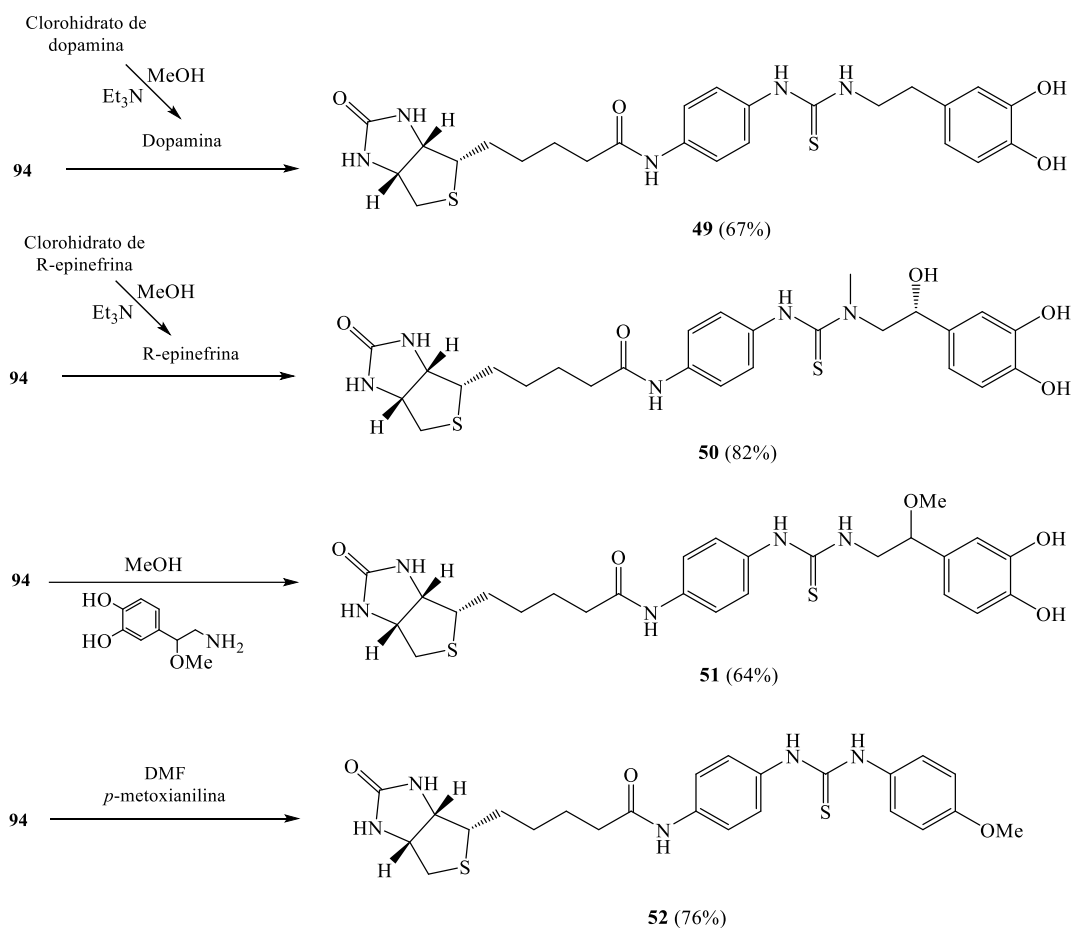
Una vez obtenida esta molécula, y aprovechando la mayor nucleofilia del grupo amino alifático, se llevó a cabo el acoplamiento quimioselectivo de este con la biotina usando el procedimiento basado en el uso del cloroformiato de isobutilo. La posterior reacción del grupo amino aromático con tiofosgeno originó el isotiocianato **48** (Esq. 22). Sin embargo, el posterior intento de obtención de una tiosemicarbazona mediante el tratamiento de **48** con hidracina y posteriormente con 3,4-dihidroxibenzaldehído resultó infructuoso.



Esquema 22. Síntesis del isotiocianato **48**

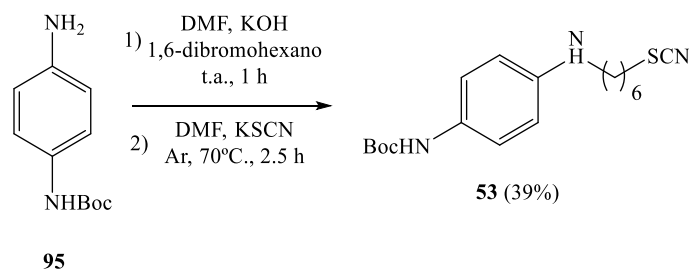
Como tercera opción de modificación estructural, se llevó a cabo la sustitución de la función tiosemicarbazona por una función de tipo tiourea. Así pues, empleando como intermedio clave el isotiocianato **94**, se llevó a cabo el acoplamiento de este con tres catecolaminas (dopamina, *R*-epinefrina, β -metoxidopamina), así como con *p*-metoxianilina, dando lugar a las tioureas **49-52** (**49-51** obtenidas en colaboración con la alumna de trabajo de fin de grado Inés Romero). Los rendimientos obtenidos fueron de buenos a muy buenos (67-82%) (Esq. 23).

6. Síntesis de nuevos derivados organocalcógenos y evaluación de su actividad anticancerígena



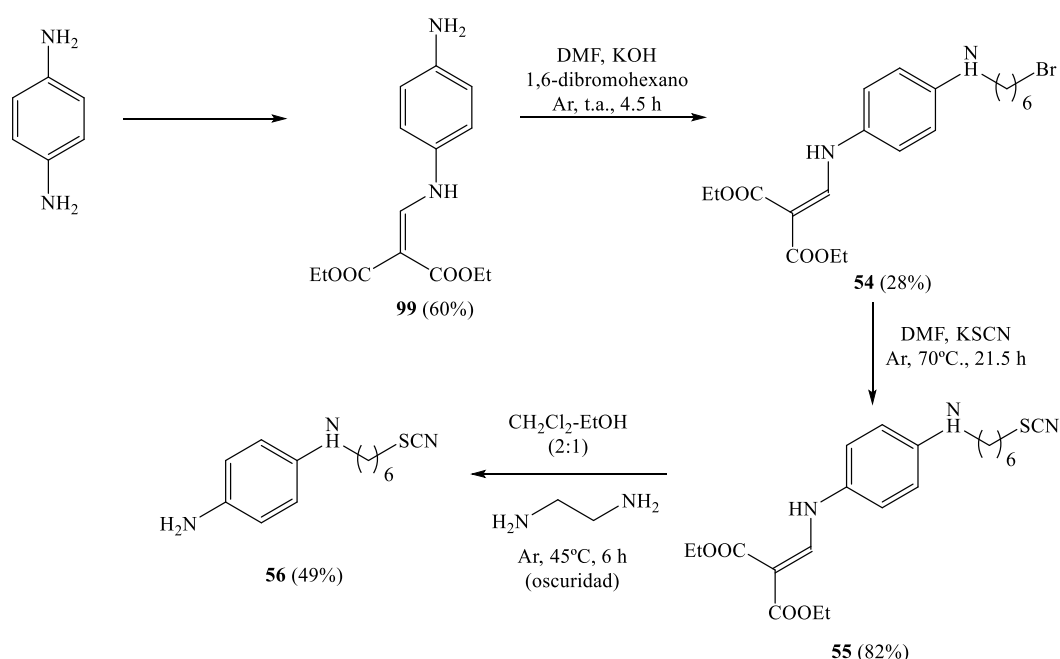
Esquema 23. Síntesis de tioureas derivadas de biotina

Con posterioridad a ello, también se abordó la síntesis de tiocyanatos y disulfuros derivados de biotina. Para ello una primera opción fue partir de 1,4-fenilendiamina que previamente se protegió de manera selectiva en un nitrógeno con (Boc)₂O (compuesto **95**). Tras esto se alquiló el grupo amino libre con un exceso de 1,6-dibromohexano para facilitar la monosustitución, y posteriormente, mediante desplazamiento nucleofílico del segundo bromo con KSCN se obtuvo el tiocianato **53** (Esq. 24).



Esquema 24. Síntesis del tiocianato 53 a partir de 1,4-fenilendiamina

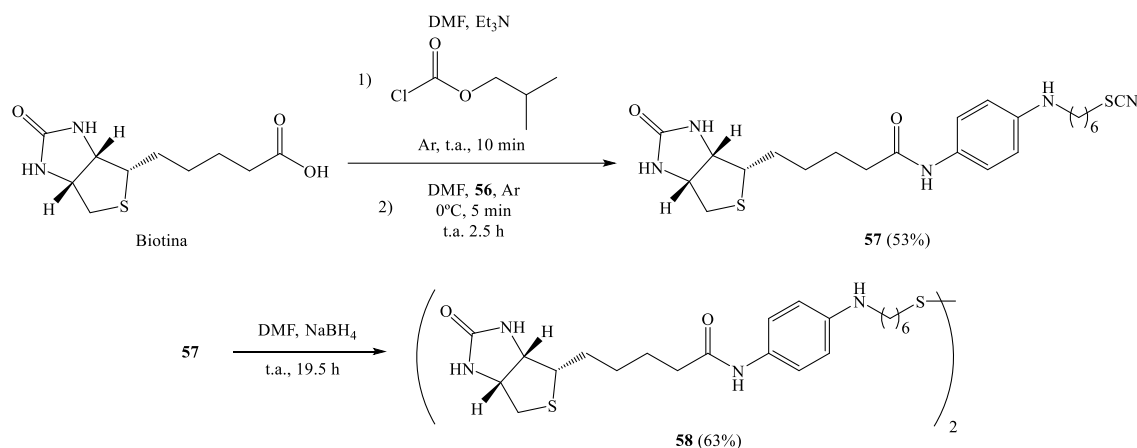
Sin embargo, una vez obtenido **53**, los intentos de eliminar el grupo protector mediante el uso de ácido trifluoroacético (CF_3COOH) fueron infructuosos, ya que se observó degradación del compuesto. Debido a esto se optó por proteger uno de los grupos amino con etoximetilenmalonato de dietilo en forma de enamina.¹⁷⁶ En esta ocasión si se obtuvo de manera exitosa el tiocianato deseado (**56**), mediante alquilación del intermedio **99** con 1,6-dibromohexano, un posterior desplazamiento nucleófilico del bromo restante con KSCN y finalmente mediante eliminación del grupo protector del compuesto **55** usando etilendiamina (**Esq. 25**).



Esquema 25. Síntesis de tiocianato **56** a partir de fenilendiamina

Una vez obtenido el tiocianato **56**, se acopló a un fragmento de biotina mediante el uso de cloroformiato de isobutilo para dar lugar al derivado **57**, el cual tras ser tratado con NaBH_4 en presencia de oxígeno atmosférico, dio lugar al disulfuro simétrico **58** (**Esq. 26**).

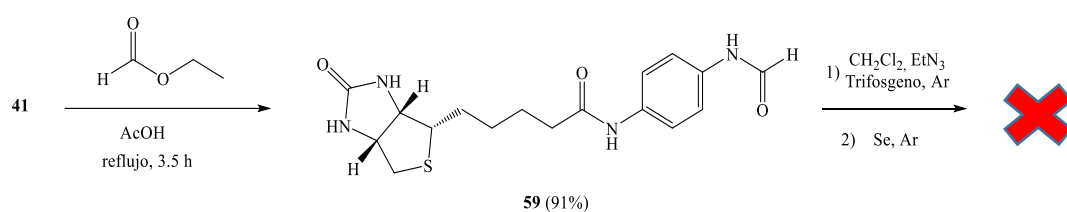
176. A. Ilangoan, R.G. Kumar. 2,2-Bis(ethoxycarbonyl)vinyl (BECV) as a versatile amine protecting group for selective functional-group transformations. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 2938-2943.



Esquema 26. Síntesis de tiocianato y disulfuro derivado de biotina

Por último, se propuso la síntesis de selenoderivados de biotina, con objeto de analizar la actividad antiproliferativa de los mismos y compararla con la de los derivados de azufre de biotina sintetizados.

La primera síntesis propuesta fue la obtención de selenosemicarbazonas. Sin embargo, esta ruta presentó problemas a la hora de sintetizar el isoselenocianato intermedio mediante el método descrito en nuestro grupo de investigación,¹⁷⁷ empleando trifosgeno para la formación de un grupo isonitrilo a partir de una formamida, y posterior adición de selenio negro en polvo para obtener el correspondiente isoselenocianato (**Esq. 27**).



Esquema 27. Intento de síntesis de isoselenocianato derivadas de biotina

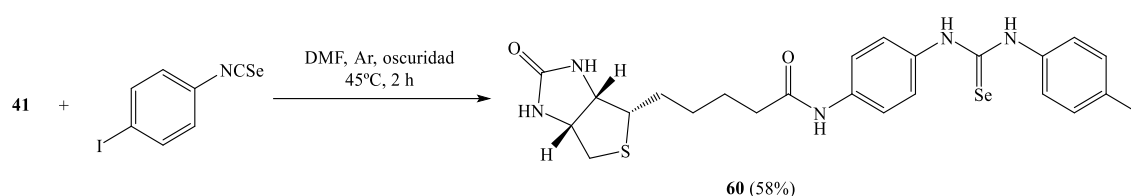
Al tratar de sintetizar el isoselenocianato a partir de la formamida **59**, obtenida a su vez mediante *N*-formilación de la amina **41** con formiato de etilo, se obtuvo una mezcla

177. J.G. Fernández-Bolaños, Ó. López, V. Ulgar, I. Maya, J. Fuentes. Synthesis of *O*-unprotected glycosyl selenoureas. A new access to bicyclic sugar isoureas. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4081-4084.

compleja de compuestos, observándose la desaparición de los picos característicos de la biotina, lo que nos lleva a pensar que en las condiciones de reacción usadas pudo darse la degradación de dicha estructura.

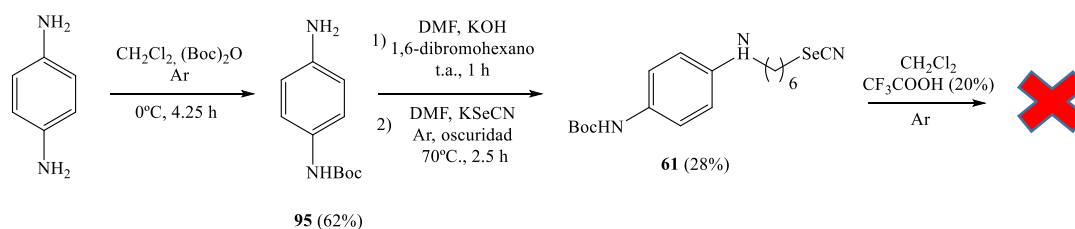
Por ello, se propuso obtener otros derivados de biotina utilizando otros grupos funcionales organoselénicos. Las familias elegidas fueron de tipo selenourea, selenocianato y diselenuro.

Para la selenourea buscada se llevó a cabo el acomplamiento del compuesto **41** con el isoselenocianato proveniente de la *p*-yodoanilina, elegido por la observada buena actividad antiproliferativa frente a células tumorales de *N*-arilselenoureas con grupos halógenos en el anillo aromático,¹²⁵ obteniéndose el compuesto **60** de manera exitosa (**Esq. 28**).



Esquema 28. Síntesis de selenourea derivada de biotina

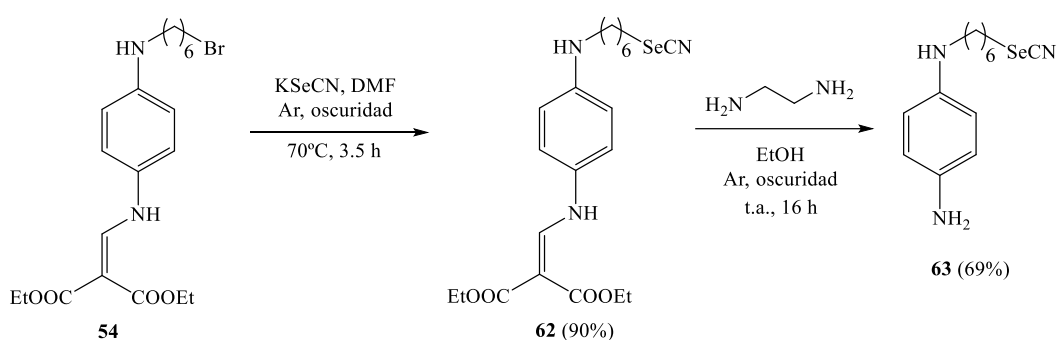
Al igual que ocurrió en el tiocianato **53**, el uso de (Boc)₂O para obtener la fenilendiamina monoprottegida resultó incompatible con la funcionlización del selenocianato **61**, obtenido por alquilación del derivado **95** con 1,6-dibromohexano seguido del desplazamiento nucleofílico posterior del segundo átomo de bromo con KSeCN. En el intento de desprotección del compuesto **61** con ácido trifluoroacético se observó la degradación del compuesto de selenio (**Esq. 29**).



Esquema 29. Síntesis de selenocianato 61 derivado de 1,4-fenilendiamina

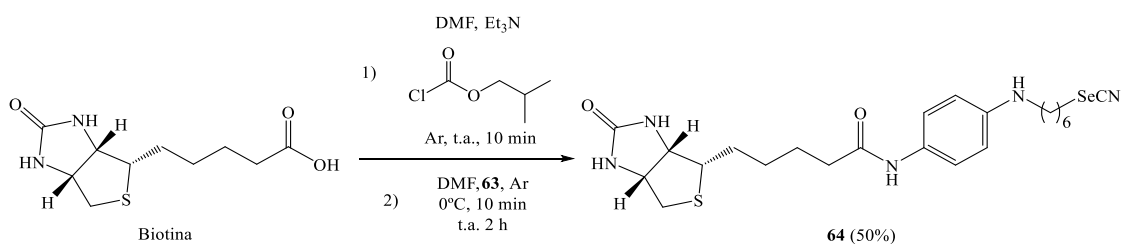
6. Síntesis de nuevos derivados organocalcógenos y evaluación de su actividad anticancerígena

Es por ello que al igual que para la obtención de tiocianatos derivados de biotina, fue necesaria la protección de la 1,4-fenilendiamina con etoximetilnamalonato de dietilo, seguido de la alquilación de dicho compuesto protegido con 1,6-dibromohexano para obtener el compuesto **54**, el cual tras una posterior sustitución del átomo de bromo por el grupo -SeCN dio lugar al correspondiente selenocianato **62**. La desprotección de dicho compuesto con etilendiamina transcurrió de manera satisfactoria a temperatura ambiente, escogiéndose dicha temperatura debido a que en este caso al llevar a cabo la reacción de desprotección con calentamiento, tenía lugar la degradación del selenocianato. (**Esq. 30**).



Esquema 30. Síntesis del selenocianato 63 derivado de 1,4-fenilendiamina

Una vez obtenido el compuesto **63** se unió a un fragmento de biotina usando las condiciones descritas con anterioridad, empleándose cloroformiato de isobutilo, obteniéndose de manera exitosa el compuesto **64** con un rendimiento del 50%. (**Esq. 31**). Sin embargo, la obtención del correspondiente diselenuro (al igual que se hizo con el derivado análogo de azufre para obtener **58**), empleándose NaBH₄ en presencia de oxígeno atmosférico, no fue posible debido a la formación de mezclas complejas observadas por cromatografía de capa fina.



Esquema 31. Síntesis del selenocianato 64 derivado de biotina

Cabe añadir la similitud estructural existente entre los compuestos **53**, **55-58**, **61-64** y los inhibidores de histona desacetilasa SelSA-1 (5-fenilcarbamoilpentilselenocianato) y SelSA-2 (bis(5-fenilcarbamoilpentil)diselenuro) (**Fig. 41**), siendo la inhibición de dicha enzima importante para combatir ciertos tipos de cáncer,¹⁴⁸ lo cual incrementa el interés que presentan estos nueve compuestos.

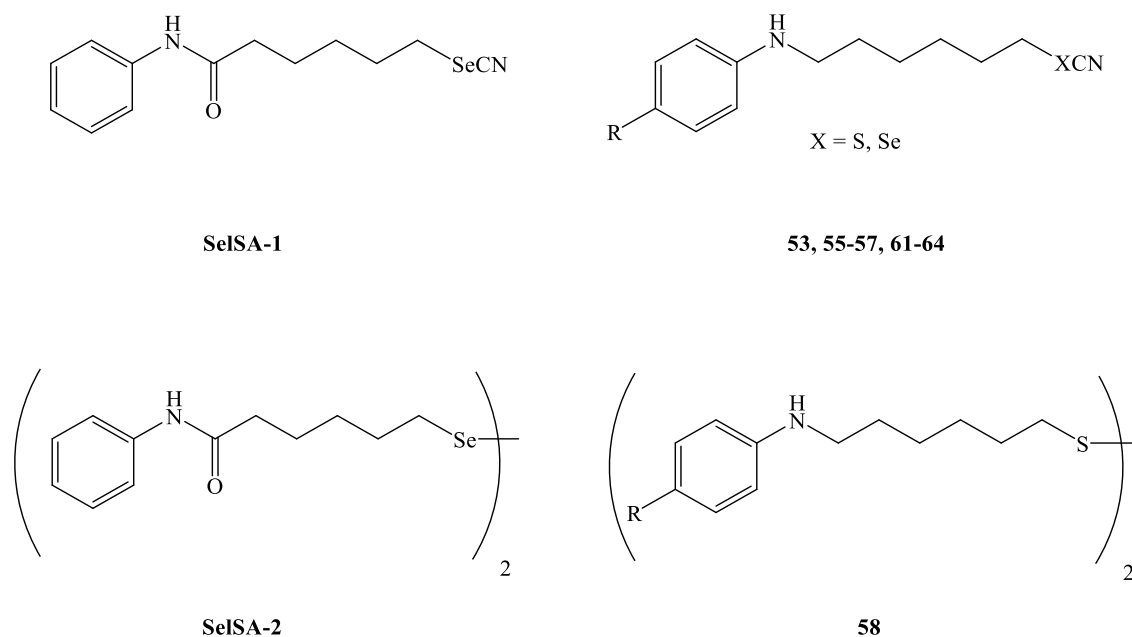


Figura 41. Similitud estructural entre SelSA-1 y SelSA-2 y los nuevos compuestos 53, 55-58, 61-64

6.2.2.2. Evaluación de capacidad antiproliferativa

En colaboración con el grupo de investigación del profesor J.M. Padrón, de la Universidad de la Laguna, se llevó a cabo el estudio de la capacidad antiproliferativa de los compuestos sintetizados en este apartado. Dicha actividad se evaluó para 6 líneas tumorales diferentes, expresándose en forma de GI_{50} (μM). Para aquellos que presentaron valores destacables frente a las líneas celulares tumorales analizadas, se evaluó como afectaban a la proliferación de células no tumorales (fibroblastos humanos). Los valores obtenidos se muestran a continuación (**Tabla 15**), incluyéndose en ella los de los compuestos 5-FU y cisplatino con objeto de llevar a cabo una comparación con dichos agentes quimioterápicos.

Tabla 15. Ensayos antiproliferativos en nuevos derivados organocalcógenos de biotina y sus intermedios de reacción

| Compuesto | A549 | HBL-100 | HeLa | SW1573 | T-47D | WiDr | BJ-hTert |
|------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| 41 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | *NT |
| 94 | 38±5 | 20±7 | 18±3 | 25±2 | 25±7 | 25±4 | *NT |
| 42 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | *NT |
| 43 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | *NT |
| 44 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | *NT |
| 45 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | *NT |
| 46 | 17±1 | 25±4 | 16±1 | 23±3 | 25±4 | 20±3 | *NT |
| 47 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | *NT |
| 48 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | *NT |
| 49 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | *NT |
| 50 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | *NT |
| 51 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | *NT |
| 52 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | *NT |
| 53 | 14±2 | 16±3 | 19±4 | 16±3 | 18±6 | 29±7 | *NT |
| 55 | 2.7±0.6 | 3.5±1.6 | 3.4±0.6 | 1.8±0.6 | 4.0±1.4 | 5.0±0.6 | >100 |
| 56 | 2.8±1.0 | 4.0±0.9 | 4.7±0.7 | 2.2±0.6 | 17±4 | 15±3 | >100 |
| 57 | 29±11 | 19±1 | 6.3±1.7 | 22±2 | 34±4 | 36±7 | *NT |
| 58 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | *NT |
| 60 | 22±3 | 23±10 | 20±3 | 24±7 | 28±9 | 39±4 | *NT |
| 61 | 3.9±0.5 | 4.7±1.1 | 2.4±0.4 | 2.5±0.9 | 3.6±1.2 | 5.4±0.7 | >100 |
| 62 | 3.5±0.6 | 12±2 | 13±3 | 2.5±1.2 | 16±4 | 18±6 | >100 |
| 63 | 0.21±0.00 | 0.18±0.01 | 0.086±0.019 | 0.13±0.03 | 0.026±0.011 | 0.12±0.06 | 91±11 |
| 64 | 0.066±0.026 | 0.051±0.018 | 0.013±0.005 | 0.017±0.009 | 0.059±0.020 | 0.023±0.011 | >100 |
| 5-FU | NT* | 5.5 ± 2.3 | 15 ± 4.7 | 4.3 ± 1.6 | 47 ± 18 | 49 ± 6.7 | 5.5 ± 0.5 |
| Cisplatino | 4.9 ± 0.2 | 1.9 ± 0.2 | 2.0 ± 0.3 | 3.4 ± 0.7 | 15 ± 2.3 | 26 ± 5.6 | 14 ± 2.4 |

*NT: no testado

A549: cáncer de pulmón

SW1573: cáncer de pulmón

BJ-hTert: fibroblasto humano (célula sana) inmortalizado

HBL-100: cáncer de mama

T-47D: cáncer de mama

HeLa: cáncer cérvico-uterino

WiDr: cáncer de colon

6. Síntesis de nuevos derivados organocalcógenos y evaluación de su actividad anticancerígena

Como puede observarse en la tabla, existe una gran diversidad de valores, observándose desde valores de $GI_{50} > 100 \mu M$ en algunos compuestos, hasta valores situados en el rango nanomolar.

Se obtiene de los valores obtenidos la siguiente información:

Por un lado, se observa que los derivados de azufre de biotina tienen una actividad antiproliferativa prácticamente inexistente a las concentraciones empleadas, encontrándose valores moderados para los derivados **94** y **57**.

La alteración de la polaridad de las tiosemicarbazonas (**43** vs. **47**) o el cambio del grupo funcional tiosemicarbazona por otro diferente (tioureas **49-52**, tiocianato **57** o disulfuro **58**) no conduce a una mejora de la actividad de este tipo de compuestos salvo en el compuesto **57**, que como se dijo antes presentó una actividad moderada. Sin embargo, se observa en algunos intermedios o análogos de los tioderivados de biotina una cierta actividad (**46**, **55**, **56**) concluyéndose que de alguna manera la presencia de biotina en estos derivados con azufre pueda mermar su actividad como agentes antiproliferativos en células tumorales.

Sin embargo, al cambiar el calcógeno usado y emplear selenio en los derivados de biotina, observamos una mejora sustancial de la capacidad antiproliferativa de dichos compuestos, obteniéndose la selenourea **60** con una actividad moderada pero superior a la de las tioureas sintetizadas (**49-52**), y el selenocianato **64**, con una actividad excelente situada en el rango nanomolar, siendo entre 372 y 1565 veces mejor a la del tiocianato **57**. Además, se obtuvieron una serie de selenocianatos intermedios que cabe destacar, presentando una actividad antiproliferativa frente a células tumorales desde buena (**61** y **62**) hasta excelente (**63**).

En aquellos compuestos con los valores de GI_{50} , inferiores a $10 \mu M$, se evaluó también su influencia en el crecimiento de células humanas sanas. Con ello se observó que en dichos compuestos (**55**, **56** y **61-64**) existe una selectividad desde buena hasta excelente, puesto que se observaron valores de $GI_{50} > 100 \mu M$ para células humanas sanas (BJ-hTert) en todos ellos, a excepción del compuesto **63** cuya $GI_{50} = 91 \pm 11 \mu M$, el cual sigue resultando un valor muy bueno. De todos ellos, destacan de manera clara los derivados **63** y **64**, con una actividad antitumoral elevada y altamente selectiva, obteniéndose en ellos índices de selectividad desde valores de 433 hasta valores mayores a 7692 (**Tabla 16**).

Tabla 16. Índice de selectividad en ensayos antiproliferativos en los cabezas de serie 55, 56, 61-64

| Compuesto | IS* | | | | | |
|-------------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | A549 | HBL-100 | HeLa | SW1573 | T-47D | WiDr |
| 55 | >37 | > 29 | >29 | >56 | >25 | >20 |
| 56 | >36 | >25 | >21 | >45 | >5.9 | >6.7 |
| 61 | >26 | >21 | >42 | >40 | >28 | >19 |
| 62 | >29 | >8.3 | >7.7 | >40 | >6.3 | >5.6 |
| 63 | 433 | 506 | 1058 | 700 | 3500 | 758 |
| 64 | >1515 | >1961 | >7692 | >5882 | >1695 | >4348 |
| 5-FU | NT** | 1.0 | 0.37 | 1.3 | 0.11 | 0.11 |
| Cisplatino | 2.9 | 7.4 | 7.0 | 4.1 | 0.93 | 0.54 |

*IS: índice de selectividad (GI₅₀ (célula sana)/ GI₅₀ (célula tumoral))

**NT: no testado

7. CONCLUSIONES

- 1) La obtención de nuevos tioderivados de tacrina se llevó a cabo de manera exitosa, obteniéndose en la evaluación biológica de los compuestos **3** y **4** excelentes valores como inhibidores selectivos de acetilcolinesterasa en modelos animales empleados comúnmente en este ensayo. De ellos, destacó el compuesto **3**, en el cual se observó una elevada actividad como inhibidor de AChE humana, 257 veces más potente que la de la tacrina usada como referencia.
- 2) Del compuesto **3** se evaluó su actividad como inhibidor de la formación de placas β -amiloides, su neurotoxicidad y su capacidad antioxidante, obteniéndose valores muy positivos en dichos ensayos, lo que hace interesante dicho compuesto como potencial fármaco anti-Alzheimer.
- 3) Los nuevos tioderivados de tacrina **1-4** demostraron además buenos valores de actividad antiproliferativa en las seis líneas celulares tumorales estudiadas. Destacan los compuestos **3** y **4**, con valores de antiproliferación mejores que los de fármacos conocidos como el cisplatino o el 5-fluorouracilo.
- 4) Por otro lado, se sintetizaron de manera exitosa nuevos derivados de tacrina a partir de diferentes derivados de fenoles. Se observó en ellos que la actividad como inhibidores de AChE y BuChE era dependiente de la naturaleza y longitud del espaciador usado, del número de grupos hidroxilos presentes en el fragmento fenólico y de si dichos grupos hidroxilos se encuentran protegidos a no.
- 5) En esta familia de compuestos, destacaron como buenos inhibidores de colinesterasas aquellos que poseían un espaciador de 8 átomos entre los dos fragmentos farmacóforos. Tienen especial interés la diamina **20**, la cual presento excelente actividad como inhibidor de AChE y BuChE humanas, útil para primeras etapas del Alzheimer, y los éteres **24-29** con excelentes valores como inhibidores selectivos de BuChE humana, lo cual resulta útil para etapas más avanzadas de la enfermedad.
- 6) Atendiendo a la actividad de los compuestos **24-29** anteriormente mencionada, y unida a los ensayos realizados en los mismos de medida de inhibición de formación de placas β -amiloides, destacaron las moléculas **25** y **27**. Tras evaluarse en estos dos compuestos su capacidad neuroprotectora, así como su neurotoxicidad y

hepatotoxicidad, destacó el compuesto **25** como cabeza de serie, resultando de interés frente al Alzheimer.

- 7) En cuanto a la síntesis de nuevos derivados *O*-metilados de tirosol e hidroxitirosol, se llevó a cabo de manera exitosa obteniendo diferentes monómeros y dímeros con valores de actividad antiproliferativa frente a diferentes tipos de cáncer desde moderados hasta muy buenos, destacando las moléculas con calcógenos en su estructura.
- 8) De entre todos ellos, destacó ampliamente la actividad del selenocianato **39** y del diselenuro **40**. En ambos se observaron valores de GI₅₀ mejores a los del cisplatino y 5-FU usados como referencia, situándose los valores obtenidos en el rango nanomolar para los 6 modelos tumorales humanos estudiados (68 nM – 960 nM), no observándose inhibición del crecimiento en células humanas sanas a las concentraciones estudiadas.
- 9) En lo que se refiere a los nuevos derivados de biotina, se consiguieron sintetizar de manera exitosa una amplia serie de compuestos con diferentes grupos funcionales calcógenos (isotiocianato, tiosemicarbazona, tiourea, tiocianato, disulfuro, selenourea y selenocianato).
- 10) En dichos derivados de biotina se observó que los que presentaban azufre carecían prácticamente de actividad antiproliferativa frente a diferentes células tumorales estudiadas, mientras que los derivados con selenio presentaban una actividad más marcada. De todos los derivados de biotina y compuestos intermedios sintetizados, destacaron por su actividad antiproliferativa frente a células tumorales los tiocianatos **55**, **56** y los selenocianatos **61-64**, observándose valores de GI₅₀ para las células tumorales estudiadas desde buenos hasta excelentes, situados estos últimos en el rango nanomolar. Además se observó en todos ellos o ninguna o muy escasa inhibición del crecimiento de células humanas sanas.
- 11) De esta última familia se tomó como cabeza de serie el compuesto **64**, destacando con valores de GI₅₀ en células cancerosas desde 66 nM hasta 13 nM y un valor de GI₅₀>100 μM en fibroblastos humanos (células sanas), lo que se tradujo en índices de selectividad desde valores mayores a 1515 hasta valores mayores a 7692.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Métodos generales

Los **reactivos** y **disolventes** usados en el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral proceden de casas comerciales entre las que se encuentran Sigma-Aldrich, TCI o VWR entre otras previamente especificadas.

Los espectros de $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ fueron realizados en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS); se han registrado en espectrómetros Bruker Avance-300 (300.1 MHz para ^1H y 75.5 MHz para ^{13}C), y Avance-500 (500.1 MHz para ^1H y 125.8 MHz para ^{13}C).

Se emplearon como disolventes en la preparación de muestras CD_3OD , CDCl_3 , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ y $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Se utilizó como referencia las señales generada por el TMS, así como las señales características de los mismos disolventes en el espectro.

Los **espectros de masas** también se realizaron en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación (CITIUS). La fuente de ionización empleada fue una fuente de ionización por electrospray y el equipo utilizado fue un QTRAP.

La **cromatografía de capa fina** se utilizó para llevar a cabo el seguimiento cualitativo de las diferentes reacciones llevadas a cabo utilizando láminas de aluminio cubiertas de gel de sílice (E. Merck Sílica Gel 60 F₂₅₄) de 0.25 mm de espesor. Los diferentes compuestos fueron observados mediante luz UV ($\lambda=254$ nm), y mediante revelado en disoluciones de H_2SO_4 al 10% en EtOH, vainillina al 1% en EtOH con un 1% de H_2SO_4 (96%), así como ninhidrina al 0.6% en EtOH, ácido fosfomolíbico al 3% en EtOH, y 4-dimetilaminocinamaldehído al 0.5% en una disolución de HCl (6M) – isopropanol (1:1), y posterior calentamiento.

La **cromatografía en columna** se utilizó para la separación y purificación de los compuestos formados en las diferentes reacciones. Como fase estacionaria se utilizó gel de sílice (tamaño de partícula 0.063–0.200 mm) y como fase móvil las mezclas ciclohexano-AcOEt, CH_2Cl_2 -MeOH, Et₂O-ciclohexano, AcOEt-ciclohexano-TEA, CH_2Cl_2 -MeOH-NH₃ (28% en H₂O) y CH_2Cl_2 -MeOH-AcOH glacial.

La **polarimetría** se empleó para la medida de la rotación óptica específica de los compuestos con quiralidad en un equipo Jasco P-2000. La medida se realizó utilizándose una lámpara de sodio con la que se trabajó a una longitud de onda de 589 nm,

empleándose una celda de 0.5 mL de volumen con una longitud de paso de luz de 10 mm y usándose concentraciones entre 6.4 y 11.5 mg/mL empleándose DMSO como disolvente.

Los ensayos de **inhibición de la acetilcolinesterasa** (*Electrophorus electricus*) y **butirilcolinesterasa** (suero equino) (**ensayo de Ellman**), así como la determinación de la **actividad antirradicalaria** (**ensayo de DPPH**) y la evaluación de compuestos como **miméticos de glutatión peroxidasa**, se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-Visible Hitachi U-2900, y cubetas de poliestireno y de cuarzo de dimensiones 10 x 4 x 45 mm y 10 x 12 x 45 mm (paso de luz de 10 mm).

8.1.1. Ensayo de inhibición de AChE y BuChE en derivados organocalcógenos empleando enzimas modelo de origen animal

El ensayo se realizó siguiendo el método de Ellman con pequeñas variaciones.^{73,74} Se llevó a cabo la preparación de disoluciones de 1.2 mL en cubetas de poliestireno (PS). Como sustrato se emplea acetato de *p*-nitrofenilo o butirato de *p*-nitrofenilo (5 concentraciones diferentes, 35-560 μ M para AChE y 70-560 μ M para BuChE). Para la preparación de las disoluciones de dichos compuestos se preparan primeramente disoluciones metanólicas de los mismos de concentraciones 34.7 mM, de las cuales se diluye 1 mL en H₂O hasta obtener un volumen de 25 mL de concentración 1.39 mM, que es la usada en estos ensayos.

Además, se usa también un medio tamponado (fosfato 0.1 M, pH = 6.8) en dicho ensayo y disoluciones metanólicas o de DMSO de nuestros derivados de tacrina (2 o 3 concentraciones diferentes y para el control usamos MeOH o DMSO en ausencia de inhibidor), siendo la [MeOH] o [DMSO] del 5% v/v con respecto al 1.2 mL total usado. Adicionados estos componentes a la cubeta, se completa la mezcla con agua destilada hasta un volumen de 1.14 mL y con posterioridad se agregan 60 μ L de disolución acuosa de la enzima (AChE de *Electroforus electricus* y BuChE de suero equino).

La disolución de AChE fue preparada de manera que en ausencia de inhibidor en la cubeta con una mayor concentración de acetato de *p*-nitrofenilo, la variación de la absorbancia a lo largo del tiempo fuera entre 0.1 y 0.15 unidades de absorbancia por

minuto. En cuanto a la disolución empleada de BuChE se preparó de la misma manera, empleándose una concentración de 66.5 unidades de enzima/mL.

A continuación se representa mediante cuatro tablas las proporciones de cada una de las disoluciones usadas en el presente ensayo, apareciendo en primer lugar las tablas para la receta del ensayo de inhibición AChE (**Tabla 17 y 18**) y en segundo lugar las tablas para la receta del ensayo de inhibición de BuChE (**Tabla y 19 y 20**):

Tabla 17. Proporciones de cada componente usadas en ensayo de Ellman con organocalcógenos para el cálculo de K_M con AChE

| | V (μ L) | | | | |
|-----------------------------|--------------|----------|----------|----------|----------|
| | Cubeta 1 | Cubeta 2 | Cubeta 3 | Cubeta 4 | Cubeta 5 |
| Disolución tamponada | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 |
| Sustrato | 30 | 60 | 120 | 240 | 480 |
| H₂O | 451.2 | 422.4 | 364.8 | 249.6 | 19.2 |
| MeOH/DMSO | 58.8 | 57.6 | 55.2 | 50.4 | 40.8 |
| Enzima | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Tabla 18. Proporciones de cada componente usadas en ensayo de Ellman con organocalcógenos para el cálculo de K_i con AChE

| | V (μ L) | | | | |
|-----------------------------|--------------|----------|----------|----------|----------|
| | Cubeta 1 | Cubeta 2 | Cubeta 3 | Cubeta 4 | Cubeta 5 |
| Disolución tamponada | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 |
| Sustrato | 30 | 60 | 120 | 240 | 480 |
| H₂O | 451.2 | 422.4 | 364.8 | 249.6 | 19.2 |
| MeOH/DMSO | 28.8 | 27.6 | 25.2 | 20.4 | 10.8 |
| Inhibidor | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Enzima | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Tabla 19. Proporciones de cada componente usadas en ensayo de Ellman con organocalcógenos para el cálculo de K_M con BuChE

| | V (μL) | | | | |
|-----------------------------|---------------------|----------|----------|----------|----------|
| | Cubeta 1 | Cubeta 2 | Cubeta 3 | Cubeta 4 | Cubeta 5 |
| Disolución tamponada | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 |
| Sustrato | 60 | 80 | 120 | 240 | 480 |
| H₂O | 422.4 | 403.2 | 364.8 | 249.6 | 19.2 |
| MeOH/DMSO | 57.6 | 56.8 | 55.2 | 50.4 | 40.8 |
| Enzima | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Tabla 20. Proporciones de cada componente usadas en ensayo de Ellman con organocalcógenos para el cálculo de K_i con BuChE

| | V (μL) | | | | |
|-----------------------------|---------------------|----------|----------|----------|----------|
| | Cubeta 1 | Cubeta 2 | Cubeta 3 | Cubeta 4 | Cubeta 5 |
| Disolución tamponada | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 |
| Sustrato | 60 | 80 | 120 | 240 | 480 |
| H₂O | 422.4 | 403.2 | 364.8 | 249.6 | 19.2 |
| MeOH/DMSO | 27.6 | 26.8 | 25.2 | 20.4 | 10.8 |
| Inhibidor | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Enzima | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Las medidas se realizaron tras adición de enzima y agitación de la disolución a 25°C, empleándose para ello un Peltier (± 0.1 °C), y registrándose la formación de *p*-nitrofenolato, que se monitoriza a $\lambda=400$ nm durante 175 segundos en intervalos de 25 segundos.

Mediante el cálculo de la velocidad (pendiente de la representación de la absorbancia frente al tiempo), se obtienen representaciones de Lineweaver-Burk o de dobles inversos ($1/v$ frente a $1/[S]$). Con las mismas se obtuvieron los parámetros K_M , v_{\max} , K_M' y v_{\max}' , utilizados para estimar los valores de las constantes de inhibición

enzimática de los compuestos analizados. Con la representación de Lineweaver-Burk además se obtiene el tipo de inhibición enzimática producida.

Según el tipo de interacción de nuestro inhibidor con la enzima, se pueden dar diferentes tipos de inhibición (**Fig. 42**):

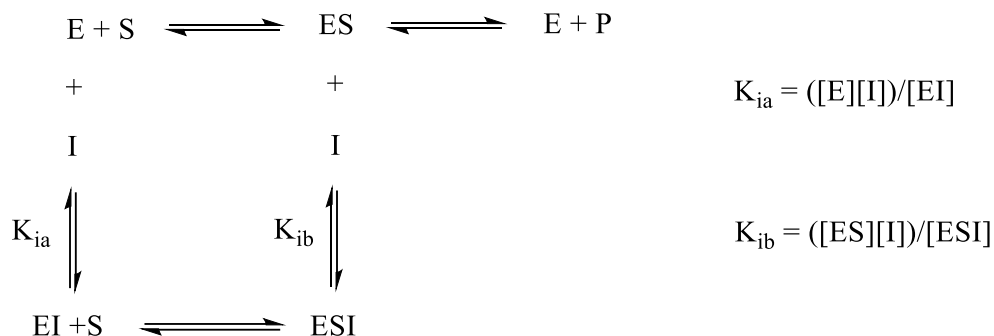


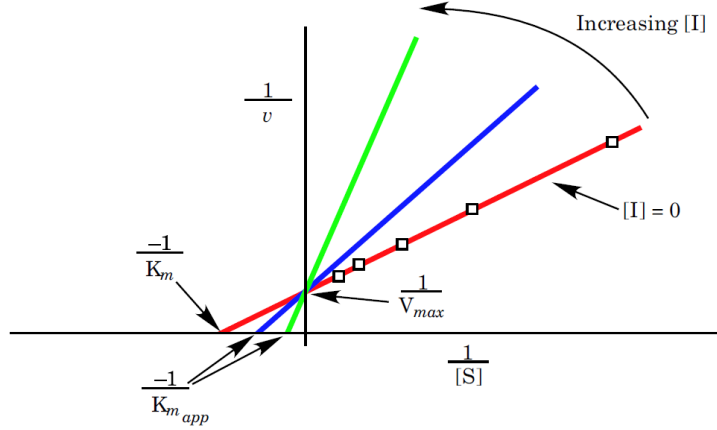
Figura 42. Representación de los posibles equilibrios producidos en una inhibición enzimática¹⁷⁸

Con K_{ia} representamos la constante de inhibición en la interacción del inhibidor con la enzima libre, mientras que con K_{ib} designamos la constante de inhibición de la interacción del inhibidor con el complejo enzima-sustrato. Además, se definen los parámetros de la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis-Menten (K_M) como la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción enzimática es la mitad de la velocidad máxima.

Según el tipo de interacción dado, tendremos una inhibición competitiva (el inhibidor interacciona con el sitio activo de la enzima formando un complejo enzima-inhibidor), incompetitiva (el inhibidor únicamente interacciona con el complejo enzima-sustrato formando un complejo inhibidor-enzima-sustrato), mixta (el inhibidor interacciona tanto con la enzima libre como con el complejo enzima-sustrato) o no competitiva (caso especial de inhibición mixta en el que $K_{ia} = K_{ib}$) (**Fig. 43**).¹⁷⁸

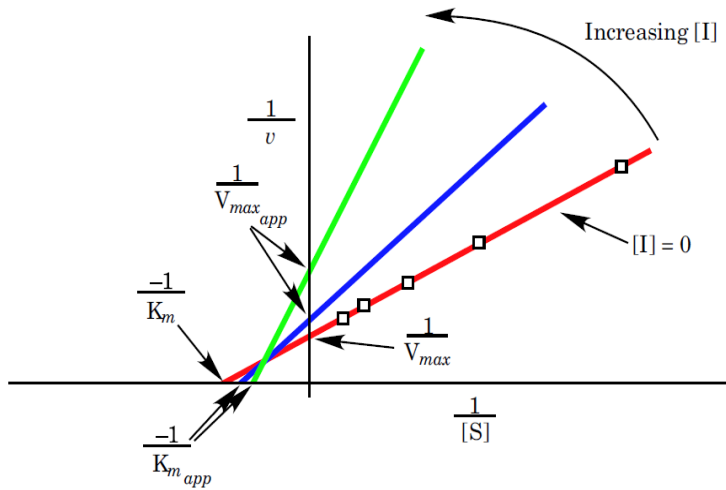
178. https://www.rose-hulman.edu/~brandt/Chem330/Inhibition_kinetics.pdf Última consulta el 11/1/2020.

Inhibición competitiva



$$K_{m_{app}} = K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{ia}}\right)$$

Inhibición mixta



$$K_{m_{app}} = K_m \cdot \frac{1 + \frac{[I]}{K_{ia}}}{1 + \frac{[I]}{K_{ib}}} \quad V_{max_{app}} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_{ib}}}$$

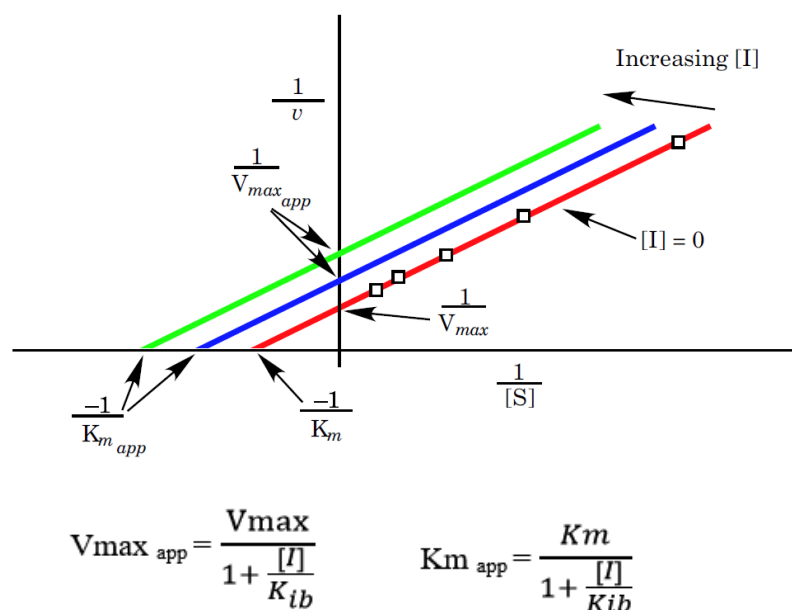
Inhibición incompetitiva

Figura 43. Representación de Lineweaver-Burk para distintos tipos de inhibición enzimática¹⁷⁸

8.1.2. Ensayo de inhibición de AChE y BuChE en compuestos sin calcógenos empleando enzimas modelo de origen animal

El ensayo se realizó mediante el método de Ellman⁷³ con variaciones. Para ello se llevó a cabo la preparación de disoluciones de 1.2 mL en cubetas de poliestireno (PS), conteniendo como sustrato yoduro de acetiltiocolina o yoduro de butiriltiocolina (5 concentraciones diferentes, 14.5-116 μM para ensayo con AChE y 9.2-73.6 μM para ensayo con BuChE) en un medio acuoso. La disolución de los sustratos usados se prepararon a partir de una disolución madre de concentración 0.29 mM. Se emplea también una disolución 3 mM de DTNB en una disolución tamponada con fosfato (0.1 M, pH = 8.0) y disoluciones metanólicas de los nuevos derivado de tacrina (2 o 3 concentraciones diferentes y para el control usamos MeOH en ausencia de inhibidor), siendo la [MeOH] del 5% v/v con respecto al 1.2 mL total usado. Adicionados estos componentes a la cubeta, se completa la mezcla con agua destilada hasta un volumen de 1.14 mL y con posterioridad se agregan 60 μL de disolución acuosa de la enzima (AChE de *Electroforus electricus* y BuChE de suero equino).

La disolución de AChE fue preparada de manera que en ausencia de inhibidor en la cubeta con una mayor concentración de yoduro de acetiltiocolina, la variación de la absorbancia a lo largo del tiempo fuera entre 0.1 y 0.15 unidades de absorbancia por minuto. En cuanto a la disolución empleada de BuChE se preparó de la misma manera, empleándose una concentración de 3.3 unidades de enzima/mL.

A continuación se representa mediante cuatro tablas las proporciones de cada una de las disoluciones usadas en el presente ensayo, apareciendo en primer lugar las tablas para la receta del ensayo con AChE (**Tabla 21 y 22**) y en segundo lugar para la receta del ensayo de inhibición de BuChE (**Tabla 23 y 24**):

Tabla 21. Proporciones de cada componente usadas en ensayo de Ellman con compuestos no organocalcógenos para el cálculo de K_M con AChE

| | V (μ L) | | | | |
|-----------------------------|--------------|----------|----------|----------|----------|
| | Cubeta 1 | Cubeta 2 | Cubeta 3 | Cubeta 4 | Cubeta 5 |
| Disolución tamponada | 190 | 190 | 190 | 190 | 190 |
| DTNB | 350 | 350 | 350 | 350 | 350 |
| Sustrato | 30 | 60 | 120 | 240 | 480 |
| H₂O | 510 | 480 | 420 | 300 | 60 |
| MeOH | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Enzima | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Tabla 22. Proporciones de cada componente usadas en ensayo de Ellman con compuestos no organocalcógenos para el cálculo de K_i con AChE

| | V (μ L) | | | | |
|-----------------------------|--------------|----------|----------|----------|----------|
| | Cubeta 1 | Cubeta 2 | Cubeta 3 | Cubeta 4 | Cubeta 5 |
| Disolución tamponada | 190 | 190 | 190 | 190 | 190 |
| DTNB | 350 | 350 | 350 | 350 | 350 |
| Sustrato | 30 | 60 | 120 | 240 | 480 |
| H₂O | 510 | 480 | 420 | 300 | 60 |
| Inhibidor | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Enzima | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Tabla 23. Proporciones de cada componente usadas en ensayo de Ellman con compuestos no organocalcógenos para el cálculo de K_M con BuChE

| | V (μ L) | | | | |
|-----------------------------|--------------|----------|----------|----------|----------|
| | Cubeta 1 | Cubeta 2 | Cubeta 3 | Cubeta 4 | Cubeta 5 |
| Disolución tamponada | 190 | 190 | 190 | 190 | 190 |
| DTNB | 350 | 350 | 350 | 350 | 350 |
| Sustrato | 60 | 90 | 120 | 240 | 480 |
| H₂O | 480 | 450 | 420 | 300 | 60 |
| MeOH | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Enzima | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Tabla 24. Proporciones de cada componente usadas en ensayo de Ellman con compuestos no organocalcógenos para el cálculo de K_i con BuChE

| | V (μ L) | | | | |
|-----------------------------|--------------|----------|----------|----------|----------|
| | Cubeta 1 | Cubeta 2 | Cubeta 3 | Cubeta 4 | Cubeta 5 |
| Disolución tamponada | 190 | 190 | 190 | 190 | 190 |
| DTNB | 350 | 350 | 350 | 350 | 350 |
| Sustrato | 60 | 90 | 120 | 240 | 480 |
| H₂O | 480 | 450 | 420 | 300 | 60 |
| Inhibidor | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Enzima | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Las medidas se realizan a 25 °C, registrándose la formación de anión 5-mercapto-2-nitrobenzoato, monitoreándola a $\lambda=405$ nm durante 125 segundos en intervalos de 25 segundos.

Los cálculos usados para obtener las constantes de inhibición son similares a los empleados en el apartado anterior.

8.1.3. Ensayo inhibición de AChE y BuChE empleando enzimas humanas

Los ensayos en enzimas humanas fueron realizados por el grupo de investigación de la profesora M. Bartolini de la Universidad de Bolonia. En ellos se empleó el método de Ellman nuevamente con ciertas variaciones. En este caso se utilizó una disolución tamponada con fosfato (0.1 M, pH = 8.0), AChE humana recombinante y BuChE de suero humano a una concentración de 0.02 unidades/mL (Sigma-Aldrich), DTNB a una concentración 340 μ M y yoduro de acetil y butiriltiocolina de una concentración 550 μ M. En este ensayo se empleó una cantidad fija de sustrato y cantidades variables del inhibidor, con objeto de obtener en este caso la concentración a la que se produce una inhibición del 50% (CI_{50}). En este caso, la mezcla sin el sustrato se preincuba a 37 °C durante 20 minutos, tras lo cual el sustrato es añadido y se mide la absorbancia a 412 nM durante 5 minutos. De manera paralela, se prepararon blancos que contenían todos los componentes excepto la enzima para dar cuenta de la hidrólisis no enzimática del sustrato.

Tras ello, se comparan las velocidades de reacción en presencia y ausencia de inhibidor y se calcula el porcentaje de inhibición debido a la presencia de compuestos testado. Cada concentración se analizó por triplicado y los valores de CI_{50} se determinaron gráficamente a partir de las representaciones del porcentaje de inhibición frente al logaritmo de concentración de inhibidor usado.

8.1.4. Ensayo de inhibición de autoagregación de polipéptidos β -amiloides

Este ensayo, también se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación de la profesora M. Bartolini. En él, se prepara una disolución de hexafluoroisopropanol (HFIP) y A β 1-42 pretratadas para obtener una disolución en CH₃CN /Na₂CO₃ 0.3 mM / NaOH 250 mM (48.4 / 48.4 / 3.2) estable ([A β 1-42] = 500 μ M). Los ensayos se realizaron incubando el péptido en tampón fosfato 10 mM (pH = 8.0) que contenía NaCl 10 mM, a una temperatura de 30 °C durante 24 h. Las concentraciones de A β 1-42 final y del inhibidor usado en el ensayo fueron en ambos casos 50.0 μ M. El blanco se preparó en ausencia de A β 1-42.

Para la cuantificación de la formación de placas β -amiloides se utilizó el método con tioflavina T.⁷⁹

Tras la incubación la muestra es diluida hasta un volumen final de 2.0 mL con disolución tampón 50 mM glicina-NaOH (pH = 8,5) que contiene tioflavina T en una concentración 1,5 μ M. El ensayo se realizó durante 300 segundos, observando la variación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo ($\lambda_{\text{excitación}} = 446$ nm, $\lambda_{\text{emisión}} = 490$ nm). Los valores obtenidos se promediaron tras restar la fluorescencia del control. Con dichos valores se obtuvo el porcentaje de inhibición de la formación de placas β -amiloides.

8.1.5. Ensayo de DPPH

En el método de determinación de actividad antirradicalaria mediante el uso de DPPH,¹¹² se utiliza una disolución metanólica (metanol calidad HPLC) 60 μ M de DPPH. El DPPH tiene un máximo de absorción a 515 nm, por lo que en este método lo que medimos es como se reduce la absorbancia de esta disolución en presencia de un agente antiradicalario. Para dicho método se añade en las cubetas 1.17 mL de la disolución preparada de DPPH y se adicionan 30 μ L de disolución metanólica del antioxidante. La mezcla se mantiene 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se mide su absorbancia a 25 °C. Se utiliza para cada ensayo un mínimo de 5 concentraciones de cada compuesto, realizándose cada medida por triplicado (para el control se adicionan sólo 30 μ L de metanol). Una vez obtenidos los datos, se representa el porcentaje de DPPH remanente en función de la concentración de antioxidante usada en el ensayo. El % de DPPH remanente se obtiene de la siguiente forma:

$$\% \text{ DPPH restante} = \frac{A (\text{muestra})}{A (\text{control})} \times 100$$

Con los gráficos obtenidos, obtenemos el valor del EC₅₀ para cada compuesto, definido por la concentración a la cual dicha molécula es capaz de reducir la cantidad de DPPH inicial en un 50%.

8.1.6. Ensayo de evaluación de compuestos como miméticos de GPx

Para el ensayo de medida de la capacidad de los compuestos como miméticos de GPx se utilizó en procedimiento descrito por Iwaoka y Tomoda.⁸⁵

En dicho ensayo se prepararon disoluciones metanólicas de PhSH (25 mM) y H₂O₂ (256 mM) y una disolución en MeOH o DMSO de los compuestos estudiados como miméticos de GPx (10 mM), utilizándose en la medida cubetas de cuarzo. Para el control se utilizan 1562 μL de MeOH, 440 μL de disolución de PhSH, 22 μL de disolvente usado para disolver las muestras y 176 μL de disolución de H₂O₂, y por otro lado para las medidas de las muestras se emplean 1562 μL de MeOH, 440 μL de disolución de PhSH, 22 μL nuestra muestra y 176 μL de disolución de H₂O₂, El blanco usado estuvo compuesto de 2178 μL de MeOH y 22 μL del disolvente usado para las muestras.

El ensayo se realiza midiendo la variación de la absorbancia a 305 nm debido a la variación de la concentración del PhSSPh formado. Con ello se mide la variación de la concentración de PhSH a lo largo del tiempo, utilizándose un intervalo de 180 segundos. Dichas concentraciones se calcularon mediante la siguiente expresión:¹⁷⁹

$$[\text{PhSH}] = c_0 - \frac{2A}{\epsilon_1}$$

Usándose un coeficiente de extinción molar para el (PhS)₂, denominado ϵ_1 , con un valor de $1.24 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.⁸⁵ Tras la corrección de fondo, se representó la variación de la concentración de PhSH en función del tiempo, obteniéndose mediante dicha representación la velocidad de reacción de la oxidación del PhSH, así como el tiempo de vida media de dicho compuesto.

8.1.7. Ensayo de neurotoxicidad

En colaboración con el grupo de investigación de la profesora B. Monti, de la Universidad de Bolonia, se llevó a cabo la medida de la neurotoxicidad de los compuestos cabeza de serie.

Para medir la neurotoxicidad se utilizaron neuronas corticales inmortalizadas de ratones Neuro2A (N2A de American Type Culture Collection (ATCC), a través de LGC Standards S.r.l., Sesto San Giovanni, MI, Italia). Dichas células se mantuvieron en medio

179. G. Muges, A. Panda, H.B. Singh, N.S. Punekar, R.J. Butcher. Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: a mechanistic study. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 839-850.

de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con un 10% de suero bovino fetal, suplementado con L-glutamina 2 mM y 50 unidades/ml de penicilina/estreptomicina.

Las condiciones para la incubación de la muestra fueron de 37 °C y una atmosfera constituida por un 5% de CO₂ y un 95% de aire humidificado.

Para la medida, las células se colocaron en placas de 96 pocillos con una densidad de $0.1 \cdot 10^6$ células por pocillo, sometiéndose a diferenciación mediante tratamiento con dibutilil AMPc 1 mM en el medio con un 1% de suero bovino fetal y AMPc a una concentración 1 mM durante 3 días.

Para probar la neurotoxicidad, las células N2A diferenciadas se expusieron a cada uno de los compuestos durante 24 h a una concentraciones entre 0 y 50 μ M. Se realizó un ensayo de MTT por triplicado. En dicho ensayo se añadió azul de tiazolilo a una concentración de 0.1 mg/mL, incubándose tras esto durante 20 minutos a 37 °C en oscuridad. Tras esto, el precipitado de MTT se disolvió en una disolución tampón Tris-HCl 0.1 M que contiene 5% de Triton X-100. La medida para cuantificar la supervivencia celular se realizó a 570 nm en un espectrofotómetro de lectura múltiple (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Segrate, MI, Italia).

8.1.8. Ensayo de hepatotoxicidad

Las medidas de hepatotoxicidad de llevaron a cabo en el grupo de investigación de la profesor B. Monti.

Para dicho ensayo, se utilizaron células HepG2, cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco, con un suplemento de suero fetal bovino (10%) inactivado por calor, con un 1% de penicilina/estreptomicina y glutamina 2 mM. Las células se tripsinizaron durante 5 minutos a 37 °C, inactivándose posteriormente la tripsina. Las células separadas se recogieron y centrifugaron durante 5 minutos a 300xg, y se resuspendieron para contabilizarlas. Para dicho experimento los hepatocitos se colocaron en placas de 96 pocillos previamente recubiertas con poli-L-lisina a una concentración de $2 \cdot 10^4$ / 0.2 mL de medio por pozo en ausencia o en presencia del compuesto testado a diferentes concentraciones crecientes (0, 1, 2.5, 5, 10 y 25 μ M) en medio sin suero durante 24 horas. Tras esto se realizó el ensayo de viabilidad celular con MTT.

8.1.9. Ensayo de neuroprotección

Para este ensayo, realizado por el grupo de la profesora B. Monti, la viabilidad neuronal se cuantificó mediante el ensayo de MTT. En dicho ensayo se indujo neurodegeneración mediante privación de K^+ . En dicho ensayo, los cultivos diferenciados de NGC (neuronas granulares del cerebelo) primarios se mantuvieron en un medio libre de suero con KCl 25 mM (condición de control) o KCl 5 mM (suero con privación de potasio) en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos evaluados (0, 1, 2.5, 5, 10 y 25 μ M) durante 48 horas, midiéndose la capacidad neuroprotectora de estos mediante el ensayo de viabilidad celular con MTT.^{113,180}

8.1.10. Ensayo de estabilidad en plasma sanguíneo

La medida de la estabilidad en plasma fue realizada en colaboración con el grupo de investigación de la profesora B. Monti. En dicho ensayo, se añadieron 5 μ L de la disolución madre del compuesto evaluado (210 μ M en tampón PBS) a 100 μ L de plasma de un voluntario sano para alcanzar la concentración final de inhibidor de 10 μ M. Las muestras se incubaron a 37 °C, bajo agitación suave (300 rpm, Thermomixer Comfort, Eppendorf). A determinados tiempos (0, 60, 180 y 360 min), las proteínas plasmáticas se precipitaron mediante la adición de 400 μ L de acetonitrilo helado que contenía propranolol como estándar interno (6.25 μ M). Cada punto de tiempo se ensayó por triplicado. Las muestras se centrifugaron a 13000 rcf durante 10 min a 4 °C, tras lo cual se recogieron 350 μ l del líquido sobrenadante y se secó bajo una corriente de nitrógeno. Finalmente, el residuo se resuspendió en 1 ml de H₂O/AcCN (65/35, v/v) y se analizó por cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS). El análisis cromatográfico se llevó a cabo mediante un equipo Agilent serie 1200 (Walbronn, Alemania) equipada con un inyector automático. Los análisis se realizaron en una columna C18 (Aeris; 150 \times 2.1 mm i.d., 3.6 μ m; Phenomenex) termostatazada a 60°C en un horno de columna (horno de columna SICO-300, LabService Analytica). Se usó una fase móvil H₂O/AcCN/FA, (65/35/0.1, (v/v/v)), un caudal de 0.3 ml/min y el volumen de inyección fue de 5 μ L. Los

180. E. Uliassi, L.E. Peña-Altamira, A.V. Morales, F. Massenzio, S. Petralla, M. Rossi, M. Roberti, L. Martínez González, A. Martínez, B. Monti, M.L. Bolognesi. A focused library of psychotropic analogues with neuroprotective and neuroregenerative potential. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10*, 279-294.

análisis de espectrometría de masas se realizaron en un espectrómetro Q-ToF (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado con una fuente de iones Z-spray. La temperatura de la fuente de ESI se ajustó a 120°C, la temperatura de desolvatación a 280°C, la tensión capilar a 3.0 kV y el voltaje del cono a 35 V. Las adquisiciones de monitorización selectiva de iones (SIM) en polaridad positiva se realizaron a 449 y 260 m/z para el compuesto testado y el patrón interno respectivamente. La relación entre el compuesto testado y el área del pico del patrón interno se representó en función del tiempo para evaluar la estabilidad de nuestro compuesto en plasma.

8.1.11. Estudio de modelización molecular

La enzima BuChE complejada con tacrina se obtuvo de Protein Data Bank (código PDB: 4bds).¹⁸¹ Esta proteína se preparó con el paquete de software MAESTRO.¹⁸² Luego, cada derivado de tacrina se construyó modificando el fragmento de tacrina de la estructura 4bds.

Se aplicó una metodología análoga para AChE complejo con inhibidor de tacrina-benzofurano (código PDB: 4w63).¹⁸³ Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo utilizando el programa Chem3D. El protocolo de equilibrio consistió en una minimización inicial de mecánica molecular usando el campo de fuerza MM2 (gradiente RMS 0.01), seguido de una minimización que solo movía el derivado de tacrina (10000 pasos) mientras que el sistema se calentó a un volumen constante hasta 300 K.

Las interacciones no covalentes entre los derivados de tacrina y los sitios de unión se evaluaron utilizando las coordenadas cristalográficas a nivel de teoría M06-2X / def2-

181. F. Nachon, E. Carletti, C. Ronco, M. Trovaslet, Y. Nicolet, L. Jean, P.Y. Renard. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochem. J.* **2013**, *453*, 393-399.

182. Maestro, Version 9.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2010.

183. X. Zha, D. Lamba, L. Zhang, Y. Lou, C. Xu, D. Kang, L. Chen, Y. Xu, L. Zhang, A. De Simone, S. Samez, A. Pesaresi, J. Stojan, M.G. Lopez, J. Egea, V. Andrisano, M. Bartolini. Novel tacrine-benzofuran hybrids as potent multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease: design, synthesis, biological evaluation, and X-ray Crystallography. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 114-131.

TZVP con el paquete Gaussian 09.¹⁸⁴ Además, la corrección de dispersión de Grimme¹⁸⁵ también se incluyó en Gaussian 09. El error de superposición del conjunto de bases para el cálculo de las energías de interacción se ha corregido utilizando el método de contrapeso¹⁸⁶ como sigue:

$$\Delta E_{int} = E_{sistema} - E_1 - E_2$$

$$\Delta E_{corr} = \Delta E_{int} - E_{BSSE}$$

Los modelos de los compuestos estudiados fueron completamente optimizados en el mismo nivel de teoría. El análisis de frecuencia se realizó para caracterizar estas estructuras como mínimas ($N_{imag} = 0$). Los efectos del disolvente (H_2O) se evaluaron durante la optimización aplicando el modelo de polarización continua (PCM) con la variante de formalismo de ecuaciones integrales (IEFPCM).

8.1.12. Ensayo de antiproliferación

La medida de la actividad antiproliferativa, llevadas a cabo en colaboración con el profesor J.M. Padrón y su grupo de investigación del Instituto de Bio-Orgánica Antonio González de la Universidad de La Laguna, se realizaron utilizando el protocolo con

-
184. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, €O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09 C.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.
185. S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *J. Chem. Phys.* **2010**, 132, 154104.
186. S.F. Boys, F. Bernardi, The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Mol. Phys.* **1970**, 19, 553-566.

ligeras modificaciones¹⁸⁷ del Instituto Nacional del Cáncer (INC) de los Estados Unidos¹⁸⁸ contra seis líneas celulares de tumores sólidos humanos (A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr) y una línea celular no tumoral (BJ-hTert, fibroblastos humanos).

Las células se mantuvieron en matraces de cultivo de 25 cm³ en RPMI 1640 suplementado con suero de ternera fetal inactivado por calor al 5% y L-glutamina 2 mM en una incubadora a 37 °C, 5% de CO₂, 95% de aire humidificado. Las células que crecieron exponencialmente se tripsinizaron y se resuspendieron en medio que contenía antibiótico (100 unidades de penicilina G y 0.1 mg de estreptomicina por ml). Posteriormente se contaron las suspensiones de células individuales que mostraban > 97% de viabilidad por exclusión de colorante azul de tripano. Después del conteo, se hicieron diluciones para dar las densidades celulares apropiadas para la inoculación en placas de microtitulación de 96 pocillos. Las células se inocularon en un volumen de 100 µL por pocillo a densidades de 10,000 (A549, HBL-100, HeLa y SW1573), 15000 (T-47D) y 20000 (WiDr) por pocillo, en función de sus tiempos de duplicación.

Los compuestos a ensayar se disolvieron en DMSO a una concentración inicial de 40 mM. Las células de control se expusieron a una concentración equivalente de DMSO (0.25% v/v, control negativo). Cada agente se probó por triplicado a diferentes diluciones en el rango de 1-100 µM. El tratamiento farmacológico se inició el día 1. Los tiempos de incubación del fármaco fueron de 48 h, después de lo cual las células se precipitaron con 25 µl de ácido tricloroacético helado (50% p/v) y se mantuvieron durante 60 minutos a 4 °C. Luego se realizó el ensayo de sulforodamina B (SRB). La densidad óptica (DO) de cada pocillo se midió a 492 nm, utilizando el lector de microplacas de absorción PowerWave XS de BioTek. Se corrigieron los valores con la densidad óptica de fondo de los pocillos que solo contenían medio de cultivo.

187. P.O. Miranda, J.M. Padron, J.I. Padron, J. Villar, V.S. Martín. Prins-type synthesis and SAR study of cytotoxic alkyl chloro dihydropyrans, *ChemMedChem*. **2006**, *1*, 323-329.

188. P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M.R. Boyd. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.

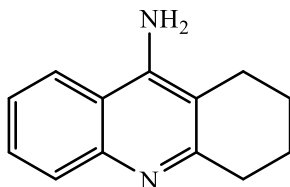
8.1.13. Análisis estadístico

Los valores se expresan como el intervalo de confianza, que se calculó para $P=0.95$ usando la distribución t de Student para los ensayos de inhibición de AChE y BuChE de modelos animales para derivados calcógenos de tacrina y para el ensayo de mimético de GPx.

Se empleó el cálculo de la media y la desviación estándar para el resto de ensayos realizados.

8.2. Síntesis de materias primas

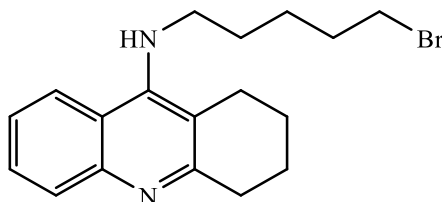
Tacrina (66)



Una disolución del hidrocloreto de tacrina polihidratada comercial (351.4 mg) en una mezcla 1:1 de CH_2Cl_2 -NaOH 1M (60 mL) se deja agitando a temperatura ambiente hasta observar la total disolución del sólido blanco. A continuación se lleva a cabo una separación líquido-líquido, lavando la fase acuosa con CH_2Cl_2 (2x15 mL). Para terminar, la fase orgánica se concentra hasta sequedad, obteniéndose la tacrina (**66**) como un sólido blanco.

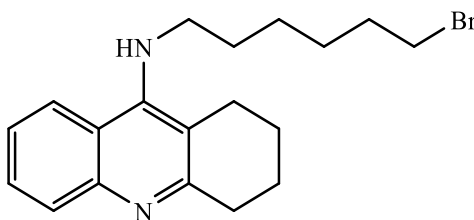
Sólido blanco. Rendimiento: 285.5 mg; $R_f = 0.24$ (AcOEt-ciclohexano- Et_3N (6:4:1)).

N-(5-Bromopentil)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amina (67)⁶⁹



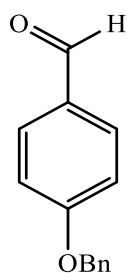
Una mezcla de tacrina (400.3 mg, 2.02 mmol), 1,5-dibromopentano (1.62 g, 0.96 mL, 6.83 mmol, 97% p/p, 3.4 equiv.) y KOH (452.2 mg, 6.85 mmol, 85% p/p, 3.4 equiv.) en acetonitrilo (20 mL) se mantiene a temperatura ambiente con agitación bajo atmósfera de argón durante 23 horas. Tras este tiempo, se concentra hasta sequedad y se realiza una separación líquido-líquido con 30 mL de AcOEt y 30 mL de H_2O , seguido con posterioridad de dos extracciones con 30 mL de AcOEt. El conjunto de fases orgánicas se concentra hasta sequedad y el residuo resultante se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow AcOEt-ciclohexano (6:4)).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 312.8 mg, 45%; $R_f = 0.51$ (AcOEt-ciclohexano-TEA (6:4:1)).

N-(6-Bromohexil)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (68)⁶⁹

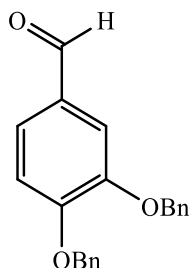
Una mezcla de tacrina (400.6 mg, 2.06 mmol), 1,6-dibromohexano (1.72 g, 1.085 mL, 6.83 mmol, 96% p/p, 3.3 equiv.) y KOH (450.4 mg, 6.82 mmol, 85% p/p, 3.3 equiv.) en acetonitrilo (20 mL) se mantiene a temperatura ambiente con agitación bajo atmósfera de argón durante 22.5 horas. Tras este tiempo, se concentra hasta sequedad la mezcla y se realiza una extracción con 30 mL de AcOEt y 30 mL de H₂O, seguido con posterioridad de dos extracciones con 30 mL de AcOEt. El conjunto de fases orgánicas se concentra hasta sequedad y el residuo resultante se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 6:4).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 346.4 mg, 47%; $R_f = 0.51$ (AcOEt-ciclohexano-TEA 6:4:1).

4-(Benciloxi)benzaldehído (80)

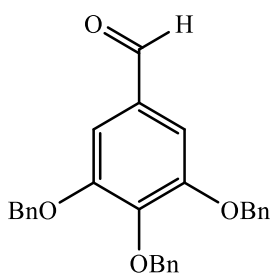
La síntesis se realizó empleando la metodología de bencilación de aldehídos fenólicos descrita por S.J. Mills *et al.*⁹⁷ Una mezcla de 4-hidroxibenzaldehído (495.5 mg, 98% p/p 4.0 mmol), bromuro de bencilo (994 μ L, 7.9 mmol, 98% p/p 2.0 equiv.) y K₂CO₃ (1.71 g, 99% p/p, 12.2 mmol, 3.0 equiv.) en DMF anhidra (15 mL) se calienta a 70 °C bajo atmósfera inerte (Ar) durante 17.5 horas. La mezcla se filtra para eliminar el K₂CO₃, y la disolución se concentra hasta sequedad. La mezcla obtenida se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt - ciclohexano 1:10).

Cera amarilla. Rendimiento: 842.5 mg, 100%. $R_f = 0.57$ (AcOEt-ciclohexano 1:2)

3,4-Bis(benciloxi)benzaldehído (81)

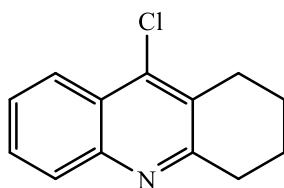
La síntesis se realizó empleando la metodología de bencilación de aldehídos fenólicos descrita por S.J. Mills *et al.*⁹⁷ Una mezcla de 3,4-dihidroxibenzaldehído (251.5 mg, 98% p/p, 1.8 mmol), bromuro de bencilo (880 μ L, 7.26 mmol, 98% p/p, 4.0 equiv.) y K_2CO_3 (1.05 g, 7.53 mmol, 99% p/p, 4.1 equiv.) en DMF anhidra se calienta a 70 °C bajo atmosfera inerte (Ar) durante 21 horas. La mezcla se filtra para eliminar el K_2CO_3 y la disolución se concentra hasta sequedad. La mezcla obtenida se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow AcOEt-ciclohexano 1:8).

Cera amarilla. Rendimiento: 558.4 mg, 98%. $R_f = 0.51$ (AcOEt-ciclohexano 1:2)

3,4,5-Tris(benciloxi)benzaldehído (82)⁹⁷

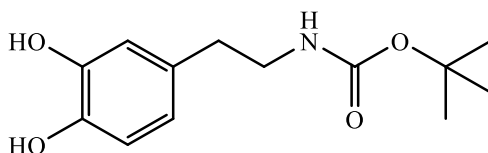
Una mezcla de 3,4,5-trihidroxibenzaldehído (61.3 mg, 98% p/p, 0.39 mmol), bromuro de bencilo (260 μ L, 2.14 mmol, 98% p/p, 5.5 equiv.), y K_2CO_3 (272.7 mg, 1.95 mmol, 99% p/p, 5.0 equiv.) en DMF anhidra se calienta a 80 °C bajo atmosfera inerte (Ar) durante 21.5. La mezcla se filtra para eliminar el K_2CO_3 y la disolución se concentra hasta sequedad. La mezcla se purifica en columna cromatográfica de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow AcOEt-ciclohexano 1:8).

Cera amarilla. Rendimiento: 126.5 mg, 76%. $R_f = 0.32$ (AcOEt-ciclohexano 1:6).

9-Cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina (83)⁹⁹

A una mezcla de ácido antranílico (700.2 mg, 98% p/p, 5.0 mmol) y ciclohexanona (475 μ L, 0.948 g/mL, 99% p/p, 4.54 mmol) en un baño de hielo se le añade lentamente 4.3 mL de POCl₃ (98% p/p). La reacción se calienta a reflujo durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se realiza una extracción con AcOEt-K₂CO₃ (aq, sat) (50 mL-50 mL), tras lo cual, medido el pH de la disolución acuosa y detectado como básico, se realizaron dos lavados posteriores con H₂O a la fase orgánica (2x50mL) hasta alcanzarse un pH de aproximadamente de entre 8 y 9 en la última fase acuosa usada. Una vez terminado los lavados, la fase orgánica se llevó hasta sequedad obteniéndose un sólido marrón, y se purifico mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow AcOEt-ciclohexano 1:4).

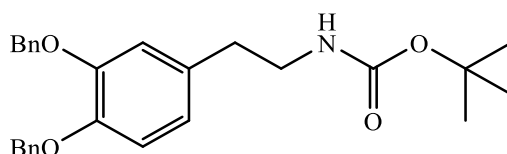
Sólido amarillo. Rendimiento: 665.4 mg, 67%. R_f = 0.34 (AcOEt-ciclohexano 1:4).

(3,4-Dihidroxifenetil)carbamato de *tert*-butilo (84)¹⁰⁰

A una mezcla de cloruro de dopamina (500.6 mg, 2.64mmoles) y anhídrido de Boc (644.8 mg, 2.9 mmol, 1.1 equiv.) se le adicionan 5.5 mL de THF y 3.3 mL de NaHCO₃ (aq) saturada y se mantiene dicha mezcla agitando a temperatura ambiente durante 140 minutos.

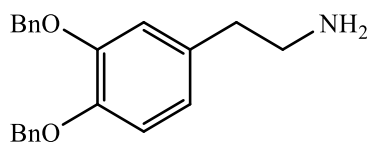
Transcurrido este tiempo se lleva a cabo una extracción, separándose primero la fase orgánica, y la fase acuosa se lava con dos porciones de AcOEt de 10 mL que son recogidas junto con la porción de THF. La mezcla de las fases orgánicas se lava con NaCl (sat) (4x10 mL). La fase orgánica finalmente se lleva a sequedad, obteniéndose un sólido blanco.

Sólido blanco. Rendimiento: 598.9 mg, 90%. R_f = 0.44 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1).

(3,4-Bis(benciloxi)fenetil)carbamato de *terc*-butilo (85)¹⁰¹

84 (598.9mg, 2.36 mmol) es disuelto en 10 mL de DMF, tras lo que se adiciona K_2CO_3 (1325.2 mg, 99%, 9.5 mmol) y bromuro de bencilo (1.33 mL, 98%, 11.2 mmol) y se mantiene dicha mezcla con agitación a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón durante 24 horas. La mezcla es llevada a sequedad y se realiza una extracción con CH_2Cl_2 y H_2O (30 ml-30 mL), con dos lavados posteriores de la fase acuosa con 60 mL de CH_2Cl_2 (2x30mL). La fase orgánica se concentra hasta sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow AcOEt-ciclohexano 1:8)

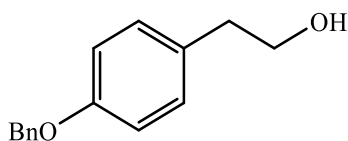
Sólido blanco. Rendimiento: 881.9 mg, 86%. $R_f = 0.39$ (AcOEt-ciclohexano 1:4)

3,4-Bis(benciloxi)fenetilamina (86)¹⁰¹

85 (880.4 mg, 2.03 mmol) es disuelto en 10 mL de CH_2Cl_2 y se adicionan 3 mL de CF_3COOH (99% m/m, 1.48 g/mL, 42.4 mmol, 20.8 equiv). La mezcla se deja durante 90 minutos con agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se adicionan 15 mL de $NaHCO_3$ saturado y se deja agitar unos minutos, tras lo cual se añaden otros 15 mL de CH_2Cl_2 y 15 mL de $NaHCO_3$ saturado y se realiza una extracción, recuperando la fase orgánica. Esta es lavada con otros 30 mL de $NaHCO_3$, comprobándose tras la extracción que la fase acuosa tiene pH básico. Por último se hace un último lavado de la fase orgánica con 30 mL de agua destilada alcanzando en la fase acuosa un pH = 9. La fase orgánica se lleva entonces a sequedad, obteniéndose un sirupo amarillo.

Sólido blanco. Rendimiento: 690.6 mg, 90%.

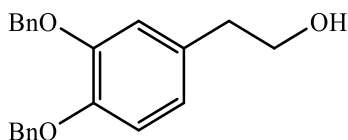
2-(4-Benciloxifenil)etanol (89)¹⁰⁸



Se disuelve tirosol (397.2 mg, 2.87 mmol, 1 equiv.) en 6 mL de DMF y se adiciona a dicha mezcla cloruro de bencilo (735.0 mg, 99% p/p, 5.75 mmol, 2 equiv.) y K_2CO_3 (1209.4 mg, 99% p/p, 8.66 mmol, 3 equiv.) y se mantiene la reacción con agitación bajo atmósfera de argón y calentando a 65 °C durante 23 horas. La mezcla se lleva hasta sequedad y se realiza una extracción con CH_2Cl_2 - H_2O (20 mL-20 mL) lavándose posteriormente la fase acuosa con 2 porciones de 20 mL de CH_2Cl_2 . La unión de fases orgánicas se seca con sulfato sódico anhidro y se concentra hasta sequedad. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 1:4)

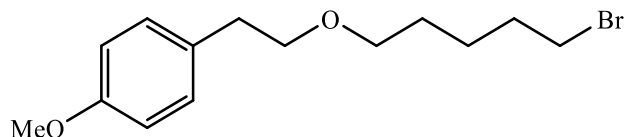
Sólido blanco. Rendimiento: 586.8 mg, 89%. $R_f = 0.63$ (AcOEt-ciclohexano 2:1)

2-(3,4-Dibenciloxifenil)etanol (90)¹⁰⁹



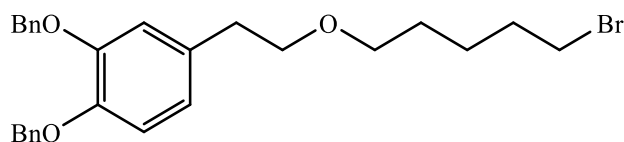
A una disolución de hidroxitirosol (952.7 mg, 6.18 mmol) en 30 mL de acetona anhidra, se añade bromuro de bencilo (2.625 mL, 21.6 mmol, 3.5 equiv.) y K_2CO_3 (3.446 g, 24.7 mmol, 4 equiv.). La mezcla se deja reaccionar durante 30 horas calentando a reflujo y con agitación, bajo atmosfera inerte. Tras esto, se filtra la mezcla para eliminar las sales insolubles en acetona, y se purifica el compuesto buscado mediante cromatografía en columna de sílice (hexano → AcOEt-hexano 1:2).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 1420.8 mg, 69%. $R_f = 0.42$ (AcOEt-hexano 1:1)

1-(2-((5-Bromopentil)oxi)etil)-4-metoxibenceno (91)

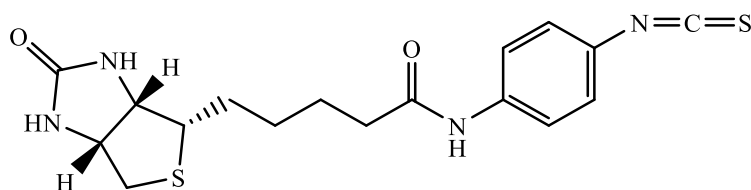
Se disuelve **87** (104.0 mg, 98% p/p 0.67 mmol) en 4 mL de DMSO anhidro y se adiciona NaH (103.3 mg, 95% p/p, 4.09 mmol, 6.1 equiv.) y 1,5-dibromopentano (753 μ L, 1.688 g/mL, 97% p/p, 5.36 mmol, 8 equiv.). La mezcla se mantiene a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón con agitación durante 5 horas. Tras llevar dicha mezcla a sequedad, se realiza una extracción con $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ (15 mL-15 mL) seguido de dos extracciones con CH_2Cl_2 (2x15 mL). El conjunto de fases orgánicas es secado con sulfato sódico anhidro y concentrado hasta sequedad. La mezcla que queda en el matraz es purificada mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow Et_2O -ciclohexano 1:15)

Sirupo amarillo tenue. Rendimiento: 114.8 mg, 57%. $R_f = 0.26$ (Et_2O -ciclohexano 1:15)

4-(2-((5-Bromopentil)oxi)etil)1,2-dibenciloxibenceno (92)

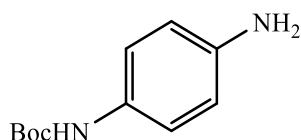
90 (41.7 mg, 0.12 mmol), se disuelven en 2 mL de DMSO anhidro y se adicionan 1,5-dibromoalcano (140 μ L, 1.688 g/mL, 97% p/p 1.0 mmol, 8 equiv.), y NaH (20.5 mg, 95% p/p, 0.81 mmol, 6.8 equiv.) y se mantiene con agitación bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 5 horas. La reacción se lleva hasta sequedad y se realiza una extracción con $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ (15 mL-15 mL), realizándose dos extracciones posteriormente con CH_2Cl_2 (2 x 15 mL). La fase orgánica se lleva hasta sequedad y se realiza una purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow Et_2O -ciclohexano 1:15)

Sirupo amarillo. Rendimiento: 40.7 mg, 67%. $R_f = 0.39$ (Et_2O -ciclohexano 1:2)

4-(Biotinilamino)fenilisotiocianato (94)

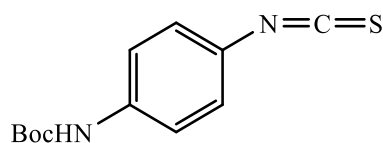
A **41** (46.0 mg, 0.138 mmol) se le adicionan 5 mL de una mezcla CH₂Cl₂-H₂O (1:1), CaCO₃ (41.6 mg, 0.416 mmol, 3 equiv.) y tiofosgeno (16.3 μL, 1.5 g/mL, 97% p/p, 0.206 mmol, 1.5 equiv.). La reacción se mantiene con agitación a temperatura ambiente, en oscuridad y con atmosfera de argón. Tras 45 minutos se observa por cromatografía de capa fina la conversión total del reactivo inicial. Se hace una extracción con CH₂Cl₂ (5 mL H₂O y 15 mL de CH₂Cl₂), recogándose la fase orgánica y realizándose dos extracciones posteriormente con CH₂Cl₂ (2x15mL). El conjunto de fases orgánicas se concentra hasta sequedad, obteniéndose el isotiocianato correspondiente.

Sólido blanco. Pf = (224-235) °C. $[\alpha]_D^{22} = +38$ (c 0.77, DMSO). Rendimiento: 36.4 mg, 70 %. R_f = 0.76 (CH₂Cl₂-MeOH 5:1)

(4-Aminofenil)carbamato de *tert*-butilo (95)¹⁷³

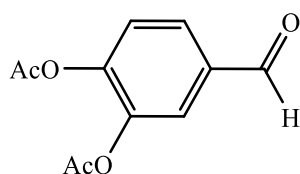
Disolvemos 1,4-fenilendiamina (1084 mg, 97% p/p, 9.7 mmol, 4.9 equiv.) en 8 mL de CH₂Cl₂ anhidro y se mantiene durante 10 minutos agitando en un baño de hielo y salmuera. Tras esto se disuelve anhídrido de Boc (437.0 mg, 99% p/p, 2 mmol) en 2 mL de CH₂Cl₂ anhidro y se adiciona lentamente a la disolución de fenilendiamina. Una vez completada la adición, se mantiene la reacción con agitación bajo atmosfera de argón y en un baño de hielo y salmuera durante 4.25 horas. La mezcla se lleva entonces hasta sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 1:1)

Sólido blanco. Rendimiento: 257.6 mg, 62%. R_f = 0.65 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1)

(4-Isotiocianatofenil)carbamato de *tert*-butilo (96)

La síntesis de este compuesto se llevó a cabo empleando una metodología ligeramente diferente a la usada por otros autores, como por ejemplo la descrita por T. Yamada *et. al.*¹⁸⁹ **95** (668.5 mg, 3.2 mmol) se disuelve en una mezcla de CH₂Cl₂-H₂O 1:1 (40 mL) y se adiciona CaCO₃ (963.7 mg, 9.6 mmol, 3 equiv.) y tiofosgeno (380 μL, 1.5 g/mL, 97% p/p, 4.8 mmol, 1.5 equiv.) manteniéndose la mezcla con agitación, en oscuridad y bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 3.5 horas. Tras esto separamos la fase orgánica de la acuosa y realizamos dos extracciones con CH₂Cl₂ (2x20 mL), tras lo cual se unieron las fases orgánicas y se llevaron a sequedad. La mezcla se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 1:4)

Rendimiento: 649.3 mg, 81%. R_f = 0.81 (AcOEt-ciclohexano 1:1)

3,4-Diacetoxibenzaldehido (97)¹⁷⁴

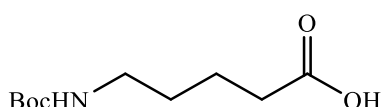
Al 3,4-dihidroxibenzaldehido (100 mg, 98% p/p, 0.71 mmol) se le adiciona anhídrido acético (690 μL, 1.08g/mL, 99% p/p, 7.2 mmol, 10.1 equiv.) y piridina (3 mL, 0.983 g/mL, 99% p/p, 36.9 mmol, 52.0 equiv.) y se mantiene calentando a 37 °C con agitación magnética en oscuridad durante 22 horas. Tras este tiempo se añade hielo y se lleva a cabo una extracción con acetato de etilo (20 mL), lavando la fase orgánica con 2 porciones de HCl 1M (2x20 mL) y posteriormente con NaHCO₃ 1 M (2x20 mL). La fase orgánica

189. T. Yamada, M. Shtashige, K. Yokota, M. Sawa, H. Moriyama. Tnik inhibitor and the use. WO2010064111 A1, **2010**.

se llevó a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 1:2)

Sirupo amarillo pálido. Rendimiento: 67.6 mg, 43%. $R_f = 0.55$ (AcOEt-ciclohexano 1:1)

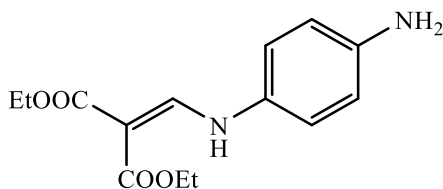
Ácido 5-((*tert*-butoxicarbonil)amino)pentanoico (98)¹⁷⁵



Disolvemos ácido 5-aminovalérico (400 mg, 97% p/p, 3.3 mmol) en 10 mL H₂O y mantenemos la mezcla con agitación a 0 °C. Sobre dicha mezcla, adicionamos 4 mL de dioxano, NaHCO₃ (524.2 mg, 6.23 mmol, 1.9 equiv.) y ^tBoc₂O (1052.1 mg, 98% p/p, 4.7 mmol, 1.4 equiv). La reacción se mantiene con agitación a 0 °C durante 10 minutos y posteriormente se deja a temperatura ambiente durante 21 horas. Transcurrido este tiempo se adiciona HCl 1M hasta obtener un pH = 1, y realizamos una extracción con AcOEt (50 mL), seguida de 2 extracciones más con el mismo disolvente (2x50 mL). El conjunto de las fases orgánicas se lleva a sequedad, obteniéndose el compuesto buscado de manera pura.

Sólido blanco. Rendimiento: 661.2 mg, 92%. $R_f = 0.76$ (CH₂Cl₂-MeOH 1:1).

2-(((4-Aminofenil)amino)metilen)malonato de dietilo (99)¹⁷⁶



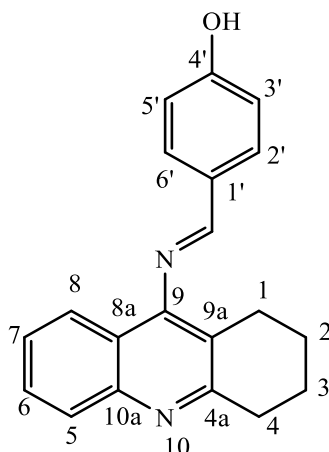
Se disuelve fenilendiamina (503.3 mg, 97% p/p, 4.5 mmol) en 2.5 mL de etanol absoluto y se adiciona etoximetilenmalonato de dietilo (935 µL, 1.08g/mL, 97% p/p 4.5 mmol, 1 equiv.) manteniendose la mezcla a temperatura ambiente con agitación durante 10

minutos. Al observarse por cromatografía de capa fina que la conversión no era total, se añadieron 300 μL más de dietoximetilenmalonato de dietilo y se mantuvo la reacción a temperatura ambiente con agitación durante 20 minutos más, observándose por cromatografía de capa fina la desaparición de la materia de partida. Tras esto la mezcla se lleva a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow Et₂O).

Sólido amarillo. Rendimiento: 758.4 mg, 60%. $R_f = 0.64$ (CH₂Cl₂-MeOH 20:1).

8.3. Síntesis por una nueva ruta de compuestos conocidos

(*E*)-*N*-(4-Hidroxybenciliden)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amina (**9**)



Una mezcla de **6** (39.1 mg, 0.10 mmol) e Pd(OH)₂ (19.2 mg, 20% Pd p/p, 0.036 mmol) en CH₂Cl₂-MeOH 1:1 (2 mL) se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró sobre un lecho de celita (celita[®] 545). La disolución se concentró hasta sequedad y la mezcla obtenida se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-MeOH 60:1 → CH₂Cl₂-MeOH 20:1).

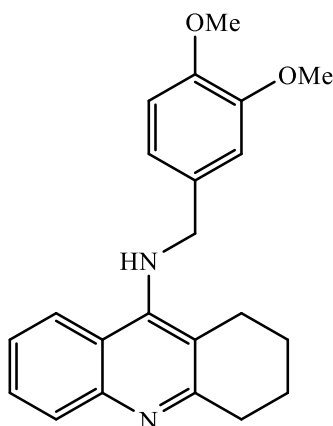
Sirupo amarillo. Rendimiento: 14.3 mg, 48%. R_f = 0.46 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1)

¹H-RMN (300 MHz, mezcla CD₃OD-CDCl₃) δ: 8.20 (1H, s, -N=CH-), 7.88 (1H, d, J₈₋₇ = 8.3 Hz, H-8), 7.82 (2H, m, H-2', H-6'), 7.67 (1H, dd, J_{5,6} = 8.4 Hz, J_{5,7} = 1.0 Hz, H-5), 7.61 (1H, td, J₅₋₆ = 8.4 Hz, J₆₋₈ = 1.4 Hz, H-6), 7.38 (1H, m, H-7), 6.94 (2H, m, H-3', H-5'), 3.09 (2H, t, J = 6.8 Hz, H-4), 2.72 (2H, t, J = 6.8 Hz, H-1), 1.96 (2H, m, H-2), 1.86 (2H, m, H-3) ppm.

¹³C-RMN (125.8 MHz, mezcla CD₃OD-CDCl₃) δ: 164.8 (C-4a), 162.5 (C-4'), 160.0 (-N=CH-), 156.7 (C-9), 146.8 (C-10a), 131.9 (Ar-C), 129.9 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 126.1 (Ar-C), 123.8 (Ar-C), 121.5 (Ar-C), 119.1 (Ar-C), 116.6 (Ar-C), 33.9 (C-4), 25.8 (C-1), 23.4 (C-2, C-3) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₀H₁₉N₂O ([M + H]⁺): 303.1497, encontrado: 303.1492.

***N*-(3,4-Dimetoxibencil)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amina (12)**



Una mezcla de **5** (19.3 mg, 0.056 mmol) e Pd(OH)₂ (4.6 mg, 0.009 mmol, 20% p/p) en CH₂Cl₂-MeOH 1:1 (2 mL) se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, se filtró la mezcla sobre un lecho de celita (celita[®] 545). La disolución filtrada se concentró a sequedad y la mezcla obtenida se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-MeOH 40:1 → CH₂Cl₂-MeOH 10:1).

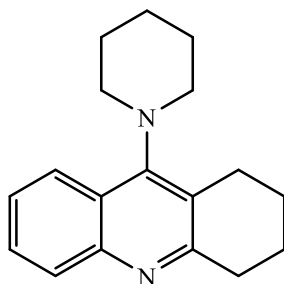
Sirupo amarillo. Rendimiento: 10.0 mg, 52%. R_f = 0.23 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 8.18 (1H, dd, J₈₋₇ = 8.6 Hz, J₈₋₆ = 0.9 Hz, H-8), 7.76 (1H, dd, J₅₋₆ = 8.4 Hz, J₅₋₇ = 0.8 Hz, H-5), 7.65 (1H, ddd, J₆₋₅ = 8.4 Hz J₆₋₇ = 6.9 Hz, J₆₋₈ = 1,3 Hz, H-6), 7.38 (1H, ddd, J₇₋₈ = 8.4 Hz J₇₋₆ = 6.8 Hz J₇₋₅ = 1.3 Hz, H-7), 6.90 (1H, s, J = 7.5 Hz, H-2'), 6.88 (2H, m, H-5', H-6'), 4.80 (2H, s, Ar-CH₂-N-), 3.79 (3H, s, Ar-O-CH₃), 3.73 (3H, s, Ar-O-CH₃), 2.99 (2H, m, H-4), 2.72 (2H, m, H-1), 1.90 (4H, m, H-2, H-3) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CD₃OD) δ: 156.4 (Ar-C), 155.2 (Ar-C), 150.7 (Ar-C), 149.9 (Ar-C), 144.7 (Ar-C), 133.3 ppm (Ar-C), 131.5 (Ar-C), 147.5 (Ar-C), 125.4 (Ar-C), 124.8 (Ar-C), 120.5 (Ar-C), 119.8 (Ar-C), 116.1 (Ar-C), 113.1 (Ar-C), 112.0 (Ar-C), 56.5 (-O-CH₃), 56.4 (-O-CH₃), 52.4 (-HN-CH₂-), 32.3 (Ar-CH₂), 25.7 (Ar-CH₂), 23.6 (-CH₂-), 23.0 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₂H₂₅N₂O₂ ([M + H]⁺): 349.1916, encontrado: 349.1904.

9-(Piperidin-1-il)-1,2,3,4-tetrahydroacridina (17)



Una mezcla de tacrina (400.3 mg, 1.71 mmol), 1,5-dibromopentano (1.62 g, 0.96 mL, 6.83 mmol, 97% p/p, 4 equiv.) y KOH (452.2 mg, 6.85 mmol, 85% p/p, 4 equiv.) en acetonitrilo (20 mL) se mantiene a temperatura ambiente con agitación bajo atmosfera de argón durante 23 horas. Tras este tiempo, se concentra hasta sequedad y se realiza una extracción con 30 mL de AcOEt y 30 mL de H₂O, seguido con posterioridad de dos extracciones con 30 mL de AcOEt cada una. La unión de las fases orgánicas se concentra hasta sequedad, tras lo cual se lleva a cabo una extracción con éter-HCl 6M (30 mL-30 mL) lavándose la fase etérea con 30 mL más de HCl 6 M para separar en la fase acuosa la amina del dihaluro en exceso. A la fase acuosa se le adicionan 150 mL de NaOH 3M y se lleva a cabo nuevamente una extracción con 150 mL de AcOEt y posteriormente realizando dos extracciones con 100 mL de AcOEt cada una. La fase orgánica se concentra hasta sequedad y el residuo resultante se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 6:4).

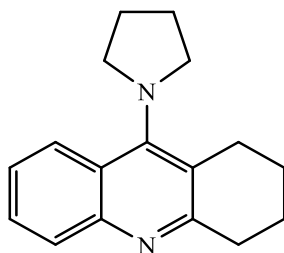
Sólido amarillo. Rendimiento: 161.0 mg, 30%. $R_f = 0.76$ (AcOEt-ciclohexano-TEA 6:4:1).

¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 8.17 (1H, dd, $J_{8-7} = 8.4$ Hz, $J_{8-6} = 1.0$ Hz, H-8), 7.83 (1H, d, $J_{5-6} = 8.3$ Hz, H-5), 7.56 (1H, m H-6), 7.42 (1H, m, H-7), 3.27 (4H, m, 2 CH₂-N-), 3.01 (2H, t, $J_{4-3} = 6.5$ Hz, H-4), 2.96 (2H, t, $J_{1-2} = 6.5$ Hz, H-1), 1.81 (10H, m, 5 - CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CD₃OD) δ : 161.3 (Ar-C), 156.5 (Ar-C), 148.5 (Ar-C), 129.7 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 127.3 (Ar-C), 126.0 (Ar-C), 125.5 (Ar-C), 53.2 (CH₂-N), 34.4 (-CH₂-), 28.1 (-CH₂-), 27.9 (-CH₂-), 25.7 (-CH₂-), 24.0 (-CH₂-), 23.7 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₁₈H₂₃N₂ ([M + H]⁺): 267.1856, encontrado: 267.1854.

9-(Pirrolidin-1-il)-1,2,3,4-tetrahidroacridina (18)



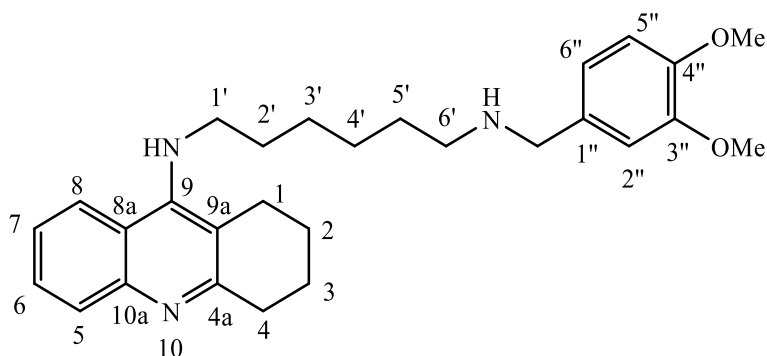
Una mezcla de tacrina (200.1 mg, 0.85 mmol), 1,4-dibromobutano (743.3 mg, 0.411 mL, 3.41 mmol, 99% p/p, 4 equiv.) y KOH (225.8 mg, 3.42 mmol, 85% p/p, 4 equiv.) en acetonitrilo (10 mL) se mantiene a temperatura ambiente con agitación bajo atmosfera de argón durante 25.5 horas. Tras este tiempo, se concentra hasta sequedad y se realiza una extracción con 30 mL de AcOEt y 30 mL de H₂O, seguido con posterioridad de dos extracciones con 30 mL de AcOEt cada una. Las fases orgánicas se concentran hasta sequedad, tras lo cual se lleva a cabo una extracción con éter-HCl 6M (30 mL-30 mL) lavándose la fase etérea con 30 mL más de HCl 6 M para separar en la fase acuosa la amina del dihaluro en exceso. A la fase acuosa se le adicionan 150 mL de NaOH 3M y se lleva a cabo nuevamente una extracción con 150 mL de AcOEt y posteriormente realizando dos extracciones con 100 mL de AcOEt cada una. La fase orgánica se concentra hasta sequedad y el residuo resultante se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 6:4).

Sólido amarillo. Rendimiento: 106.1 mg, 42%. $R_f = 0.78$ (AcOEt-ciclohexano-TEA 6:4:1).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.93 (1H, d, $J_{8-7} = 8.4$ Hz, H-8), 7.85 (1H, d, $J_{5-6} = 8.2$ Hz, H-5), 7.56 Ar-H (1H, m, H-6), 7.40 (1H, m, H-7), 3.39 (4H, m, 2 CH₂-N-), 3.03 (2H, t, $J_{4-3} = 6.5$ Hz, H-4), 2.81 (2H, t, $J_{1-2} = 6.5$ Hz, H-1), 2.10 (4H, m, 2 -CH₂-), 1.91 (2H, m, -CH₂), 1.82 (2H, m, -CH₂) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CD₃OD) δ : 161.2 (Ar-C), 153.3 (Ar-C), 148.4 (Ar-C), 130.0 (Ar-C), 129.7 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 127.4 (Ar-C), 126.0 (Ar-C), 125.2 (Ar-C), 52.3 (-CH₂-N), 34.3 (-CH₂-), 27.4 (-CH₂-), 23.9 (-CH₂-), 23.8 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₁₇H₂₁N₂ ([M + H]⁺): 253.1699, encontrado: 253.1695

N-(6-(3,4-dimetoxibencil)amino)hexil-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (19)

68 (354.1 mg, 0.98 mmol) se disuelve en 10 mL de DMF y se adiciona NaN_3 (222.7 mg, 99% p/p, 3.4 mmol, 3.5 equiv.). La mezcla se mantiene a 75 °C bajo atmósfera de argón y con agitación magnética durante 25 horas. Transcurrido este tiempo se lleva a cabo una extracción con $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ (20 mL-20 mL), realizándose dos extracciones más con dos porciones de 20 mL de CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas se llevan hasta sequedad obteniéndose un sirupo amarronado. Dicho sirupo es disuelto en 15 mL de MeOH y se añade a dicha disolución Pd/C (175.5 mg, 10% de Pd p/p, 0.16 mmol, 0.16 equiv.) para la reducción de la azida a amina. La reacción se mantiene a temperatura ambiente bajo atmósfera de hidrógeno durante 5 horas. Después de este tiempo, se filtra la mezcla sobre un lecho de celita (celita[®] 545). La disolución se concentra hasta sequedad y se purifica en columna cromatográfica de gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MeOH-NH}_3$ (28% en H_2O) 97:3), obteniéndose 349.2 mg de la amina pura. De dicha amina se recoge una fracción (55.7 mg, 0.19 mmol) sobre los que se adicionan 2.5 mL de tolueno, un exceso de 3,4-dimetoxibenzaldehído (64.4 mg, 0.39 mmol, 2.0 equiv.) y 40 gotas de etilendiamina (pH = (9-10)). Esta mezcla se calienta a reflujo bajo atmósfera de argón durante 17 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se lleva a sequedad y se redisuelve en 4 mL de MeOH, añadiéndose Pd/C (40.9 mg, 10% de Pd p/p, 0.04 mmol, 0.2 equiv.) y se mantiene dicha mezcla con agitación bajo atmósfera de hidrogeno a temperatura ambiente durante 2.25 horas. La mezcla obtenida se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow MeOH- NH_3 (28% v/v en H_2O) 300:1)

Sirupo amarillo. Rendimiento: 68.4 mg, 82%. $R_f = 0.21$ (AcOEt-ciclohexano-TEA 6:4:1)

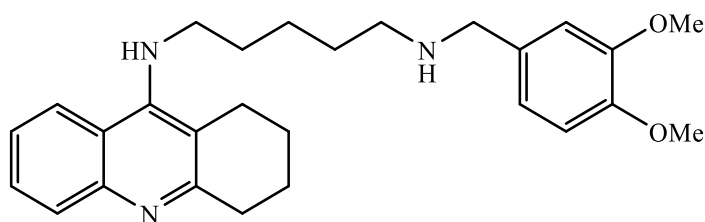
¹H-RMN (300 MHz, MeOD) δ : 8.09 (1H, d, $J_{8-7} = 8.4$ Hz, H-8), 7.76 (1H, dd, $J_{5-6} = 8.4$ Hz, $J_{5-6} = 0.6$ Hz, H-5), 7.54 (1H, m, H-6), 7.35 (1H, m, H-7), 6.95 (1H, d, $J_{2''-6''} = 1.6$ Hz, H-2''), 6.84 (2H, m, H-5'', H-6''), 3.81 (3H, s, -OCH₃), 3.79 (3H, s, -OCH₃), 3.63 (2H,

s, -CH₂-N), 3.52 (2H, t, $J_{1'-2'} = 7.1$ Hz, H-1'), 2.97 (2H, m, -CH₂-), 2.73 (2H, m, -CH₂-), 2.49 (2H, t, $J_{6'-5'} = 7.5$ Hz, H-6'), 1.90 (4H, m, 2 -CH₂-), 1.63 (2H, m, -CH₂-), 1.47 (2H, m, -CH₂-), 1.32 (4H, m, 2 -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOD) δ : 159.1 (Ar-C), 153.3 (Ar-C), 150.5 (Ar-C), 149.7 (Ar-C), 147.9 (Ar-C), 133.3 (Ar-C), 129.8 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 124.7 (Ar-C), 124.4 (Ar-C), 122.1 (Ar-C), 121.3 (Ar-C), 116.8 (Ar-C), 113.5 (Ar-C), 112.8 (Ar-C), 56.5 (OCH₃), 56.4 (OCH₃), 54.1 (-CH₂-N), 49.6 (-CH₂-N), 34.2 (-CH₂-), 32.2 (-CH₂-), 30.1 (-CH₂-), 28.1 (-CH₂-), 27.8 (-CH₂-), 26.2 (-CH₂-), 24.1 (-CH₂-), 23.7 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₈H₃₈N₃O₂ ([M + H]⁺): 448.2959, encontrado: 448.2953.

N-(5-(3,4-dimetoxibencil)amino)pentil-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (21)



67 (312.8 mg, 0.90 mmol) se disuelven en 10 mL de DMF y se adiciona NaN₃ (178.2 mg, 99% p/p, 2.71 mmol, 3.0 equiv.). La mezcla se mantiene a 70 °C bajo atmósfera de argón y con agitación magnética durante 26 horas. Transcurrido este tiempo se lleva a cabo una extracción con CH₂Cl₂-H₂O (20 mL-20 mL), realizándose dos extracciones más con dos porciones de 20 mL de CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se llevan hasta sequedad obteniéndose un sirupo amarronado. Dicho sirupo es disuelto en 10 mL de MeOH y se añade a dicha disolución Pd(OH)₂/C (82.1 mg, 20% de Pd p/p, 0.15 mmol, 0.17 equiv.) para la reducción de la azida a amina. La reacción se mantiene a temperatura ambiente bajo atmósfera de hidrógeno durante 7 horas. Después de este tiempo, se filtra la mezcla sobre un lecho de celita (celita[®] 545). La disolución se concentra hasta sequedad obteniéndose 250.3 mg de un sirupo amarronado. De dicho sirupo se recogen 144.2 mg sobre los que se adicionan 5 mL de tolueno, un exceso de 3,4-dimetoxibenzaldehído (171.0 mg, 1.03 mmol) y 80 gotas de etilendiamina (pH = (9-10)). Esta mezcla se calienta a reflujo bajo atmósfera de argón durante 17 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se lleva a sequedad y se redisuelve en 4 mL de MeOH, añadiéndose Pd/C (70.6 mg, 10%

de Pd p/p, 0.07 mmol), y se mantiene dicha mezcla con agitación bajo atmósfera de hidrogeno a temperatura ambiente durante 2.5 horas. La mezcla obtenida se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano-TEA 6:4:1)

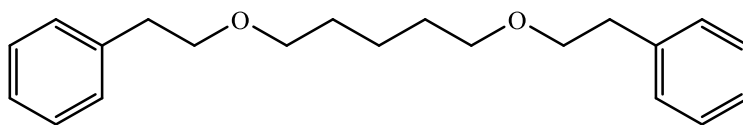
Sirupo amarillo. Rendimiento: 104.4 mg, 46%. $R_f = 0.20$ (AcOEt-ciclohexano-TEA 6:4:1)

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, MeOD) δ : 8.04 (1H, d, $J_{8-7} = 8.5$ Hz, H-8), 7.76 (1H, dd, $J_{5-6} = 8.5$ Hz, $J_{5-6} = 0.8$ Hz, H-5), 7.51 (1H, m, H-6), 7.31 (1H, m, H-7), 6.92 (1H, d, $J_{2''-6''} = 1.7$ Hz, H-2''), 6,80 (2H, m, H-5'', H-6''), 3.78 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.76 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.59 (2H, s, $-\text{CH}_2\text{-N}$), 3.47 (2H, t, $J_{1'-2'} = 7.1$ Hz, H-1'), 2.94 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 2,68 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 2.46 (2H, t, $J_{6'-5'} = 7.2$ Hz, H-6'), 1.85 (4H, m, 2 $-\text{CH}_2-$), 1.59 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 1.47 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 1.31 (2H, m, $-\text{CH}_2-$) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, MeOD) δ : 159.2 (Ar-C), 153.1 (Ar-C), 150.4 (Ar-C), 149.6 (Ar-C), 148.0 (Ar-C), 133.5 (Ar-C), 129.6 (Ar-C), 128.1 (Ar-C), 124.7 (Ar-C), 124.3 (Ar-C), 122.0 (Ar-C), 121.4 (Ar-C), 116.8 (Ar-C), 113.4 (Ar-C), 112.8 (Ar-C), 56.5 (OCH₃), 56.4 (OCH₃), 54.2 ($-\text{CH}_2\text{-N}$), 49.6 ($-\text{CH}_2\text{-N}$), 34.3 ($-\text{CH}_2-$), 32.1, ($-\text{CH}_2-$), 30.0 ($-\text{CH}_2-$), 26.1 ($-\text{CH}_2-$), 25.7 ($-\text{CH}_2-$), 24.1 ($-\text{CH}_2-$), 23.7 ($-\text{CH}_2-$) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 434.2802, encontrado: 434.2795.

1,5-Difenetoxipentano (32)



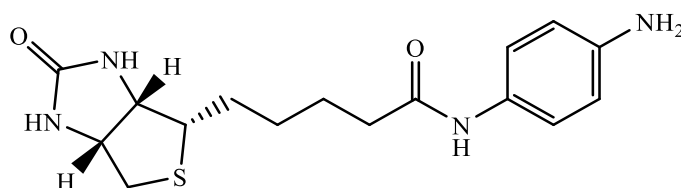
Se disuelve 2-feniletanol (105 μL , 1.02 g/mL, 99% p/p, 0.87 mmol, 4.1 equiv.) en 2 mL de DMF anhidra y se adiciona NaH (131.5 mg, 95% p/p 5.2 mmol, 23.7 equiv.), manteniéndose esta mezcla con agitación a temperatura ambiente y atmosfera inerte (Ar). A dicha mezcla se le adiciona 1,5-dibromopentano (30 μL , 1.688 g/mL, 97% p/p, 0.21 mmol). La reacción se da por finalizada tras 6 horas, adicionándose agua para eliminar el exceso de hidruro y se lleva hasta sequedad. La mezcla seca se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → Et₂O)

Sirupo transparente. Rendimiento: 17.2 mg, 26%. $R_f = 0.5$ (Et₂O-ciclohexano 1:4)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.17 (10H, m, Ar-H), 3.54 (4H, t, $J = 7.3$ Hz, 2 CH₂-O-), 3.35 (4H, t, $J = 6.7$ Hz, 2 CH₂-O-), 2.81 (4H, t, $J = 7.3$ Hz, 2 -CH₂-Ar), 1.51 (4H, m, 2 -CH₂-), 1.31 (2H, m, -CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₁H₂₈NaO₂ ([M + Na]⁺): 335.1982, encontrado: 335.1981

4-(Biotinilamino)anilina (41)



La D-biotina (488.8 mg, 2 mmol) se disuelven en 30 mL de DMF seca y se adiciona Et₃N (640 μ L, 99% p/p, 4.5 mmol, 2.25 equiv.) manteniéndose la mezcla con agitación a temperatura ambiente. A dicha disolución se le adiciona lentamente cloroformiato de isobutilo (340 μ L, 98% p/p, 2.6 mmol, 1.3 equiv.) para formar un anhídrido mixto, manteniendo la mezcla bajo atmosfera de argón.

Por otro lado se disuelve 1,4-fenilendiamina (234.8 mg, 97% p/p, 2.1 mmol, 1.05 equiv.) en 5 mL de DMF seca y se mantiene con agitación a 0 °C bajo atmosfera inerte (Ar). A esta disolución le añadimos la mezcla que contiene el anhídrido lentamente. La disolución se deja agitando a temperatura ambiente durante 2.5 horas. Transcurrido este tiempo se lleva la mezcla a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ \rightarrow CH₂Cl₂-MeOH 5:1)

Solido blanco. Pf = (186-200) °C. $[\alpha]_D^{23} = +40$ (c 0.85, DMSO). Rendimiento: 478.9 mg, 72%. $R_f = 0.50$ (CH₂Cl₂-MeOH 5:1)

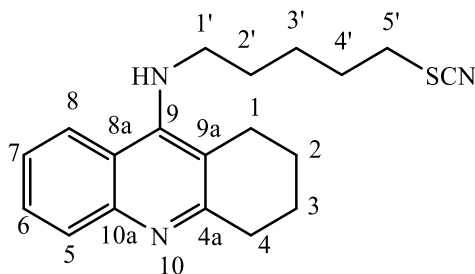
¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ : 9.42 (1H, s, -CONH-Ar), 7.19 (2H, m, Ar-H), 6.48 (2H, m, Ar-H), 6.45 (1H, s, NH-CO-NH), 6.36 (1H, s, NH -CO-NH), 4.81 (2H, s, Ar-NH₂), 4.30 (1H, m, CH-NHCONH-), 4.13 (1H, m, CH-NHCONH-), 3.12 (1H, m, -CH-CH₂), 2.82 (1H, dd, $J = 12.5$ Hz, $J' = 5.0$, -CH₂-S-), 2.58 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, -CH₂-S-), 2.21 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, -CH₂-CONH-), 1.47 (6H, m, 3 -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 170.1 (-CONH-), 162.7 (-NHCONH-), 144.6 (Ar-C-NH₂), 128.6 (Ar-C-NHCO-), 120.9 (Ar-C-H), 113.8 (Ar-C-H), 61.1 (CH-NH), 59.2 (CH-NH), 55.4 (CH-S-), 39.8 (CH₂-S-), 36.0 (-CH₂-), 28.3 (-CH₂-), 28.1 (-CH₂-), 25.3 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₁₆H₂₃N₄O₂S ([M + H]⁺): 335.1536, encontrado: 355.1535.

8.4. Síntesis de nuevos compuestos

N-(1,2,3,4-Tetrahidroacridin-9-il)-*N*-(5-tiocianatopentil)amina (1)



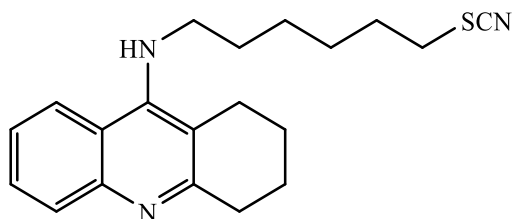
Una mezcla de **67** (152.4 mg, 0.44 mmol) y KSCN (132.9 mg, 1.35 mmol, 99% p/p, 3.07 equiv.), en DMF (2 mL) se calienta a 70 °C bajo atmosfera de argón durante 17 horas. Transcurrido este tiempo, se concentra hasta sequedad y el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 96.0 mg, 67%. $R_f = 0.49$ (AcOEt-ciclohexano-TEA 6:4:1).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ : 8.11 (1H, dd, $J_{8-7} = 8.6$ Hz, $J_{8-6} = 0.6$ Hz, H-8), 7.77 (1H, dd, $J_{5-6} = 8.5$ Hz, $J_{5-7} = 0.7$ Hz, H-5), 7.57 (1H, ta, $J = J_{5-6}$, H-6), 7.38 (1H, ta, $J_{7-8} = J_{7-6} = 8.6$ Hz, H-7), 3.58 (2H, t, $J_{1'-2'} = 7.1$ Hz, H-1'), 2.99 (m, 4H, 2 -CH₂-, CH₂-SCN, H-4), 2.78 (2H, m, H-1), 1.93 (4H, m, 2 -CH₂-), 1.81 (2H, m, -CH₂-), 1.70 (2H, m, -CH₂-), 1.53 (2H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (125.8 MHz, CD₃OD) δ : 159.0 (C-4a), 153.4 (Ar-C), 147.6 (Ar-C), 129.9 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 124.9 (Ar-C), 124.4 (Ar-C), 121.3 (Ar-C), 116.9 (Ar-C), 113.6 (-SCN), 49.6 (CH₂-NH-), 34.7 (-CH₂-), 34.0 (-CH₂-), 31.5 (-CH₂-), 30.8 (-CH₂-), 26.2 (-CH₂-), 24.1 (-CH₂-), 23.6 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₁₉H₂₄N₃S ([M + H]⁺): 326.1685, encontrado: 326.1682.

N-(1,2,3,4-Tetrahidroacridin-9-il)-N-(6-tiocianatohexil)amina (2)

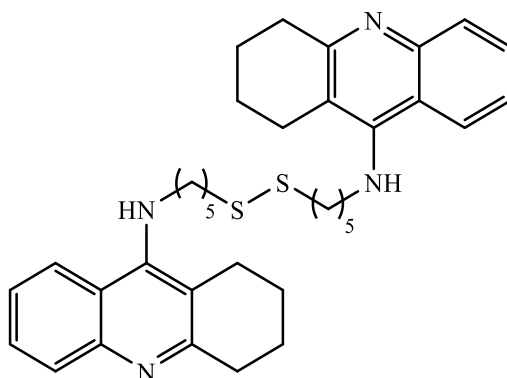
Una mezcla de **68** (149.7 mg, 0.41 mmol) y KSCN (121.8 mg, 1.24 mmol, 99% p/p, 2.95 equiv.), en DMF (2 mL) se calienta a 70°C bajo atmosfera de argón durante 17 horas. Transcurrido este tiempo, se concentra hasta sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 6:4).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 54.8 mg, 39%. $R_f = 0.39$ (AcOEt-ciclohexano-TEA 6:4:1).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 8.09 (1H, dd, $J_{8-7} = 8.5$ Hz, $J_{8-6} = 0.6$ Hz, H-8), 7.77 (1H, dd, $J_{5-6} = 8.5$ Hz, $J_{5-7} = 0.7$ Hz, H-5), 7.55 (1H, m, H-6), 7.37 (1H, m, H-7), 3.54 (2H, t, $J_{1'-2'} = 7.1$ Hz, H-1'), 2.98 (2H, m, H-4), 2.95 (2H, t, $J_{6'-5'} = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-SCN}$), 2.75 (2H, m, H-1), 1.91 (4H, m, 2 CH_2 , H-2, H-3), 1.76 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 1.66 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 1.42 (4H, m, 2 $-\text{CH}_2-$) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (125.8 MHz, CD_3OD) δ : 159.1 (C-4a), 153.3 (Ar-C), 147.8 (Ar-C), 129.8 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 124.8 (Ar-C), 124.4 (Ar-C), 121.3 (Ar-C), 116.9 (Ar-C), 113.7 ($-\text{SCN}$), 49.6 ($\text{CH}_2\text{-NH-}$), 34.7 ($-\text{CH}_2-$), 34.1 ($-\text{CH}_2-$), 32.0 ($-\text{CH}_2-$), 30.9 ($-\text{CH}_2-$), 28.5 ($-\text{CH}_2-$), 27.2 ($-\text{CH}_2-$), 26.2 ($-\text{CH}_2-$), 24.1 ($-\text{CH}_2-$), 23.7 ($-\text{CH}_2-$) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{S}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 340.1842, encontrado: 340.1836.

Bis(5-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ilamino)pentil)disulfuro (3)

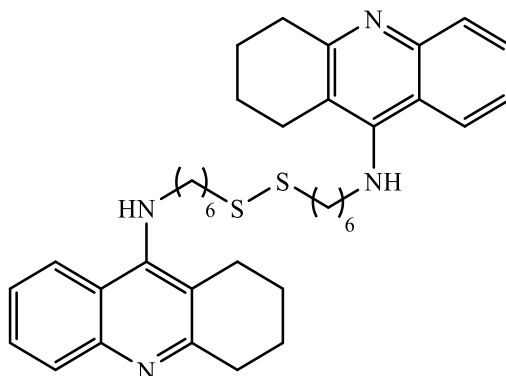
Una mezcla de **1** (81.1 mg, 0.25 mmol) y NaBH₄ (9.9 mg, 0.25 mmol, 97% p/p, 1.0 equiv.), en EtOH (1.5 mL) se mantiene a temperatura ambiente durante 25 horas. Transcurrido este tiempo, se añade otro equivalente de borohidruro sódico. Tras un tiempo de reacción total de 44.5 horas se lleva la mezcla hasta sequedad y el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 6:4).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 38.6 mg, 52%. R_f = 0.41 (AcOEt-ciclohexano-TEA 6:4:1).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 8.03 (2H, dd, *J*₈₋₇ = 8.6 Hz, *J*₈₋₆ = 0.9 Hz, H-8), 7.74 (2H, d, *J*₄₋₃ = 8.5 Hz, H-5), 7.50 (2H, m, H-6), 7.31 (2H, m, H-7), 3.47 (4H, t, *J*_{1'-2'} = 7.1 Hz, 2 CH₂-NH-), 2.93 (4H, m, H-4), 2.69 (4H, m, H-1), 2.53 (4H, t, *J*_{5'-4'} = 7.2 Hz, 2 CH₂-S-), 1.86 (8H, m, H-2, H-3), 1.57 (8H, m, 4 -CH₂-), 1.36 (4H, m, 2 -CH₂-), ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CD₃OD) δ: 158.8 (C-4a), 153.3 (Ar-C), 147.6 (Ar-C), 129.9 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 124.7 (Ar-C), 124.5 (Ar-C), 121.1 (Ar-C), 116.6 (Ar-C), 49.5 (-CH₂-NH-), 39.5 (CH₂-S-), 34.0 (-CH₂-), 31.7 (-CH₂-), 29.7 (-CH₂-), 26.5 (-CH₂-), 26.1 (-CH₂-), 24.0 (-CH₂-), 23.6 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₃₆H₄₇N₄S₂ ([M + H]⁺): 599.3237, encontrado: 599.3229.

Bis[5-(1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-ilamino)hexil]disulfuro (4)

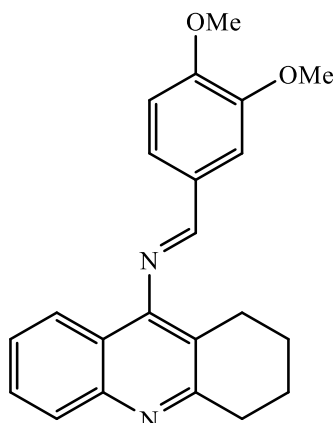
Una mezcla de **2** (39.8 mg, 0.12 mmol) y NaBH₄ (4.4 mg, 0.11 mmol, 97% p/p, 0.96 equiv.), en EtOH (1.5 mL) se mantiene a temperatura ambiente durante 18 horas. Tras este tiempo de reacción, se lleva la mezcla hasta sequedad y el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 6:4).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 19.6 mg, 53%. R_f = 0.38 (AcOEt-ciclohexano-TEA 6:4:1).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 8.06 (2H, dd, J₈₋₇ = 8.6 Hz, J₈₋₆ = 0.9 Hz, H-8), 7.75 (2H, dd, J₅₋₆ = 8.5 Hz, J₅₋₇ = 0.8 Hz, H-5), 7.53 (2H, m, H-6), 7.33 (2H, m, H-7), 3.50 (4H, t, J_{1'-2'} = 7.1 Hz, 2 CH₂-NH-), 2.94 (4H, m, H-4), 2.70 (4H, m, H-1) 2.54 (4H, t, J_{6'-5'} = 7.2 Hz, 2 CH₂-S-), 1.86 (8H, m, H-2, H-3), 1.57 (12H, m, 6 -CH₂-), 1.30 (4H, m, 2 -CH₂-), ppm.

¹³C-RMN (125.8 MHz, CD₃OD) δ: 158.6 (C-4a), 153.5 (Ar-C), 147.4 (Ar-C), 130.0 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 124.8 (Ar-C), 124.5 (Ar-C), 121.0 (Ar-C), 116.5 (Ar-C), 49.6 (-CH₂-NH-), 39.5 (CH₂-S-), 33.9 (-CH₂-), 32.1 (-CH₂-), 29.9 (-CH₂-), 28.9 (-CH₂-), 27.4 (-CH₂-), 26.1 (-CH₂-), 24.0 (-CH₂-), 23.6 (-CH₂-), ppm.

HRESI-MS calculado para C₃₈H₅₁N₂S₂ ([M + H]⁺): 627.3550, encontrado: 627.3539.

(E)-N-(3,4-Dimetoxibenciliden)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amina (5)

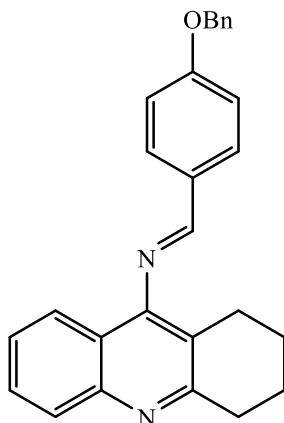
A una mezcla de tacrina (50.0 mg, 0.25 mmol) y 3,4-dimetoxibenzaldehído (35.9 mg, 0.25 mmol, 99% p/p, 0.8 equiv.), en tolueno anhidro (2 mL) se le añaden unas gotas de dietilamina (15 gotas, pH entre 9 y 10). La mezcla se calienta a reflujo bajo atmósfera inerte durante 5 días. Tras este tiempo, se concentra hasta sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 40:1).

Sólido amarillo. Rendimiento: 35.8 mg, 41%. $R_f = 0.61$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 10:1).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.25 (1H, s, $-\text{N}=\text{CH}-$), 7.88 (1H, d, $J_{8-7} = 8.4$ Hz, H-8), 7.70 (1H, s, H-2'), 7.65 (1H, d, $J_{5-6} = 8.4$ Hz, H-5),), 7.62 (1H, m, H-6), 7.45 (1H, d, $J_{6-5'} = 8.2$ Hz, H-6'), 7.38 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-7), 7.06 (1H, d, $J_{5'-6'} = 8.3$ Hz, H-5'), 3.91 (3H, s, Ar-O- CH_3), 3.90 (3H, s, Ar-O- CH_3), 3.07 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-4), 2.69 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1), 1.94 (2H, m, H-2), 1.83 (2H, m, H-3) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (125.8 MHz, CD_3OD) δ : 165.6 (C-4a), 160.6 ($-\text{N}=\text{CH}-$), 157.1 (C-9), 154.6 (Ar-C-O), 151.1 (Ar-C-O), 147.5 (C-10a), 130.2 (Ar-C), 129.8 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 126.5 (Ar-C), 126.0 (Ar-C), 124.1 (Ar-C), 121.9 (Ar-C), 119.3 ppm (Ar-C), 112.3 (Ar-C), 110.8 (Ar-C), 56.5 ($-\text{O}-\text{CH}_3$), 56.5 ($-\text{O}-\text{CH}_3$), 34.4 (C-4), 26.2 (C-1), 23.8 (C-2, C-3) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 347.1760, encontrado: 347.1745.

(E)-N-(4-(Benciloxi)benciliden)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (6)

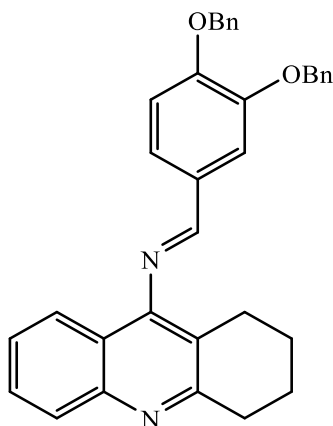
A una mezcla de tacrina (39.2 mg, 0.20 mmol, 1) y 4-(benciloxi)benzaldehído (70.4 mg, 0.33 mmol, 1.7 equiv.) en tolueno anhidro (2 mL), se le añaden unas gotas de dietilamina (30 gotas, pH entre 9 y 10). La mezcla se calienta a reflujo bajo atmosfera inerte durante 47 horas. Tras este tiempo, se concentra la mezcla hasta sequedad y el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 1:2).

Sólido amarillo. Rendimiento: 50.2 mg, 65%. $R_f = 0.41$ (AcOEt-ciclohexano 1:1).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.22 (1H, s, $-\text{N}=\text{CH}-$), 7.97 (1H, d, $J_{8-7} = 8.6$ Hz, H-8), 7.92 (2H, m, H-2', H-6'), 7.67 (1H, m, H-6), 7.60 (1H, m, H-7), 7.41 (6H, m, Ar-H), 7.12 (2H, m, H-3', H-5'), 5.18 (2H, s, Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.14 (2H, t, $J = 6,4$, H-4), 2.72 (2H, t, $J = 6,4$ Hz, H-1), 1.96 (2H, m, H-2), 1.86 (2H, m, H-3) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ : 162.7, 162.2 (C-4a, C-4'), 159.5 ($-\text{N}=\text{CH}-$), 155.0 (C-9), 147.0 (C-10a), 136.5 (C-1''), 130.9 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 128.8 ppm (Ar-C), 128.7 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 125.1 (Ar-C), 123.1 (Ar-C), 120.6 (Ar-C), 118.0 (Ar-C), 115.4 (Ar-C), 70.3 (Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$ -), 34.3 (C-4), 25.4 (C-1), 23.2, 23.0 (C-2, C-3) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 393.1967, encontrado: 393.1953.

(E)-N-(3,4-Bis(benciloxi)benciliden)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (7)

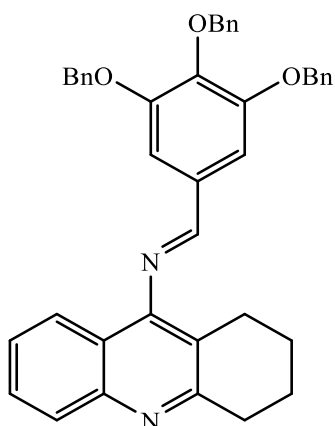
A una mezcla de tacrina (40.0 mg, 0.20 mmol) y 3,4-bis(benciloxi)benzaldehído (108.4 mg, 0.34 mmol, 1.7 equiv.) en tolueno anhidro (2 mL), se le añaden unas gotas de dietilamina (30 gotas, pH entre 9 y 10). La mezcla se calienta a reflujo bajo atmósfera inerte durante 44 horas. Tras este tiempo, se concentra la mezcla hasta sequedad y el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 1:1).

Sólido amarillo. Rendimiento: 56.6 mg, 56%. $R_f = 0.36$ (AcOEt-ciclohexano 1:1).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.16 (1H, s, $-\text{N}=\text{CH}-$), 7.98 (1H, d, $J_{8-7} = 8.2$ Hz, H-8), 7.80 ppm (1H, s, H-2'), 7.65 (1H, dd, $J_{5-6} = 8.4$ Hz, $J_{5-7} = 0.9$ Hz, H-5), 7.60 (1H, m, H-6), 7.50 (4H, m, Ar-H), 7.37 (8H, m, Ar-H), 7.02 (1H, d, $J_{5'-6'} = 8.2$ Hz, H-5'), 5.27 (4H, s, Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.15 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-4), 2.71 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1), 1.96 (2H, m, H-2), 1.86 (2H, m, H-3) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ : 162.8 (C-4a), 159.5 ppm ($-\text{N}=\text{CH}-$), 154.8 (C-9), 152.6 (C-4'), 149.5 (C-3'), 147.0 (C-10a), 136.9 (Ar-C), 136.7 (Ar-C), 129.1 (Ar-C), 128.7 (Ar-C), 128.7 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.1 (Ar-C), 128.1 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 127.2 (Ar-C), 125.1 (Ar-C), 124.9 (Ar-C), 123.0 (Ar-C), 120.5 (Ar-C), 118.0 (Ar-C), 113.8 (Ar-C), 112.5 (Ar-C), 71.2 (Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$ -), 71.1 (Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$ -), 34.3 (C-4), 25.4 (C-1), 23.2, 23.0 (C-2, C-3) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 499.2386, encontrado: 499.2372.

(E)-N-(3,4,5-Tris(benciloxi)benciliden)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (8)

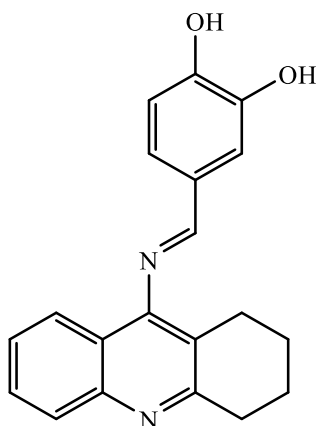
A una mezcla de tacrina (30.9 mg, 0.16 mmol, 1 equiv.) y 3,4,5-tris(benciloxi)benzaldehído (102.9 mg, 0.24 mmol, 1.5 equiv.) en tolueno anhidro (2 mL), se le añaden unas gotas de dietilamina (30 gotas, pH entre 9 y 10). La mezcla se calienta a reflujo bajo atmosfera inerte durante 45 horas. Tras este tiempo, se concentra la mezcla hasta sequedad y el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 1:2).

Sólido amarronado. Rendimiento: 54.4 mg, 58%. $R_f = 0.37$ (AcOEt-ciclohexano 1:1).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.16 (1H, s, $-\text{N}=\text{CH}-$), 8.00 (1H, d, $J_{8-7} = 8.2$ Hz, H-8), 7.63 (2H, m, H-5, H-6), 7.38 (18H, m, Ar-H), 5.21 (4H, s, Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$), 5.19 (2H, s, Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.16 (1H, t, $J = 6.4$ Hz, H-4), 2.72 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-1), 1.98 (2H, m, H-2), 1.88 (2H, m, H-3) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ : 163.0 (C-4a), 159.5 ($-\text{N}=\text{CH}-$), 154.5 (Ar-C), 153.4 (Ar-C), 147.0 (Ar-C), 142.1 (Ar-C), 137.6 (Ar-C), 136.8 (Ar-C), 130.9 (Ar-C), 128.8 (Ar-C), 128.7 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.4 (Ar-C), 128.2 (Ar-C), 128.1 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 125.2 (Ar-C), 123.0 (Ar-C), 120.4 (Ar-C), 117.9 (Ar-C), 108.3 (Ar-C), 75.4 (Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$), 71.4 (Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$), 34.2 (C-4), 25.5 (C-1), 23.1, 23.0 (C-2, C-3) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{41}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_3$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 605.2804, encontrado: 605.2776.

(E)-N-[3,4-(Dihidroxi)benciliden]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (10)

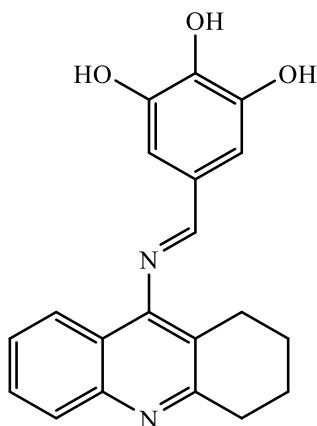
Una mezcla de **7** (53.1 mg, 0.11 mmol) en CH₂Cl₂-MeOH 1:1 (3 mL) y empleándose Pd(OH)₂ (24.5 mg, 20% Pd p/p, 0.046 mmol) como catalizador, se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, se filtró la mezcla sobre un lecho de celita (celita® 545). La disolución se concentró a sequedad y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-MeOH 40:1 → CH₂Cl₂-MeOH 20:1).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 6.8 mg, 20%. R_f = 0.35 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1).

¹H-RMN (500 MHz, mezcla CD₃OD-CDCl₃) δ: 8.10 (1H, s, -N=CH-), 7.87 (1H, d, J₈₋₇ = 8.4 Hz; H-8), 7.66 (1H, dd, J₅₋₆ = 8.4 Hz, J₅₋₇ = 1.0 Hz, H-5), 7.59 (1H, m, H-6), 7.50 (1H, s, H-2'), 7.36 (1H, t, J₇₋₈ = J₇₋₆ = 7.7 Hz, H-7), 7.23 (1H, dd, J_{5'-6'} = 8.2 Hz, J_{2'-6'} = 2.0, H-6'), 6.91 (1H, d, J_{5'-6'} = 8.2, H-5'), 3.07 (2H, t, J = 6.4 Hz, H-4), 2.70 (2H, t, J = 6.5 Hz, H-1), 1.94 (2H, m, H-2), 1.83 (2H, m, H-3) ppm.

¹³C-RMN (125.8 MHz, mezcla CD₃OD-CDCl₃) δ: 164.7 (C-4a), 159.8 (-N=CH-), 156.2 (C-9), 150.6 (C-4'), 146.7, 146.2 (C-10a, C-3'), 129.6 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.4 (Ar-C), 125.8 (Ar-C), 124.1 (Ar-C), 123.5 (Ar-C), 121.3 (Ar-C), 118.9 (Ar-C), 115.8 (Ar-C), 114.7 (Ar-C), 33.7 (C-4), 25.6 (C-1), 23.2 (C-2, C-3) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₀H₁₉N₂O₂ ([M + H]⁺): 319.1447, encontrado: 319.1435.

(E)-N-(3,4,5-Trihidroxibenciliden)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (11)

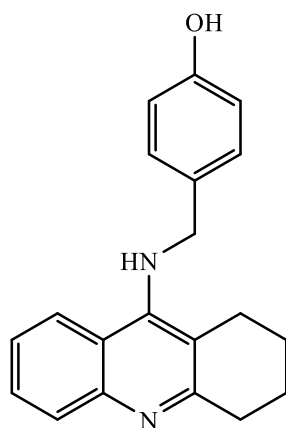
Una mezcla de **8** (45.9 mg, 0.076 mmol) en CH₂Cl₂-MeOH 1:1 (2 mL) empleándose Pd/C (24.5 mg, 10% Pd p/p, 0.016 mmol) como catalizador, se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se filtró la mezcla sobre un lecho de celita (celita[®] 545). La disolución filtrada se concentró a sequedad y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

Sirupo anaranjado. Rendimiento: 12.7 mg, 50%. R_f = 0.58 (CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 8.07 (1H, s, -N=CH-), 7.88 (1H, d, J₈₋₇ = 8.4 Hz, H-8), 7.65 (2H, m, H-5, H-6), 7.41 (1H, td, J₇₋₈ = J₇₋₆ = 8.3 Hz, J₇₋₅ = 1.1, H-7), 7.03 (2H, s, H-2', H-6'), 3.09 (2H, t, J = 6.5 Hz, H-4), 2.70 (2H, t, J = 6.5 Hz; H-1), 1.96 (2H, m, H-2), 1.86 (2H, m, H-3) ppm.

¹³C-RMN (125.8 MHz, CD₃OD) δ: 165.9 (C-4a), 160.5 (-N=CH-), 157.5 (C-9), 147.3, 147.2 (C-10a, C-3', C-5'), 134.2 (Ar-C), 130.3 (Ar-C), 127.8 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 126.5 (Ar-C), 124.2 (Ar-C), 122.0 (Ar-C), 119.4 (Ar-C), 109.5 (C-2', C-6'), 34.3 (C-4), 26.1 (C-1), 23.8 (C-2, C-3) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₀H₁₉N₂O₃ ([M + H]⁺): 335.1396, encontrado: 335.1390.

N-(4-Hidroxibencil)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (13)

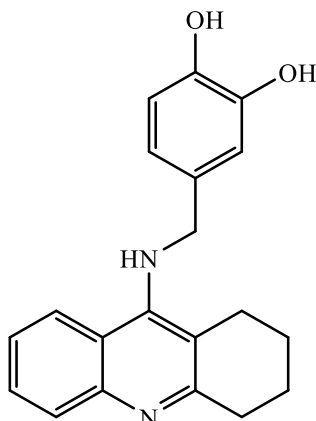
Una mezcla de **6** (53.0 mg, 0.14 mmol) en CH₂Cl₂-MeOH 1:1 (2 mL) y empleando Pd/C (29.1 mg, 10% Pd p/p, 0.027 mmol) como catalizador, se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se filtró la mezcla sobre un lecho de celita (celita[®] 545). La disolución se concentró a sequedad y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-MeOH 10:1 → CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 11.7 mg, 29%. R_f = 0.27 (CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 8.26 (1H, d, J₈₋₇ = 8,4 Hz, H-8), 7.74 (2H, m, H-5, H-6), 7.42 (1H, m, H-7), 7.18 (2H, m, H-2', H-6'), 6.78 (2H, m, H-3', H-5'), 4.94 (2H, s, Ar-CH₂-N-), 3.01 (2H, m, H-4), 2.72 (2H, m, H-1), 1.94 (4H, m, H-2, H-3) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CD₃OD) δ: 158.2 (C-9), 157.0 (C-4'), 153.8 (Ar-C), 134.1 (Ar-C), 133.0 (Ar-C), 130.4 (Ar-C), 129.2 (Ar-C), 126.3 (Ar-C), 125.9 (Ar-C), 122.1 (Ar-C), 116.7 (Ar-C), 116.1 (Ar-C), 114.4 (Ar-C), 52.0 (-HN-CH₂-), 30.6 (C-4), 25.1 (C-1), 23.2 (C-2, C-3) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₀H₂₁N₂O ([M + H]⁺): 305.1654, encontrado: 305.1648.

***N*-(3,4-Dihidroxibencil)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (14)**

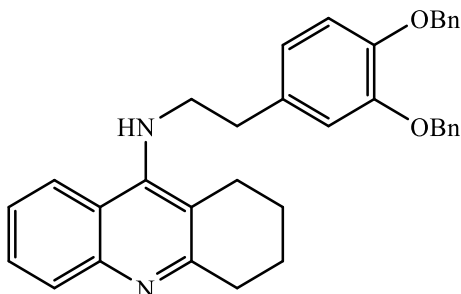
Una mezcla de **7** (53.1 mg, 0.11 mmol) en CH₂Cl₂-MeOH 1:1 (3 mL) se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente empleándose Pd(OH)₂ (24.5 mg, 20% Pd p/p, 0.046 mmol) como catalizador. El tiempo de reacción fue de 90 minutos. Transcurrido este tiempo, se filtró la mezcla sobre un lecho de celita (celita[®] 545) y la disolución filtrada se concentró hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-MeOH 40:1 → CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 18.7 mg, 55%. R_f = 0.19 (CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 8.25 (1H, d, J₈₋₇ = 8.5 Hz, H-8), 7.73 (2H, m, H-5, H-6), 7.41 (1H, m, H-7), 6.77 (1H, d, J_{2'-6'} = 2.1 Hz, H-2'), 6.75 (1H, d, J_{5'-6'} = 8.1 Hz, H-5'), 6.68 (2H, dd, J_{6'-5'} = 8.1 Hz, J_{6'-2'} = 2.0 Hz, H-6'), 4.88 (2H, s, Ar-CH₂-N-), 3.00 (2H, m, H-4), 2.72 (2H, m, H-1), 1.93 (4H, m, H-2, H-3) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CD₃OD) δ: 157.3 (C-4a), 153.0, 146.9, 146.1 (C-9, C-10a, C-3', C4'), 133.3 (Ar-C), 130.8 (Ar-C), 126.5 (Ar-C), 125.9 (Ar-C), 121.3 (Ar-C), 119.1 (Ar-C), 117.6 (Ar-C), 116.7 (Ar-C), 114.8 (Ar-C), 113.8 (Ar-C), 51.8 (-HN-CH₂-), 30.1 (C-4), 25.0 (C-1), 23.1 (C-2, C-3) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₀H₂₁N₂O₂ ([M + H]⁺): 321.1603, encontrado: 321.1589.

***N*-(3,4-Bis(benciloxi)fenetil)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (15)**

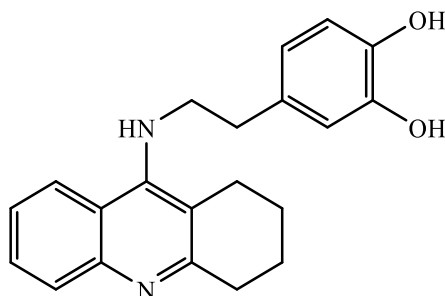
86 (192.9mg, 0.58 mmol, 2.1 equiv) se disuelve en fenol (1g) y se adicionan **83** (64.7 mg, 0.28 mmol) y NaI (21.2 mg, 0.14 mmol, 0.47 equiv). La mezcla se mantiene calentando a reflujo durante 3.5 horas. Se extrae tras ello el fenol de la mezcla mediante una extracción con NaOH (1M) - CH₂Cl₂ recogiéndose la fase orgánica y llevándose hasta sequedad. La mezcla se obtenida se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂-MeOH 10:1).

Sirupo marrón. Rendimiento: 102.6 mg, 72%. R_f = 0.30 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1).

¹H-RMN (500 MHz, (CD₃)₂CO) δ: 8.11 (1H, d, J₈₋₇ = 8.5 Hz, H-8), 7.96 (1H, d, J₅₋₄ = 8.5 Hz, H-5), 7.59 Ar-H (1H, m Ar-H), 7.49 (1H, m, Ar-H), 7.48 (1H, m, Ar-H) 7.45 (1H, m, Ar-H) 7.44 (1H, m, Ar-H) 7.32 (7H, m, Ar-H), 6.96 (1H, d, J_{5'-6'} = 8.0 Hz, H-5'), 6.94 (1H, d, J_{2'-6'} = 2 Hz, H-2'), 6,77 (1H, dd, J_{5'-6'} = 8Hz, J_{2'-6'} = 2Hz, H-6'), 5.35 (1H, s, -NH-), 5.12 (2H, s, -CH₂-Ph), 5.03 (2H, s, -CH₂-Ph), 3.89 (2H, m, -CH₂), 2.99 (2H, t, J = 6.3 Hz, -CH₂-) 2.94 (2H, t, J = 7.0 Hz -CH₂-), 2.59 (2H, t, J = 6.3 Hz -CH₂-), 1.82 (4H, m, H-2, H-3) ppm.

¹³C-RMN (125.8 MHz, (CD₃)₂CO) δ: 157.1 (C-4a), 152.9 (Ar-C), 150.1(Ar-C), 148.7 (Ar-C), 146.0 (Ar-C), 138.8 (Ar-C), 138.6 (Ar-C), 133.1 (Ar-C), 129.8 (Ar-C), 129.19 (Ar-C), 129.17 (Ar-C), 128.51 (Ar-C), 128.50 (Ar-C), 128.35 (Ar-C), 128.33 (Ar-C), 127.3 (Ar-C), 124.6 (Ar-C), 124.4 (Ar-C), 122.6 (Ar-C), 120,3 (Ar-C), 116.6 (Ar-C), 116.2 (Ar-C), 116.0 (Ar-C), 77.8 (Ph-CH₂), 77.6 (Ph-CH₂), 50.7 (CH₂-NH-), 37.2 (-CH₂-Ar) 33.2 (C-4), 25.3 (C-1), 23.5, 23.0 (C-2, C-3) ppm.

HRESI-MS calculado para C₃₅H₃₅N₂O₂ ([M + H]⁺): 515.2687, encontrado: 515.2693.

N-(3,4-Dihidroxifenetil)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (16)

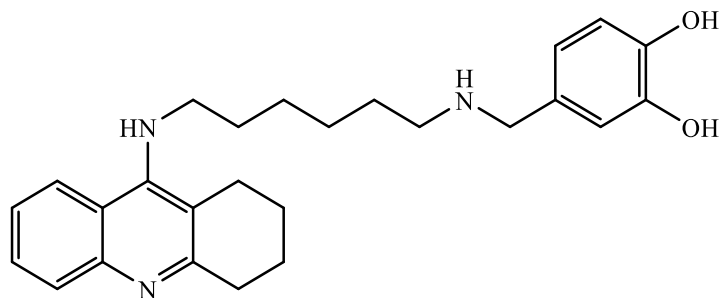
15 (16.0 mg, 0.031 mmol) se disuelve en 2 mL de una mezcla CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) y se adiciona una cantidad catalítica de Pd/C (9.8 mg, 10% p/p, 0.009 mmol) y se mantiene la mezcla agitando a temperatura ambiente bajo atmosfera de hidrógeno durante 4.5 horas. Tras este tiempo se filtró la mezcla sobre un lecho de celita (celita[®] 545). La disolución se concentró hasta sequedad y la mezcla obtenida se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 5:1).

Sirupo marrón claro. Rendimiento: 2.1 mg, 20%. $R_f = 0.30$ (CH_2Cl_2 -MeOH 10:1).

¹H-RMN (300 MHz, CD_3OD) δ : 8.31 (1H, d, $J_{8-7} = 8.5$ Hz, H-8), 7.78 (2H, m, H-5, H-6), 7.55 Ar-H (1H, m, H-7), 6.57 (1H, d, $J_{5'-6'} = 7.3$ Hz, H-5'), 6.53 (1H, d, $J_{2'-6'} = 1.9$ Hz, H-2'), 6.43 (1H, ds, $J_{5'-6'} = 7.3$ Hz, $J_{6'-2'} = 1.9$ Hz, H-6'), 4.13 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, CH_2 -NH), 2.96 (2H, m, H-4), 2.89 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, CH_2 -Ar), 2.52 (2H, m, H-1), 1.90 (4H, m, 2 CH_2 , H-2, H-3) ppm.

¹³C-RMN (125.8 MHz, CD_3OD) δ : 166.9 (C-4a), 133.2 (Ar-C), 129.0 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 125.7 (Ar-C), 124.7 (Ar-C), 121.0 (Ar-C), 120.1, (Ar-C), 117.5 (Ar-C), 116.6 (Ar-C), 115.9 (Ar-C), 50.4 ($-\text{CH}_2-$), 36.6 ($-\text{CH}_2$ -NH), 30.4, 29.1 ($-\text{CH}_2$ -Ar, C-4), 24.6 (C-1), 22.6, 21.0 (C-2, C-3) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 335.1754, encontrado: 335.1754.

N-(6-(3,4-dihidroxibencil)amino)hexil-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (20)

Una mezcla de **68** (354.1 mg, 0.98 mmol) y NaN_3 (222.7 mg, 99% p/p, 3.4 equiv.) en DMF (10 mL) se mantiene a 75 °C bajo atmosfera de argón durante 24 horas. Tras este tiempo, la mezcla se concentra hasta sequedad, y se realiza una extracción con una mezcla de CH_2Cl_2 - H_2O (20 mL-20 mL) realizándose dos extracciones posteriores con CH_2Cl_2 (2x20mL). La fase orgánica se lleva hasta sequedad. Tras esto, se añade una cantidad catalítica de Pd/C (175.5 mg, 10%p/p, 0.16 mmol) y 15 mL de MeOH anhidro, y se mantiene dicha mezcla a presión atmosférica y a temperatura ambiente bajo atmosfera de H_2 durante 5 horas. Transcurrido este tiempo, se filtra la mezcla sobre un lecho de celita (celita[®] 545). La disolución filtrada se concentra hasta sequedad y el residuo obtenido es purificado mediante cromatografía en columna de gel de sílice (MeOH- NH_3 250:1 → MeOH- NH_3 200:1), obteniéndose 96.6 mg de *N*¹-(1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-il)hexano-1,6-diamina.

Tras esto, una mezcla de *N*¹-(1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-il)hexano-1,6-diamina (53.0 mg, 0.18 mmol) y 3,4-bis(benciloxi)benzaldehído (114.4 mg, 0.36 mmol, 2 equiv.) en 2.5 mL de tolueno anhidro a la que se le añaden 40 gotas de dietilamina, se mantiene calentando a reflujo bajo atmosfera de argón durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se lleva hasta sequedad y posteriormente es disuelta en 2.5 mL de MeOH anhidro. A dicha disolución se le añade una cantidad catalítica de Pd/C (75.0 mg, 10% p/p, 0.071 mmol) y se mantiene a presión atmosférica y temperatura ambiente bajo atmosfera de H_2 durante 5 horas. Tras este tiempo, se filtra la mezcla sobre un lecho de celita (celita[®] 545) y la disolución filtrada es concentrada hasta sequedad, obteniéndose una mezcla que se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH_2Cl_2 → CH_2Cl_2 -MeOH-AcOH 6:2:1).

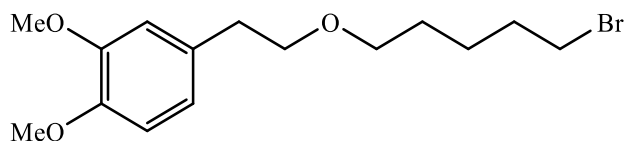
Sirupo marrón. Rendimiento: 19.6 mg, 17%. $R_f = 0.24$ (AcOEt-MeOH-AcOH- H_2O 6:2:1:1).

¹H-RMN (500 MHz, (CD₃)₂SO) δ : 8.09 (1H, d, $J_{8-7} = 8.0$ Hz, H-8), 7.69 (1H, d, $J_{5-6} = 8.0$ Hz, H-5), 7.50 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-6), 7.32 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-7), 6.62 (3H, m, H-2'', H-5'', H-6''), 5.37 (1H, s, NH), 3.50 (2H, s, -CH₂-N), 3.38 (2H, m, H-1'), 2.89 (2H, m, -CH₂-), 2.70 (2H, m, -CH₂-), 2.43 (1H s, -NH), 1.81 (6H, m, 3 -CH₂-), 1.52 (2H, m, -CH₂-), 1.36 (2H, m, -CH₂-), 1.23 (4H, m, 2 -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (125.8 MHz, (CD₃)₂SO) δ : 172.8 (C-4a), 157.9 (Ar-C), 150.4 (Ar-C), 146.9 (Ar-C), 145.2 (Ar-C), 144.3 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 123.2 (Ar-C), 123.0, 119.0 (Ar-C), 115.9 (Ar-C), 115.4 (Ar-C), 52.3 (-CH₂-N), 48.0 (-CH₂-N), 47.0 (-CH₂-N), 33.6 (-CH₂-), 30.5, (-CH₂-), 29.0 (-CH₂-), 28.9 (-CH₂-), 26.6 (-CH₂-), 26.3 (-CH₂-), 22.8, 22.4 (C-2, C-3), ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₆H₃₄N₃O₂ ([M + H]⁺): 420.2646, encontrado: 420.2647.

4-(2-((5-Bromopentil)oxi)etil)-1,2-dimetoxibenceno (22)



Se disuelve **88** (102.5 mg, 98% p/p, 0.55 mmol) en 4 mL de DMSO anhidro, añadiéndose NaH (84.5 mg, 95% p/p, 3.4 mmol, 6.1 equiv.) y 1,5-dibromopentano (630 μ L, 1.688 g/mL, 97% p/p, 4.5 mmol, 8.2 equiv.) y se mantiene esta mezcla a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón con agitación durante 4.5 horas. Tras este tiempo, se lleva dicha mezcla a sequedad, se realizando una extracción con Et₂O-H₂O (15 mL-15 mL) seguido de dos extracciones más con éter (2x15 mL). Las fases orgánicas se unen y su conjunto es secado con sulfato sódico anhidro, filtrándose tras ello y concentrándose la mezcla hasta sequedad. Tras ello, se purifica la mezcla obtenida mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow Et₂O-ciclohexano 1:5).

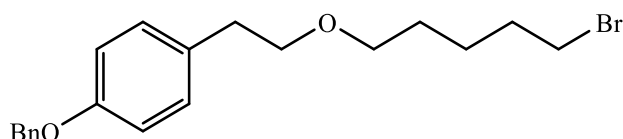
Sirupo amarillo tenue. Rendimiento: 92.1 mg, 50%. $R_f = 0.31$ (Et₂O-ciclohexano 1:2).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.77 (3H, m, Ar-H), 3.86 (3H, s, CH₃-O-), 3.85 (3H, s, CH₃-O-), 3.60 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, -CH₂-), 3.44 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, -CH₂-), 3.39 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, -CH₂-), 2.82 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, -CH₂-), 1.86 (2H, m, -CH₂-), 1.53 (2H, m, 2 -CH₂-) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ : 148.9 (Ar-C), 147.6 (Ar-C), 131.8 (Ar-C), 120.9 (Ar-C), 112.4 (Ar-C), 111.3 (Ar-C), 72.2 (- $\text{CH}_2\text{-O}$ -), 70.8 (- $\text{CH}_2\text{-O}$ -), 56.0 ($\text{CH}_3\text{-O}$ -), 55.9 ($\text{CH}_3\text{-O}$ -), 36.1 (- CH_2 -), 33.9 (- CH_2 -), 32.7 (- CH_2 -), 29.0 (- CH_2 -), 25.1 (- CH_2 -) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_3^{79}\text{BrNa}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$): 353.0723, encontrado: 353.0721. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}^{81}\text{BrNaO}_2$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$): 355.0702, encontrado 355.0700.

1-(Benciloxi)-4-(2-((5-bromopentil)oxi)etil)benceno (23)



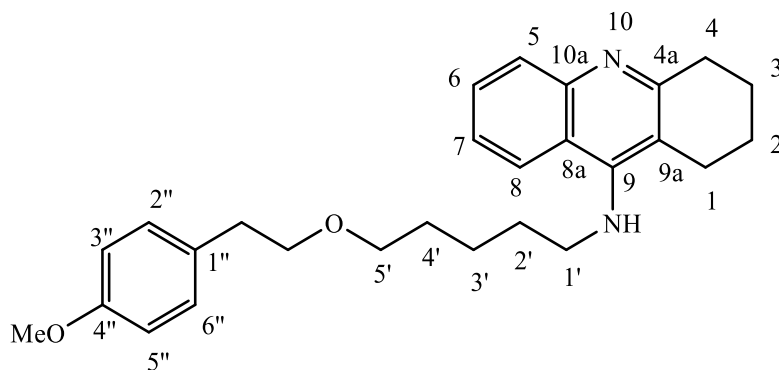
89 (100.1 mg, 0.44 mmol, 1 equiv.) se disuelve en 4 mL de DMF anhidra. A dicha mezcla se le añade NaH (63.1 mg, 95% p/p, 2.50 mmol, 5.7 equiv.) y 1,5-dibromopentano (480 μL , 1.688 g/mL, 97% p/p, 3.42 mmol, 7.8 equiv.) y se deja con agitación bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente durante 5 horas. La mezcla es llevada hasta sequedad y se realiza tras esto una extracción con $\text{Et}_2\text{O-H}_2\text{O}$ (15 mL-15 mL), extrayéndose dos veces más con dos porciones de Et_2O (2x15mL). La fase orgánica se lleva hasta sequedad y se realiza una separación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow Et_2O -ciclohexano 1:10).

Sirupo transparente. Rendimiento: 103.6 mg, 63 %. $R_f = 0.82$ (AcOEt -ciclohexano 1:2).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.39 (5H, m, Ar-H), 7.15 (2H, m, Ar-H), 6.92 (2H, m, Ar-H), 5.06 (2H, s, Ph- CH_2 -), 3.60 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, - CH_2 -), 3.43 (4H, m, 2 - CH_2 -), 2.84 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, - CH_2 -), 1.87 (2H, m, - CH_2 -), 1.60 (2H, m, - CH_2 -), 1.49 (2H, m, - CH_2 -) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ : 157.4 (Ar-C), 137.3 (Ar-C), 131.5 (Ar-C), 130.0 (Ar-C), 128.7 (Ar-C), 218.0 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 114.9 (Ar-C), 72.2 (- $\text{CH}_2\text{-O}$ -), 70.7 (- $\text{CH}_2\text{-O}$ -), 70.1 (- $\text{CH}_2\text{-O}$ -), 35.6 (- CH_2 -), 33.9 (- CH_2 -), 32.7 (- CH_2 -), 29.0 (- CH_2 -), 25.1 (- CH_2 -) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{25}^{79}\text{BrNaO}_2$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$): 399.0930, encontrado: 399.0927.

N-(5-(4-metoxifenetilo)pentil)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (24)

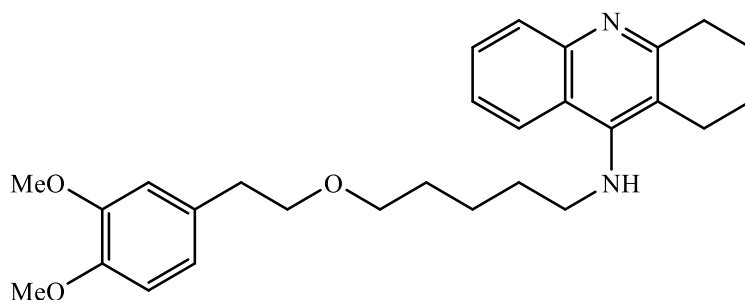
91 (78.5 mg, 0.26 mmol) se disuelve en 4.5 mL de DMF anhidra y se adiciona tacrina (258.0 mg, 1.30 mmol, 5 equiv.) en exceso y KOH (430.7 mg, 85% p/p, 6.5 mmol, 25.1 equiv.) a dicha disolución. La reacción se mantiene con agitación bajo atmósfera de argón durante 4 horas, tras lo cual se lleva hasta sequedad. De la mezcla obtenida se realiza una extracción con CH₂Cl₂-H₂O (15 mL–15 mL), realizándose dos extracciones más con dos porciones de CH₂Cl₂ (2x15 mL). La fase orgánica se concentra hasta sequedad y se realiza una purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂-MeOH 10:1).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 56.7 mg, 52%. R_f = 0.38 (AcOEt-ciclohexano-Et₃N 10:5:1)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.02 (2H, m, H-5, H-8), 7.55 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-6), 7.34 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-7), 7.10 (2H, d, *J*_{2''-3''} = *J*_{6''-5''} = 8.3 Hz, H-2'', H-6''), 6.79 (2H, d, *J*_{3''-2''} = *J*_{5''-6''} = 8.3 Hz, H-3'', H-5''), 4.58 (1H, s, -NH-), 3.73 (3H, s, -OCH₃), 3.56 (4H, m, 2 -CH₂-), 3.41 (2H, t, *J* = 6.1 Hz, -CH₂-), 3.10 (2H, m, H-4), 2.79 (2H, t, *J* = 7.1 Hz, -CH₂-), 2.66 (2H, m, H-1), 1.88 (4H, m, 2 H-2, H-3), 1.63 (4H, m, H-2', H-4'), 1.45 (2H, m, H-3') ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ: 158.1, 156.6 (C-4a, C-4''), 152.1, 145.3 (C-10a, C-9), 131.1 (Ar-C), 129.8 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 126.7 (Ar-C), 124.0 (Ar-C), 123.3 (Ar-C), 119.1 (Ar-C), 114.6 (Ar-C), 110.0 (Ar-C), 72.1 (O-CH₂-), 70.6 (O-CH₂-), 55.3 (CH₃-O), 49.2 (-HN-CH₂-), 35.5 (-CH₂-Ar), 32.6 (-CH₂-), 31.4 (-CH₂-), 29.4 (-CH₂-), 24.6 (-CH₂-), 23.7 (-CH₂-), 22.8 (-CH₂-), 22.3 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₇H₃₅N₂O₂ ([M + H]⁺): 419.2693, encontrado: 419.2684.

N-(5-(3,4-Dimetoxifenetilo)pentil)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amina (25)

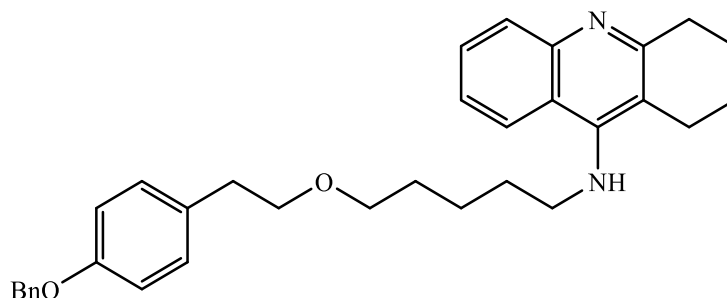
22 (61.3 mg, 0.19 mmol) se disuelve en 4 mL de DMF anhidra y se adiciona tacrina (184.9 mg, 0.93 mmol, 5 equiv.) en exceso y KOH (309.8 mg, 85% p/p, 4.7 mmol, 25.3 equiv.) a la disolución. La reacción se mantiene a temperatura ambiente con agitación bajo atmósfera de argón durante 4 horas, tras lo cual se lleva hasta sequedad. De la mezcla obtenida se realiza una extracción con CH₂Cl₂-H₂O (15 mL–15 mL), realizándose dos extracciones más con CH₂Cl₂ (2x15 mL). La fase orgánica se concentra hasta sequedad y se realiza una purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂-MeOH 20:1).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 20.7 mg, 25%. $R_f = 0.19$ (AcOEt-ciclohexano-Et₃N 10:5:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.00 (2H, m, H-8, H-5), 7.57 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, J, H-6), 7.35 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7), 6.75 (3H, m, H-2'', H-5'', H-6''), 4.17 (1H, s, NH), 3.85 (3H, s, CH₃-O-), 3.82 (3H, s, CH₃-O-), 3.57 (4H, m, 2 -CH₂-O), 3.43 (2H, t, $J = 6.1$ Hz -CH₂-N), 3.10 (2H, m, H-4), 2.81 (2H, t, $J = 6.9$ Hz -CH₂-Ar), 2.67 (2H, m, H-1), 1.90 (4H, m, 2 H-2, H-4), 1.64 (4H, m, H-2', H-4'), 1.46 (2H, m, H-3') ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ : 157.3, 151.7, 148.9, 147.6 (C-4a, C-9, C-10a, C-3'', C-4''), 131.8 (Ar-C), 129.1 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 124.0 (Ar-C), 123.2 (Ar-C), 120.9 (Ar-C), 119.5 (Ar-C), 115.1 (C-9a), 112.4, 111.3 (C-2'', C-5''), 72.2 (O-CH₂-), 70.7 (O-CH₂-), 56.0 (CH₃-O), 55.9 (CH₃-O), 49.4 (-HN-CH₂-), 36.0 (-CH₂-Ar), 31.6 (-CH₂-), 29.5 (-CH₂-), 24.7 (-CH₂-), 23.8 (-CH₂-), 23.0 (-CH₂-), 22.5 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₈H₃₇N₂O₃ ([M + H]⁺): 449.2799, encontrado: 449.2789.

N-(5-(4-(Benciloxifenetilo)pentil)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (26)

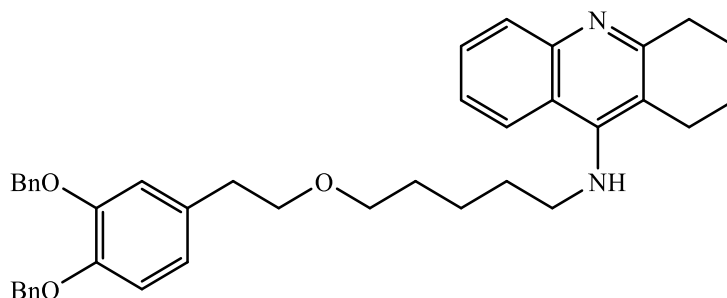
23 (94.2 mg, 0.25 mmol) se disuelve en 5 mL de DMF anhidra. A dicha mezcla se le adiciona tacrina (251.5 mg, 1.27 mmol, 5 equiv.) y KOH (442.4 mg, 85% p/p, 6.7 mmol, 26.8 equiv.) y se mantiene a temperatura ambiente con agitación bajo atmósfera de argón durante 5 horas. Transcurrido este tiempo se lleva la mezcla hasta sequedad y se realiza una extracción con CH₂Cl₂-H₂O (15 mL-15 mL), extrayéndose dos veces más con CH₂Cl₂ (2x15 mL). La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro y se lleva hasta sequedad. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂-MeOH 10:1).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 53.1 mg, 43 %. $R_f = 0.45$ (AcOEt-ciclohexano-TEA 10:5:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.97 (1H, dd, $J_{8-7} = 8.5$ Hz, $J_{8-6} = 0.8$ Hz, H-8), 7.91 (1H, dd, $J_{5-6} = 8.5$ Hz, $J_{5-7} = 0.8$ Hz, H-5), 7.54 (1H, m, H-6), 7.36 (6H, m, Ar-H), 7.13 (2H, m, H-2'', H-6''), 6.90 (2H, m, H-3'', H-5''), 5.01 (2H, s, Ph-CH₂-), 3.93 (1H, s, -NH-), 3.58 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, -CH₂-O), 3.45 (4H, m, 2 -CH₂-), 3.07 (2H, m, H-4), 2.82 ((2H, t, $J = 7.1$ Hz, -CH₂-Ar), 2.71 (2H, m, H-1), 1.92 (4H, m, H-2, H-3), 1.64 (4H, m, H-2', H-4'), 1.46 (2H, m, H-3') ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ : 158.6, 157.5 (C-4a, C-4'), 150.7, 147.7 (C-9, C-10a), 137.2 (Ar-C), 131.4 (Ar-C), 129.9 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 128.6 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 123.7 (Ar-C), 122.9 (Ar-C), 120.4 (Ar-C), 116.1, 114.8 (C-9a, C-3'', C-5''), 72.1 (-CH₂-O-), 70.7 (-CH₂-O-), 70.1 (-CH₂-O-), 49.5 (-HN-CH₂-), 35.5 (-CH₂-), 34.2 (-CH₂-), 31.6 (-CH₂-), 29.5 (-CH₂-), 24.9 (-CH₂-), 23.7 (-CH₂-), 23.2 (-CH₂-), 22.9 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₃₃H₂₉N₂O₂ ([M + H]⁺): 495.3006, encontrado: 495.2998.

N-(5-(3,4-Bis(benciloxi)fenetilo)pentil)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (27)

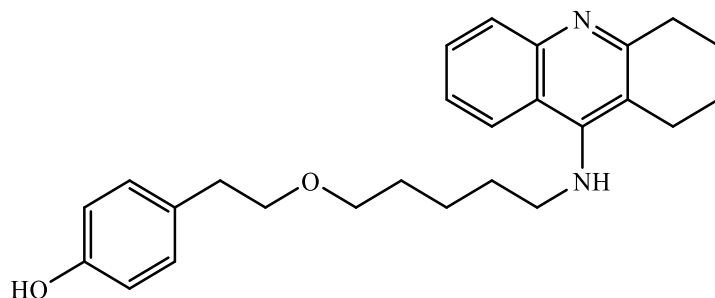
92 (38.3 mg, 0.079 mmol) se disuelve en 2 mL de DMF anhidra. A dicha mezcla se le adiciona tacrina (78.7 mg, 0.40 mmol, 5 equiv.) y KOH (131.2 mg, 85% p/p, 1.99 mmol, 25.1 equiv.) y se mantiene a temperatura ambiente con agitación bajo atmósfera de argón durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se lleva la mezcla hasta sequedad y se realiza una extracción con CH₂Cl₂-H₂O (15 mL-15 mL), extrayéndose dos veces más con CH₂Cl₂ (2x15 mL). La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro y se lleva hasta sequedad. La mezcla obtenida se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂-MeOH 10:1).

Sirupo amarillo. Rendimiento: 31.5 mg, 66 %. R_f = 0.45 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.17 (1H, d, J₈₋₇ = 8.4 Hz, H-8), 7.99 (1H, d, J₅₋₆ = 8.1 Hz, H-5), 7.52 (1H, m, H-6), 7.27 (11 H, m, Ar-H), 6.78 (2 H, m, H-2'', H-5''), 6.65 (1H, dd, J_{6'-5''} = 8.1 Hz, J_{6''-2''} = 2.0 Hz, H-6''), 5.04 (2H, s, Ph-CH₂-), 5.01 (2H, s, Ph-CH₂-), 3.61 (2H, t, J = 7.2 Hz, -CH₂-O), 3.48 (2H, t, J = 7.2 Hz, -CH₂-), 3.34 (2H, t, J = 6.1 Hz, -CH₂-), 3.09 (2H, m, H-4), 2.69 (2H, t, J = 7.0 Hz, Ar-CH₂-), 2.53 (2H, m, H-1), 1.78 (4H, m, 2 -CH₂-), 1.66 (2H, m, -CH₂-), 1.52 (2H, m, -CH₂-), 1.38 (2H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ: 153.5 (Ar-C), 149.0 (Ar-C), 137.5 (Ar-C), 137.4 (Ar-C), 132.7 (Ar-C), 130.6 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 127.4 (Ar-C), 124.5 (Ar-C), 123.7 (Ar-C), 122.0 (Ar-C), 117.8 (Ar-C), 116.4 (Ar-C), 115.4 (Ar-C), 113.1 (Ar-C), 72.0 (-CH₂-O-), 71.6 (-CH₂-O-), 70.6 (-CH₂-O-), 49.0 (-HN-CH₂-), 35.9 (-CH₂-), 31.2 (-CH₂-), 29.3 (-CH₂-), 24.2 (-CH₂-), 23.7 (-CH₂-), 22.5 (-CH₂-), 21.7 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₄₀H₄₅N₂O₃ ([M + H]⁺): 601.3425, encontrado: 601.3415.

N-(5-(4-Hidroxifenetiloxy)pentil)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (28)

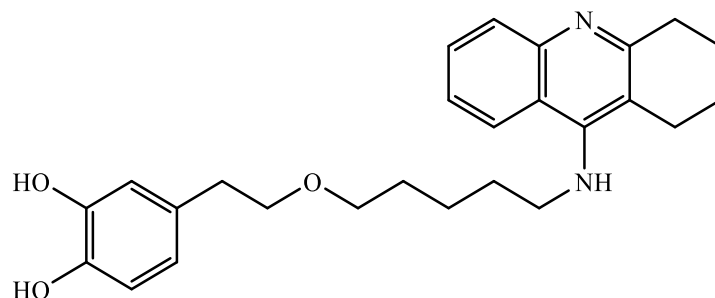
26 (38.5 mg, 0.078 mmol) se disuelve en 2 mL de CH_2Cl_2 y se adiciona una cantidad catalítica de $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (20.0 mg, 20% p/p, 0.028 mmol, 0.36 equiv.) Tras 1 hora de reacción, filtramos la mezcla sobre una lecho de celita (celita[®] 545). La disolución filtrada se concentra hasta sequedad y el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 5:1).

Sirupo incoloro. Rendimiento: 14.0 mg, 44 %. $R_f = 0.41$ (AcOEt-ciclohexano-TEA 15:5:2).

¹H-RMN (300 MHz, CD_3OD) δ : 8.24 (1H, d, $J_{8-7} = 8.4$ Hz, H-8), 7.73 (2H, m, H-6), 7.48 (1H, m, H-7), 6.99 (2H, m, H-2'', H-6''), 6.66 (2H, m, H-3'', H-5''), 3.74 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-O}$), 3.54 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-}$), 3.42 (2H, t, $J = 6.1$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-}$), 2.98 (2H, m, H-4), 2.70 (4H, m, 2 $-\text{CH}_2\text{-}$), 1.93 (4H, m, 2 $-\text{CH}_2\text{-}$), 1.73 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{-}$), 1.56 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{-}$), 1.43 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{-}$) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CD_3OD) δ : 156.8, 155.8, 154.9, 143.3 (C-4a, C-9, C-10a, C-4''), 132.2 (Ar-C), 131.1 (Ar-C), 130.8 (Ar-C), 125.6 (Ar-C), 123.5 (Ar-C), 118.9 (Ar-C), 116.0 (Ar-C), 114.6 (Ar-C), 73.2 ($-\text{CH}_2\text{-O}$), 71.5 ($-\text{CH}_2\text{-O}$), 49.4 ($-\text{HN-CH}_2\text{-}$), 36.3 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 31.5 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 31.4 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 30.2 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 25.4 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 24.5 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 23.5 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 22.6 ($-\text{CH}_2\text{-}$) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 405.2537, encontrado: 405.2526.

N-(5-(3,4-Dihidroxifeniloxy)pentil)-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (29)

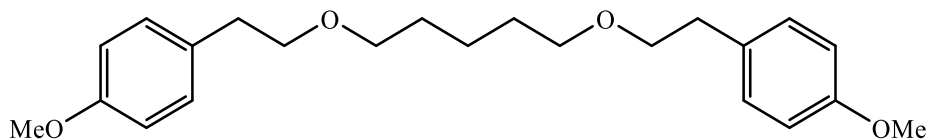
27 (17.3 mg, 0.029 mmol) se disuelve en 2 mL de CH_2Cl_2 y se adiciona una cantidad catalítica de $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (10.0 mg, 20% p/p, 0.014 mmol, 0.5 equiv.) Tras 2.5 horas de reacción, filtramos la mezcla sobre una lecho de celita (celita[®] 545). La disolución filtrada se concentra hasta sequedad y el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 5:1).

Sirupo incoloro. Rendimiento: 7.3 mg, 60 %. $R_f = 0.21$ (AcOEt-ciclohexano-TEA 15:5:2).

¹H-RMN (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.34 (1H, d, $J_{8-7} = 8.5$ Hz, H-8), 7.80 (2H, m, H-5, H-6), 7.56 (1H, m, H-7), 6.66 (2H, m, H-2'', H-5''), 6.52 (1H, dd, $J_{6''-5''} = 8.0$ Hz, $J_{6''-2''} = 2.0$ Hz, H-6''), 3.87 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-O-}$), 3.58 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-}$), 3.46 (2H, t, $J = 6.1$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-}$), 3.02 (2H, m, H-4), 2.73 (2H, m, H-1), 2.68 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-Ar}$), 1.98 (4H, m, 2 $-\text{CH}_2\text{-}$), 1.80 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{-}$), 1.61 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{-}$), 1.47 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{-}$) ppm.

¹³C-RMN (125.8 MHz, CD_3OD) δ : 157.0, 153.3, 146.1, 144.6, 141.6 (C-4a, C-9, C10-a, C-3'', C-4''), 133.1 (Ar-C), 131.9 (Ar-C), 126.1 (Ar-C), 126.0 (Ar-C), 121.8 (Ar-C), 121.1 (Ar-C), 118.0 (Ar-C), 117.0 (Ar-C), 116.2 (Ar-C), 113.7 (Ar-C), 73.2 ($-\text{CH}_2\text{-O-}$), 71.5 ($-\text{CH}_2\text{-O-}$), 36.6 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 31.3 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 30.3 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 25.1 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 24.5 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 23.2 ($-\text{CH}_2\text{-}$), 22.2 ($-\text{CH}_2\text{-}$) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_3$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 421.2486, encontrado: 421.2476.

1,5-Bis(4-metoxifenetoxi)pentano (30)

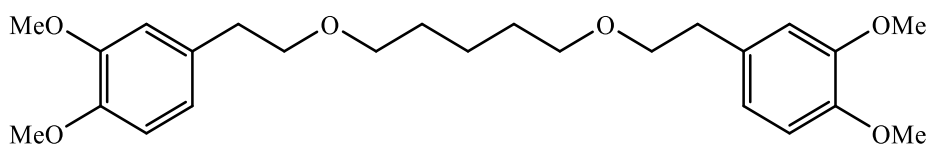
87 (133.9 mg, 98% p/p, 0.86 mmol, 4.0 equiv.) se disuelve en 4 mL de DMF y se adiciona NaH (133.5 mg, 95% p/p, 5.3 mmol, 24.1 equiv.), manteniéndose esta mezcla con agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte durante 10 minutos. Tras ello, se adiciona 1,5-dibromopentano (30 μ L, 1.688 g/mL, 97% p/p, 0.21 mmol). La reacción se mantiene con agitación bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente durante 22.5 horas. La mezcla se lleva a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow ciclohexano-Et₂O 1:4).

Sirupo transparente. Rendimiento: 12.6 mg, 16 %. $R_f = 0.50$ (Et₂O-ciclohexano 1:2)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.14 (4H, m, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 6.83 (4H, m, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 3.78 (3H, s, 2 CH₃-O-), 3.58 (4H, t, $J = 7.4$ Hz, 2 CH₂-O-), 3.42 (4H, t, $J = 6.7$ Hz, 2 CH₂-O-), 2.82 (4H, t, $J = 7.4$ Hz, 2 CH₂-Ar), 1.58 (4H, m, 2 CH₂), 1.38 (2H, m, CH₂) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ : 158.2 (Ar-C-O-), 131.3 (Ar-C-CH₂), 130.0 (Ar-C), 113.9 (Ar-C), 72.2 (-CH₂-O-), 71.0 (-CH₂-O-), 55.4 (CH₃-O-), 35.6 (-CH₂-), 29.7 (-CH₂-), 22.9 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₃H₃₂NaO₄ ([M + Na]⁺): 395.2193, encontrado: 395.2193.

1,5-Bis(3,4-dimetoxifenetoxi)pentano (31)

88 (161.4 mg, 98% p/p, 0.87 mmol, 4 equiv.) se disuelven en 4 mL de DMF y se adiciona NaH (131.1 mg, 95% p/p, 5.2 mmol, 23.6 equiv.). Dicha mezcla se mantiene agitando a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte. A la misma mezcla se le adiciona 1,5-

dibromopentano (30 μ L, 1.688 g/mL, 97% p/p, 0.21 mmol). La reacción se mantuvo en estas condiciones y con atmosfera de argón durante 22.5 horas. Tras esto se lleva la mezcla a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow ciclohexano-Et₂O 1:1).

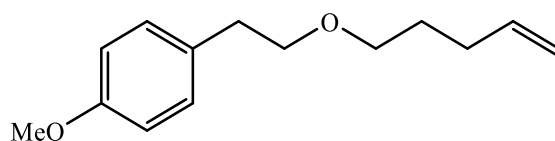
Sirupo transparente. Rendimiento: 9.5 mg, 10 %. $R_f = 0.25$ (Et₂O-ciclohexano 1:2).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.77 (6H, m, Ar-H), 3.87 (6H, s, 2 CH₃-O-), 3.85 (6H, s, 2 CH₃-O-), 3.60 (4H, t, $J = 7.2$ Hz, 2 -CH₂-O-), 3.43 (4H, t, $J = 6.5$ Hz, 2 -CH₂-O-), 2.82 (4H, t, $J = 7.2$ Hz, 2 -CH₂-Ar), 1.59 (4H, m, 2 -CH₂-), 1.40 (2H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ : 148.9 (Ar-C-O-), 147.6 (Ar-C-O-), 131.9 (Ar-C-CH₂-), 120.9 (Ar-C), 112.4 (Ar-C), 111.3 (Ar-C), 72.2 (-CH₂-O-), 71.1 (-CH₂-O-), 56.0 (CH₃-O-), 56.0 (CH₃-O-), 36.1 (-CH₂-), 29.7 (-CH₂-), 23.0 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₅H₃₆NaO₆ ([M + Na]⁺): 455.2404, encontrado: 445.2396.

1-Metoxi-4-(2-(pent-4-en-1-iloxi)etil)benceno (33)



87 (133.9 mg, 98% p/p, 0.86 mmol, 4.0 equiv.) se disuelve en 4 mL de DMF y se adiciona NaH (133.5 mg, 95% p/p, 5.3 mmol, 24.1 equiv.), manteniéndose esta mezcla con agitación a temperatura ambiente bajo atmosfera inerte durante 10 minutos. Tras ello, se adiciona 1,5-dibromopentano (30 μ L, 1.688 g/mL, 97% p/p, 0.21 mmol). La reacción se mantiene con agitación bajo atmosfera de argón y a temperatura ambiente durante 22.5 horas. La mezcla se lleva a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow ciclohexano-Et₂O 1:4).

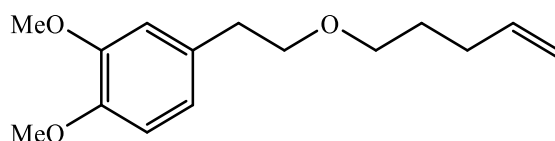
Sirupo transparente. Rendimiento: 7.7 mg, 16 %. $R_f = 0.70$ (Et₂O-ciclohexano 1:2).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.14 (2H, m, Ar-H), 6.83 (2H, m, Ar-H), 5.81 (1H, m, -CH=C-) 4.98 (2H, m, 2 CH₂=C-), 3.59 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, CH₂-O-), 3.44 (2H, $J = 6.6$ Hz, CH₂-O-), 2.82 (2H, $J = 7.1$ Hz, CH₂-Ar), 2.10 (2H, m, -CH₂-C=), 1.67 (2H, m, -CH₂-)

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ : 158.2 (Ar-C-O-), 138.5 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 131.3 (Ar-C- CH_2), 130.0 (Ar-C), 114.8 ($\text{CH}_2=\text{CH}$ -), 113.9 (Ar-C), 72.2 ($-\text{CH}_2\text{-O}$ -), 70.4 ($-\text{CH}_2\text{-O}$ -), 55.4 ($\text{CH}_3\text{-O}$ -), 35.6 ($-\text{CH}_2$ -), 30.5 ($-\text{CH}_2$ -), 29.0 ($-\text{CH}_2$ -) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NaO}_2$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$): 243.1356, encontrado: 243.1357.

1,2-Dimetoxi-4-(2-(pent-4-en-1-iloxi)etil)benceno (34)



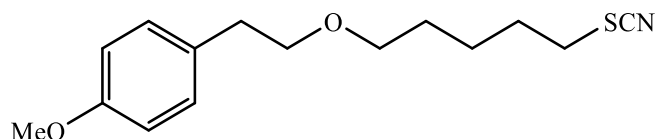
88 (161.4 mg, 98% p/p, 0.87 mmol, 4 equiv.) se disuelven en 4 mL de DMF y se adiciona NaH (131.1 mg, 95% p/p, 5.2 mmol, 23.6 equiv.). Dicha mezcla se mantiene agitando a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte. A la misma mezcla se le adiciona 1,5-dibromopentano (30 μL , 1.688 g/mL, 97% p/p, 0.21 mmol). La reacción se mantuvo en estas condiciones y con atmósfera de argón durante 22.5 horas. Tras esto se lleva la mezcla a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow ciclohexano-Et₂O 1:1).

Sirupo transparente. Rendimiento: 9.5 mg, 17%. $R_f = 0.49$ (Et₂O-ciclohexano 1:2).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.78 (3H, m, Ar-H), 5.81 (1H, m, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.99 (1H, m, $\text{CH}=\text{CH}$ -), 4.97 (1H, m, $\text{CH}=\text{CH}$ -), 3.87 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3.86 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3.61 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-O}$), 3.45 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-O}$), 2.83 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-Ar}$), 2.11 (2H, m, $-\text{CH}_2$ -), 1.67 (2H, m, $-\text{CH}_2$ -) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ : 148.9 (Ar-C-O-), 147.6 (Ar-C-O-), 138.4 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 131.9 (Ar-C- CH_2 -), 120.9 (Ar-C), 114.8 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 112.4 (Ar-C), 111.3 (Ar-C), 72.1 ($-\text{CH}_2\text{-O}$ -), 70.4 ($-\text{CH}_2\text{-O}$ -), 56.1 ($\text{CH}_3\text{-O}$ -), 55.9 ($\text{CH}_3\text{-O}$ -), 36.1 ($-\text{CH}_2$ -), 30.5 ($-\text{CH}_2$ -), 29.1 ($-\text{CH}_2$ -) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NaO}_3$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$): 273.1461, encontrado: 273.1464.

1-Metoxi-4-(2-((5-tiocianatopentil)oxi)etil)benceno (35)

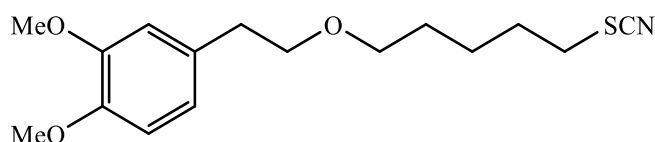
91 (296.4 mg, 0.98 mmol) se disuelve en 7 mL de DMF anhidra y se adiciona a dicha disolución KSCN (298.2 mg, 99% p/p, 3.0 mmol, 3.1 equiv.). La mezcla se mantiene agitando bajo atmosfera inerte (Ar) a 60 °C durante 5.5 horas. De dicha mezcla se separan los componentes orgánicos mediante extracción usando dietiléter y H₂O (20 mL-20 mL) y posteriormente realizándose una extracción más con otra porción de éter (20 mL). La fase orgánica obtenida se lava con 20 mL de H₂O y se seca con sulfato sódico, siendo llevada tras esto hasta sequedad, obteniéndose el tiocianato puro.

Sirupo transparente. Rendimiento: 240.5 mg, 87 %. $R_f = 0.41$ (Et₂O-ciclohexano 1:2).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.14 (2H, m, Ar-H), 6.83 (2H, m, Ar-H), 3.79 (3H, s, CH₃-O), 3.59 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, -CH₂-O), 3.44 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, -CH₂-O), 2.92 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, -CH₂-), 2.82 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, -CH₂-), 1.82 (2H, m, -CH₂-), 1.60 (2H, m, -CH₂-), 1.49 (2H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ : 158.1 (Ar-C-O-), 131.2 (Ar-C-CH₂), 129.9 (Ar-C), 113.8 (Ar-C), 112.4 (-SCN), 72.2 (-CH₂-O-), 70.4 (-CH₂-O-), 55.3 (CH₃-O-), 35.5 (-CH₂-), 34.1 (-CH₂-), 29.7 (-CH₂-), 29.0 (-CH₂-), 24.9 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₁₅H₂₁NNaO₂S ([M + Na]⁺): 302.1185, encontrado: 302.1186.

1,2-Dimetoxi-4-(2-((5-tiocianatopentil)oxi)etil)benceno (36)

22 (204.4 mg, 0.62 mmol) se disuelve en 7 mL de DMF anhidra y se adiciona KSCN (195.1 mg, 99% p/p, 2.0 mmol, 3.2 equiv.), manteniéndose dicha mezcla con agitación bajo

atmosfera inerte (Ar) a 60 °C durante 2.5 horas. De dicha mezcla se separan los componentes orgánicos mediante extracción usando dietiléter y H₂O (20 mL-20 mL) y posteriormente extrayéndose con una porción más de éter (20 mL). La fase orgánica obtenida se lava con 20 mL de H₂O y se seca con sulfato sódico, siendo llevada tras esto hasta sequedad, obteniéndose el tiocianato puro.

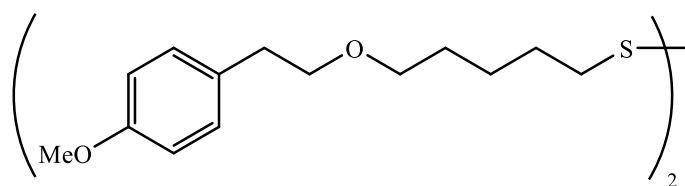
Sirupo transparente. Rendimiento: 171.8 mg, 90 %. $R_f = 0.14$ (Et₂O-ciclohexano 1:2).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.77 (3H, m, Ar-H), 3.86 (3H, s, CH₃-O-), 3.85 (3H, s, CH₃-O-), 3.60 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, -CH₂-O-), 3.44 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, -CH₂-O-), 2.91 (2H, t, $J = 6.2$ Hz, -CH₂-Ar), 2.91 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, -CH₂-), 2.82 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, -CH₂-), 1.82 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, -CH₂-), 1.60 (2H, m, -CH₂-), 1.49 (2H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ : 148.8 (Ar-C-O-), 147.5 (Ar-C-O-), 131.7 (Ar-C-CH₂-), 120.8 (Ar-C), 112.4 (Ar-C), 111.3 (Ar-C), 72.1 (-CH₂-O-), 70.4 (-CH₂-O-), 56.0 (CH₃-O-), 55.9 (CH₃-O-), 36.0 (-CH₂-), 34.0 (-CH₂-), 29.7 (-CH₂-), 29.0 (-CH₂-), 24.8 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₁₆H₂₃NNaO₃S ([M + Na]⁺): 332.1291, encontrado: 332.1288.

1,2-Bis(5-(4-metoxifenetiloxi)pentil)disulfuro (37)



35 (196.1 mg, 0.70 mmol) se disuelven en 4 mL de etanol absoluto y se adiciona NaBH₄ (28.0 mg, 97% p/p, 0.72 mmol, 1.0 equiv.). La mezcla se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 25 horas. Tras esto la mezcla se lleva a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → Et₂O-ciclohexano 1:2).

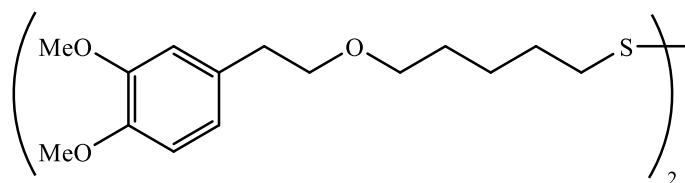
Sirupo transparente. Rendimiento: 121.1 mg, 68 %. $R_f = 0.59$ (Et₂O-ciclohexano 1:2).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.14 (4H, m, Ar-H), 6.83 (4H, m, Ar-H), 3.79 (6H, s, 2 CH₃-O-), 3.58 (4H, t, *J* = 7.3 Hz, 2 -CH₂-O-), 3.43 (4H, t, *J* = 6.5 Hz, 2 -CH₂-O-), 2.82 (4H, t, *J* = 7.3 Hz, 2 -CH₂-Ar), 2.68 (4H, t, *J* = 7.4 Hz, 2 -CH₂-S-), 1.64 (8H, m, 4 -CH₂-), 1.44 (4H, m, 2 -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ: 158.1 (Ar-C-O-), 131.2 (Ar-C-CH₂-), 129.9 (Ar-C-), 113.9 (Ar-C-), 72.2 (-CH₂-O-), 70.8 (-CH₂-O-), 55.4 (CH₃-O-), 39.1 (-CH₂-), 35.6 (-CH₂-), 29.4 (-CH₂-), 29.1 (-CH₂-), 25.3 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₈H₄₂NaO₄S₂ ([M + Na]⁺): 529.2417, encontrado: 529.2410.

1,2-Bis(5-(3,4-dimetoxifeniloxi)pentil)disulfuro (38)



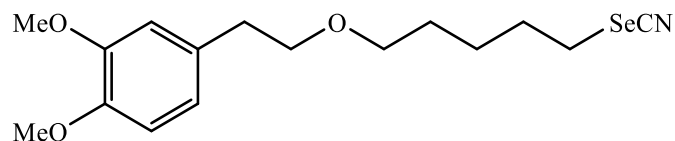
36 (134.1 mg, 0.43 mmol) se disuelve en 3.5 mL de EtOH y se adiciona NaBH₄ (17.7 mg, 97% p/p, 0.45 mmol, 1.0 equiv). La reacción se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 22 horas. Transcurrido este tiempo, se lleva la mezcla a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → Et₂O-ciclohexano 1:4).

Sirupo transparente. Rendimiento: 74.0 mg, 60 %. R_f = 0.51 (Et₂O-ciclohexano 1:4).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 6.77 (6H, m, Ar-H), 3.86 (6H, s, -CH₃), 3.84 (6H, s, -CH₃), 3.59 (4H, t, *J* = 7.1 Hz, -CH₂-O-), 3.43 (4H, t, *J* = 6.5 Hz, -CH₂-O-), 2.81 (4H, t, *J* = 7.0 Hz, Ar-CH₂-), 2.66 (4H, t, *J* = 7.2 Hz, -CH₂-S-), 1.63 (8H, m, -CH₂-), 1.44 (8H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ: 148.8 (Ar-C-O-), 147.5 (Ar-C-O-), 131.8 (Ar-C-), 131.7 (Ar-C-), 120.8 (Ar-C-), 112.3 (Ar-C-), 111.3 (Ar-C-), 72.1 (-CH₂-O-), 70.8 (-CH₂-O-), 56.0 (CH₃-O), 55.8 (CH₃-O), 39.0 (-CH₂-S-), 36.0 (-CH₂-), 29.4 (-CH₂-), 29.1 (-CH₂-), 25.2 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₃₀H₄₆NaO₆S₂ ([M + Na]⁺): 589.2628, encontrado: 589.2619.

1,2-Dimetoxi-4-(2-((5-selenocianatopentil)oxi)etil)benceno (39)

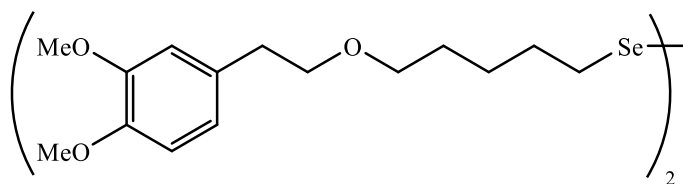
22 (272.9 mg, 0.82 mmol) se disuelven en 5 mL de DMF y se adiciona KSeCN (360.9 mg, 99% p/p, 2.48 mmol, 3.0 equiv.). La mezcla se mantiene con agitación en oscuridad a 70 °C durante 4 horas bajo atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo, se lleva la mezcla a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → Et₂O-ciclohexano 1:4).

Sirupo rojizo. Rendimiento 265.1 mg, 90%. R_f = 0.12 (Et₂O-ciclohexano 1:2).

¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 6.84 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, Ar-*H*), 6.84 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, Ar-*H*), 6.73 (1H, dd, *J* = 8.1 Hz, *J*' = 1.9 Hz, Ar-*H*), 3.73 (3H, s, CH₃-O), 3.71 (3H, s, CH₃-O), 3.53 (2H, t, *J* = 7.1 Hz, -CH₂-O-), 3.38 (2H, t, *J* = 6.1 Hz, -CH₂-O-), 3.06 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, -CH₂-Se-), 2.73 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, -CH₂-Ar), 1.8 (2H, m, -CH₂-), 1.46 (4H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 149.0 (Ar-C-O), 147.6 (Ar-C-O), 132.0 (Ar-C-), 121.1 (Ar-C-), 113.2 (Ar-C-), 112.3 (Ar-C-), 105.0 (-SeCN), 71.7 (-CH₂-O), 70.2 (-CH₂-O), 56.0 (CH₃-O), 55.9 (CH₃-O), 35.6 (-CH₂-), 31.0 (-CH₂-), 30.2 (-CH₂-), 28.9 (-CH₂-), 25.7 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₁₆H₂₃NNaO₃Se ([M + Na]⁺): 380.0735, encontrado: 380.0725.

1,2-Bis(5-(3,4-dimetoxifenetilo)pentil)diselenuro (40)

39 (231.1 mg, 0.65 mmol) se disuelve en 5 mL de DMF y se adiciona NaBH₄ (50.6 mg, 97% p/p, 1.30 mmol, 2.0 equiv), dejándose la reacción a temperatura ambiente con agitación durante 4 horas. Transcurrido este tiempo añadimos 3 mL de MeOH y llevamos la mezcla hasta sequedad, purificándose tras ello la mezcla obtenida mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → Et₂O-ciclohexano 1:1).

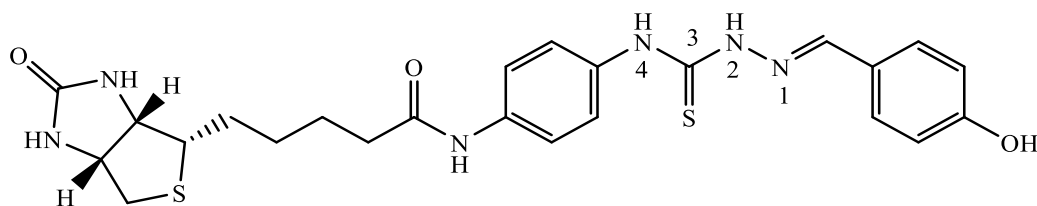
Sirupo amarillo. Rendimiento 118.8 mg, 55%. R_f = 0.45 (Et₂O-ciclohexano 2:1).

¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 6.83 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, Ar-*H*), 6.83 (2H, d, *J* = 1.9 Hz, Ar-*H*), 6.72 (2H, dd, *J* = 8.2 Hz, *J'* = 1.9 Hz, Ar-*H*), 3.73 (6H, s, CH₃-O), 3.71 (6H, s, CH₃-O), 3.53 (4H, t, *J* = 7.1 Hz, -CH₂-O-), 3.37 (4H, t, *J* = 6.1 Hz, -CH₂-O-), 2.90 (4H, t, *J* = 7.2 Hz, -CH₂-Se-), 2.72 (4H, t, *J* = 7.0 Hz, -CH₂-Ar), 1.68 (4H, m, -CH₂-), 1.51 (4H, m, -CH₂-), 1.37 (4H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 149.0 (Ar-C-O), 147.6 (Ar-C-O), 132.0 (Ar-C-), 121.1 (Ar-C-), 113.2 (Ar-C-), 112.3 (Ar-C-), 71.7 (-CH₂-O), 70.2 (-CH₂-O), 56.0 (CH₃-O), 55.8 (CH₃-O), 35.6 (-CH₂-), 30.6 (-CH₂-), 29.8 (-CH₂-), 29.2 (-CH₂-), 26.0 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₃₀H₄₆NaO₆Se₂ ([M + Na]⁺): 685.1517, encontrado: 685.1519.

4-(4-(Biotinilamino)fenil)-1-((E)-4-hidroxiciliden)-3-tiosemicarbazona (42)



A **94** (85.1 mg, 0.226 mmol) se le adicionan 7.5 mL de CH_2Cl_2 e hidracina monohidratada (17 μL , 0.34 mmol, 1.5 equiv.) y se mantiene agitando en oscuridad a temperatura ambiente durante 17 horas. Transcurrido este tiempo, se lleva la mezcla hasta sequedad. Se toma una porción de la carbazida formada (40.0 mg, 0.1 mmol) y se adiciona entonces 4 mL de EtOH y 4-hidroxibenzaldehído (25.2 mg, 0.20 mmol, 2 equiv.) sobre la misma, manteniéndose esta mezcla calentando a reflujo, en oscuridad y con agitación magnética durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se adicionan 20 mL de EtOH y la mezcla se transfiere a un tubo Falcon[®] y se centrifuga a 3000 rpm durante 2 minutos. Se obtiene un precipitado, desechándose la disolución etanólica. Dicho precipitado obtenido se lava con 15 mL de EtOH y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones anteriores, desechando nuevamente la disolución y quedándonos con el sólido precipitado, la tiosemicarbazona buscada, que se recoge con diclorometano y se lleva a sequedad.

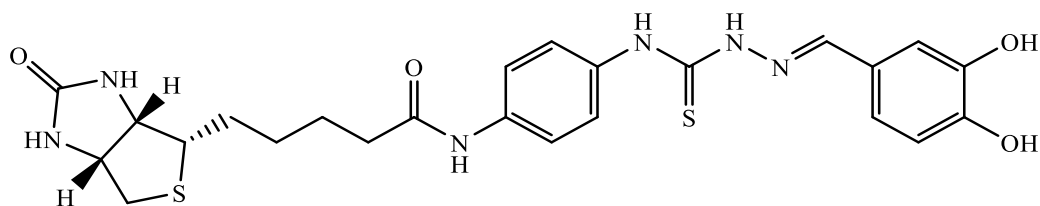
Sólido verde pálido. Pf = (232-240) °C (desc.). $[\alpha]_D^{23} = +28$ (c 0.814, DMSO). Rendimiento: 33.6 mg, 29 %.

¹H-RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 11.59 (1H, s, CH=N-), 9.91 (1H, s, -OH), 8.05 (1H, s, NH), 7.72 (2H, dm, $J = 8.9$ Hz, Ar-H), 7.50 (4H, m, Ar-H), 6.80 (2H, dm, $J = 8.9$ Hz, Ar-H), 6.45 (1H, s, NH), 6.37 (1H, s, NH), 4.31 (1H, CH-N), 4.15 (1H, CH-N), 3.13 (1H, m, CH-S), 2.82 (1H, dd, $J = 5.0$ Hz, $J' = 12.4$ Hz, H-CH-S), 2.58 (1H, d, $J' = 12.4$ Hz, H-CH-S), 2.31 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.50 (6H, m, 3 -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 175.5 (C=S), 171.0 (C=O), 162.7 (C=O), 159.4 (C-OH), 143.1 (-C=N-), 136.5.0 (Ar-C), 134.1 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 126.2 (Ar-C), 125.0 (Ar-C), 118.6 (Ar-C), 115.5 (Ar-C), 61.0 (-NH-CH-), 59.2 (-NH-CH-), 55.4 (-S-CH-), 40.2 (-S-CH₂-), 36.2 (-CH₂-), 28.2 (-CH₂-), 28.1 (-CH₂-), 25.1 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 513.1737, encontrado: 507.1733.

4-(4-(Biotinilamino)fenil)-1-((E)-3,4-dihidroxibenciliden)-3-tiosemicarbazona (43)



A **94** (63.8 mg, 0.17 mmol) se le adicionan 5 mL de CH_2Cl_2 e hidracina monohidratada (9 μL , 0.18 mmol, 1 equiv.) y se mantiene agitando dicha mezcla en oscuridad a temperatura ambiente durante 6 horas. Trascurrido este tiempo se adicionan 9 μL más de la hidracina monohidratada y se deja 16.5 horas más la reacción. Tras ello, se lleva la mezcla hasta sequedad. Se adicionan entonces 5 mL de EtOH y 3,4-dihidroxibenzaldehído (46.1 mg, 98% p/p, 0.33 mmol, 1.9 equiv.) y se mantiene la nueva mezcla calentando a reflujo en oscuridad con agitación magnética durante 2 horas. Trascurrido este tiempo se adicionan 20 mL de EtOH y la mezcla se transfiere a un tubo Falcon[®] y se centrifuga a 3000 rpm durante 2 minutos. Se obtiene un precipitado, desechándose la disolución etanólica. Dicho precipitado se lava con 15 mL de EtOH y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones anteriores, desechando nuevamente la disolución y quedándonos con el sólido precipitado, la tiosemicarbazona buscada, que se recoge con diclorometano y se lleva a sequedad.

Sólido amarillo pálido. Pf = (246-250) °C (desc.). $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +34$ (*c* 0.69, DMSO). Rendimiento: 49.8 mg, 56 %.

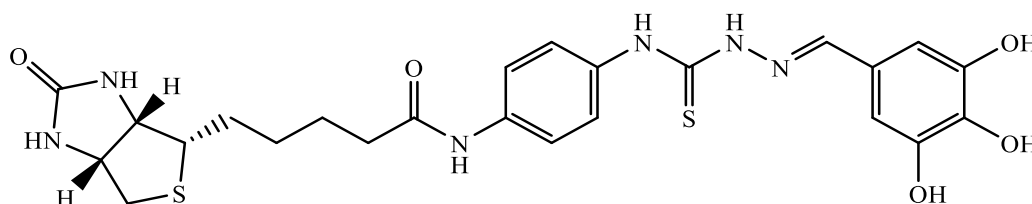
¹H-RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 11.55 (1H, s, CH=N-), 9.90 (1H, s, -OH), 9.86 (1H, s, -OH), 9.53 (1H, s, -NH), 9.00 (1H, s, -NH), 7.98 (1H, s, NH), 7.50 (4H, m, Ar-H), 7.31 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, Ar-H), 7.10 (1H, dd, *J* = 1.6 Hz, *J'* = 8.6 Hz, Ar-H), 6.77 (1H, d, *J'* = 8.6 Hz, Ar-H), 6.45 (1H, s, NH), 6.37 (1H, s, NH), 4.31 (1H, m, CH-N), 4.14 (1H, m, CH-N), 3.13 (1H, m, CH-S), 2.83 (1H, dd, *J* = 5.1 Hz, *J'* = 13.1 Hz, H-CH-S), 2.58 (1H, d, *J'* = 13.1 Hz, H-CH-S), 2.31 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.50 (6H, m, 3 -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 175.9 (C=S), 171.6 (C=O), 163.2 (C=O), 148.4 (C-OH), 146.0 (C-OH), 144.1 (-C=N-), 137.0 (Ar-C), 134.6 (Ar-C), 126.5 (Ar-C), 125.9 (Ar-C), 121.1 (Ar-C), 119.1 (Ar-C), 115.9 (Ar-C), 114.5 (Ar-C), 61.5 (-NH-CH-), 59.7 (-NH-

CH-), 55.9 (-S-CH-), 40.3 (-S-CH₂-), 36.7 (-CH₂-), 28.7 (-CH₂-), 28.5 (-CH₂-), 25.6 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₄H₂₈N₆NaO₄S₂ ([M + Na]⁺): 551.1506, encontrado: 551.1497.

4-(4-(Biotinilamino)fenil)-1-((E)-3,4,5-trihidroxibenciliden)-3-tiosemicarbazona (44)



A **94** (85.1 mg, 0.226 mmol, 2.4 equiv.) se le adicionan 7.5 mL de CH₂Cl₂ e hidracina monohidratada (17 μL, 0.34 mmol, 3.6 equiv.) y se mantiene dicha mezcla agitando en oscuridad a temperatura ambiente durante 17 horas. Transcurrido este tiempo, se lleva la mezcla hasta sequedad. Se toma una porción de la carbazida formada (52.3 mg, 0.13 mmol, 3.4 equiv.) y se adicionan 5 mL de EtOH y 3,4,5-trihidroxibenzaldehído (15.0 mg, 0.095 mmol), calentando esta mezcla a 50 °C en oscuridad con agitación magnética bajo atmosfera de argón durante 80 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionan 20 mL de EtOH y la mezcla se traspasa a un tubo Falcon® y se centrifuga a 3000 rpm durante 2 minutos. Se obtiene un precipitado, desechándose la disolución etanólica. Dicho precipitado se lava con 15 mL de EtOH y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones anteriores, desechando nuevamente la disolución y quedándonos con el sólido precipitado, la tiosemicarbazona buscada, que se recoge con diclorometano y se lleva a sequedad.

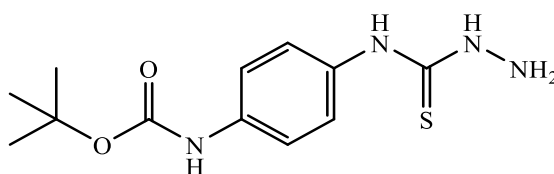
Sólido naranja pálido. Pf = (204-210) °C (desc.). $[\alpha]_D^{24} = +27$ (c 0.76, DMSO). Rendimiento: 43.6 mg, 84 %.

¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 11.51 (1H, s, CH=N-), 9.88 (1H, s, -OH), 9.82 (1H, s, -OH), 9.01 (1H, s, -NH), 8.69 (1H, s, -OH), 7.90 (1H, s, NH), 7.49 (4H, m, Ar-H), 6.77 (2H, s, Ar-H), 6.44 (1H, s, NH), 6.33 (1H, s, NH), 4.31 (1H, m, CH-N), 4.13 (1H, m, CH-N), 3.12 (1H, m, CH-S), 2.83 (1H, dd, J = 5.0 Hz, J' = 12.5 Hz, H-CH-S), 2.57 (1H, d, J' = 12.5 Hz, H-CH-S), 2.31 (2H, m, -CH₂-), 1.50 (6H, m, 3 -CH₂-) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 175.8 (C=S), 171.5 (C=O), 163.2 (C=O), 146.6 (C-OH), 144.5 (-C=N-), 136.9 (C-OH), 136.4 (Ar-C), 134.5 (Ar-C), 126.3 (Ar-C), 124.7 (Ar-C), 119.1 (Ar-C), 107.4 (Ar-C), 61.5 (-NH-CH-), 59.6 (-NH-CH-), 55.9 (-S-CH-), 40.3 (-S-CH₂-), 36.6 (-CH₂-), 28.7 (-CH₂-), 28.5 (-CH₂-), 25.6 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 545.1635, encontrado: 545.1628.

4-(4-(*tert*-Butoxicarbonilamino)fenil)-3-tiosemicarbazida (45)



95 (150.4 mg, 0.60 mmol) se disuelve en 10 mL de CH_2Cl_2 y se añade hidracina (59 μL , 1.032 g/mL, 98% p/p, 1.19 mmol, 2 equiv.). Dicha mezcla se agita magnéticamente a temperatura ambiente. Instantáneamente se observa la formación de un precipitado blanco que se seca, obteniéndose de esta manera el producto buscado.

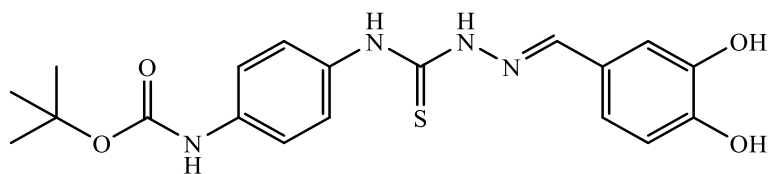
Sólido blanco. Rendimiento: 149.5 mg, 88%. Pf = (191-197) °C. R_f = 0.42 (Et_2O -ciclohexano 2:1).

^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 9.50 (1H, s, NH), 9.26 (1H, s, NH), 9.00 (1H, s, NH), 7.39 (4H, m, Ar-H), 4.73 (2H, s, -NH₂), 1.47 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 180.0 (-C=S), 153.3 (-C=O), 136.4 (Ar-C), 134.0 (Ar-C), 124.8 (Ar-C), 118.3 (Ar-C), 79.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.6 (CH_3) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{NaO}_2\text{S}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 305.1043, encontrado: 305.1042.

4-(4-(*tert*-Butoxicarbonilamino)fenil)-1-((*E*)-3,4-dihidroxibenciliden)-3-tiosemicarbazona (46)



A **45** (113.9 mg, 0.40 mmol) se le adicionan 7 mL de etanol y 3,4-dihidroxibenzaldehído (111.7 mg, 98% p/p, 0.81 mmol, 2 equiv.). La mezcla se deja con agitación calentándose a reflujo bajo atmósfera de argón y con oscuridad. Tras 1 hora se observa por cromatografía de capa fina que se ha consumido el reactivo limitante. La mezcla se lleva a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano → Et₂O-ciclohexano 2:1).

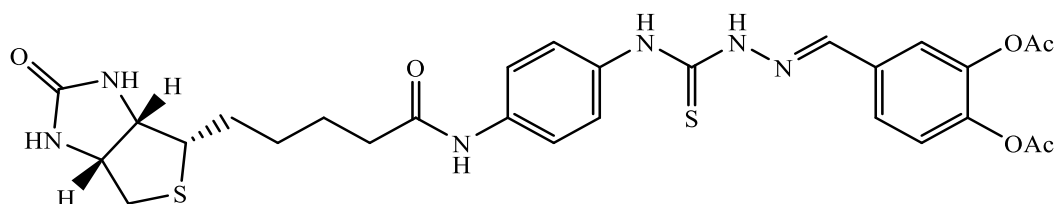
Sólido blanco. Rendimiento: 59.7 mg, 37 %. Pf = (191-197) °C. R_f = 0.2 (AcOEt-ciclohexano 1:1).

¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 11.52 (1H, s, CH=N-), 9.83 (1H, s, -OH), 9.51 (1H, s, NH), 9.33 (1H, s, -OH), 8.99 (1H, s, NH), 7.98 (1H, s, NH), 7.40 (4H, s, Ar-H), 7.31 (1H, d, J = 1.9 Hz, Ar-H), 7.09 (1H, dd, J = 8.2 Hz, J' = 1.9 Hz, Ar-H), (1H, d, J = 8.1 Hz, Ar-H), 1.48 (9H, s, (CH₃)₃C-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 175.5 (-C=S), 152.8 (-C=O), 147.9 (Ar-C), 145.6 (Ar-C), 143.6 (-C=N-), 136.8 (Ar-C), 126.2 (Ar-C), 125.5 (Ar-C), 120.6 (Ar-C), 117.7 (Ar-C), 115.5 (Ar-C), 114.1 (Ar-C), 79.0 (C-(CH₃)₃), 28.2 (-CH₃) ppm.

HRESI-MS calculado para C₁₉H₂₂N₄NaO₄S ([M + Na]⁺): 425.1254, encontrado: 425.1248.

4-(4-(Biotinilamino)fenil)-1-((E)-3,4-diacetoxibenciliden)-3-tiosemicarbazona (47)



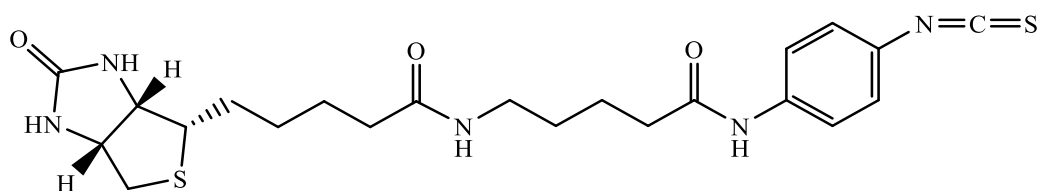
A **94** (69.9 mg, 0.19 mmol) se le adicionan 6.5 mL de CH_2Cl_2 e hidracina (14 μL , 1.032 g/mL, 98% p/p, 0.28 mmol, 1.5 equiv.). La mezcla se mantiene con agitación bajo atmosfera de argón y en oscuridad a temperatura ambiente durante 3.5 horas. Tras este tiempo, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida y se adiciona 3,4-diacetoxibenzaldehído (67.6 mg, 0.30 mmol, 1.6 equiv.) y 6 mL de etanol absoluto. La mezcla se calienta a reflujo en oscuridad y bajo atmosfera de argón durante 3.5 horas. Se obtiene un precipitado el cual se lava con dos porciones de etanol de volumen total 15 mL y centrifugando en un tubo Falcon[®], desechando la disolución y quedándonos con el precipitado que se recoge con diclorometano y se lleva a sequedad.

Solido amarillo pálido. Pf = (216-224) °C. $[\alpha]_D^{26} = +26$ (c 1.02, DMSO). Rendimiento: 91.2 mg, 80 %.

¹H-RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 11.84 (1H, s, CH=N-), 10.11 (1H, s, -NH), 9.92 (1H, s, -NH), 8.13 (1H, s, Ar-H), 7.97 (1H, s, NH), 7.74 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, $J' = 1.7$ Hz, Ar-H), 7.59 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 7.40 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 7.33 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 6.46 (1H, s, NH), 6.37 (1H, s, NH), 4.32 (1H, m, CH-N), 4.16 (1H, m, CH-N), 3.14 (1H, m, CH-S), 2.84 (1H, dd, $J = 4.9$ Hz, $J' = 12.4$ Hz, H-CH-S), 2.57 (1H, d, $J' = 12.5$ Hz, H-CH-S), 2.30 (8H, m, -CH₂- y 2 CH₃CO), 1.52 (6H, m, 3 -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 176.8 (C=S), 171.5 (C=O), 168.7 (COO), 168.6 (COO), 163.2 (C=O), 143.6 (C-O), 142.9 (-C=N-), 141.4 (C-O), 137.4 (Ar-C), 134.0 (Ar-C), 133.4 (Ar-C), 127.2 (Ar-C), 127.0 (Ar-C), 124.3 (Ar-C), 122.2 (Ar-C), 119.1 (Ar-C), 61.5 (-NH-CH-), 59.7 (-NH-CH-), 55.9 (-S-CH-), 40.3 (-S-CH₂-), 36.7 (-CH₂-), 28.7 (-CH₂-), 28.6 (-CH₂-), 25.6 (-CH₂-), 20.9 (-CH₃), 20.8 (-CH₃) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 613.1898, encontrado: 613.1889.

5-Biotinilamino-*N*-(4-isotiocianatofenil)pentanamida (48)

Se disuelve fenilendiamina (276.2 mg, 2.6 mmol) en 5 mL de DMF anhidra y se mantiene la disolución bajo atmósfera de argón con agitación en un baño de hielo.

Se disuelve por otro lado **98** (661.2 mg, 3.0 mmol, 1.2 equiv.) en 20 mL de DMF anhidra y añadimos Et₃N (900 μL, 0.726 g/mL, 99% p/p, 6.4 mmol, 2.5 equiv.) y lentamente cloroformiato de isobutilo (500 μL, 1.053 g/mL, 98% p/p, 3.8 mmol, 1.5 equiv.) dejando esta segunda mezcla en agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, adicionamos esta segunda mezcla a la disolución de fenilendiamina. Esta nueva mezcla se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 5.5 horas, tras lo cual llevamos es llevada a sequedad. La mezcla ya seca se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂-MeOH 20:1). Con ello se obtienen 445.9 mg de (5-((4-Aminofenil)amino)-5-oxopentil)carbamato de *tert*-butilo (R_f = 0.61 (CH₂Cl₂-MeOH 5:1)).

Se disuelve dicha cantidad de compuesto en 8 mL de CH₂Cl₂ y adicionamos 2 mL de CF₃COOH (99% p/p). La mezcla se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras observar la finalización de la reacción, se lleva la mezcla a sequedad. La mezcla obtenida se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂ - MeOH - NH₃ (28% en H₂O) (3:1:0.2), obteniéndose la 5-Amino-*N*-(4-aminofenil)pentanamida con un rendimiento cuantitativo (R_f = 0.13 (CH₂Cl₂-MeOH-NH₃ (28% en H₂O) 3:1:0.1)).

Tras esto, disolvemos D-biotina (354.0 mg, 1.45 mmol) en 30 mL de DMF seca, adicionándose Et₃N seca (0.5 mL, 0.720 g/mL, 99% p/p, 3.5 mmol, 2.4 equiv.) y manteniendo dicha mezcla en agitación a temperatura ambiente mientras se añade lentamente cloroformiato de isobutilo (284 μL, 98% p/p, 1.89 mmoles, 1.3 equiv.) para formar un anhídrido mixto, manteniendo la mezcla bajo atmosfera de argón. Por otro lado, se disuelve la totalidad de la 5-Amino-*N*-(4-aminofenil)pentanamida obtenida en la etapa

anterior (300.7 mg) en 5 mL de DMF anhidra y se coloca en un baño de hielo con agitación bajo atmósfera de argón. Tras estos preparativos, añadimos la disolución de DMF que contiene el anhídrido mixto a la disolución de 5-Amino-*N*-(4-aminofenil)pentanamida, y mantenemos esta nueva mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas. Tras este tiempo, se llevó la mezcla hasta sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

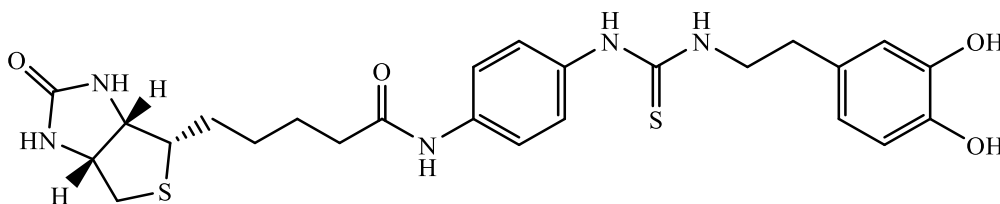
Finalmente, del compuesto purificado por columna se recoge una fracción de 104.2 mg (0.24 mmol), a la que se le añade una mezcla 1:1 de CH₂Cl₂-H₂O (10 mL) como disolvente y CaCO₃ (125.1 mg, 1.25 mmol, 5.2 equiv), adicionando tras ello tiofosgeno (48 µL, 1.5 g/mL, 97% p/p, 0.61 mmol, 2.5 equiv). Transcurridas 4 horas en la que la mezcla esta agitando magnéticamente a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, se lleva la mezcla a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

Rendimiento = 41.9 mg, 4%. R_f = 0.66 CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 10.11 (1H, s, -NH-), 7.76 (1H, t, *J* = 5.6 Hz, -NH-), 7.67 (2H, m, Ar-*H*), 7.37 (2H, m, Ar-*H*), 6.41 (1H, s, NH), 6.35 (1H, s, NH), 4.30 (1H, m, CH-N), 4.12 (1H, m, CH-N), 3.06 (1H, m, CH-S), 3.04 (2H, m, -CH₂-N), 2.80 (1H, dd, *J* = 5.1 Hz, *J*' = 12.4 Hz, H-CH-S), 2.57 (1H, d, *J*' = 12.4 Hz, H-CH-S), 2.32 (2H, m, -CH₂-CO), 2.05 (2H, m, -CH₂-CO), 1.44 (10H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 171.8 (-CONH-), 171.4 (-CONH-), 162.7 (-NHCONH-), 138.9 (Ar-C-), 132.4 (-SCN), 126.5 (Ar-C-H), 124.0 (Ar-C-SCN), 119.7 (Ar-C-H), 61.0 (CH-NH), 59.2 (CH-NH), 55.4 (CH-S-), 38.1 (CH₂-S-), 36.0 (-CH₂-), 35.2 (-CH₂-), 28.8 (-CH₂-), 28.2 (-CH₂-), 28.0 (-CH₂-), 25.3 (-CH₂-), 22.4 (-CH₂-) ppm

HRESI-MS calculado para C₂₇H₂₄N₅O₃S ([M + H]⁺): 498.1594, encontrado: 498.1595.

N-(4-(Biotinilamino)fenil)-N'-(3,4-dihidroxifenetil)tiourea (49)

A una disolución de clorhidrato de dopamina (24.5 mg, 100 % p/p, 0.13 mmol) en 3.5 mL de MeOH se le añade Et₃N (37 μ L, 99% p/p, 0.720 g/mL, 0.26 mmol, 2 equiv.), y dicha mezcla se mantiene con agitación durante 3 minutos. A continuación se añade el isotiocianato **94** (50.0 mg, 0.13 mmol, 1.0 equiv.), manteniéndose la mezcla con agitación a 50 °C durante 2 horas bajo atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo se obtuvo un precipitado. Posteriormente, la mezcla es concentrada hasta sequedad, y se adicionan 15 mL de EtOH absoluto para lavar el precipitado formado, suspendiendo el mismo en dicho disolvente y centrifugando a 3000 rpm durante 2 minutos. Tras eliminar la disolución etanólica y conservando el precipitado, se repite el proceso de lavado con etanol una segunda vez. Tras esto, se recoge el sólido y se seca a alto vacío.

Sólido amarillo pálido. Pf = (210-214) °C (desc.). $[\alpha]_D^{26} = +18$ (c 0.74, DMSO), Rendimiento 46.0 mg, 67%.

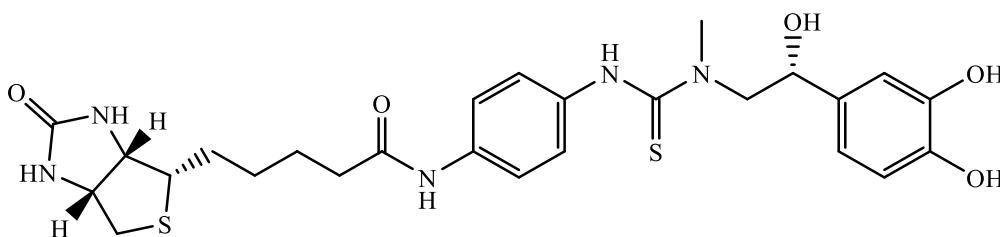
¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ : 9.85 (1H, s, -CONH-Ar), 9.40 (1H, s, NH-(C=S)-), 8.75 (1H, s, -OH), 8.63 (1H, s, -OH), 7.50 (3H, m, 2 Ar-H y NH-(C=S)-), 7.20 (2H, da, J= 8.6 Hz, Ar-H), 6.64 (1H, d, J= 8.2 Hz, Ar-H), 6.62 (1H, d, J= 2.2 Hz, Ar-H), 6.46 (1H, dd, J= 7.8 Hz, J' = 1.5 Hz, Ar-H), 6.42 (1H, s, HN-CONH-), 6.35 (1H, s, HN-CONH-), 4.31 (1H, m, CH-N), 4.14 (1H, m, CH-N), 3.58 (2H, t, CH₂-NH-), 3.12 (1H, m, CH-S-), 2.82 (1H, dd, J= 13.8 Hz, J' = 5.7 Hz, H-CH-S), 2.65 (2H, t, J= 7.3 Hz, Ar-CH₂-), 2.51 (1H, d, J=13.8 Hz, H-CH-S), 2.29 (2H, t, J= 7.5 Hz, CH₂-CO-), 1.50 (6H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) δ : 180.2 (C=S), 171.0 (-CONH-), 162.7 (-NHCONH-), 145.1 (C-OH), 143.6 (C-OH), 136.0 (Ar-C), 133.8 (Ar-C), 130.0 (Ar-C), 124.2 (Ar-C), 119.3 (Ar-C), 119.2 (Ar-C), 116.0 (Ar-C), 115.5 (Ar-C), 61.0 (-CH-NH-), 59.2 (-CH-

NH-), 55.4 (-S-CH-), 45.7 (-CH₂-NH-), 40.1 (-S-CH₂-), 36.2 (-CH₂-), 33.9 (-CH₂-), 28.2 (-CH₂-), 28.1 (-CH₂-), 25.1 (-CH₂-), ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₅H₃₁N₅NaO₄S₂ ([M + Na]⁺): 552.1710, encontrado: 552.1704.

(R)-N-(4-(Biotinilamino)fenil)-N'-(2-(3,4-dihidroxifenil)-2-hidroxi-etil)-N'-metiltiourea (50)



A una disolución de clorhidrato de *R*-epinefrina (29.2 mg, 0.13 mmol) en 3.5 mL de MeOH se le añade Et₃N (37 μL, 99% p/p, 0.720 g/mL, 0.26 mmol, 2 equiv.), manteniendo la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 3 minutos. A continuación se añade el isotiocianato **94** (50.0 mg, 0.13 mmol, 1.0 equiv.), manteniendo la mezcla con agitación, a 50 °C y bajo atmósfera de argón durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se obtuvo un precipitado. Posteriormente, la mezcla es concentrada hasta sequedad, y se adicionan 15 mL de EtOH absoluto para lavar el precipitado formado, suspendiendo el mismo en dicho disolvente y centrifugando a 3000 rpm durante 2 minutos. Tras eliminar la disolución etanólica y conservar el precipitado, se repite el proceso de lavado con etanol una segunda vez. Tras esto, se recoge el sólido y se seca a alto vacío.

Sólido marrón. Pf = (169-173) °C. $[\alpha]_D^{26} = +9$ (*c* 1.02, DMSO), Rendimiento 61.3 mg, 82%.

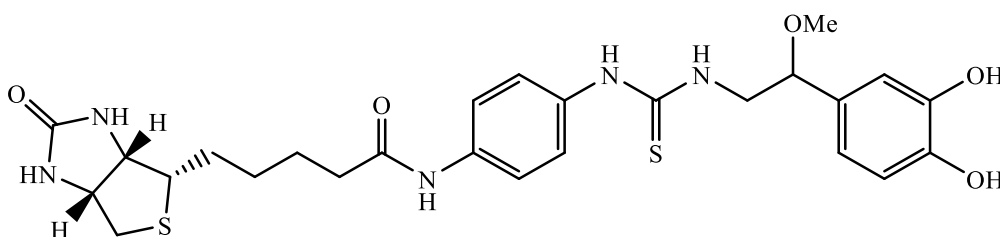
¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 9.83 (1H, s, -CONH-Ar), 9.18 (1H, s, NH-(C=S)-), 8.83 (1H, s, -OH), 8.73 (1H, s, -OH), 7.50 (2H, m, Ar-H), 7.19 (2H, m, Ar-H), 6.82 (1H, d, J= 2.2 Hz, Ar-H), 6.69 (1H, d, J= 7.7 Hz, Ar-H), 6.66 (1H, dd, J= 7.7 Hz, J' = 2.2 Hz, Ar-H), 6.43 (1H, s, HN-CONH-), 6.35 (1H, s, HN-CONH-), 5.68 (1H, s, -OH), 4.88 (1H, m, CH-O), 4.31 (1H, m, CH-N), 4.14 (1H, m, CH-N), 4.00 (1H, m, CH-NMe), 3.58 (1H, m, CH-NMe), 3.19 (3H, s, N-CH₃), 3.12 (1H, m, CH-S-), 2.82 (1H, dd, J= 12.2 Hz,

$J' = 5.4$ Hz, H-CH-S), 2.58(1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-CH-S), 2.30 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, CH₂-CO-), 1.52 (6H, m, -CH₂-) ppm

¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) δ : 181.6 (C=S), 171.0 (-CONH-), 162.7 (-NHCONH-), 145.0 (Ar-C-OH), 144.4 (Ar-C-OH), 136.0 (Ar-C), 135.9 (Ar-C), 134.3 (Ar-C), 125.9 (Ar-C), 118.7 (Ar-C), 116.6 (Ar-C), 115.2 (Ar-C), 113.3 (Ar-C), 71.0 (CH-OH), 61.1 (-NH-CH-), 59.2 (-NH-CH-), 55.4 (-S-CH-), 54.9 (-CH₂-NH-), 40.6 (-S-CH₂-), 36.2 (-CH₃), 30.7 (-CH₂-), 28.2 (-CH₂-), 28.1 (-CH₂-), 25.2 (-CH₂-), ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₆H₃₃N₅NaO₅S₂ ([M + Na]⁺): 560.1996, encontrado: 560.1986.

***N*-(4-(Biotinilamino)fenil)-*N'*-(2-(3,4-dihidroxifenil)-2-metoxietil)tiourea (51)**



Una disolución de clorhidrato de β -metoxidopamina (27.0 mg, 0.12 mmol) en 5 mL de MeOH es tratada con resina básica IRA-420 (OH) para su desprotonación, manteniendo la disolución en presencia de dicha resina con agitación durante 15-20 min a temperatura ambiente, y posteriormente filtrando la mezcla para eliminar la resina. Tras ello, la disolución es llevada a sequedad, adicionándose tras ello 5 mL de MeOH y el isotiocianato **94** (50.0 mg, 0.13, 1.1 equiv.). Esta mezcla se mantiene con agitación y calentado a 50 °C bajo atmósfera de argón durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, la disolución se concentró hasta sequedad, obteniéndose una mezcla que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ \rightarrow CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

Sirupo amarillento. Rendimiento 44.2 mg, 64%. $R_f = 0.48$ (CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

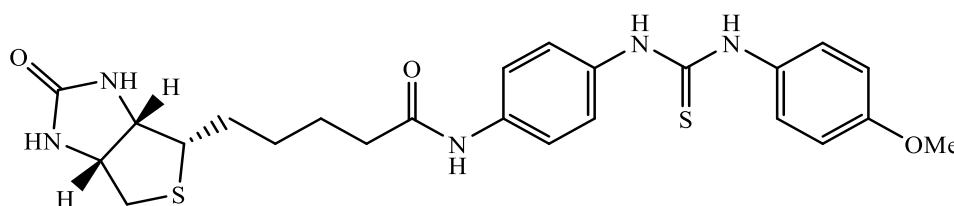
¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.54 (2H, m, Ar-H), 7.18 (2H, da, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 6.78 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, Ar-H), 6.76 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, Ar-H), 6.66 (1H, dd, $J = 8.2$ Hz, $J' = 1.9$ Hz, Ar-H), 4.49 (1H, m, CH-O), 4.36 (1H, m, CH-N), 4.31 (1H, m, CH-N), 3.84 (1H, m, 1H, m, CH-N), 3.58 (2H, m, CH-S- y CH-N), 3.22 (3H, s, O-CH₃), 2.93 (1H, dd,

$J = 13.2$ Hz, $J' = 5.1$ Hz, H-CH-S), 2.70 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, H-CH-S), 2.39 (2H, t, $J = 6.2$ Hz, CH₂-CO-), 1.57 (6H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CD₃OD) δ : 182.1 (C=S), 174.4 (-CONH-), 166.1 (-CONH-), 146.6 (Ar-C-OH), 146.4 (Ar-C-OH), 137.7 (Ar-C), 131.9 (Ar-C), 126.2 (Ar-C), 121.9 (Ar-C), 119.6 (Ar-C), 116.3 (Ar-C), 114.8 (Ar-C), 82.9 (CH-O), 63.4 (-NH-CH-), 61.6 (-NH-CH-), 57.0 y 56.8 (-S-CH- y CH₃-O-), 51.7 (-CH₂-NH-), 41.0 (-S-CH₂-), 37.6 (-CH₂-), 29.8 (-CH₂-), 29.5 (-CH₂-), 26.7 (-CH₂-), ppm.

HRESI-MS calculado para C₂₆H₃₃N₅NaO₅S₂ ([M + Na]⁺): 582.1794, encontrado: 582.1815.

***N*-(4-(Biotinilamino)fenil)-*N'*-(4-metoxifenil)tiourea (52)**



Se disuelve **94** (50.9 mg, 0.135 mmol) en 1.5 mL de DMF y se adiciona *p*-metoxianilina (34.0 mg, 98% p/p, 0.27 mmol, 2.0 equiv), manteniéndose esta mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 21 horas. Tras esto se llevó a sequedad la mezcla y se realizaron tres lavados del sólido obtenido con CH₂Cl₂ (3x10 mL), centrifugándose en cada uno de ellos, dentro de un tubo Falcon[®] a 3000 rpm durante 2 minutos, y desechándose la fracción líquida. Se obtiene un sólido gris que se seca a alto vacío.

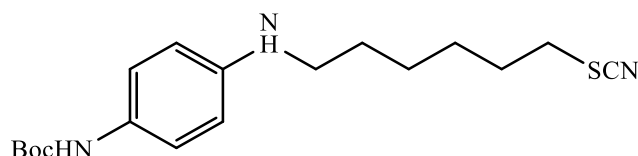
Sólido gris. Pf = (167-173) °C. $[\alpha]_D^{23} = +34$ (*c* 1.00, DMSO). Rendimiento: 51.4 mg, 76%.

¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ : 9.87 (1H, s, -CONH-Ar), 9.54 (1H, s, NH-(C=S)-), 9.50 (1H, s, NH-(C=S)-), 7.52 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 7.33 (4H, m, Ar-H), 6.89 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, Ar-H), 6.44 (1H, s, HN-CONH-), 6.36 (1H, s, HN-CONH-), 4.30 (1H, m, CH-N), 4.14 (1H, m, CH-N), 3.74 (3H, s, CH₃O-), 3.12 (1H, m, CH-S-), 2.83 (1H, dd, $J = 12.5$ Hz, $J = 4.9$ Hz, H-CH-S-), 2.58 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-CH-S-), 2.30 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, -CH₂-CO-), 1.48 (6H, m, 3 -CH₂-) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 179.9 (C=S), 171.0 (-CONH-), 162.7 (-NHCONH-), 156.5 (Ar-C-O), 136.1 (Ar-C), 132.4 (-SCN), 126.5 (Ar-C-H), 124.0 (Ar-C-SCN), 119.8 (Ar-C-H), 134.4 (Ar-C), 132.2 (Ar-C), 126.0 (Ar-C), 124.5 (Ar-C), 119.1 (Ar-C), 113.6 (Ar-C), 61.1 (CH-NH), 59.2 (CH-NH), 55.4 y 55.2 (CH-S- y CH_3O -), (36.2 (- CH_2 -), 28.2 (- CH_2 -), 28.1 (- CH_2 -), 25.2 (- CH_2 -) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{NaO}_3\text{S}_2$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$): 522.1604, encontrado: 522.1595.

(4-((6-Tiocianatohexil)amino)fenil)carbamato de *terc*-butilo (53)



95 (50.6 mg, 0.24 mmol) es disuelto en 2 mL de DMF anhidra, y se adiciona 1,6-dibromohexano (115 μL , 0.72 mmol, 3 equiv.) y KOH (30.7 g, 96% p/p, 0.47 mmol, 2 equiv.). La mezcla se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, tras lo cual se lleva la mezcla a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow AcOEt-ciclohexano 1:4). Se obtiene de esta manera 49.2 mg del compuesto procedente de la monoalquilación.

Tras repetir varias veces la reacción, tomamos 213.6 mg del producto alquilado (0.58 mmol) y lo disolvemos en 5 mL de DMF. Tras esto se adiciona KSCN (173.5 mg, 1.77 mmol, 3.0 equiv) y se mantiene la reacción con agitación bajo atmósfera de argón y a 70 $^\circ\text{C}$ durante 2.5 horas. La mezcla es llevada a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow AcOEt-ciclohexano 1:4).

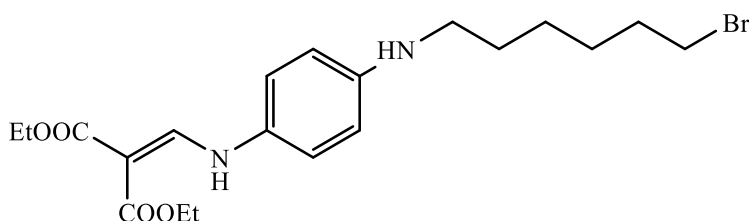
Sirupo marrón claro. Rendimiento: 145.7 mg, 39%. $R_f = 0.48$ (AcOEt-ciclohexano 1:1)

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.92 (2H, da, $J = 8.1$ Hz, Ar-H), 6.66 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 3.58 (2H, s, -NH-), 3.54 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, - CH_2 -), 2.91 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, - CH_2 -), 1.79 (2H, m, - CH_2 -), 1.42 (6H, m, - CH_2 -), 1.40 (9H, s, CH_3 -) ppm.

^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 155.4 ($-\text{COO}-$), 144.1 (Ar-C-), 134.0 (Ar-C-), 128.4 (Ar-C-), 115.7 (Ar-C-), 112.5 ($-\text{SCN}$), 79.8 ($-\text{C}-(\text{CH}_3)$), 49.9 ($-\text{CH}_2-$), 34.1 ($-\text{CH}_2-$), 29.9 ($-\text{CH}_2-$), 29.8 ($-\text{CH}_2-$), 28.5 (CH_3-), 27.7 ($-\text{CH}_2-$), 26.1 ($-\text{CH}_2-$) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 350.1897, encontrado: 350.1894.

2-(((4-((6-Bromohexil)amino)fenil)amino)metilen)malonato de dietilo (54)



99 (201.5 mg, 0.724 mmol) se disuelve en 1.5 mL de DMF y se adiciona K_2CO_3 (200.0 mg, 99% p/p, 1.45 mmol, 2.0 equiv.). Se mantiene la mezcla con agitación durante 40 minutos, tras lo cual se adiciona 1,6-dibromohexano (440 μL , 1.586 g/mL, 96% p/p, 2.9 mmol, 4.0 equiv.) y se mantiene la mezcla con agitación, a temperatura ambiente y en atmosfera de argón durante 4.5 horas. Tras esto llevamos la mezcla a sequedad y realizamos una purificación en columna cromatográfica de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow EtO_2 -ciclohexano 1:2).

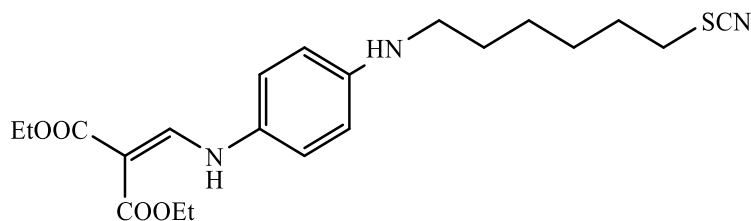
Sólido amarillo. Pf = (67-77) $^\circ\text{C}$. Rendimiento 139.6 mg, 28% (57% al recuperar 102.2 mg de producto de partida). R_f = 0.38 (Et_2O -ciclohexano 2:1).

^1H -RMN (300MHz, CDCl_3) δ : 10.95 (1H, d, Ar-NH-C=), 8.40 (1H, d, $-\text{CH}=\text{C}$), 6.99 (2H, m, Ar-H), 6.99 (2H, m, Ar-H), 6.65 (2H, dm, J = 8.6 Hz, Ar-H), 4.49 (1H, s, Ar-NH), 4.29 (2H, c, J = 7.4 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4.22 (2H, c, J = 7.1 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 3.41 (2H, t, J = 6.7 Hz, $-\text{CH}_2-\text{Br}$), 3.11 (2H, t, J = 7.0 Hz, $-\text{CH}_2-\text{N}$), 1.87 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 1.65 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 1.46 (4H, m, $-\text{CH}_2-$), 1.37 (3H, t, J = 7.1 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1.31 (3H, t, J = 7.1 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) δ : 169.5 (COO), 166.1 (COO), 152.7 ($=\text{CH}-\text{N}-$), 145.5 (Ar-C), 130.7 (Ar-C), 119.2 (Ar-C), 114.3 (Ar-C), 91.9 (OCC-CH-COO), 60.3 (CH_2-OOC), 60.0 (CH_2-OOC), 44.7 ($-\text{CH}_2-$), 33.9 ($-\text{CH}_2-$), 32.7 ($-\text{CH}_2-$), 29.2 ($-\text{CH}_2-$), 28.0 ($-\text{CH}_2-$), 26.4 ($-\text{CH}_2-$), 14.6 ($-\text{CH}_3$), 14.5 ($-\text{CH}_3$) ppm.

HRESI-MS calculado para $C_{20}H_{30}O_4N_2^{79}Br$ ($[M + H]^+$): 441.1383, encontrado: 441.1382. Calculado para $C_{20}H_{30}^{81}BrN_2O_4$ ($[M + H]^+$): 443.1363, encontrado: 443.1359

2-(((4-((6-Tiocianatohexil)amino)fenil)amino)metilen)malonato de dietilo (55)



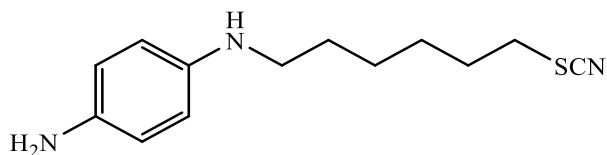
54 (128.4 mg, 0.29 mmol) se disuelve en 2 mL de DMF y se adiciona KSCN (88.0 mg, 99% p/p, 0.90 mmol, 3.1 equiv.). La mezcla se mantiene con agitación a 70 °C, bajo atmósfera de argón y en oscuridad durante 21.5 horas. Tras esto llevamos la mezcla a sequedad y realizamos una purificación en columna cromatográfica de gel de sílice (ciclohexano → EtO₂-ciclohexano 1:1).

Sólido amarillo intenso. Pf = (71-79) °C. Rendimiento 100.6 mg, 82%. R_f = 0.29 (Et₂O-ciclohexano 2:1)

¹H-RMN (300MHz, CDCl₃) δ: 10.95 (1H, d, *J* = 14.1 Hz, Ar-NH-C=), 8.40 (1H, d, *J* = 14.1 Hz, -CH=), 6.99 (2H, m, Ar-H), 6.63 (2H, m, Ar-H), 4.28 (2H, c, *J* = 7.2 Hz, -COOCH₂-), 4.22 (2H, c, *J* = 7.3 Hz, -COOCH₂-), 3.11 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₂-SCN), 2.94 (2H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₂-N), 1.85 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, -CH₂-), 1.65 (2H, q, *J* = 6.9 Hz, -CH₂-), 1.48 (4H, m, 2 -CH₂-), 1.37 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₃-CH₂OOC-), 1.31 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₃-CH₂OOC-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ: 169.5 (-COO-), 166.1 (-COO-), 152.7 (=CH-N-), 145.6 (Ar-C), 130.6 (Ar-C), 119.2 (Ar-C), 114.1 (Ar-C), 112.4 (-SCN), 91.8 (OCC-CH-COO), 60.3 (CH₂-OOC), 60.0 (CH₂-OOC), 44.5 (-CH₂-), 34.0 (-CH₂-), 29.9 (-CH₂-), 29.2 (-CH₂-), 27.8 (-CH₂-), 26.5 (-CH₂-), 14.6 (-CH₃), 14.5 (-CH₃) ppm.

HRESI-MS calculado para $C_{21}H_{30}N_3O_4S$ ($[M + H]^+$): 420.1952, encontrado: 420.1944.

***N*¹-(6-Tiocianatohexil)benceno-1,4-diamina (56)**

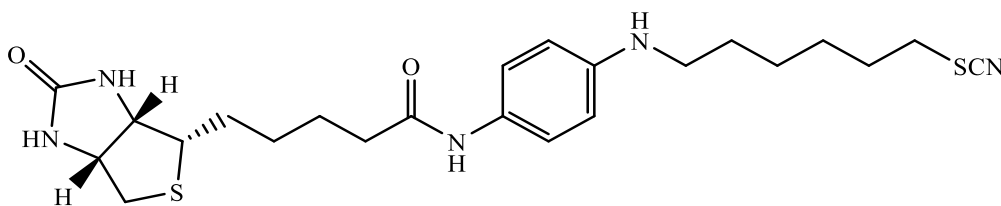
55 (231.8 g, 0.55 mmol) se disuelve en 6 mL de una mezcla CH₂Cl₂ – EtOH (2:1) y se adiciona etilendiamina (270 μL, 0.9 g/mL, 99.5 % p/p, 2.2 mmol, 8 equiv.). La mezcla se calienta a 45 °C con agitación en oscuridad y bajo atmósfera de argón durante 6 horas. Transcurrido este tiempo llevamos la mezcla a sequedad y realizamos una purificación en columna cromatográfica de gel de sílice. (Ciclohexano → EtO₂-ciclohexano 2:1).

Sirupo rojizo. Rendimiento 68.1 mg, 49%. R_f = 0.11 (Et₂O-ciclohexano 2:1)

¹H-RMN (300MHz, CDCl₃) δ: 6.59 (4H, m, Ar-H), 3.24 (3H, s, NH, y NH₂), 3.05 (2H, s, -CH₂-), 2.93 (2H, t, J = 7.2 Hz, -CH₂-), 1.83 (2H, m, -CH₂-), 1.61 (2H, m, -CH₂-), 1.45 (4H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ: 141.3 (Ar-C-N), 137.9 (Ar-C-N), 116.9 (Ar-C), 114.7 (Ar-C), 112.4 (SCN), 45.1 (-CH₂-), 34.9 (-CH₂-), 29.8 (-CH₂-), 29.4 (-CH₂-), 27.8 (-CH₂-), 26.5 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₁₃H₂₀N₃S ([M + H]⁺): 250.1372, encontrado: 250.1368.

***N*¹-Biotinil-*N*⁴-(6-tiocianatohexil)benceno-1,4-diamina (57)**

Se disuelve D-biotina (67.6 mg, 0.28 mmol, 1 equiv) en 5 mL de DMF, adicionándose Et₃N (87 μL, 0.720 g/mL, 99% p/p, 0.61 mmol, 2.2 equiv), y añadiendo lentamente cloroformiato de isobutilo (47 μL, 1.053 g/mL, 98% p/p, 0.36 mmol, 1.3 equiv.). La reacción se mantiene a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, añadimos esta mezcla sobre otra mezcla de **56** (68.1 mg, 0.27 mmol) disuelto en 1 mL de DMF y enfriado previamente en un baño de hielo.

La reacción se mantiene con agitación, en oscuridad y bajo atmósfera de argón a 0 °C durante 5 minutos y posteriormente se mantiene a temperatura ambiente durante 2.5 horas. Transcurrido este tiempo, llevamos la mezcla a sequedad y realizamos una purificación en columna cromatográfica de gel de sílice. (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂-MeOH 20:1).

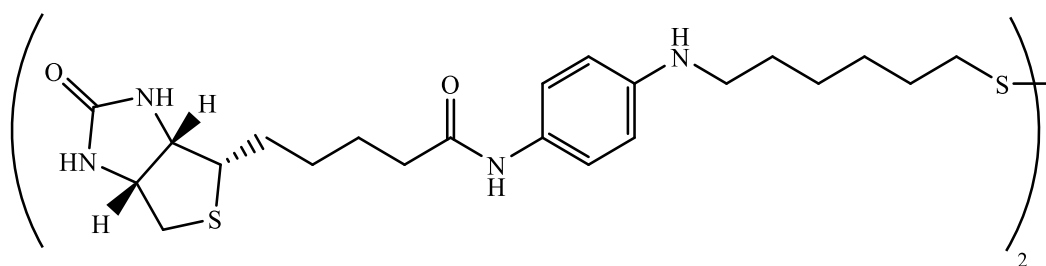
Sólido blanco. $[\alpha]_D^{25} = +31$ (*c* 1.15, (CD₃)₂SO). Rendimiento: 68.4 mg, 53%. *R_f* = 0.59 (CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

¹H-RMN (500 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 9.41 (1H, s, -CONH-Ar), 7.25 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, Ar-*H*), 6.47 (2H, d, *J* = 8.9 Hz, Ar-*H*), 6.42 (1H, s, NH-CO-), 6.34 (1H, s, NH-CO-), 5.29 (1H, t, *J* = 5.6 Hz, Ar-NH-), 4.30 (1H, m, CH-N), 4.14 (1H, m, CH-N), 3.11 (1H, m, CH-S-), 2.95 (2H, c, *J* = 6.7 Hz, -CH₂), 2.82 (1H, dd, *J* = 5.2 Hz, *J'* = 12.5 Hz, H-CH-S), 2.58, (1H, d, *J'* = 12.3 Hz, H-CH-S), 2.22 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, -CH₂-CO), 1.54 (14 H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (125.8 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 170.1 (-CONH-), 162.7 (-CONH-), 145.3 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 120.9 (Ar-C), 113.2 (SCN), 111.7 (Ar-C), 61.0 (-NH-CH-), 59.2 (-NH-CH-), 55.4 (-S-CH-), 43.1 (-CH₂-), 36.0 (-CH₂-), 33.2 (-CH₂-), 29.5 (-CH₂-), 28.5 (-CH₂-), 28.3 (-CH₂-), 28.1 (-CH₂-), 27.1 (-CH₂-), 26.0 (-CH₂-), 25.3 (-CH₂) ppm.

HRESI--MS calculado para C₂₃H₃₄N₅O₂S₂ ([M + H]⁺): 476.2148, encontrado: 476.2148

Bis(6-((4-(biotinilamino)fenil)amino)hexil)disulfuro (58)



Disolvemos **57** (58.1 mg, 0.12 mmol) en 1.5 mL de DMF y añadimos NaBH₄ (10.0 mg, 97% p/p, 0.26 mmol, 2.1 equiv.). La mezcla se deja con agitación a temperatura ambiente durante 19.5 horas. Transcurrido este tiempo, llevamos la mezcla a sequedad y realizamos una purificación en columna cromatográfica de gel de sílice. (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

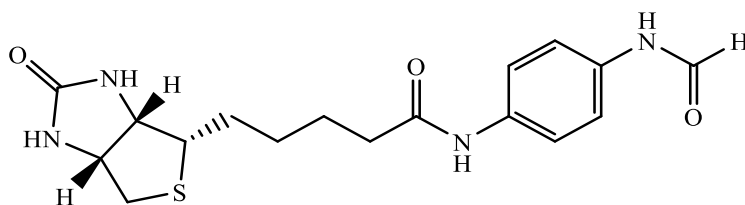
Sólido blanco. $[\alpha]_D^{25} = +29$ (c 0.64, DMSO). Rendimiento 34.4 mg, 63%. $R_f = 0.52$ (CH_2Cl_2 -MeOH 5:1).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 9.47 (2H, s, -CONH-), 7.25 (4H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 6.46 (4H, d, $J = 8.9$ Hz, Ar-H), 6.44 (2H, s, NH-CO-), 6.36 (2H, s, NH-CO-), 5.28 29 (2H, t, $J = 5.2$ Hz, Ar-NH-), 4.30 (2H, m, CH-NH), 4.13 (2H, m, CH-NH), 3.11 (2H, m, CH-S-), 2.92 (4H, c, $J = 5.9$ Hz, -CH₂), 2.82 (2H, dd, $J = 5.1$ Hz, $J' = 12.5$ Hz, H-CH-S), 2.69 (4H, t, $J = 7.2$ Hz, -CH₂-S), 2.57 (2H, d, $J' = 12.3$ Hz, H-CH-S), 2.22 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, -CH₂-CO), 1.48 (28 H, m, -CH₂-) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 170.1 (-CONH-), 162.7 (-CONH-), 145.3 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 120.9 (Ar-C), 111.7 (Ar-C), 61.1(-NH-CH-), 59.2 (-NH-CH-), 55.4 (-S-CH-), 43.1 (-CH₂-), 37.8 (-CH₂-), 36.0 (-CH₂-), 28.6 (-CH₂-), 28.6 (-CH₂-), 28.3 (-CH₂-), 28.1 (-CH₂-), 27.6 (-CH₂-), 26.3 (-CH₂-), 25.3(-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{N}_8\text{NaO}_4\text{S}_4$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$): 899.4139, encontrado: 899.4144.

N-(4-(Biotinilamino)fenil)formamida (59)



Se disuelve **41** (120.0 mg, 0.36 mmol) en 5 mL de formiato de etilo (97% p/p) y se añaden ácido acético glacial (20 μL , 1.052 g/mL, 99.7% p/p, 0.35 mmol, 1.0 equiv.). Dicha mezcla se mantiene calentando a reflujo durante 3.5 horas. El precipitado formado se lava con 5 mL de formiato de etilo, centrifugando la mezcla a 3000 rpm durante 2 minutos, desechándose la disolución y quedándonos con el precipitado formado. El precipitado es lavado nuevamente con formiato de etilo (10 mL) y centrifugado en las condiciones descritas anteriormente. Se desecha nuevamente la disolución y el precipitado obtenido es secado a alto vacío.

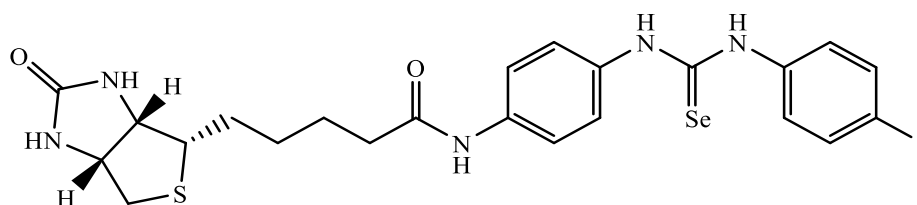
Sólido blanco. $P_f = (188-196)$ °C. $[\alpha]_D^{24} = +41$ (c 0.81, DMSO). Rendimiento: 118.1 mg, 91 %. $R_f = 0.24$ (CH_2Cl_2 -MeOH 5:1).

¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ : 9.45 (1H, s, CHO), 7.21 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 6.50 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 6.44 (1H, s, NH), 6.36 (1H, s, NH), 5.04 (2H, s, -NH-), 4.30 (1H, m, CH-NH), 4.13 (1H, m, CH-NH), 3.11 (1H, m, CH-S), 2.82 (1H, dd, $J = 5.2$ Hz, $J' = 12.5$ Hz, H-CH-S), 2.57 (1H, d, $J' = 12.2$ Hz, H-CH-S), 2.22 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, -CH₂-), 1.48 (6H, m, 3 -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) δ : 170.1 (C=O), 162.7 (C=O), 144.0 (C=O), 128.9 (C=O), 120.8 (Ar-C), 114.0 (Ar-C), 61.0 (-NH-CH-), 59.2 (-NH-CH-), 55.4 (-S-CH-), 39.8 (-S-CH₂-), 36.0 (-CH₂-), 28.2 (-CH₂-), 28.1 (-CH₂-), 25.3 (-CH₂-) ppm.

ESI-MS calculado para C₁₇H₂₃N₄O₃S ([M + H]⁺): 363.14, encontrado: 363.15.

***N*-(4-(Biotinilamino)fenil)-*N'*-(4-yodofenil)selenourea (60)**



Se disuelve **41** (46.0 mg, 0.14 mmol) en 2 mL de DMF. A dicha mezcla se le adiciona 4-yodofeniliselenocianato (50.3 mg, 0.16 mmol, 1.2 equiv). Dicha mezcla se mantiene agitando, bajo atmósfera de argón, en oscuridad y a 45 °C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se lleva a sequedad. El sólido obtenido se lava con 15 mL de EtOH, y se centrifuga a 3000 rpm durante 2 minutos, observándose la separación de un polvo gris de la disolución etanólica. Se separó el disolvente del sólido y se repitió el lavado con centrifugado una segunda vez. De esta manera se obtuvo un sólido puro.

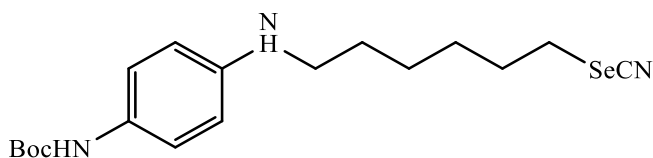
Sólido gris. Pf = (187-195) °C. $[\alpha]_D^{23} = +24$ (c 0.80, DMSO). Rendimiento: 51.6 mg, 58%.

¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ : 10.16 (1H, s, NH-(C=Se)-), 10.00 (1H, s, NH-(C=Se)-), 9.91 (1H, s, -CONH-Ar), 7.65 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 7.55 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.24 (4H, m, Ar-H), 6.43 (1H, s, HN-CONH-), 6.36 (1H, s, HN-CONH-), 4.30 (1H, m, CH-N), 4.14 (1H, m, CH-N), 3.12 (1H, m, CH-S-), 2.82 (1H, dd, $J = 12.4$ Hz, $J = 5.0$ Hz, H-CH-S-), 2.57 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-CH-S-), 2.30 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, -CH₂-CO-), 1.51 (6H, m, 3 -CH₂-) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 179.0 (C=Se), 171.6 (-CONH-), 163.2 (-NHCONH-), 140.2 (Ar-C), 137.6 (Ar-C), 137.4 (Ar-C), 134.7 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 125.9 (Ar-C), 119.7 (Ar-C), 90.2 (Ar-C-I), 61.5 (CH-NH), 59.7 (CH-NH), 55.9 (CH-S-), 36.7 (-CH₂-), 28.7 (-CH₂-), 28.6 (-CH₂-), 25.6 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{IN}_5\text{NaO}_2\text{SSe}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$): 665.9909, encontrado: 665.9892.

(4-((6-Selenocianatohexil)amino)fenil)carbamato de *terc*-butilo (61)



95 (50.6 mg, 0.24 mmol) es disuelto en 2 mL de DMF anhidra, y se adiciona 1,6-dibromohexano (115 μL , 0.72 mmol, 3 equiv.) y KOH (30.7 g, 96% p/p, 0.47 mmol, 2 equiv.). La mezcla se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, tras lo cual se lleva la mezcla a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow AcOEt-ciclohexano 1:4). Se obtiene de esta manera 49.2 mg de compuesto puro. El proceso se repite varias veces para obtener una mayor cantidad de compuesto monoalquilado.

Se disuelve entonces (4-((6-bromohexil)amino)fenil)carbamato de *terc*-butilo (224.5 mg, 0.60 mmoles) en 6 mL de DMF y se adiciona KSeCN (258.8 mg, 1.8 mmol, 3 equiv). La mezcla se calienta con agitación bajo atmósfera de argón y en oscuridad durante 2.5 horas a 70 °C. Transcurrido este tiempo se lleva a cabo una cromatografía en columna de gel de sílice para la purificación del compuesto deseado (ciclohexano \rightarrow AcOEt-ciclohexano 1:4).

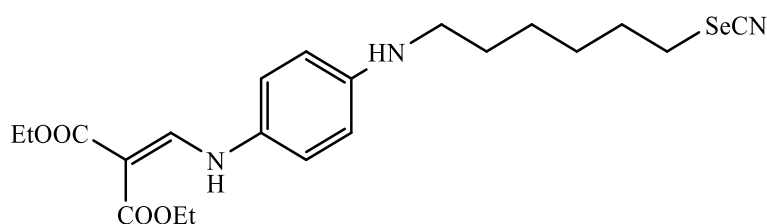
Sirupo rojo. Rendimiento = 124.7 mg, 28%. R_f = 0.50 (AcOEt-ciclohexano 1:1).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.93 (2H, da, J = 8.2 Hz, Ar-H), 6.69 (2H, m, Ar-H), 3.77 (2H, s, -NH-), 3.54 (2H, t, J = 7.2 Hz, -CH₂-), 3.01 (2H, t, J = 7.3 Hz, -CH₂-), 1.86 (2H, m, -CH₂-), 1.42 (6H, m, -CH₂-), 1.40 (9H, s, CH₃-) ppm.

^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 155.4 (-COO-), 144.5 (Ar-C-), 134.3 (Ar-C-), 128.4 (Ar-C-), 116.0 (Ar-C-), 101.7 (-SeCN), 79.8 (-C-(CH₃)), 49.9 (-CH₂-), 30.9 (-CH₂-), 29.6 (-CH₂-), 28.9 (-CH₂-), 28.5 (CH₃-), 27.7 (-CH₂-), 26.0 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2\text{Se}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 398.1341, encontrado: 398.1335.

2-(((4-((6-Selenocianatohexil)amino)fenil)amino)metilen)malonato de dietilo (62)



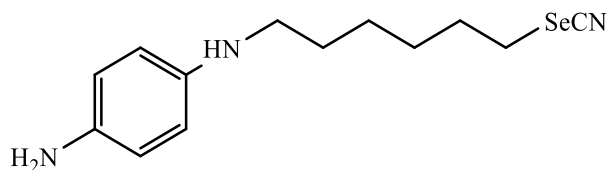
Se disuelve **54** (100.6 mg, 0.23 mmol) en 2 mL de DMF y se adiciona KSeCN (97.8 mg, 99% p/p, 0.67 mmol, 3 equiv.). La mezcla se mantiene con agitación, en oscuridad, a 70°C y bajo atmósfera de argón durante 3.5 horas. Tras esto se lleva la mezcla a sequedad y se realiza una purificación en columna cromatográfica de gel de sílice (ciclohexano → AcOEt-ciclohexano 1:2).

Sólido amarillo pardo. Rendimiento 95.4 mg, 90%. $R_f = 0.28$ (AcOEt-ciclohexano 1:2).

^1H -RMN (300MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 10.85 (1H, d, $J = 13.9$ Hz, Ar-NH-C=), 8.38 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, -CH=), 7.10 (2H, m, Ar-H), 6.68 (2H, m, Ar-H), 5.01 (1H, t, $J = 5.0$ Hz, -NH-), 4.21 (2H, c, $J = 7.1$ Hz, -COOCH₂-), 4.14 (2H, c, $J = 7.1$ Hz, -COOCH₂-), 3.19 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, -CH₂-), 3.13 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, -CH₂-), 1.93 (2H, m, -CH₂-), 1.67 (2H, m, -CH₂-), 1.52 (4H, m, -CH₂-), 1.27 (6H, m, CH₃-CH₂OOC) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 169.6 (-COO-), 166.0 (-COO-), 153.1 (=CH-N-), 148.1 (Ar-C), 130.1 (Ar-C), 119.9 (Ar-C), 113.8 (Ar-C), 102.7 (-SeCN), 92.2 (OCC-CH-COO), 60.2 (CH₂-OOC), 59.9 (CH₂-OOC), 44.3 (-CH₂-), 31.9 (-CH₂-), 30.1 (-CH₂-), 29.5 (-CH₂-), 27.1 (-CH₂-), 14.8 (-CH₃), 14.7 (-CH₃) ppm.

HRESI-MS calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_4\text{Se}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 468.1396, encontrado: 468.1396.

***N*¹-(6-Selenocyanatohexil)benceno-1,4-diamina (63)**

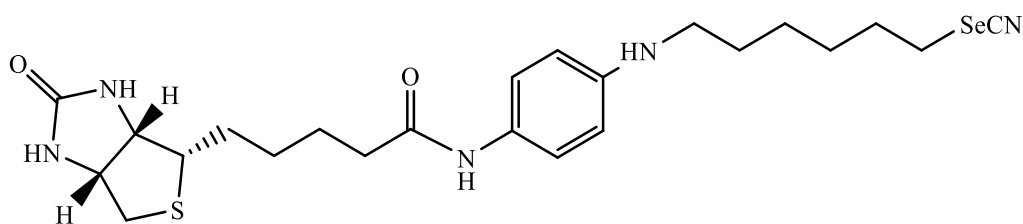
Se adiciona a **62** (241.3 mg, 0.52 mmol) 6 mL de EtOH absoluto y etilendiamina (175 μ L, 0.9 g/mL, 99.5% p/p, 3.22 mmol, 6.2 equiv). Dicha mezcla se mantiene en oscuridad, con agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón durante 16 horas. Transcurrido este tiempo se lleva la mezcla a sequedad y realizamos una purificación en columna cromatográfica de gel de sílice (ciclohexano \rightarrow AcOEt-ciclohexano 2:1).

Sólido amarillo pardo. Rendimiento 105.5 mg, 69%. $R_f = 0.42$ (AcOEt-ciclohexano 2:1).

¹H-RMN (300MHz, (CD₃)₂SO) δ : 6.38 (4H, m, Ar-H), 4.39 (3H, s, NH y NH₂), 3.08 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, -CH₂-), 2.88 (2H, m, -CH₂-), 1.81 (2H, m, -CH₂-), 1.45 (6H, m, -CH₂-) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) δ : 140.6 (Ar-C), 138.6 (Ar-C), 115.6 (Ar-C), 113.6 (Ar-C), 104.6 (-SeCN), 44.1 (-CH₂-), 30.8 (-CH₂-), 29.8 (-CH₂-), 28.3 (-CH₂-), 26.0 (-CH₂-) ppm.

HRESI-MS calculado para C₁₃H₂₀N₃Se ([M + H]⁺): 298.0817, encontrado: 298.0815.

***N*¹-Biotinil-*N*⁴-(6-selenocianatohexil)benceno-1,4-diamina (64)**

Se disuelven D-biotina (73.9 mg, 0.30 mmol) en 4.5 mL de DMF anhidra. A dicha disolución se le adiciona Et₃N anhidra (96 μ L, 0.720 g/mL, 99% p/p, 0.67 mmol, 2.5 equiv) y lentamente añadimos cloroformiato de isobutilo (57 μ L, 1.053 g/mL, 98% p/p, 0.43 mmol, 1.4 equiv.), dejando dicha mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos bajo atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo, trasparamos el contenido de este matraz a otro con una disolución en 1 mL de DMF anhidra de **63** (88.8 mg, 0.30 mmol, 1 equiv.) a 0 °C, y mantenemos la agitación a esta temperatura, en

oscuridad y bajo atmósfera de argón durante 10 minutos. Tras este tiempo, se deja la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se evapora entonces el disolvente a alto vacío y se realiza una purificación en columna cromatográfica de gel de sílice (ciclohexano → CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

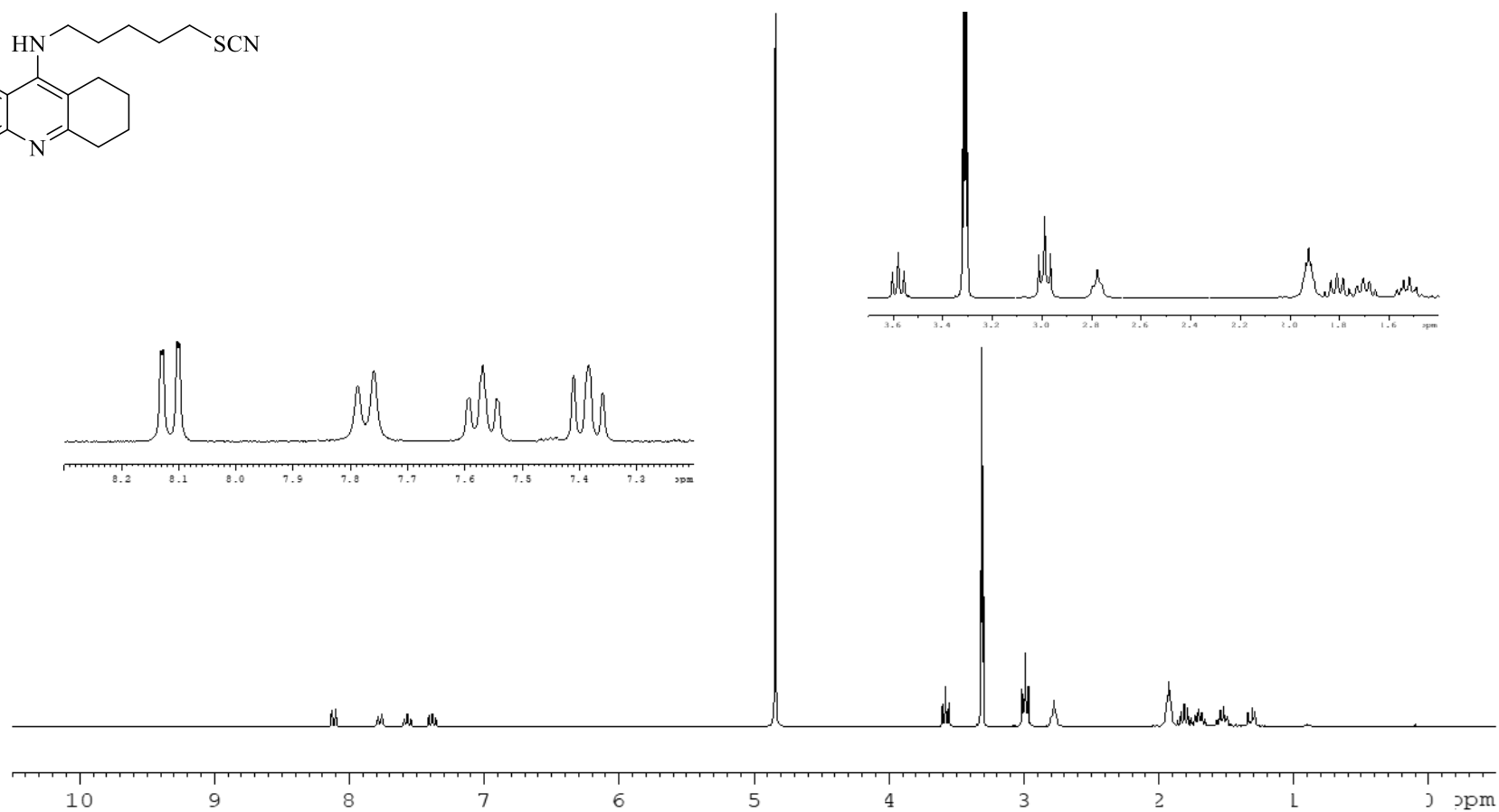
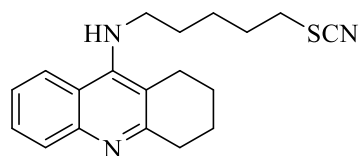
Sólido gris. Pf = (141-150) °C. $[\alpha]_D^{25} = +30$ (c 0.9167, DMSO). Rendimiento: 79.2 mg, 50%. R_f = 0.56 (CH₂Cl₂-MeOH 5:1).

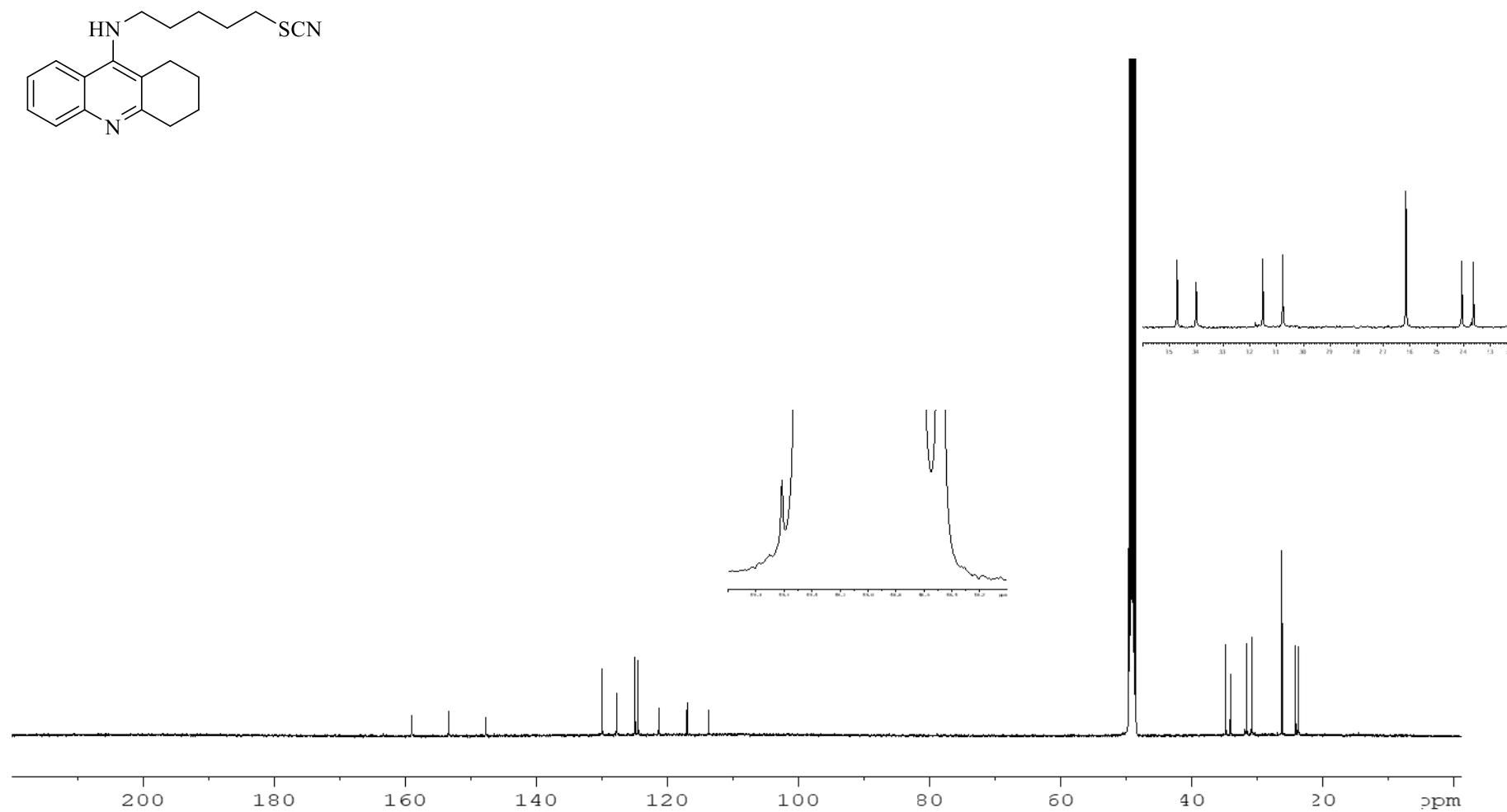
¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 9.43(1H, s, -CONH-Ar), 7.25(2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 6.47(2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 6.43 (1H, s, NH-CO-), 6.35(1H, s, NH-CO-), 5.30(1H, s, Ar-NH-), 4.30(1H, m, CH-N), 4.14(1H, m, CH-N), 3.12 (1H, m, CH-S-), 3.08 (2H, t, J = 7.3 Hz, -CH₂-), 2.95 (2H, m, -CH₂-), 2.82 (1H, dd, J = 5.1 Hz, J' = 12.4 Hz, H-CH-S), 2.57 (1H, d, J' = 12.5 Hz, H-CH-S), 2.22 (2H, t, J = 7.2 Hz, -CH₂-CO), 1.82 (2H, m, -CH₂-) 1.49 (12 H, m, -CH₂-) ppm.

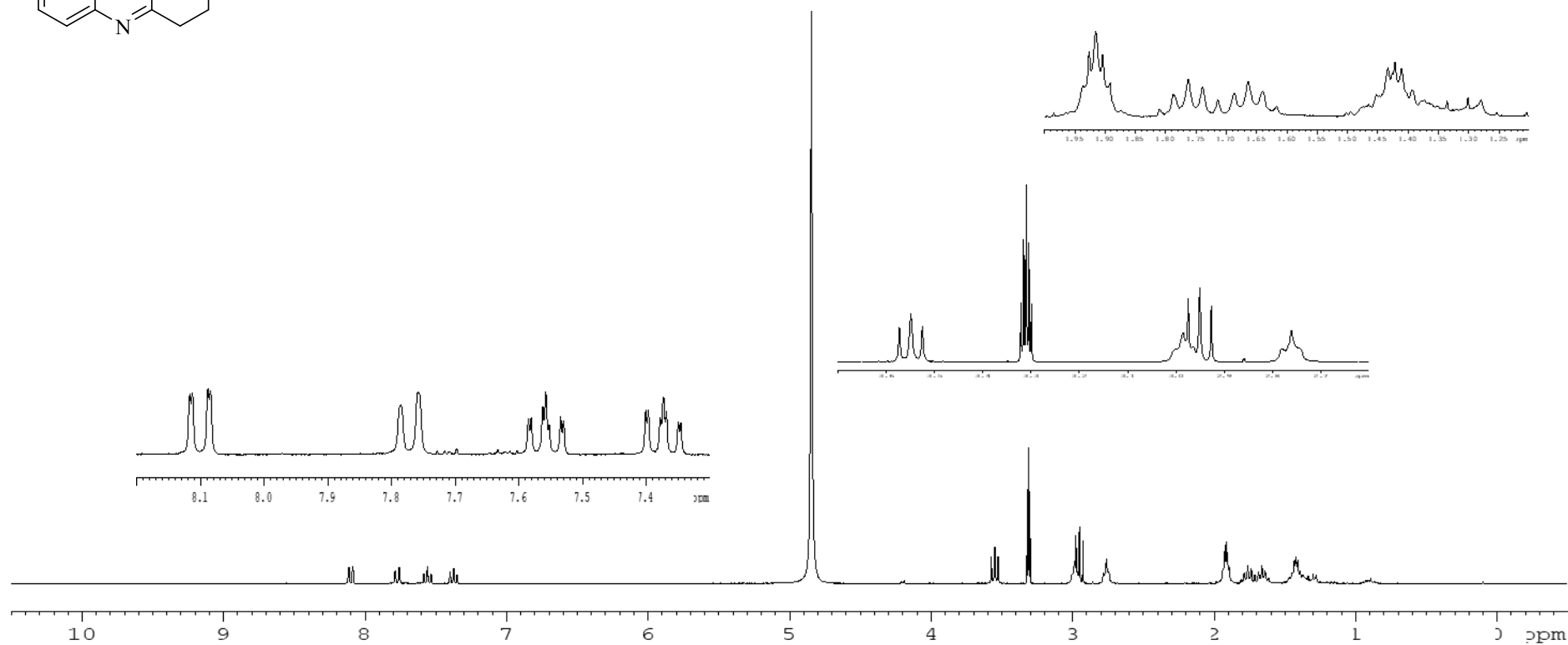
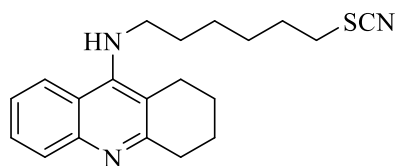
¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) δ: 170.6(-CONH-), 163.2(-CONH-), 145.7(Ar-C), 128.8(Ar-C), 121.4 (Ar-C), 112.2 (Ar-C), 105.1 (SeCN), 61.5(-NH-CH-), 59.7(-NH-CH-), 55.9(-S-CH-), 43.6 (-CH₂), 36.5 (-CH₂-), 31.2 (-CH₂-), 30.3 (-CH₂-), 29.1 (-CH₂-), 28.7 (-CH₂-), 28.6 (-CH₂-), 26.4 (-CH₂-), 25.8 (-CH₂-) ppm.

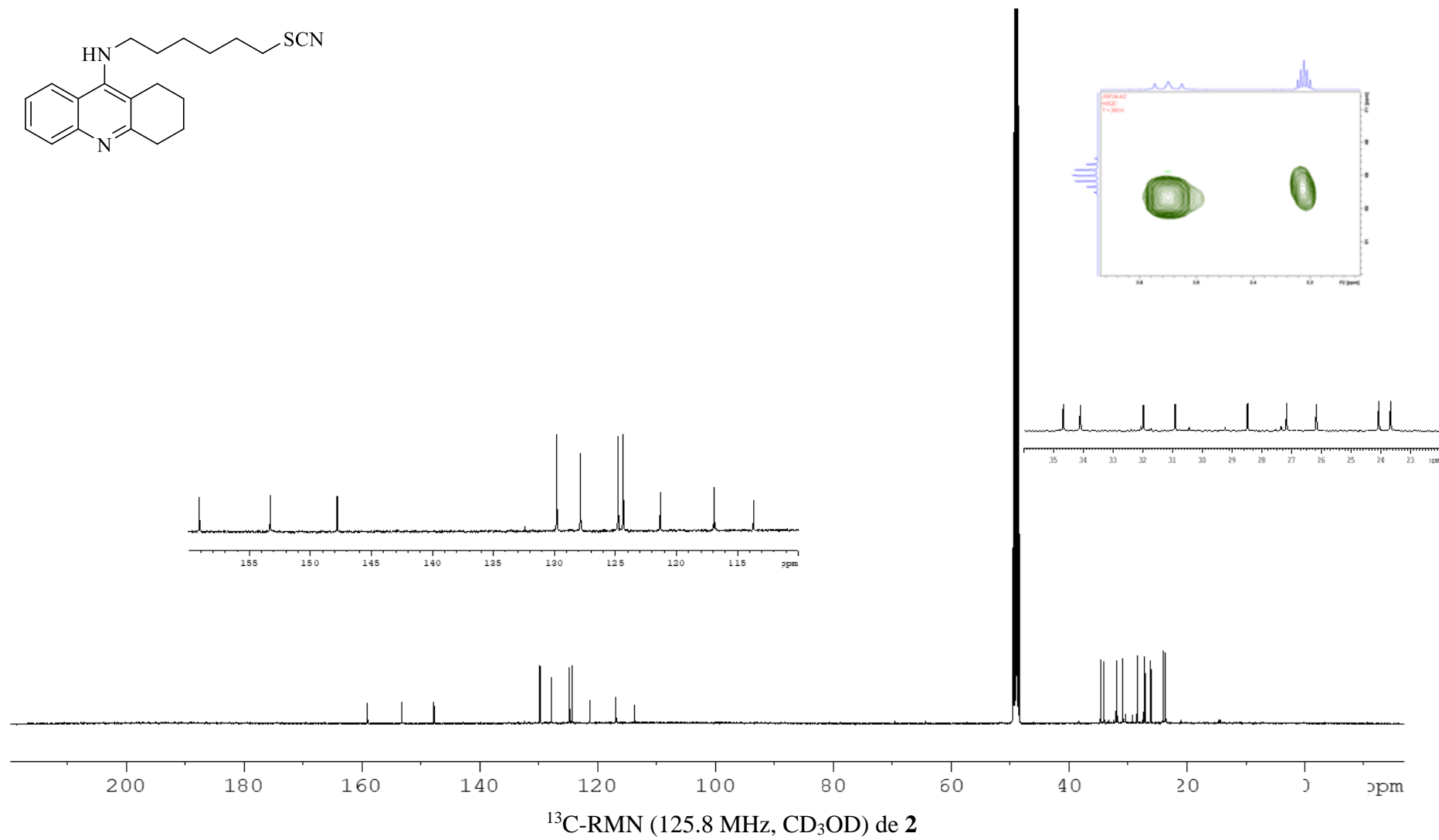
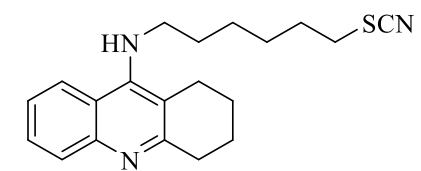
HRESI-MS calculado para C₂₃H₃₄N₅O₂SSe ([M + H]⁺): 524.1593, encontrado: 524.1583.

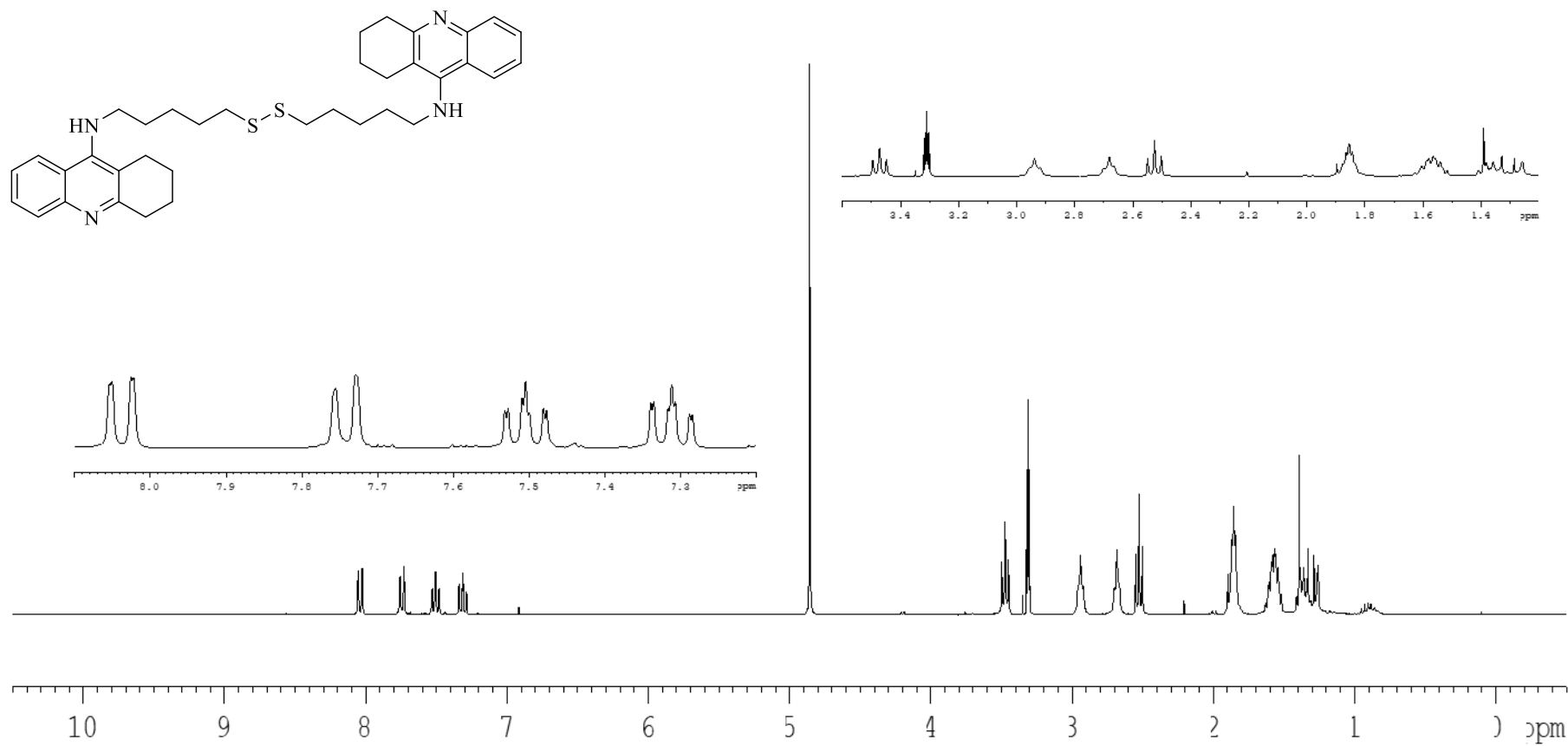
9. ESPECTROS DE RMN REPRESENTATIVOS

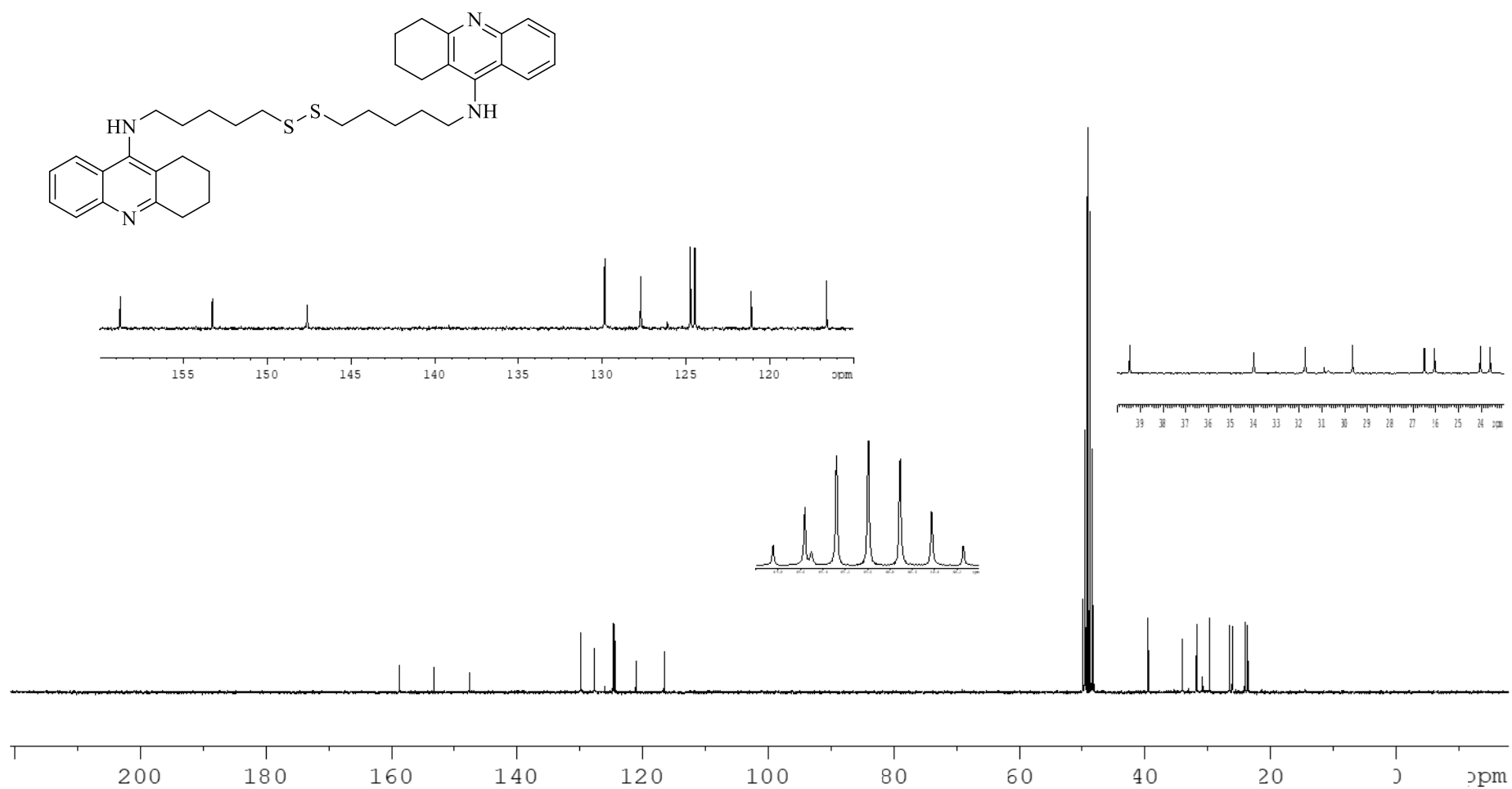
Compuesto 1 ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) de **1**

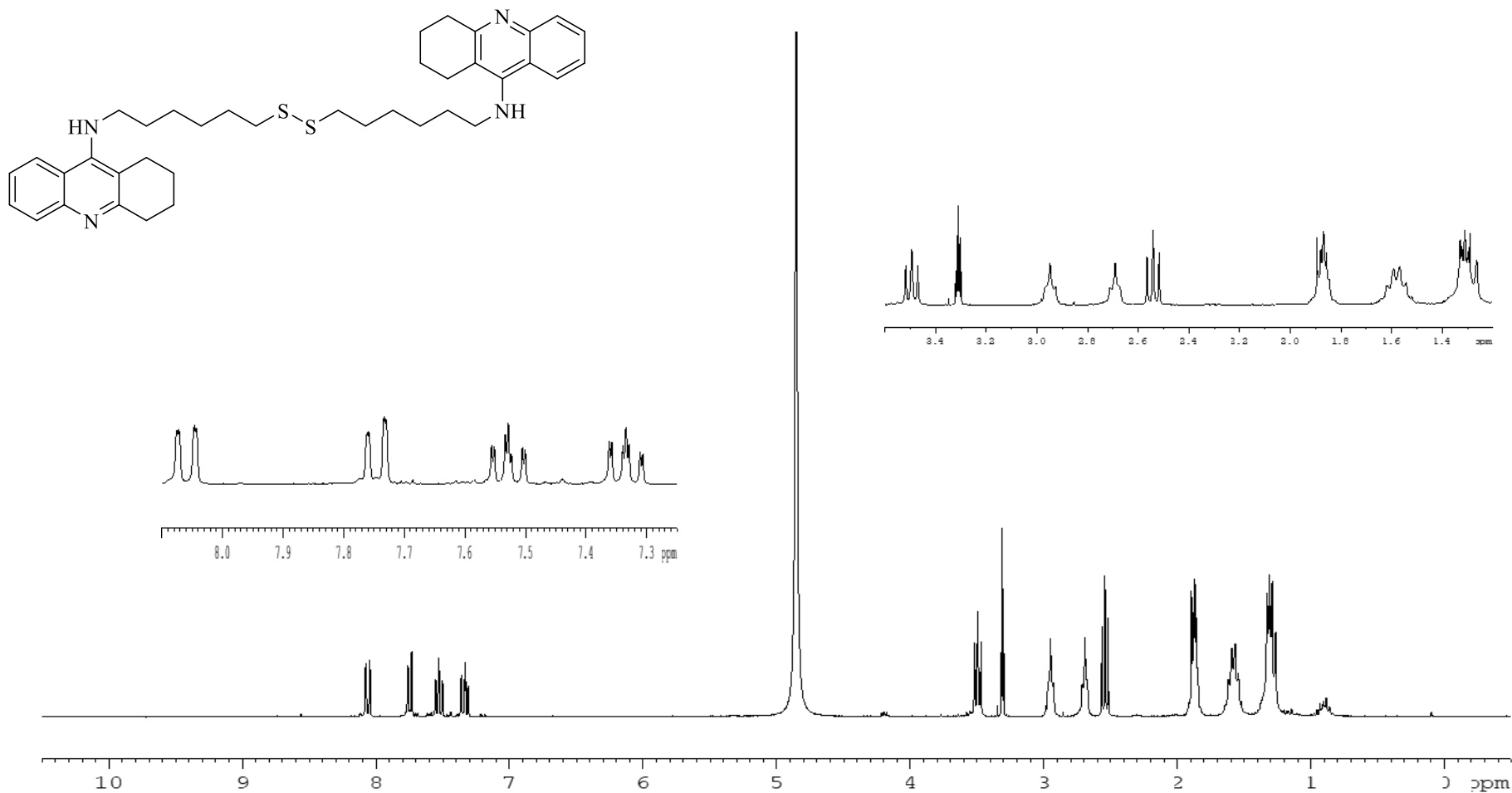
 ^{13}C -RMN (125.8 MHz, CD_3OD) de **1**

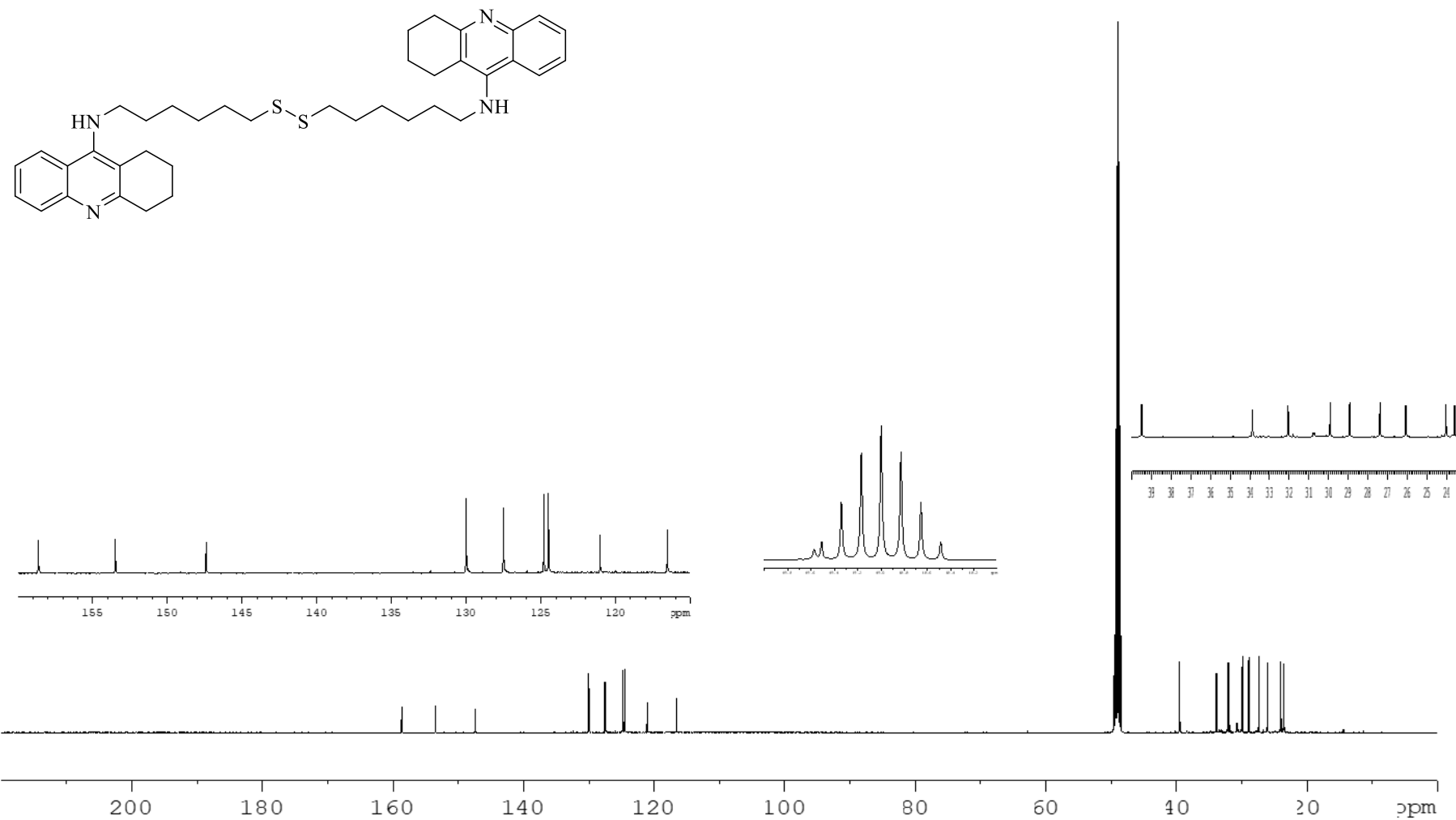
Compuesto 2 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) de 2

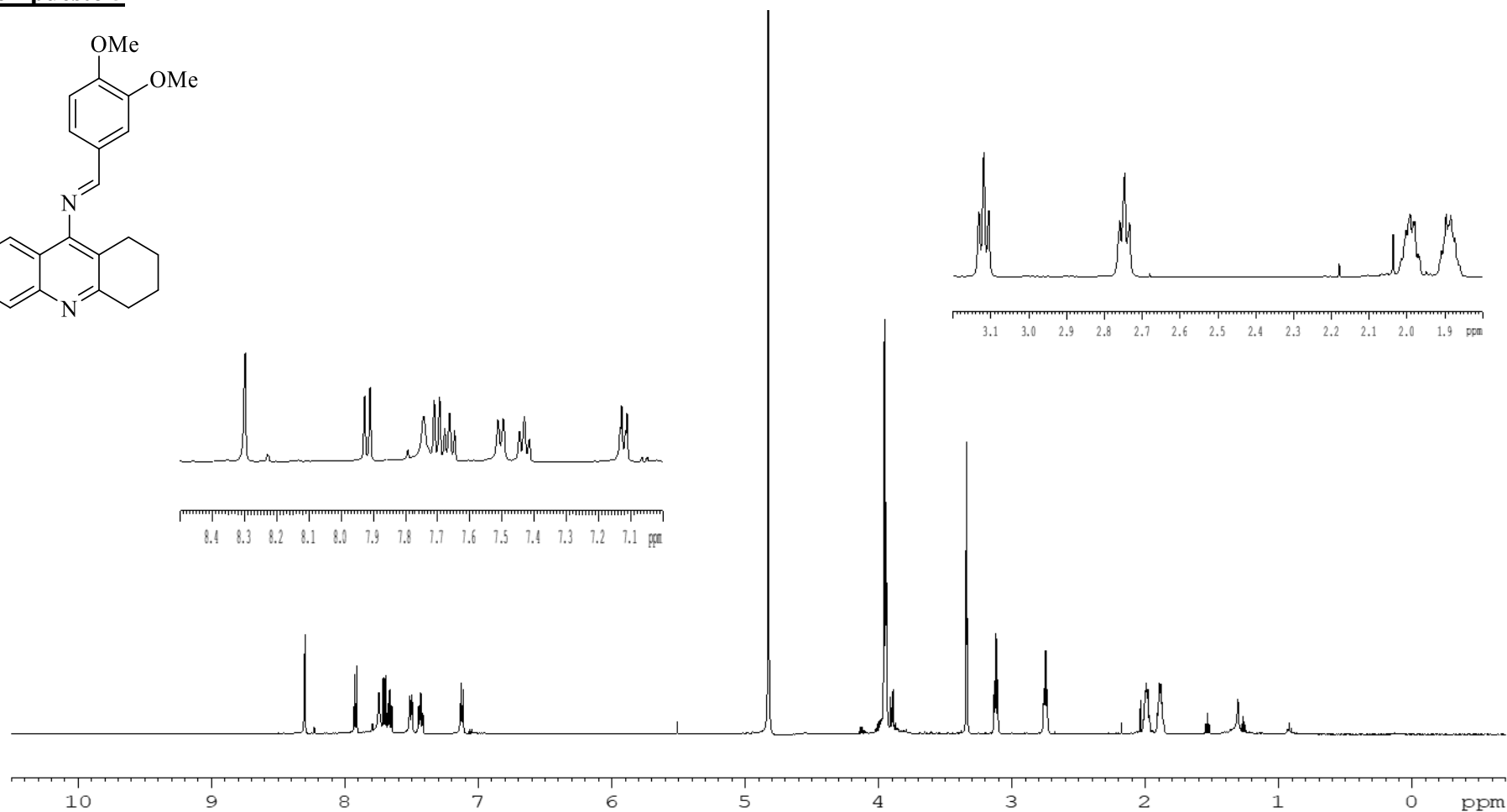
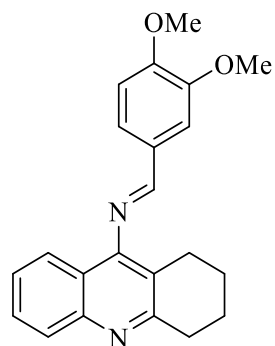


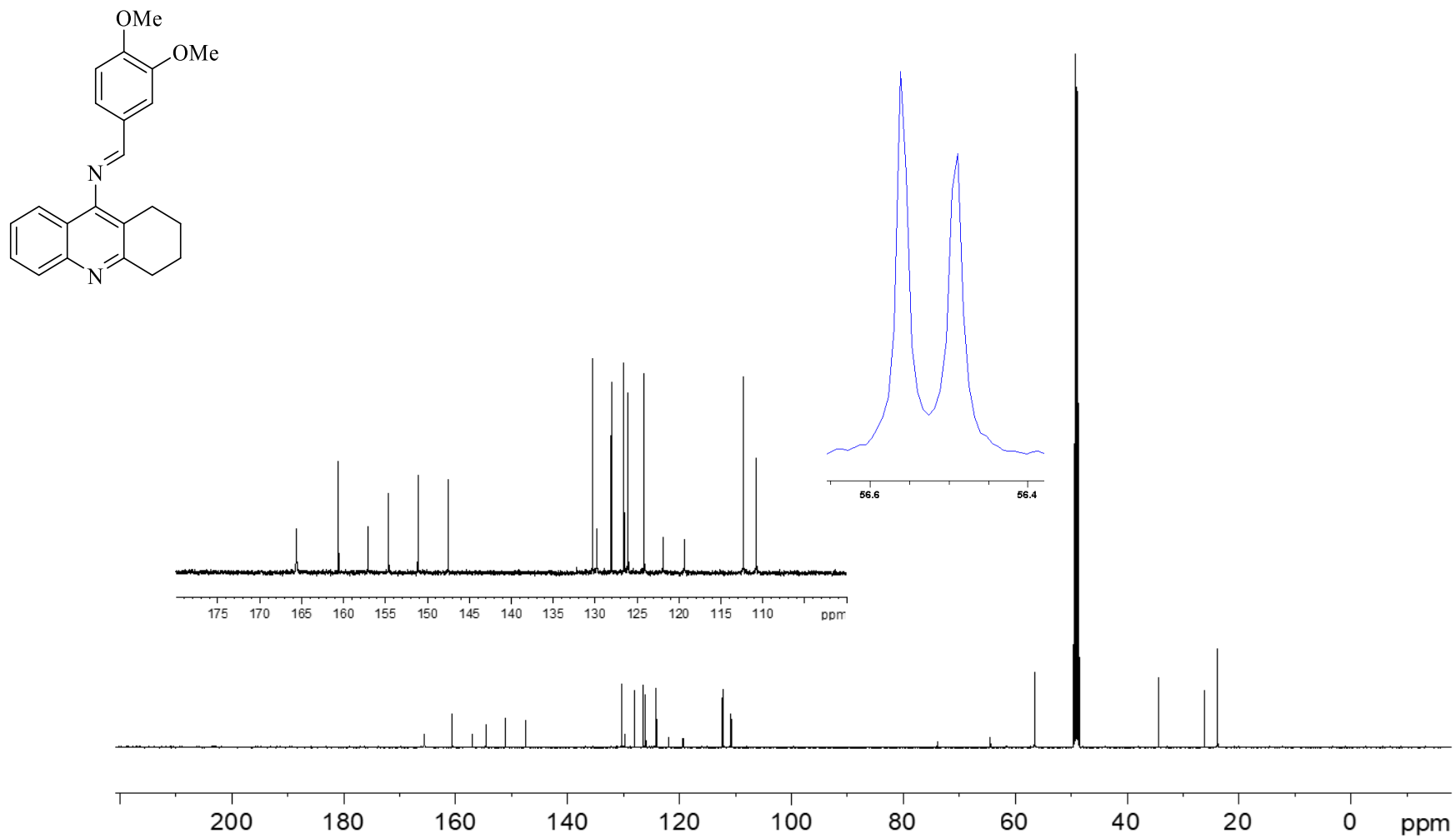
Compuesto 3 ^1H -RMN (300 MHz, CD₃OD) de **3**

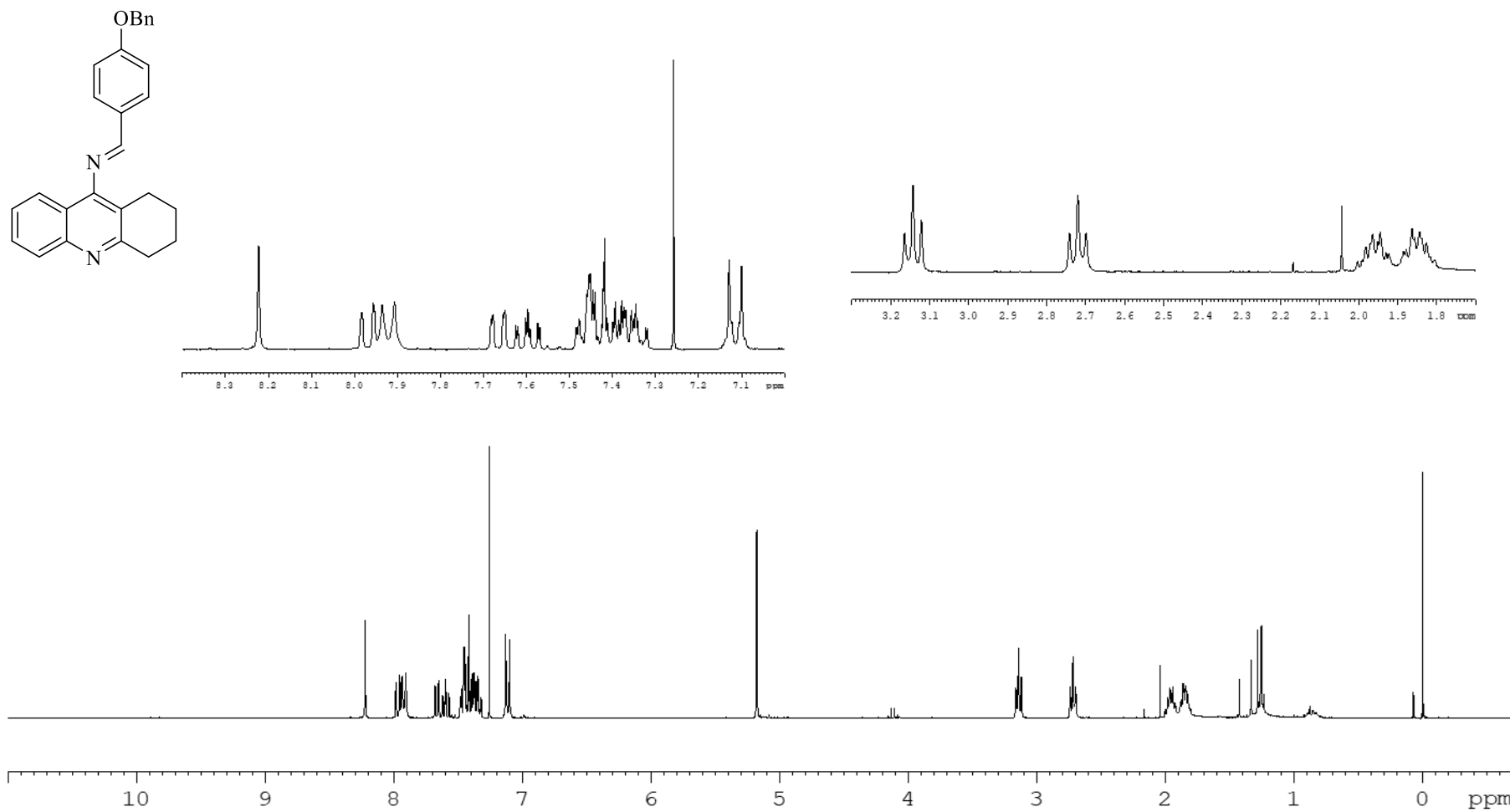


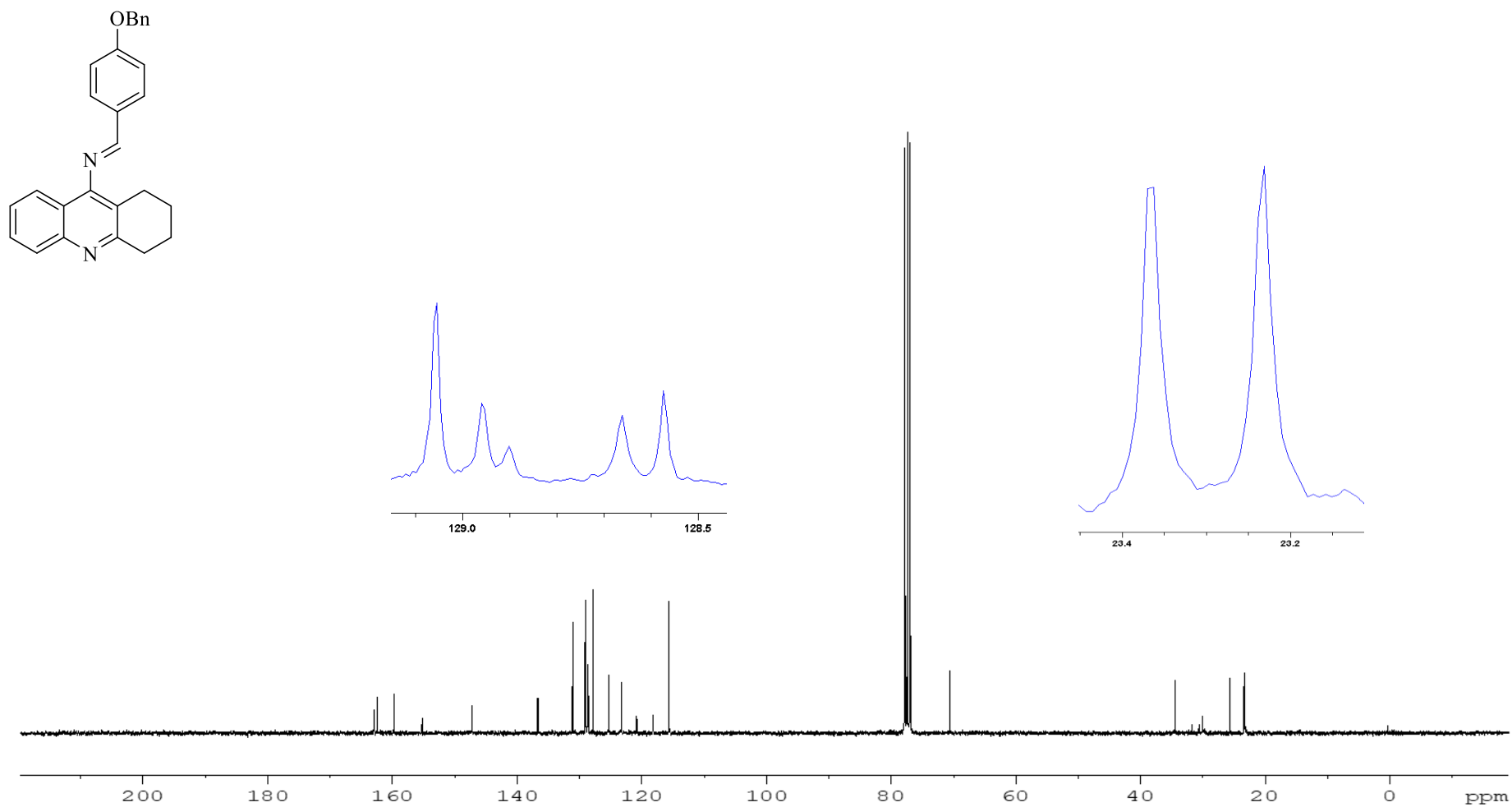
Compuesto 4 ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) de 4

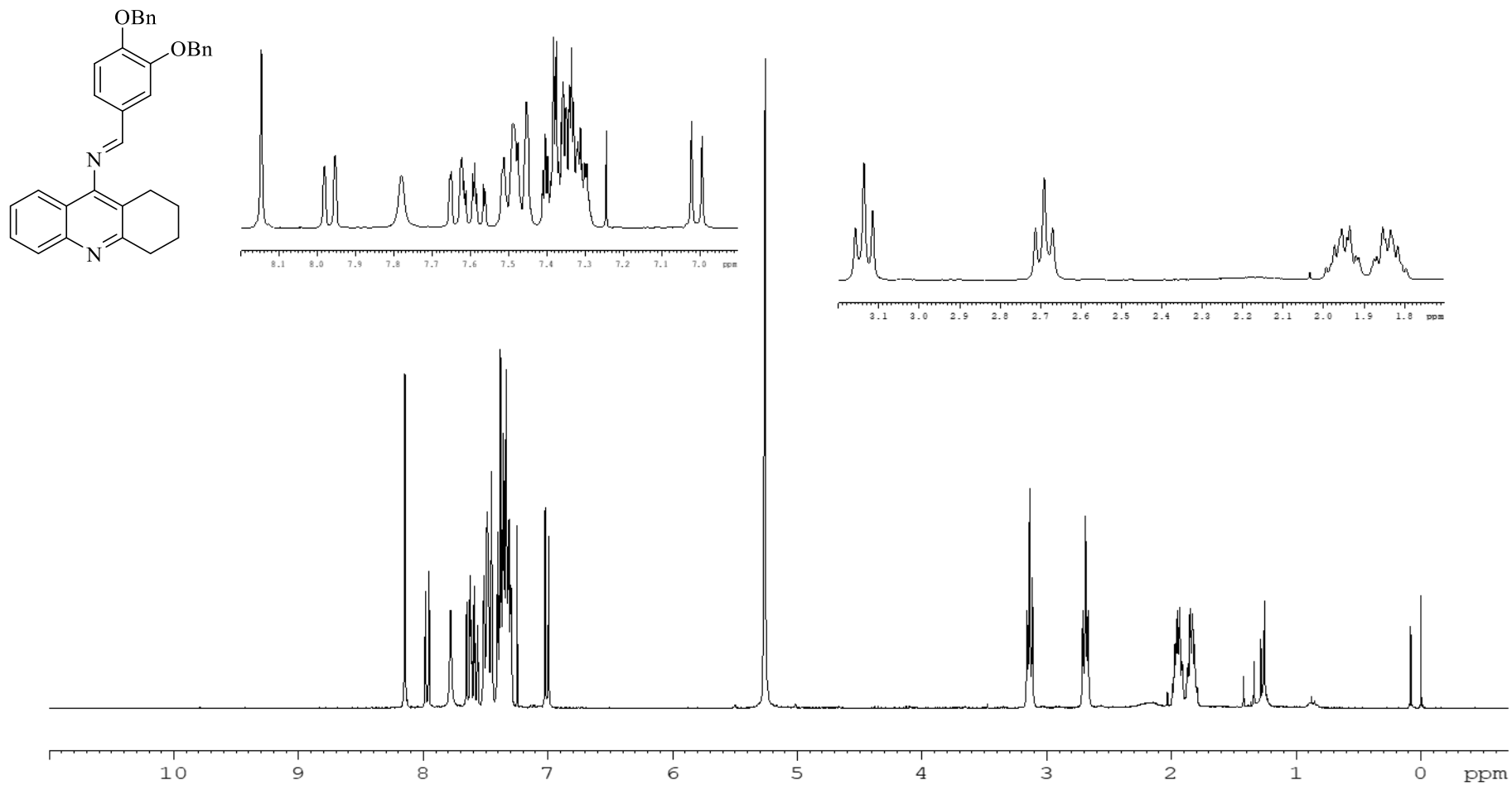
 ^{13}C -RMN (125.8 MHz, CD_3OD) de 4

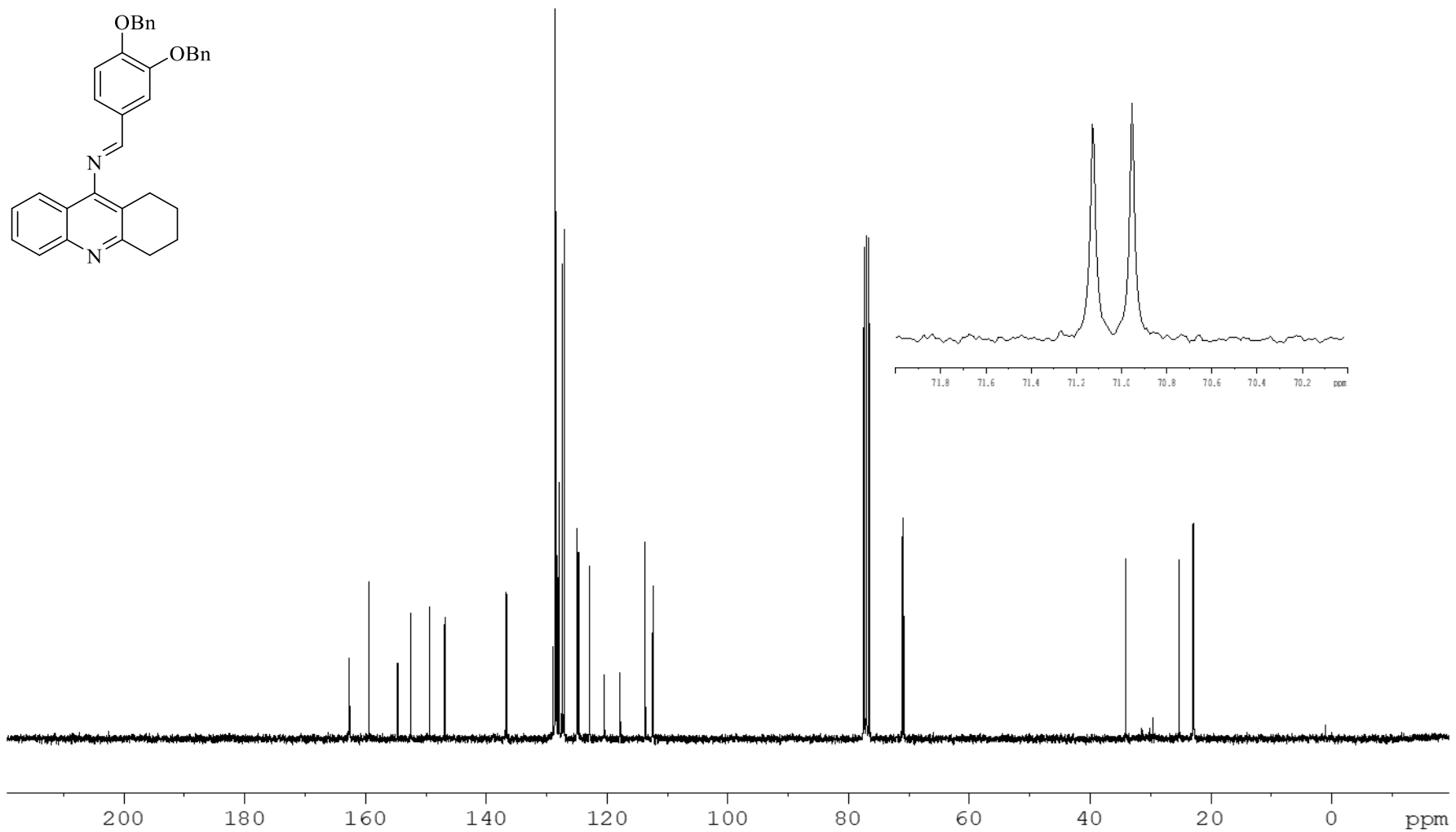
Compuesto 5¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) de 5

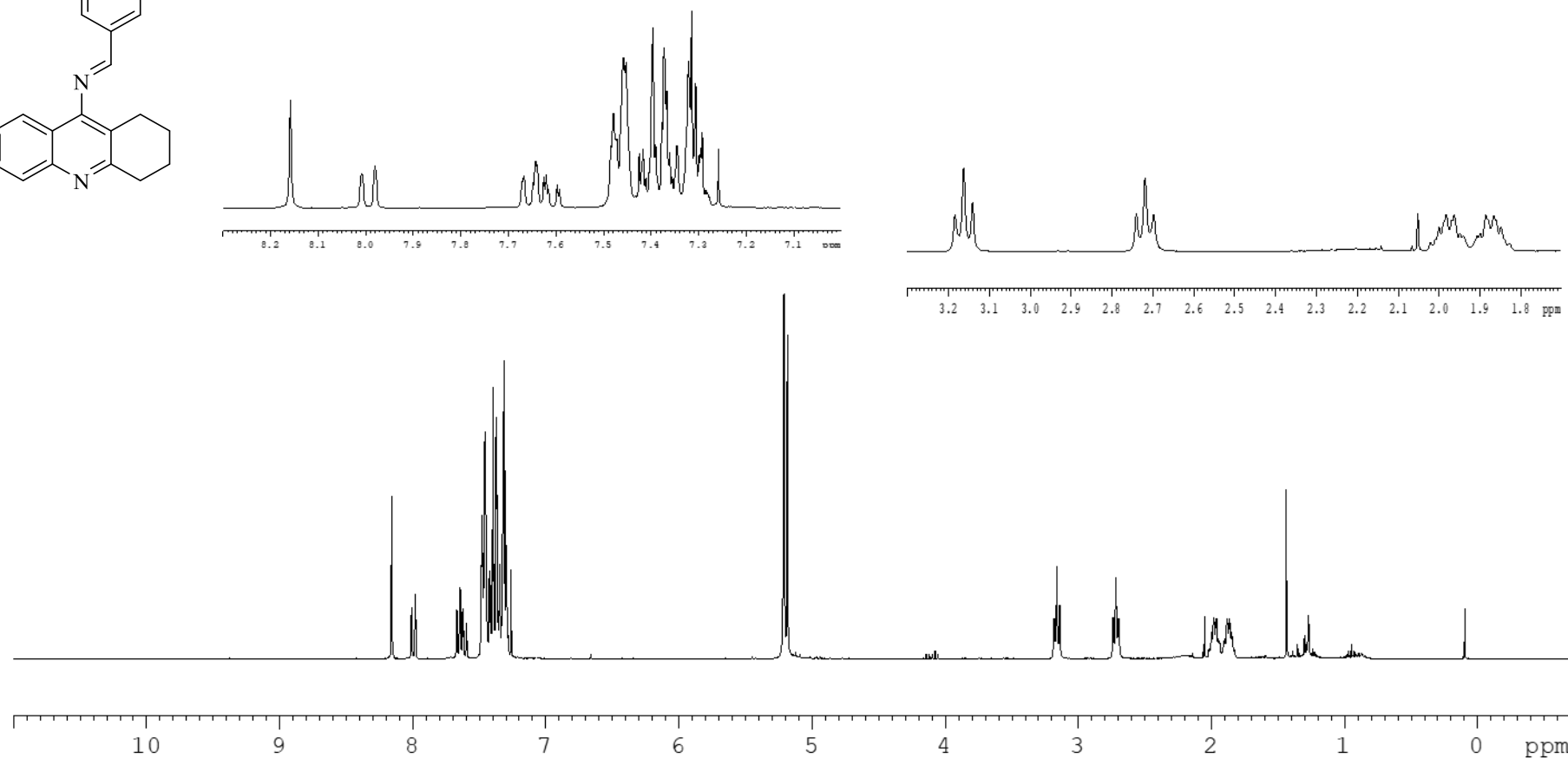
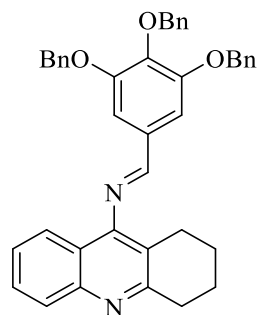
 ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CD_3OD) de 5

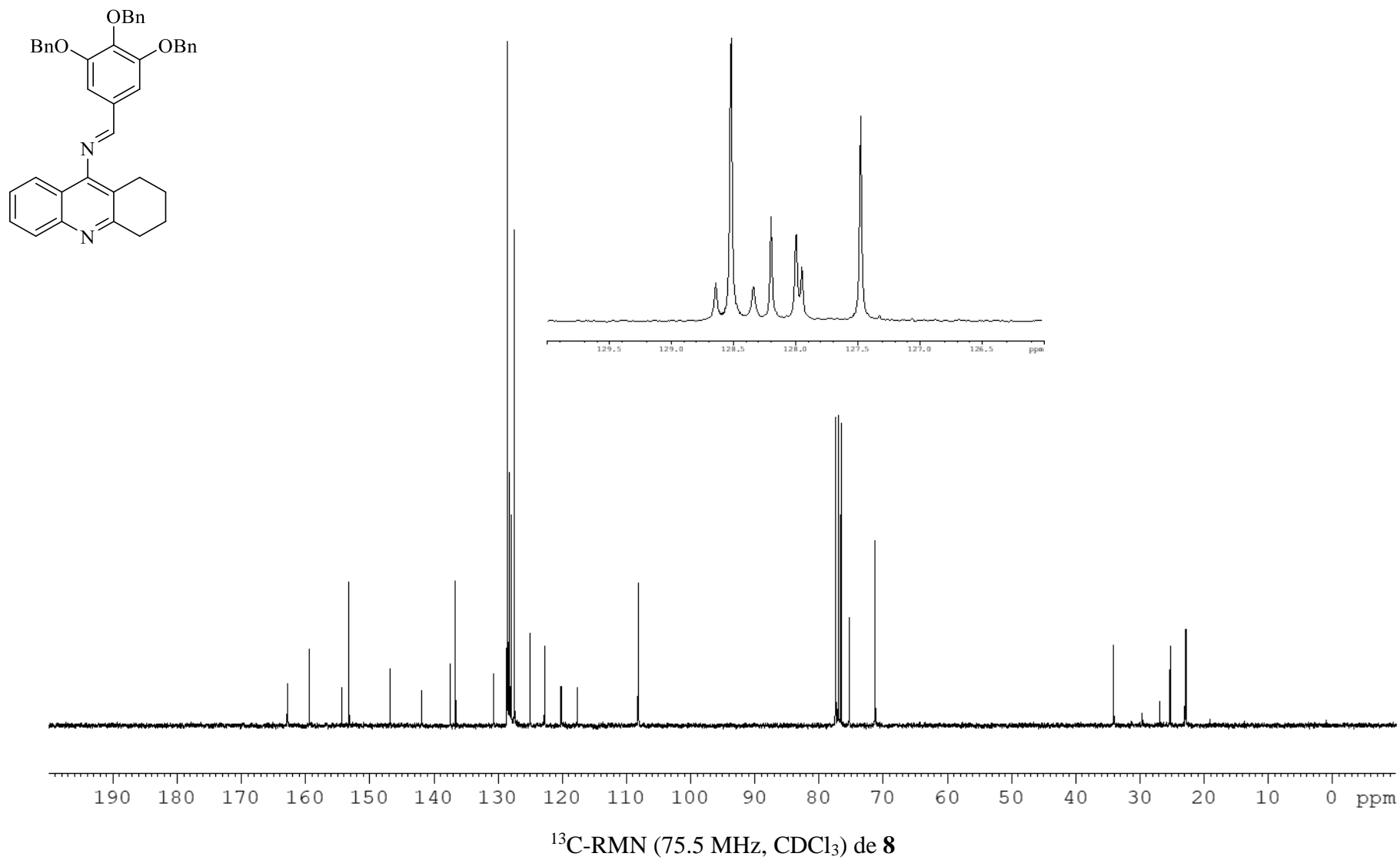
Compuesto 6 $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) de **6**

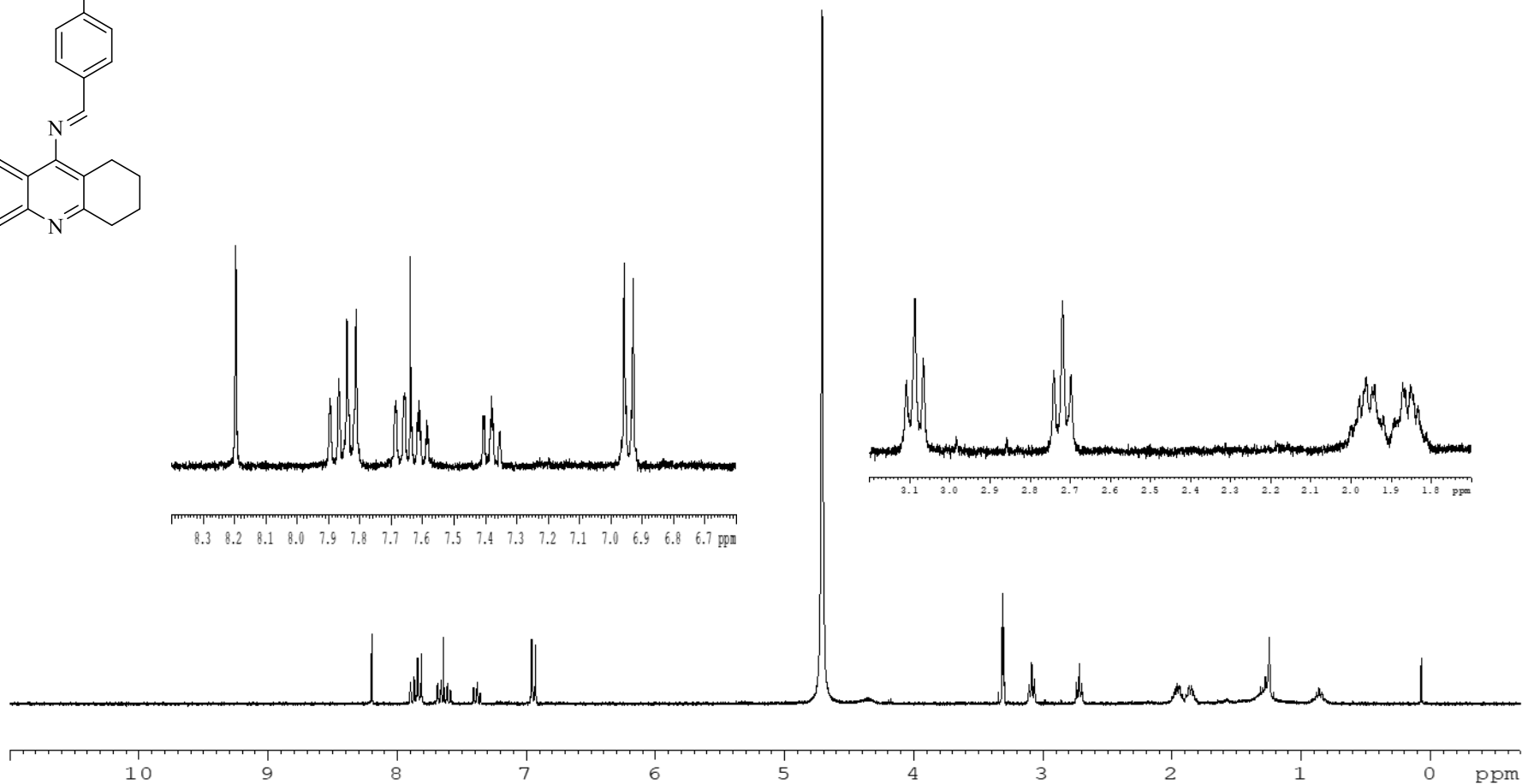
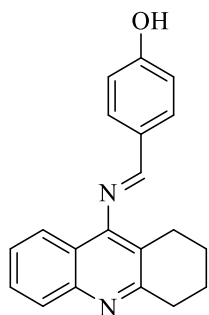


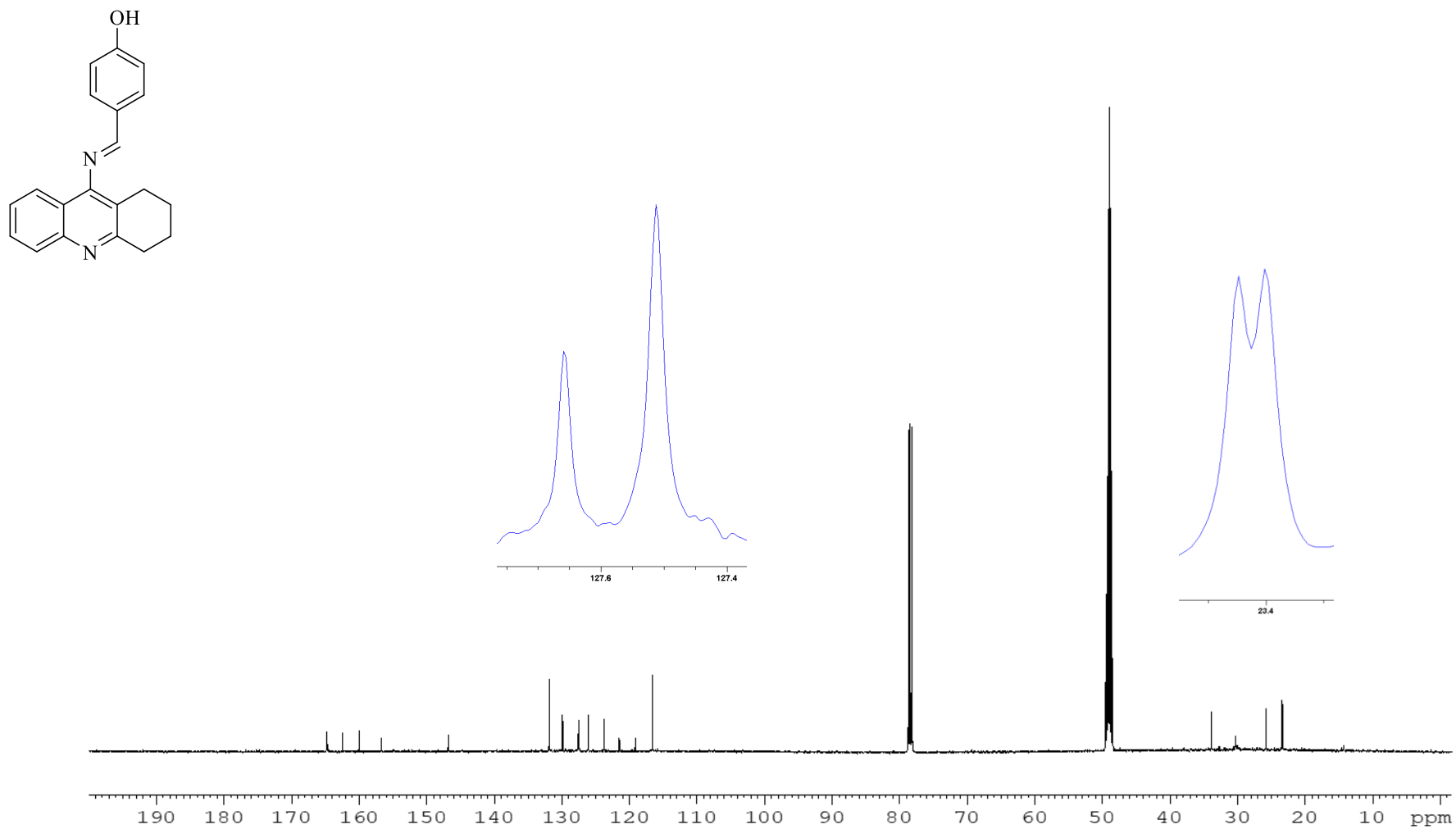
Compuesto 7 ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de 7

 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de **7**

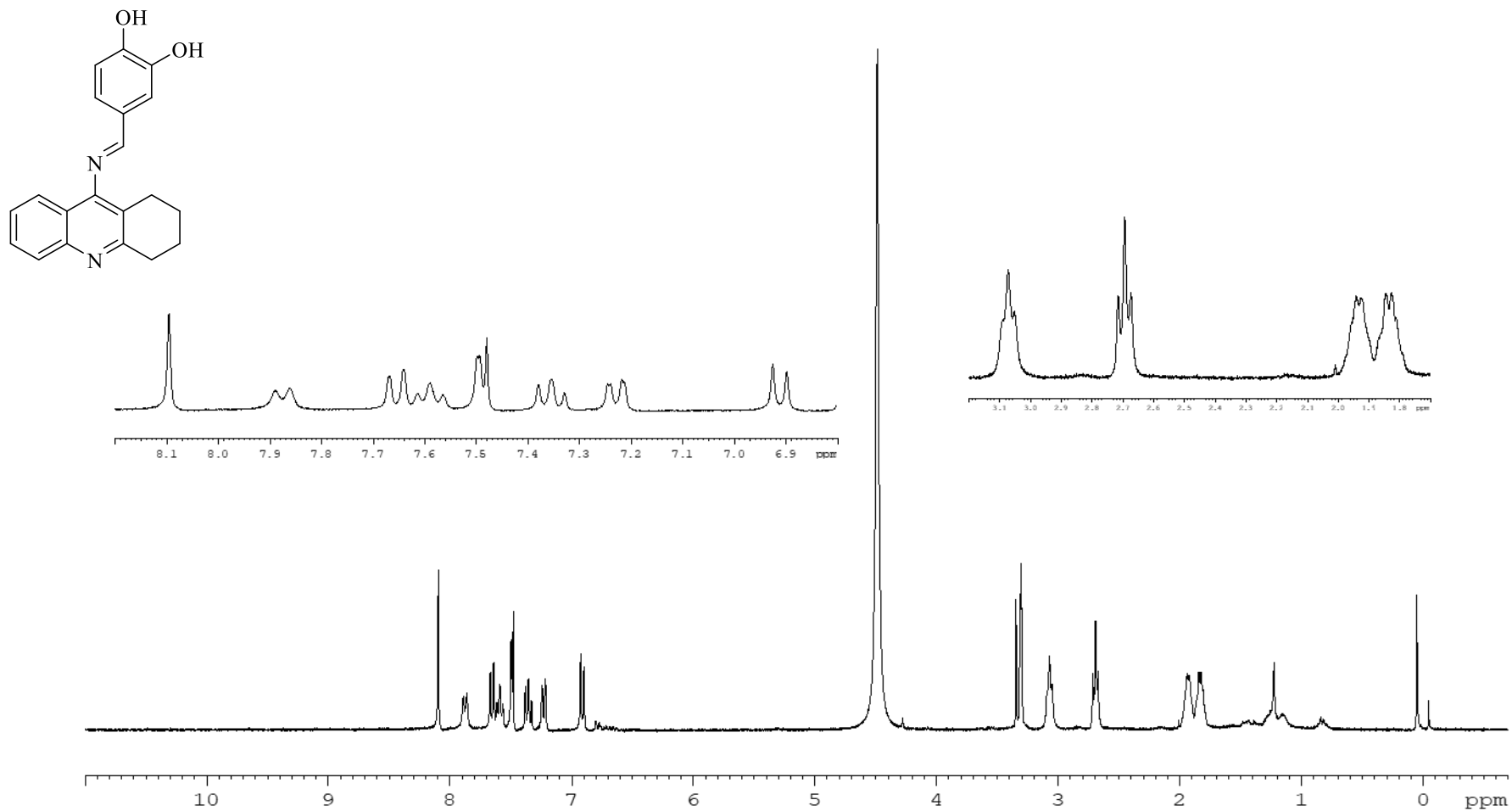
Compuesto 8¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) de **8**



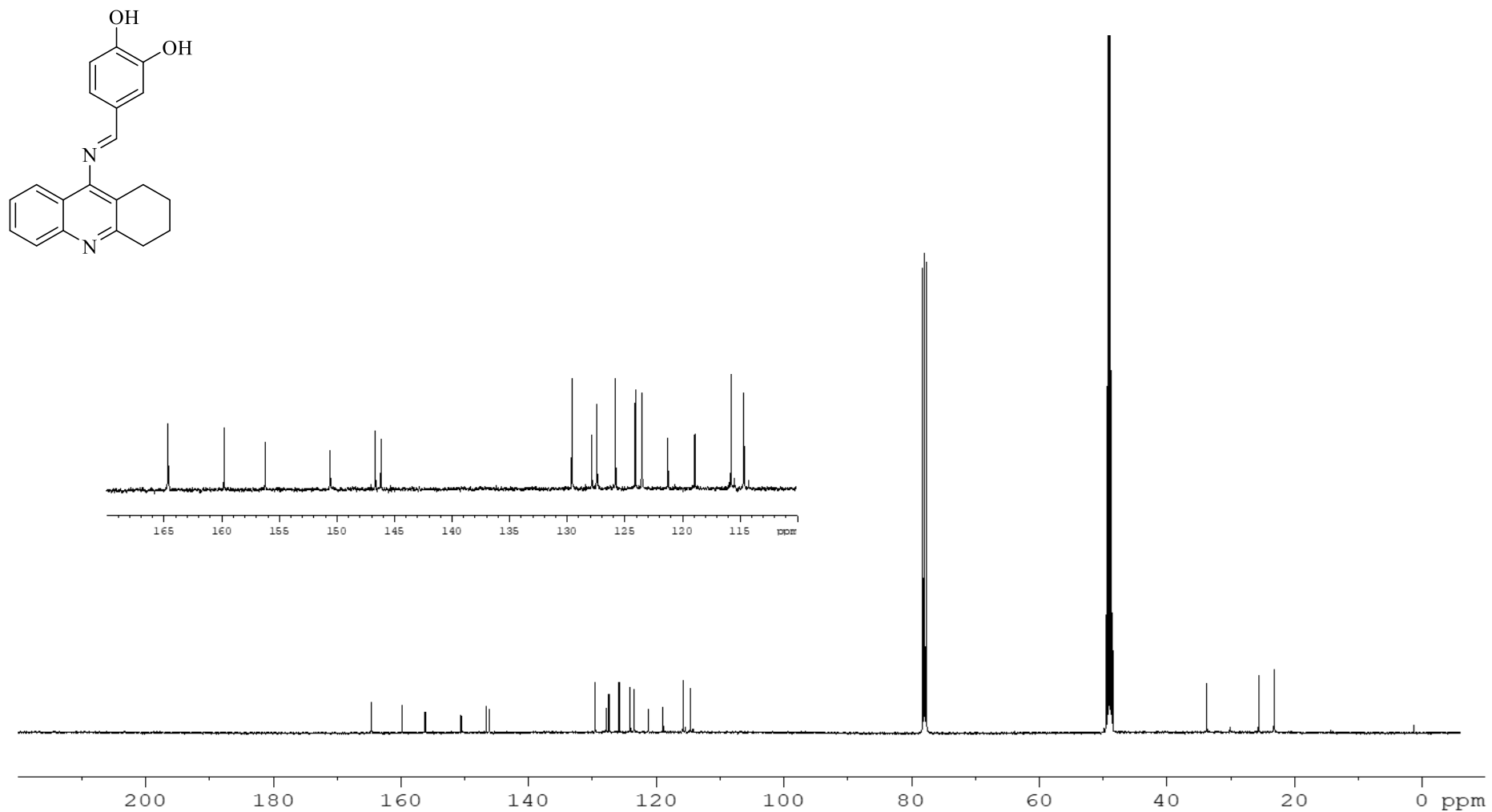
Compuesto 9¹H-RMN (300 MHz, mezcla CDCl₃-CD₃OD) de **9**

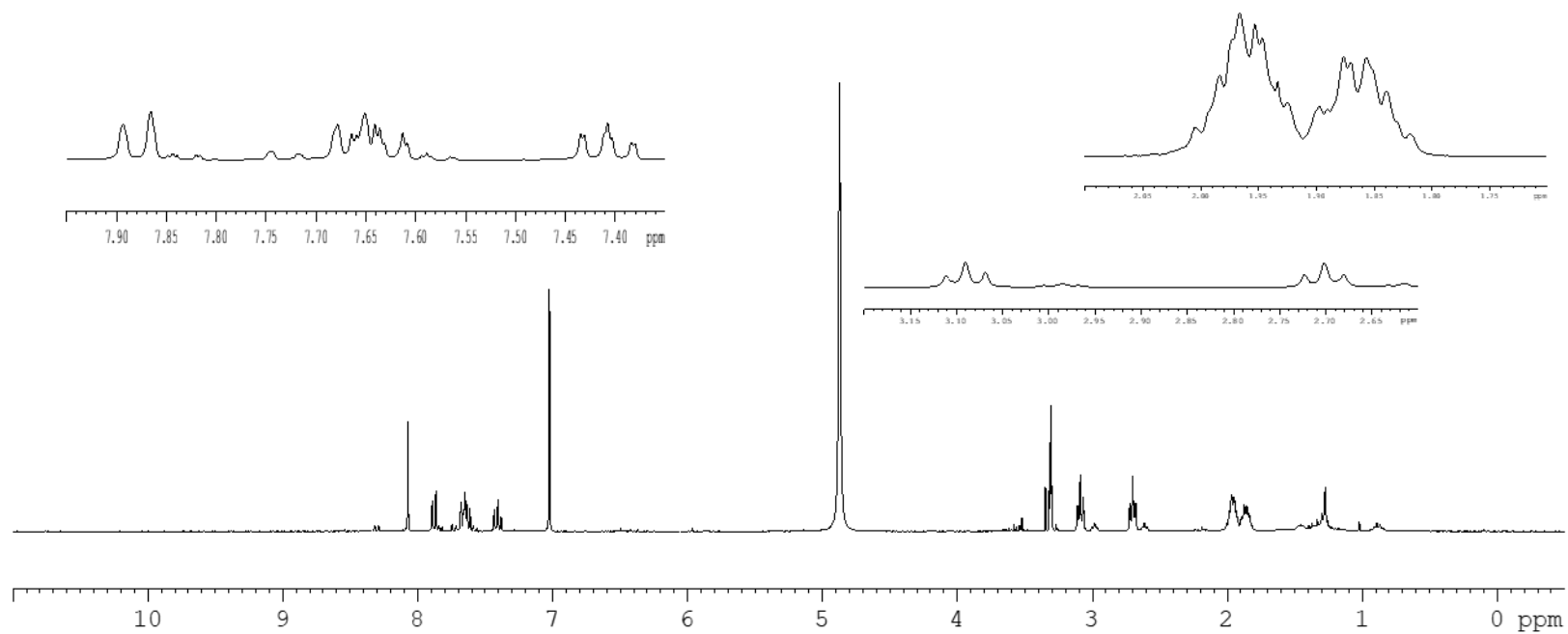
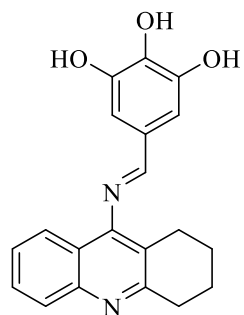


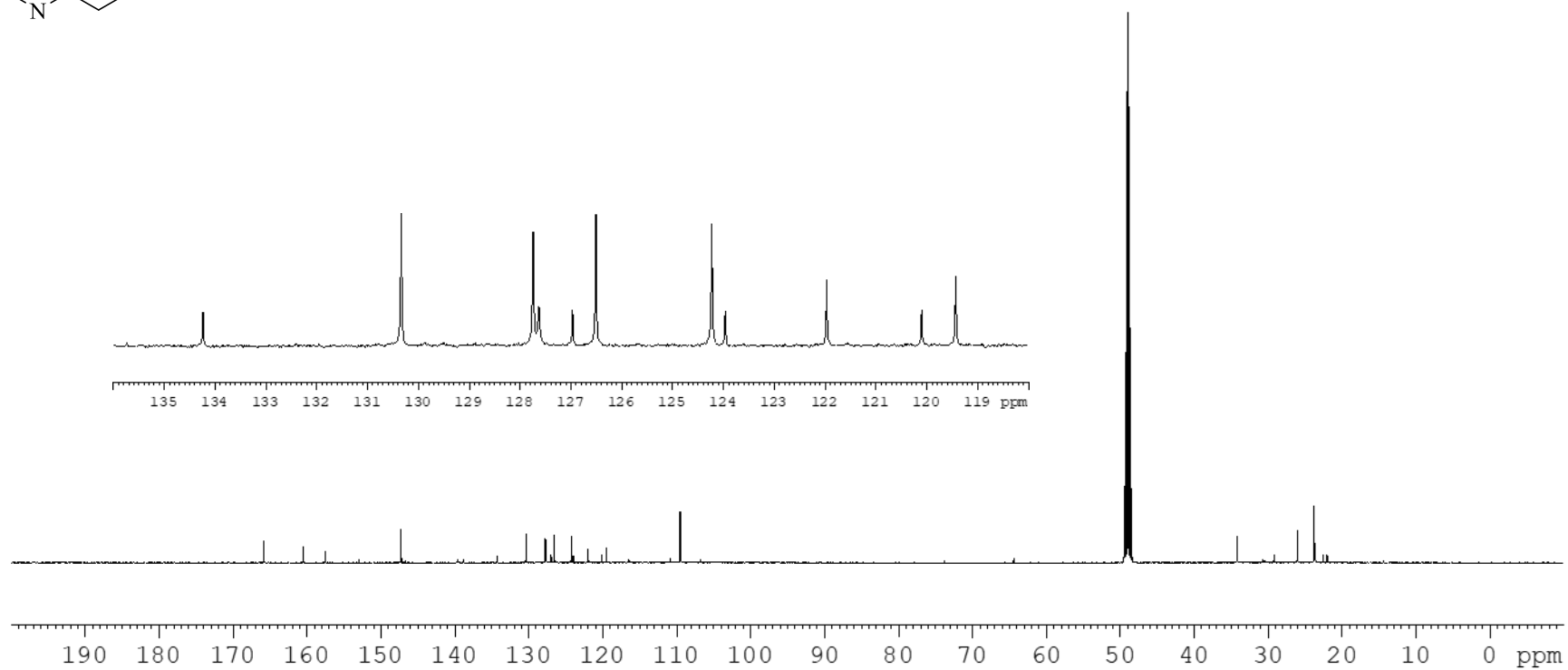
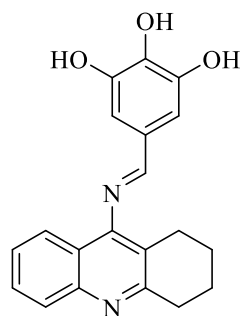
^{13}C -RMN (125.8 MHz, mezcla CDCl_3 - CD_3OD) de **9**

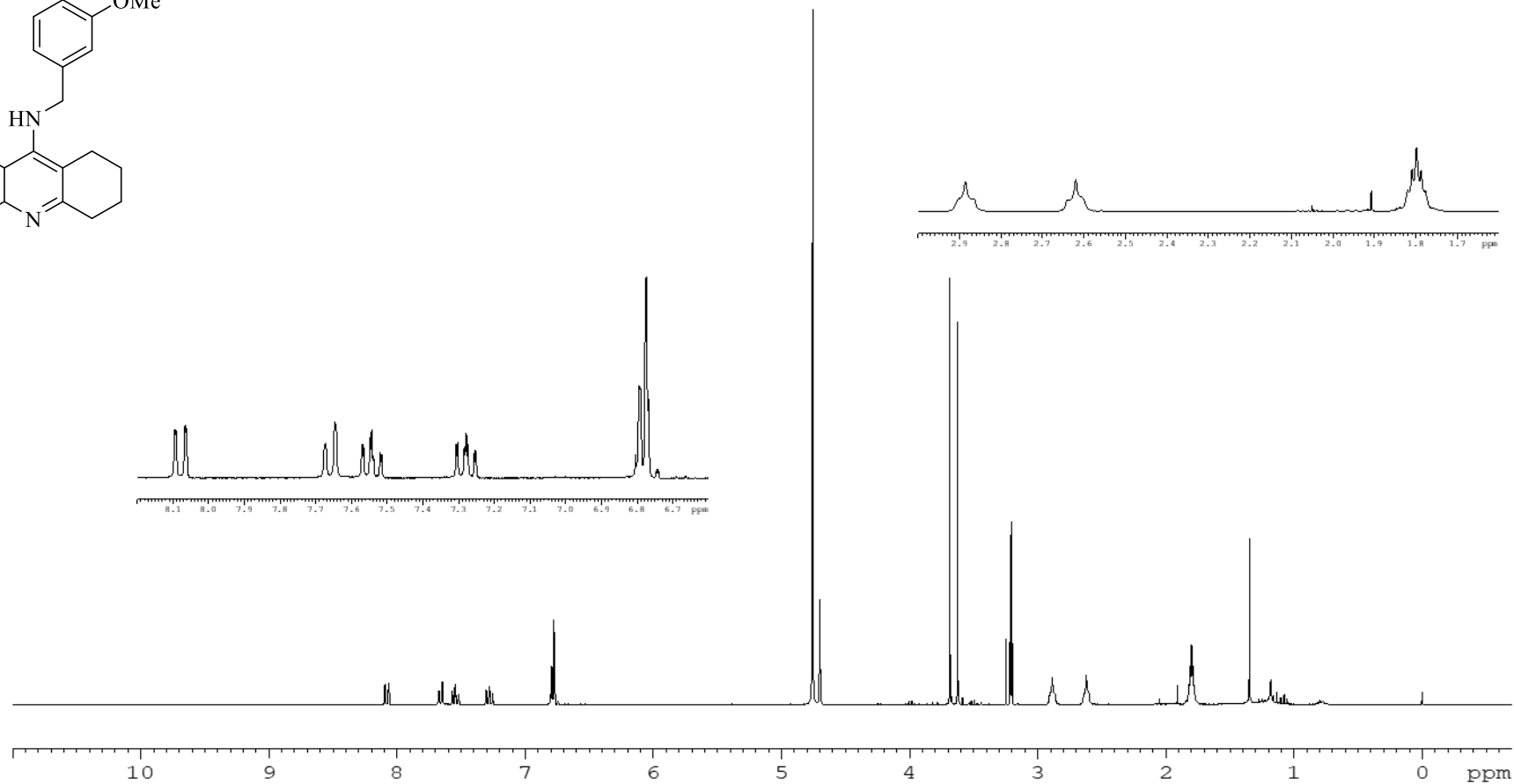
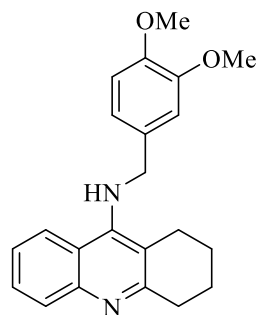
Compuesto 10

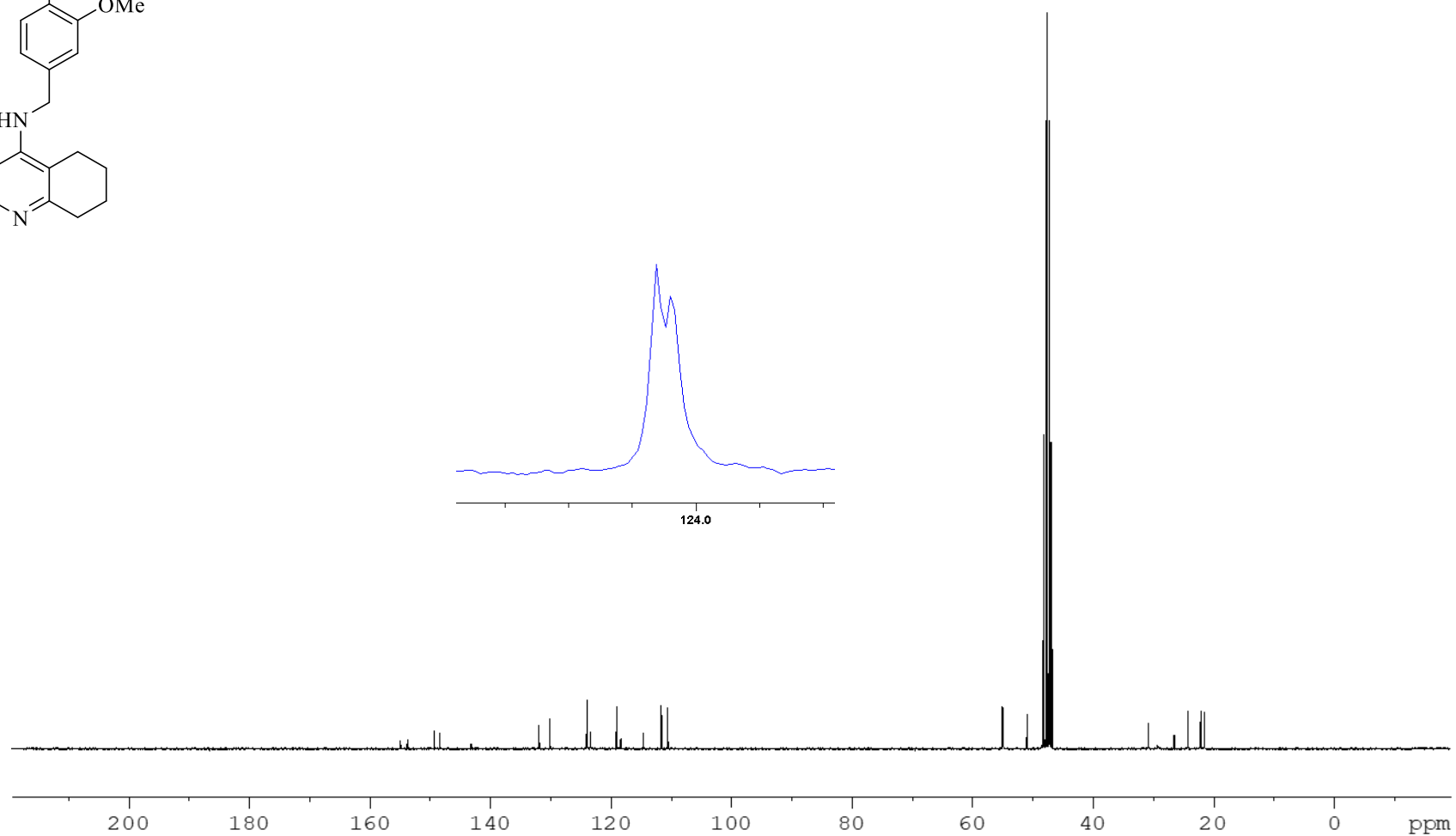
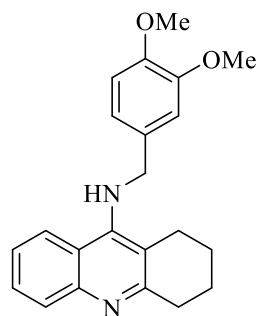
¹H-RMN (300 MHz, mezcla CDCl₃-CD₃OD) de **10**

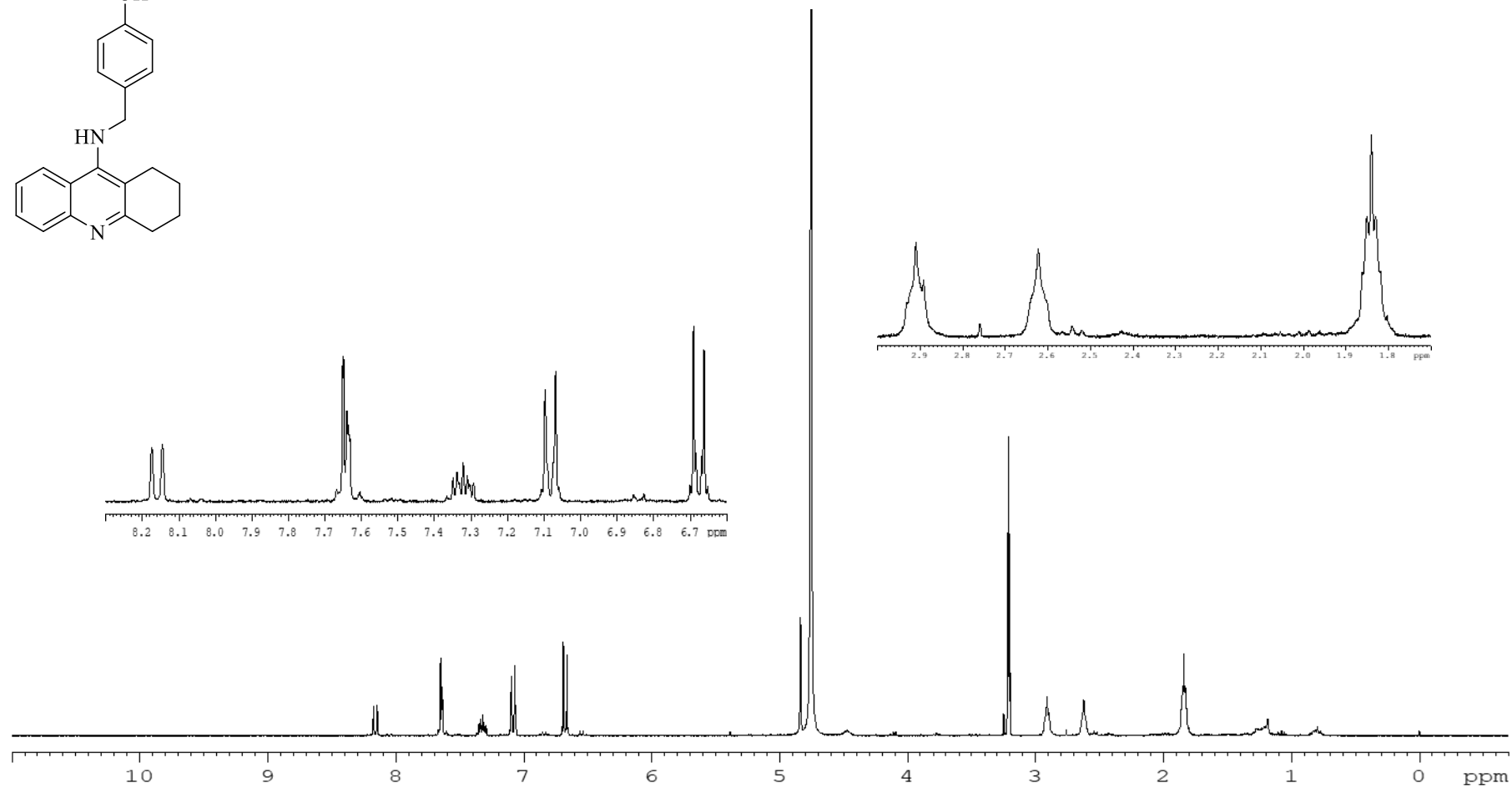
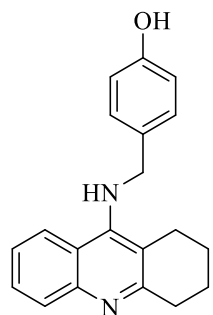
 ^{13}C -RMN (125.8 MHz, mezcla CDCl_3 - CD_3OD) de **10**

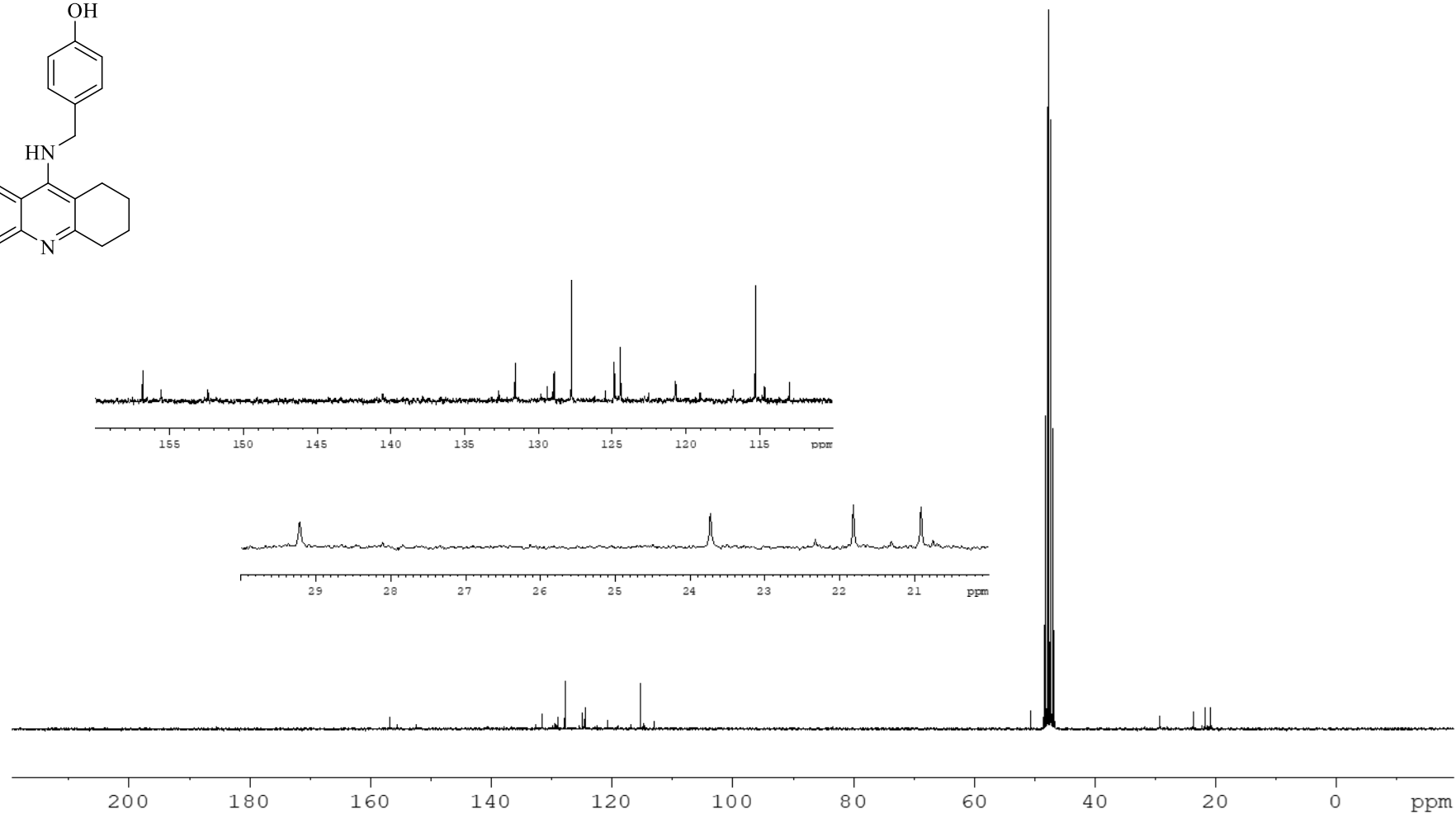
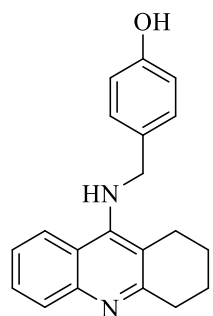
Compuesto 11 $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) de **11**

 ^{13}C -RMN (125.8 MHz, CD_3OD) de **11**

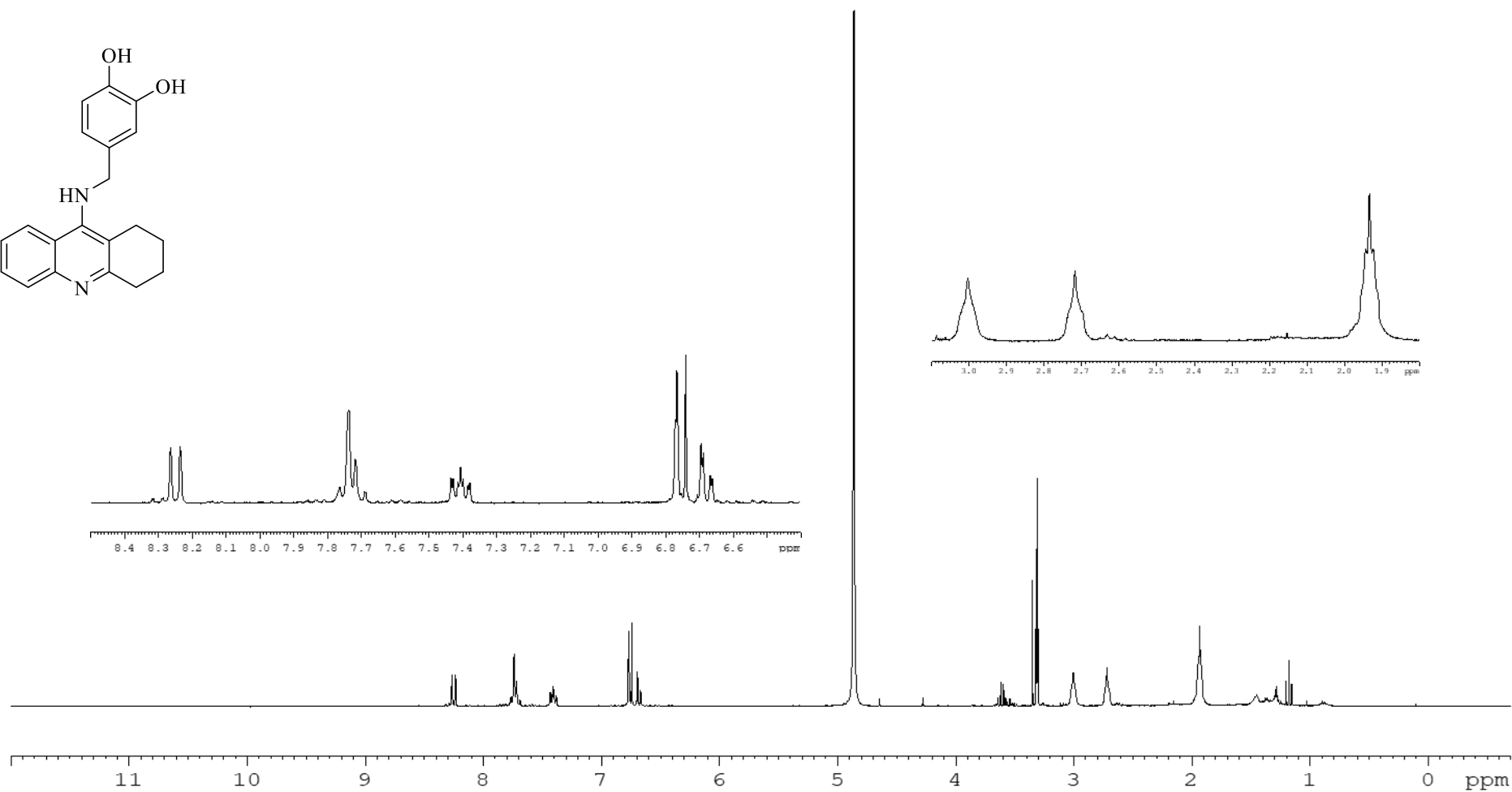
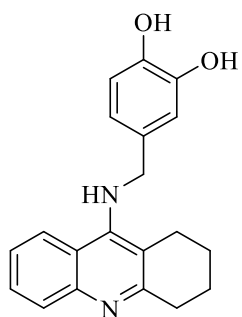
Compuesto 12 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) de **12**

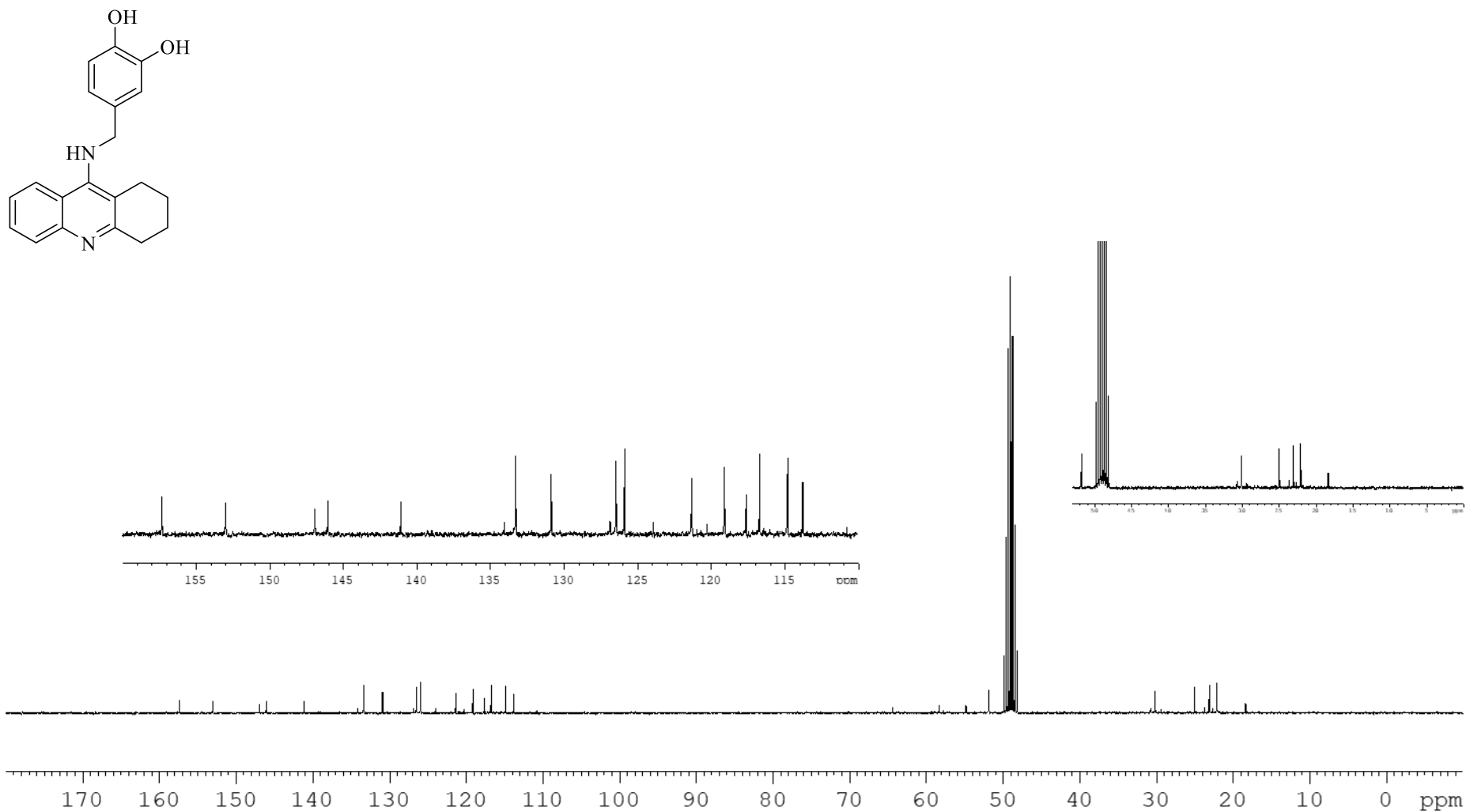


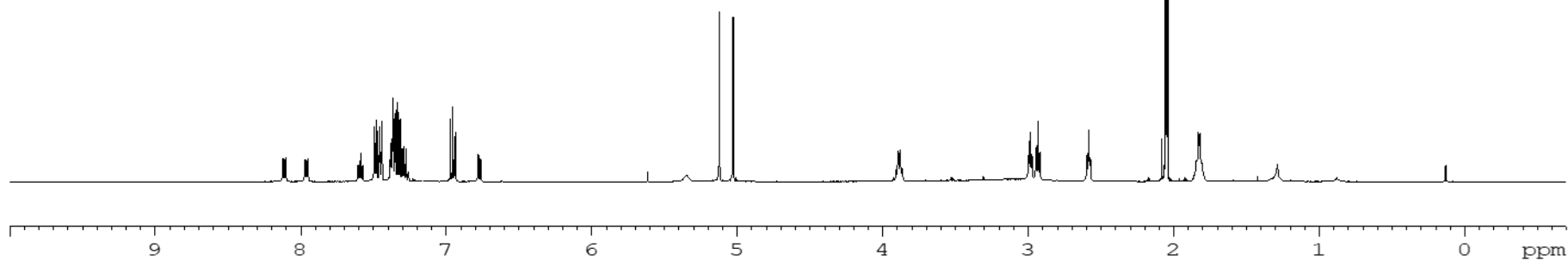
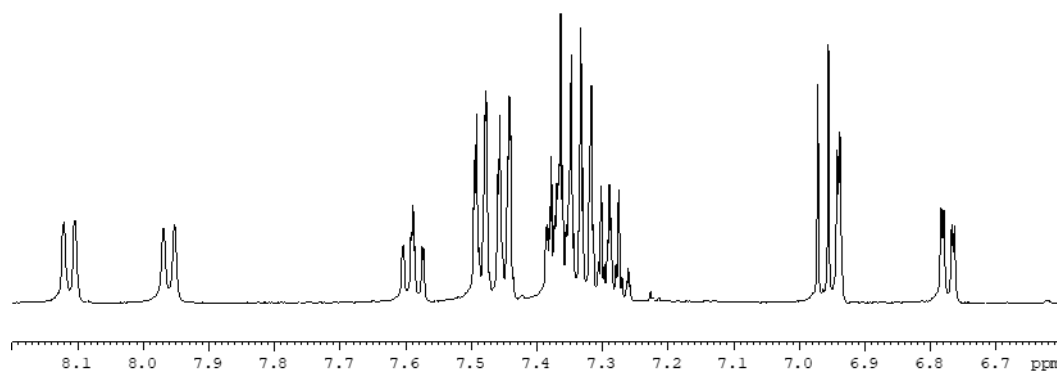
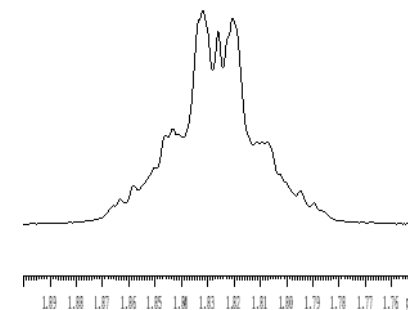
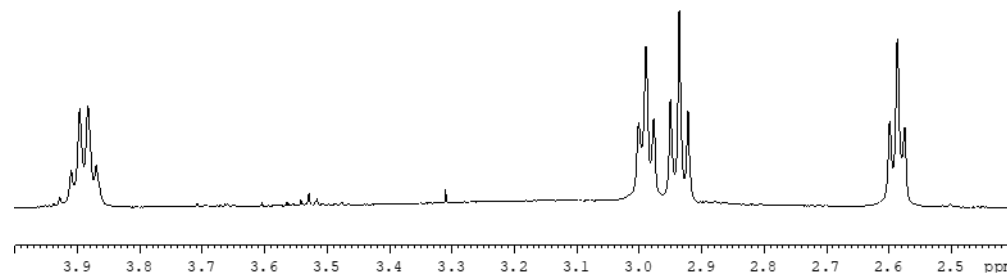
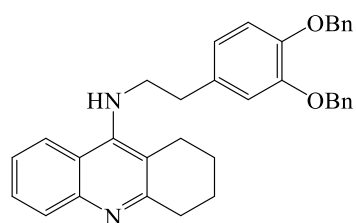
Compuesto 13 ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) de **13**

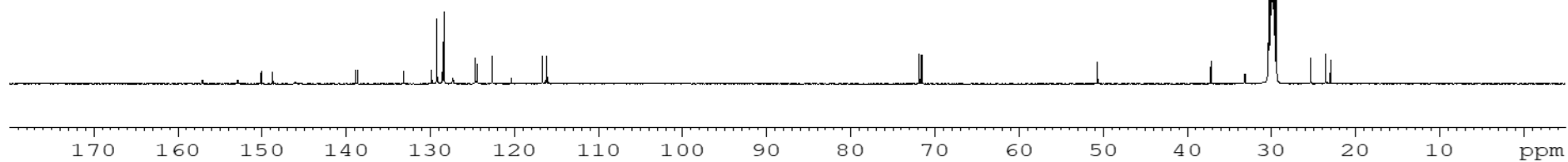
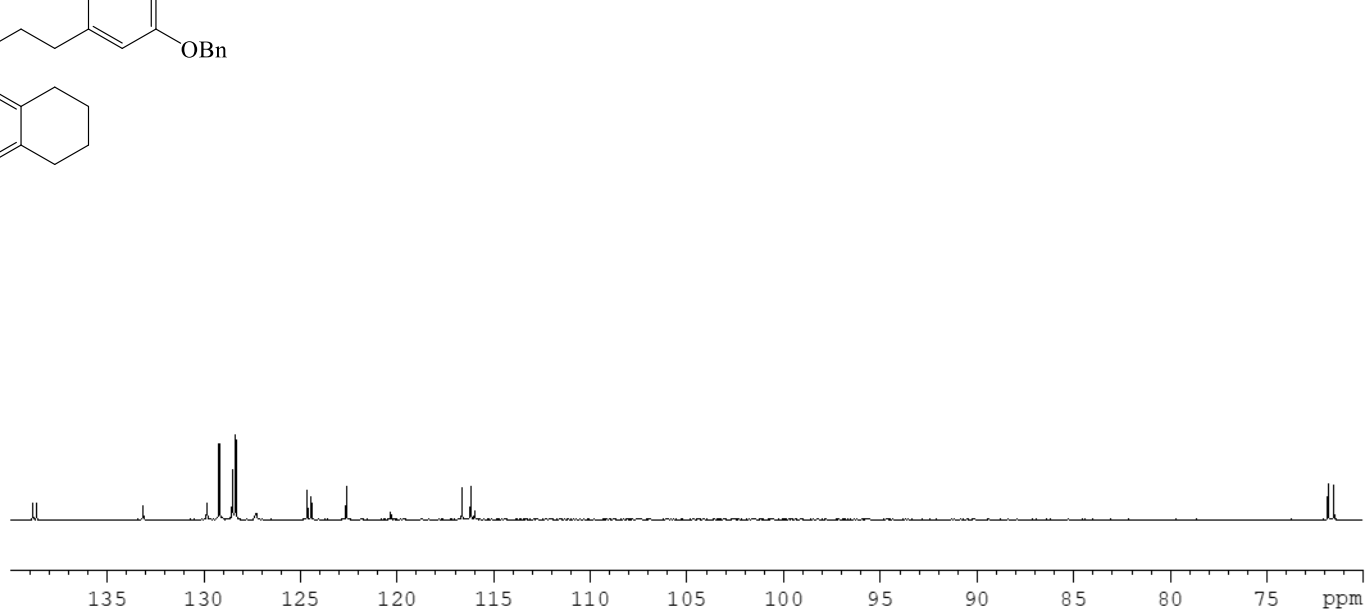
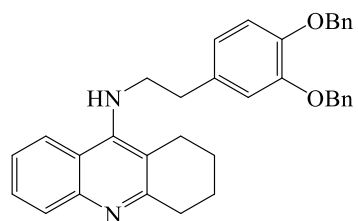


^{13}C -RMN (75.5 MHz, CD_3OD) de **13**

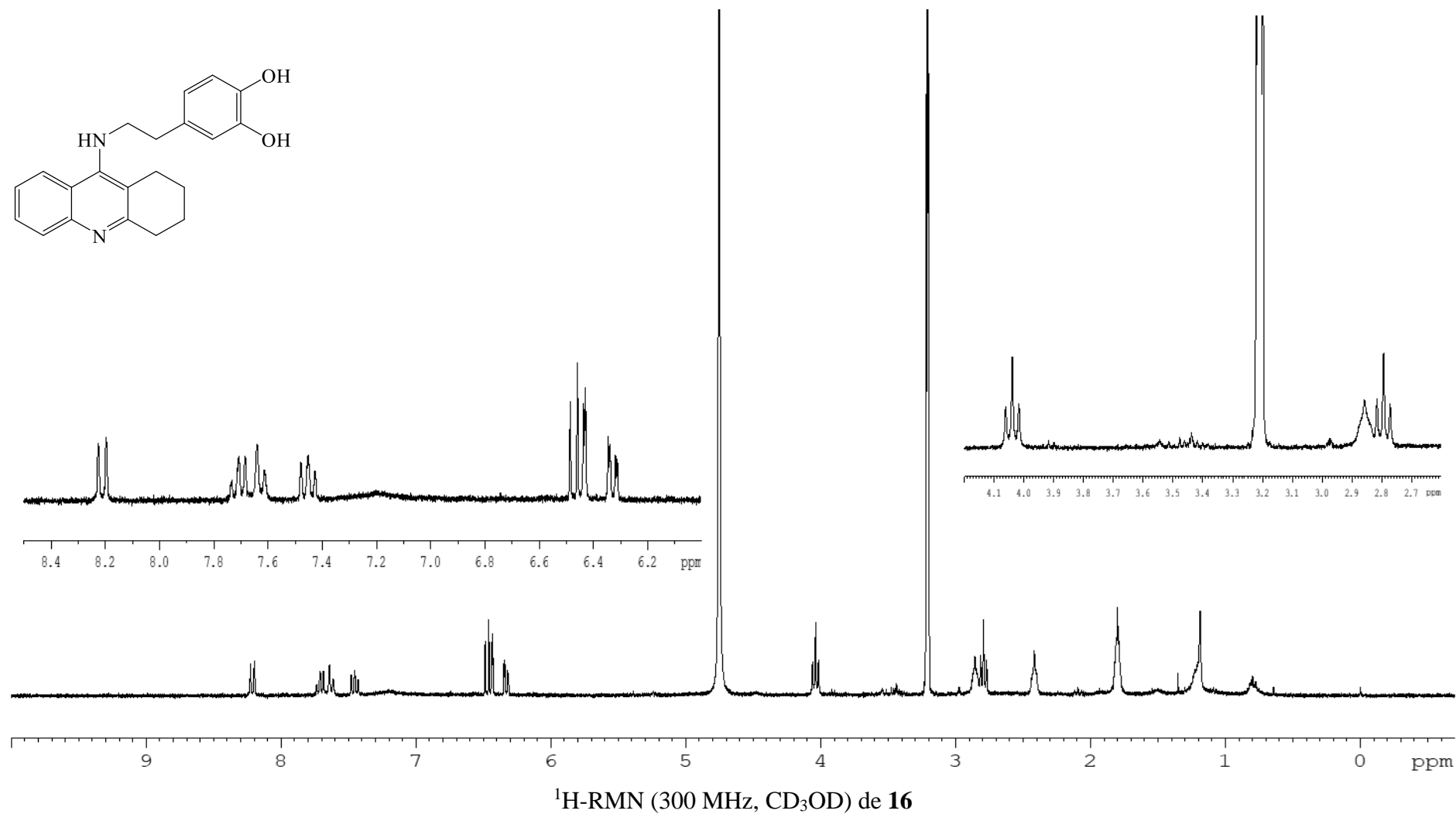
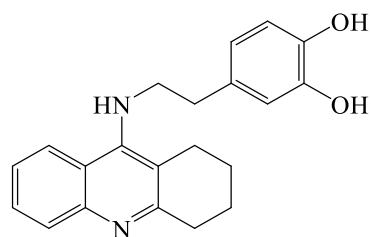
Compuesto 14 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) de 14

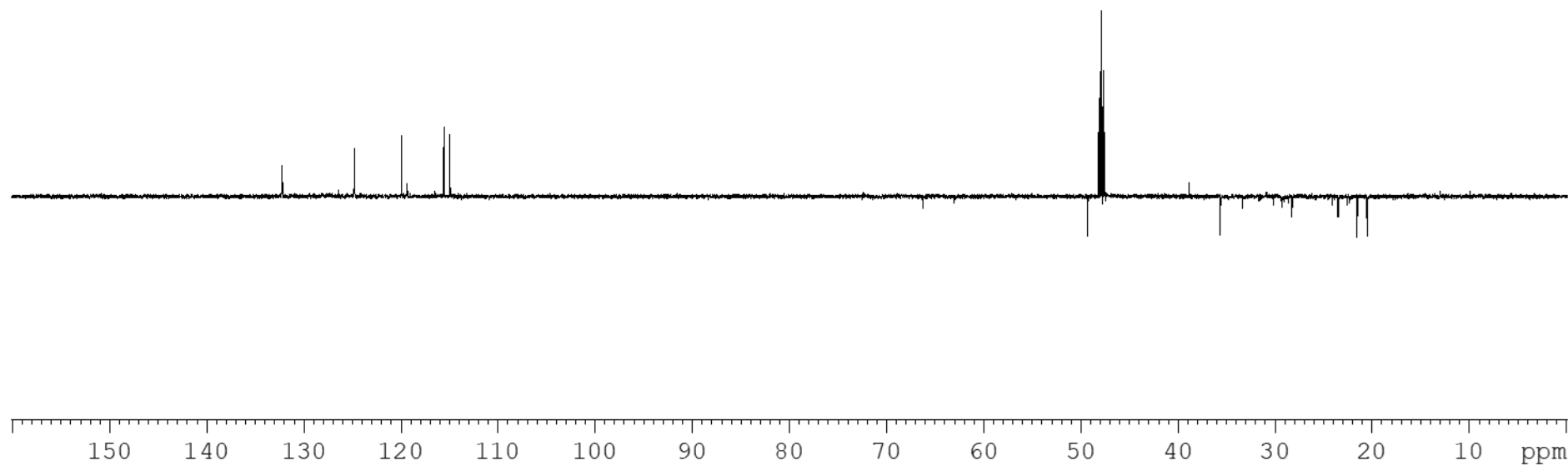
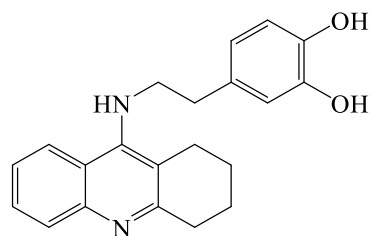
 ^{13}C -RMN (125.8 MHz, mezcla CDCl_3 - CD_3OD) de **14**

Compuesto 15 ^1H -RMN (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de **15**

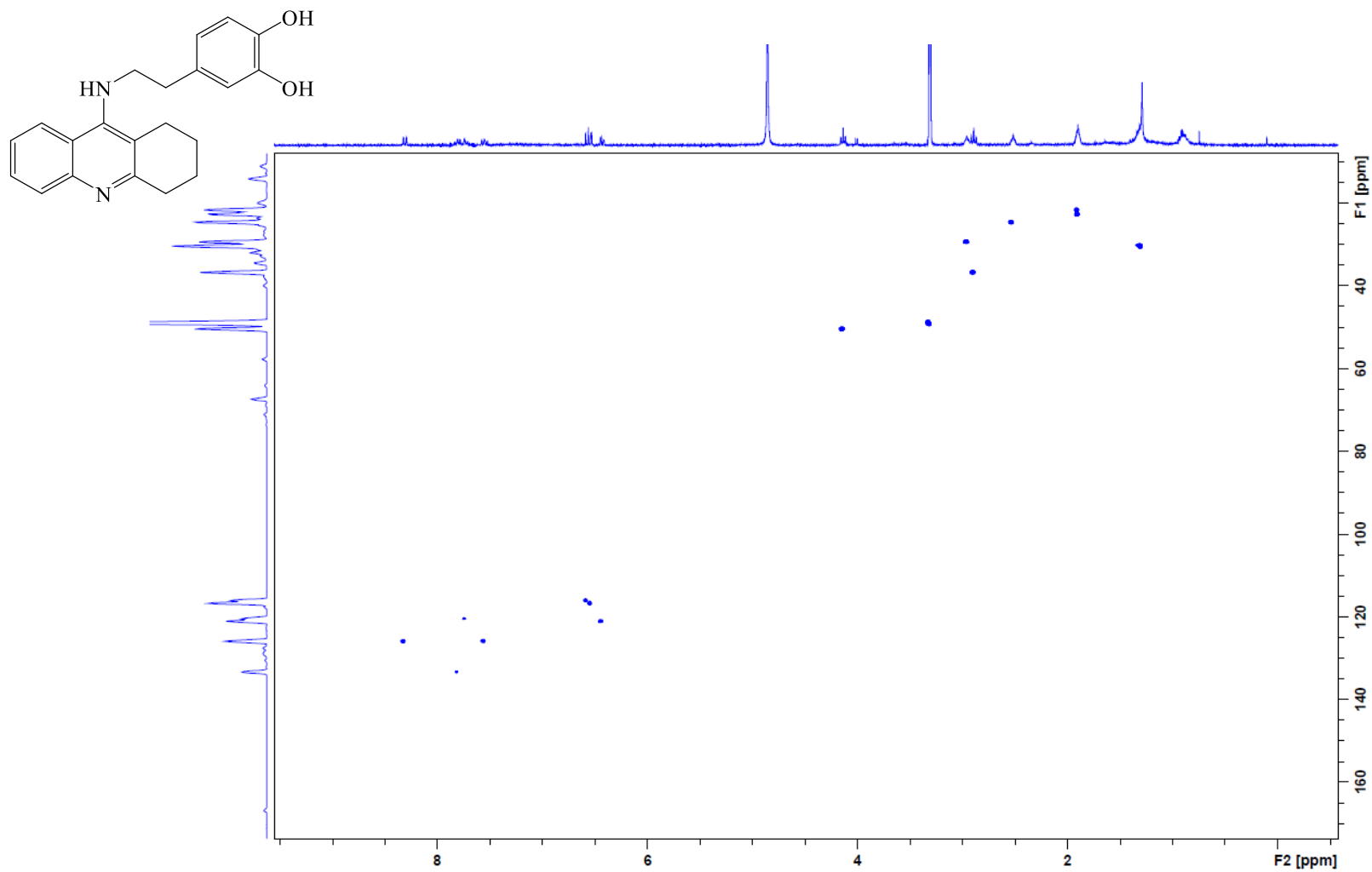


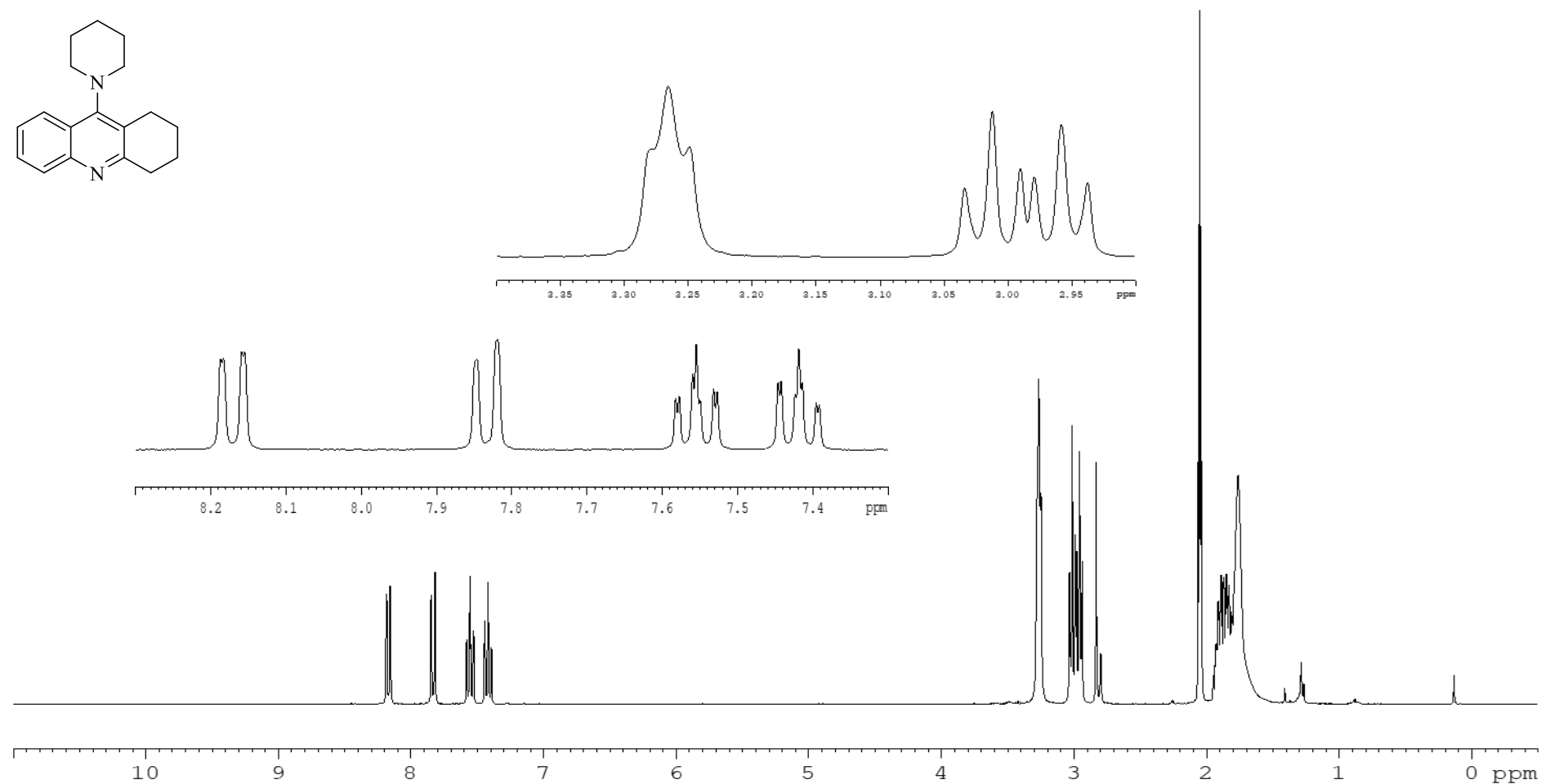
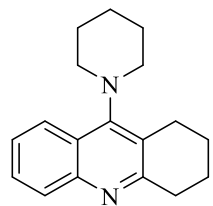
^{13}C -RMN (125.8 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de **15**

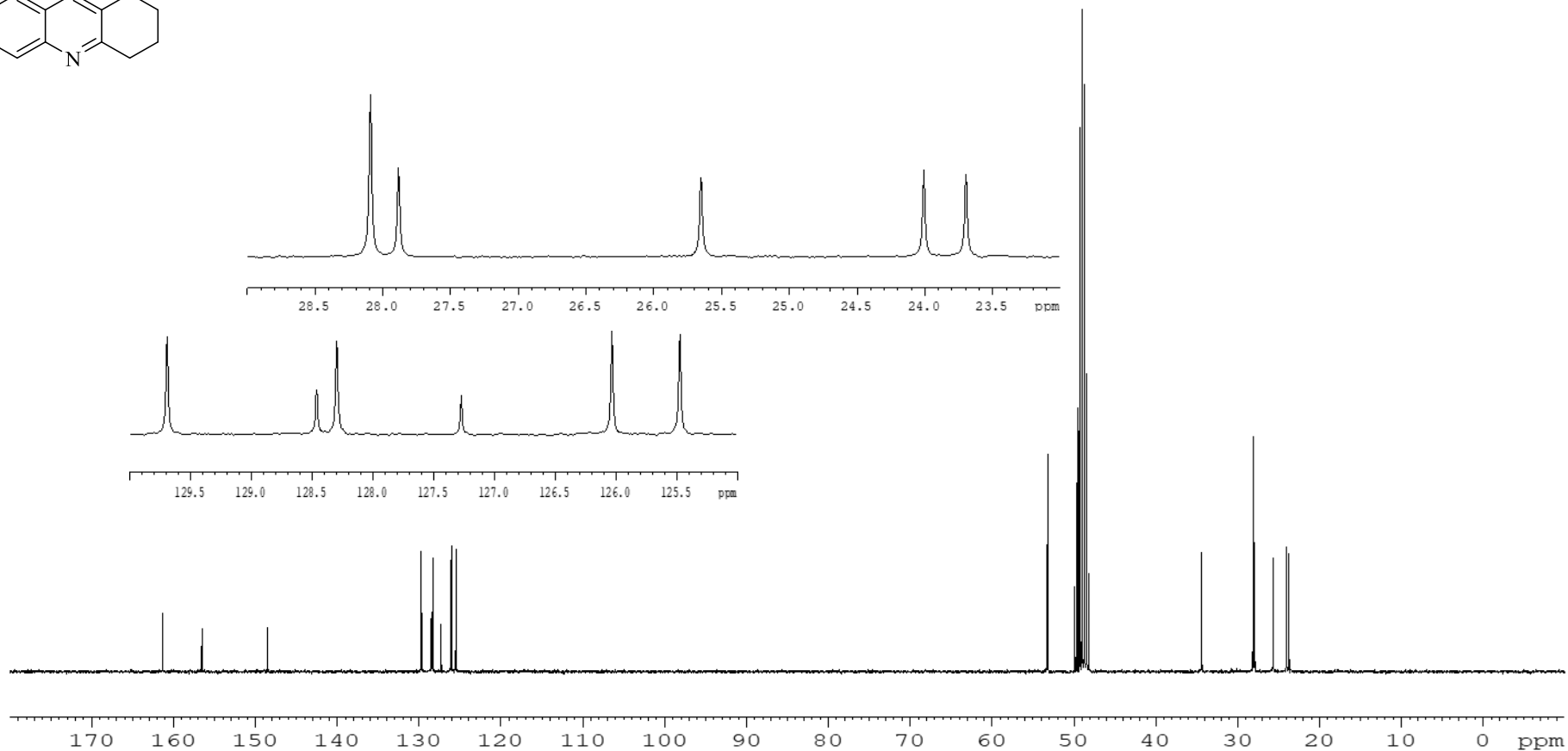
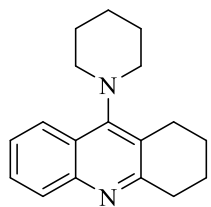
Compuesto 16

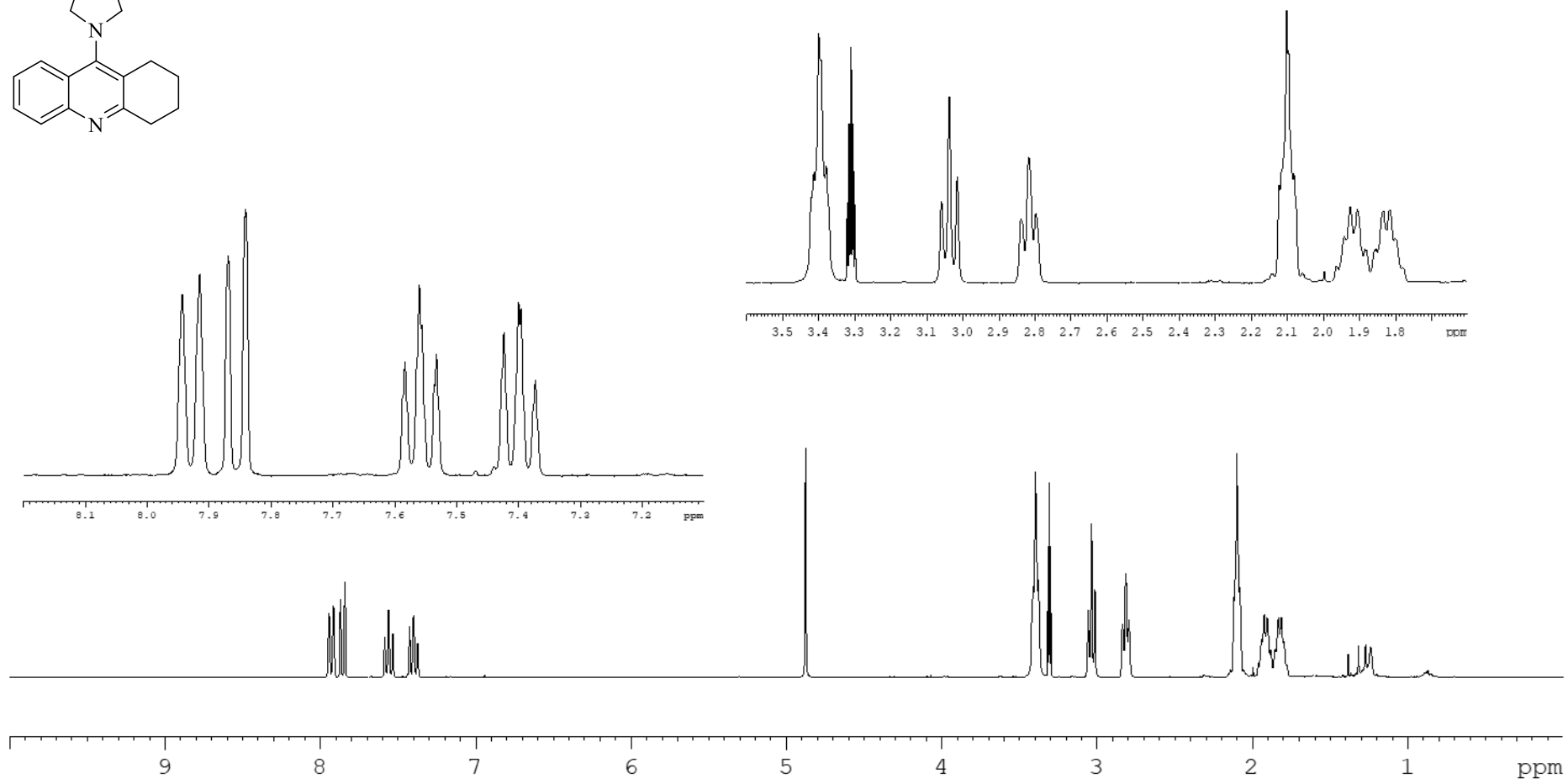
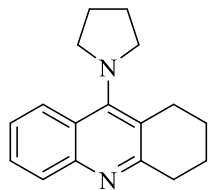


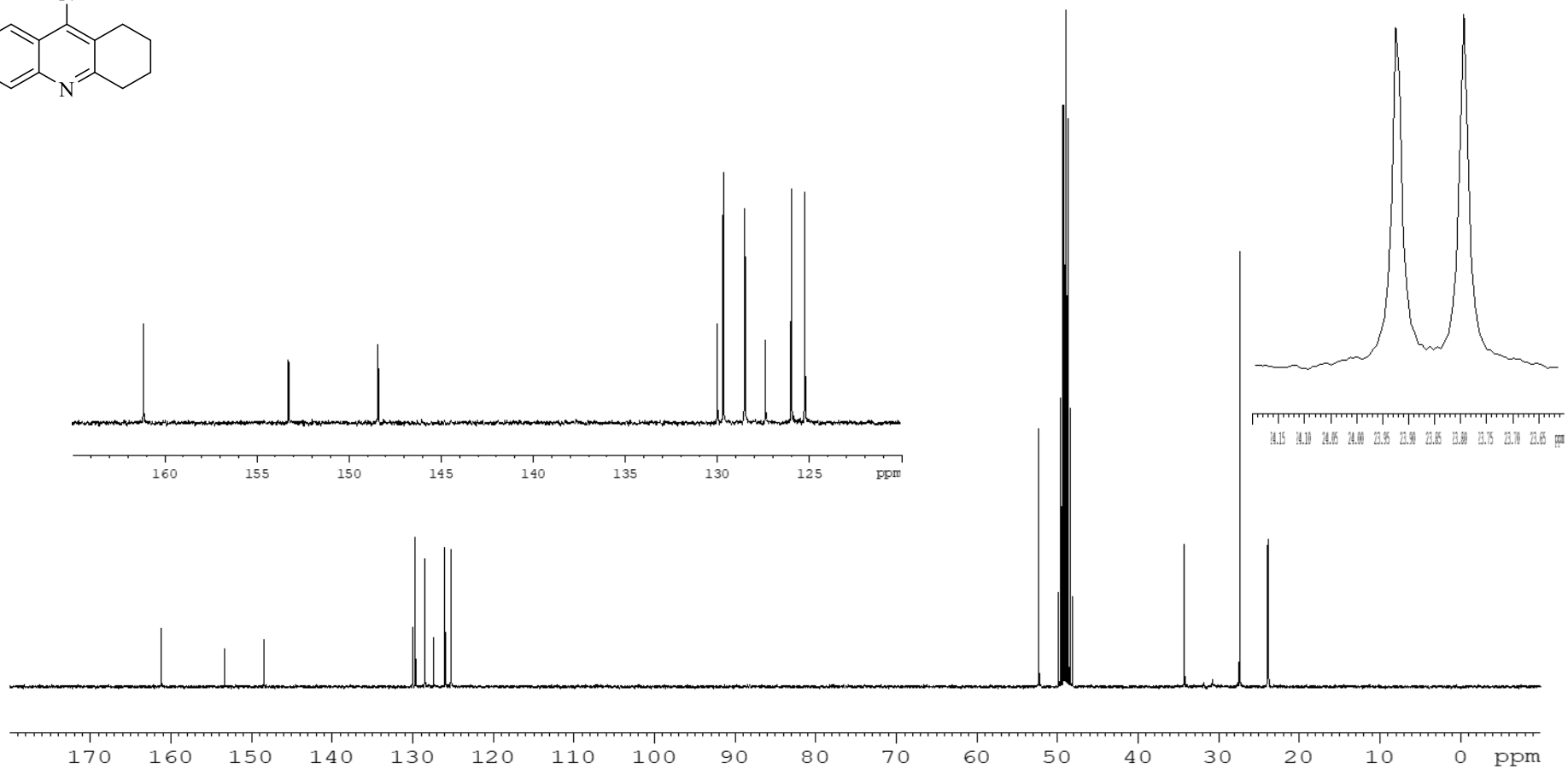
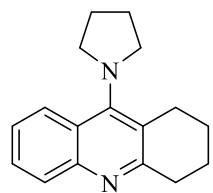
^{13}C -RMN DEPT (125.8 MHz, CD_3OD) de **JRP 16**

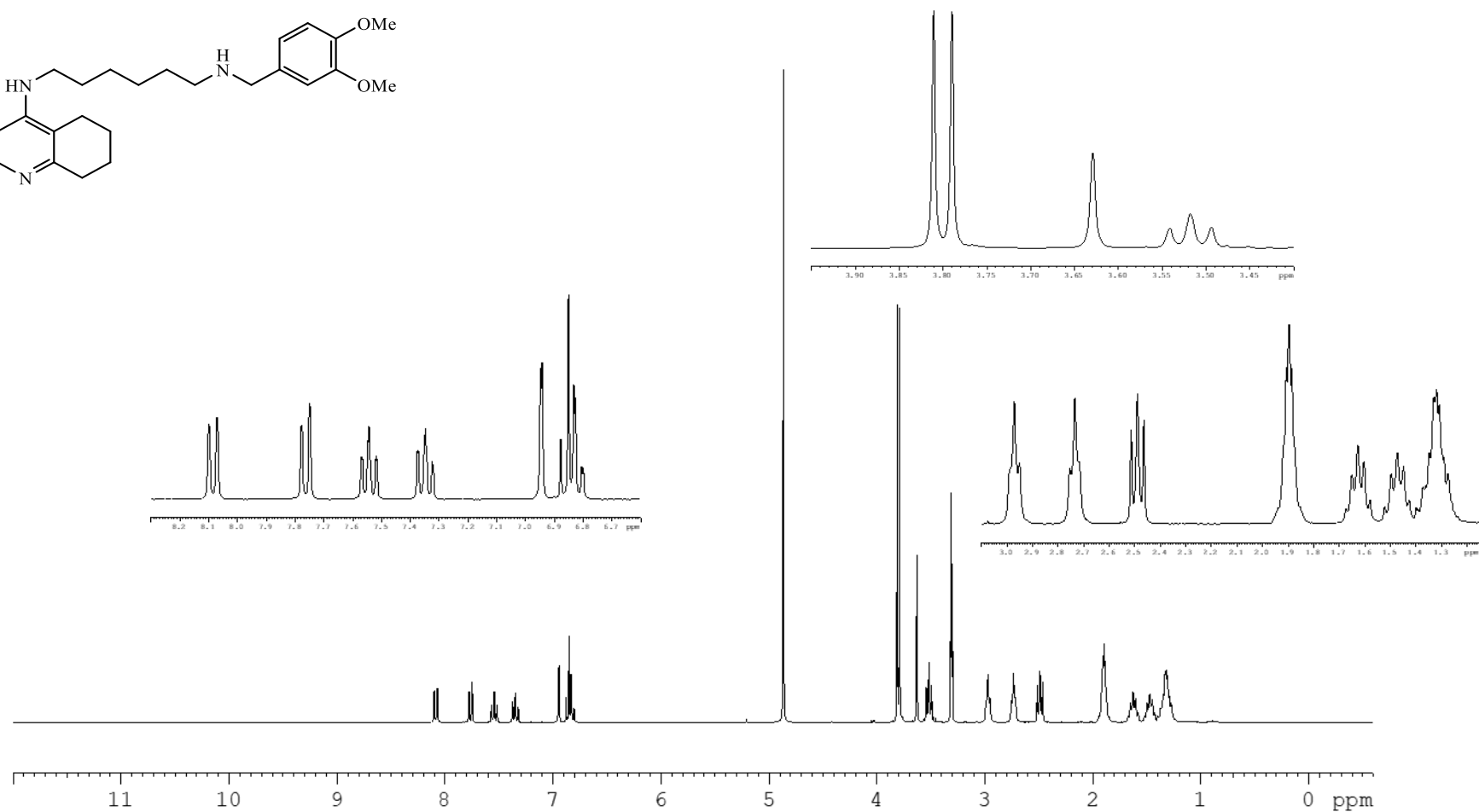
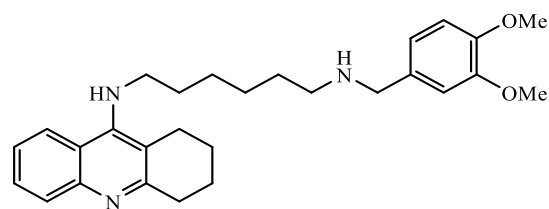


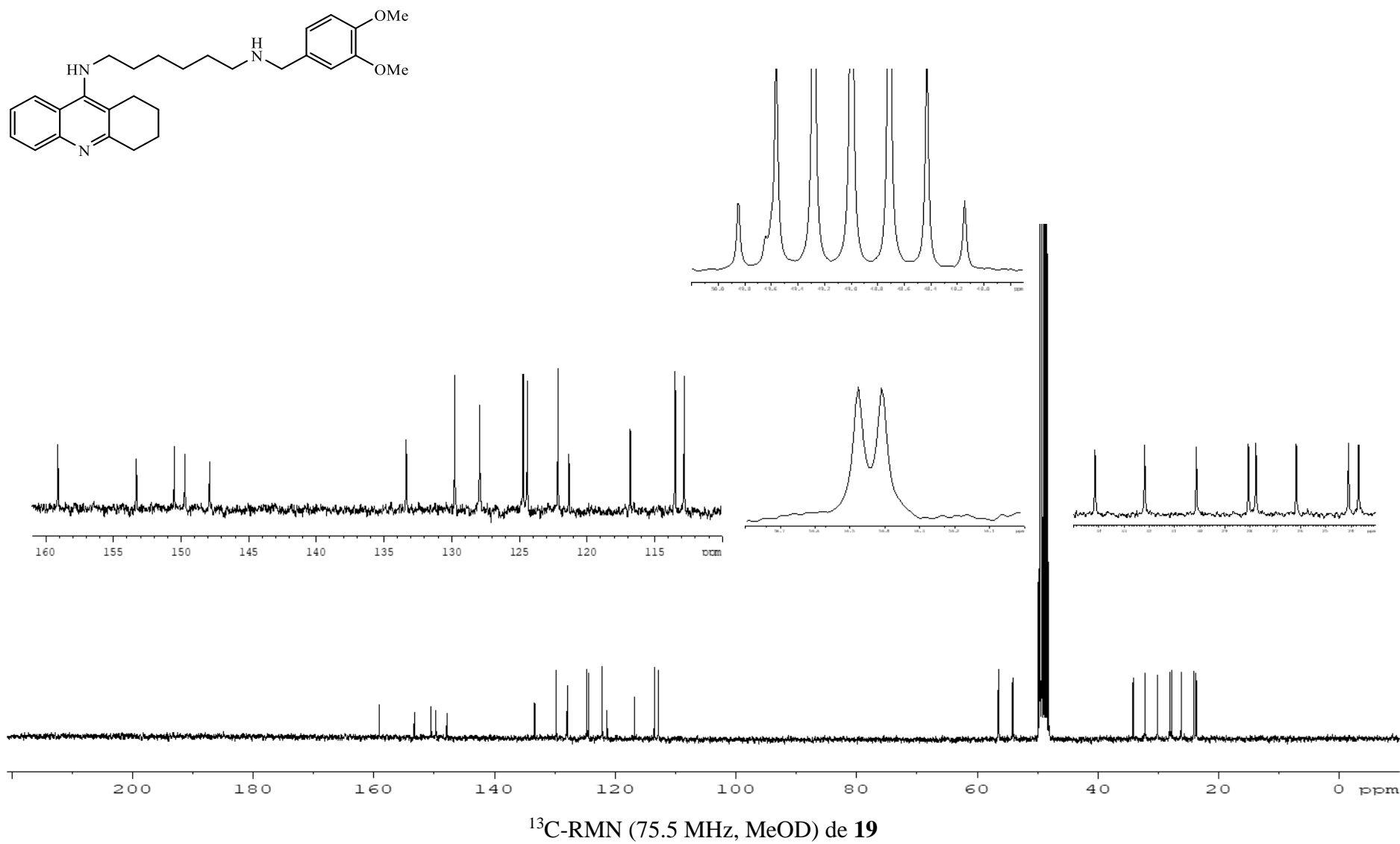
Compuesto 17 ^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de **17**

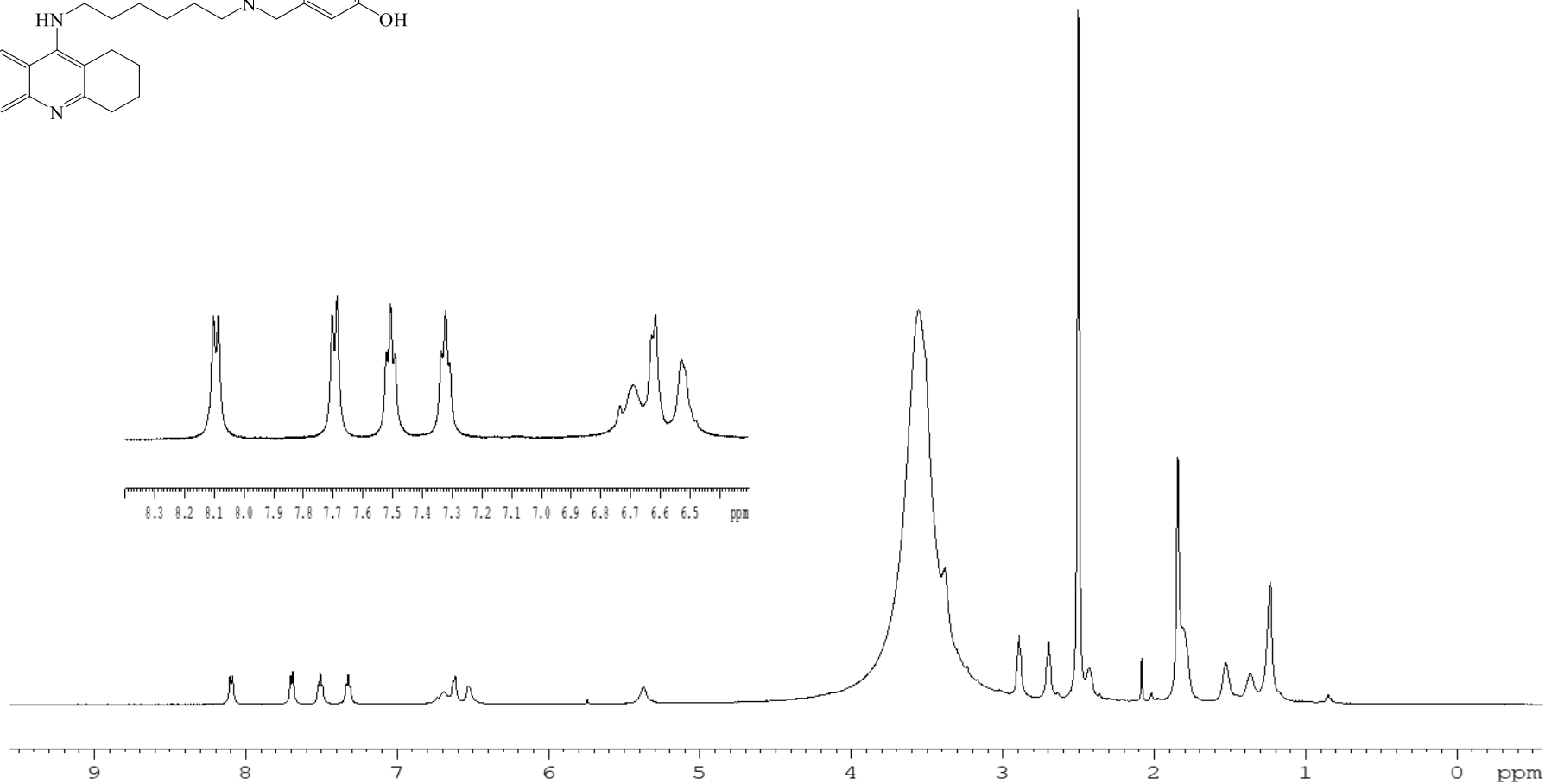
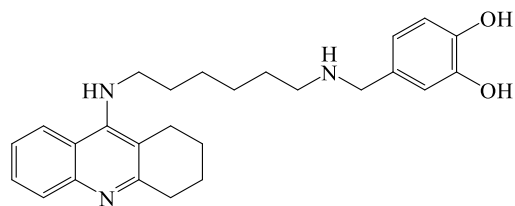
 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de **17**

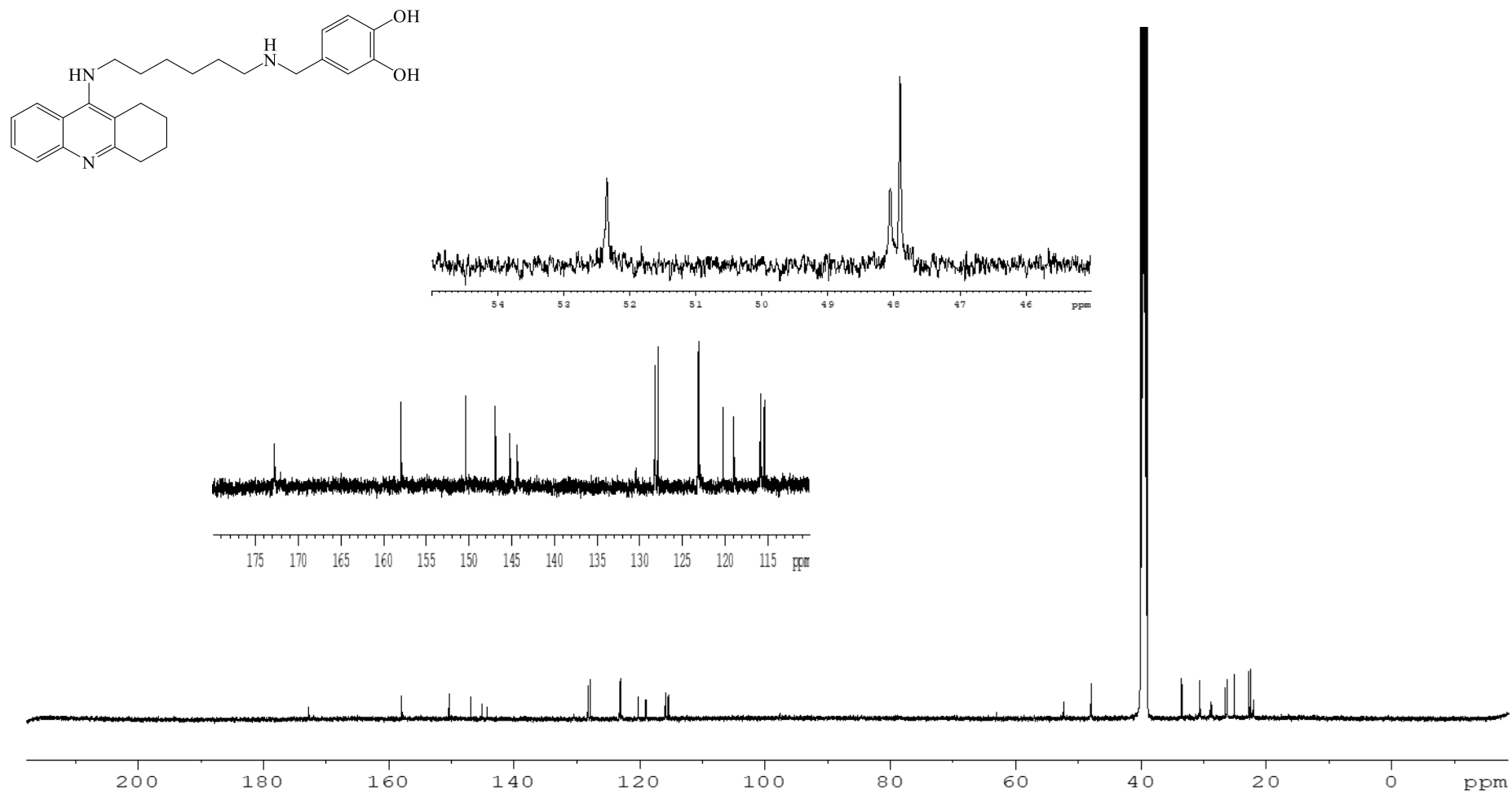
Compuesto 18 ^1H -RMN (300 MHz, MeOD) de **18**

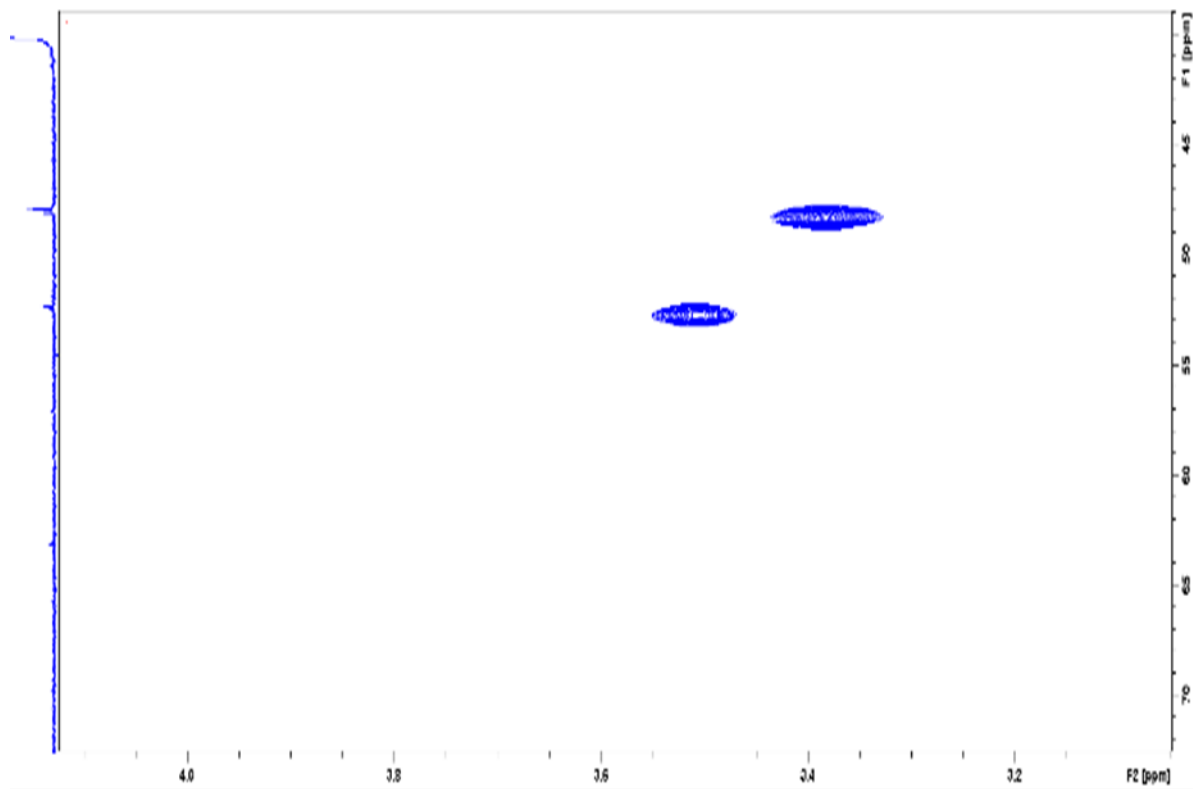
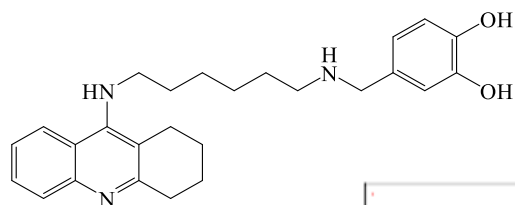
 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, MeOD) de **18**

Compuesto 19 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOD) de **19**

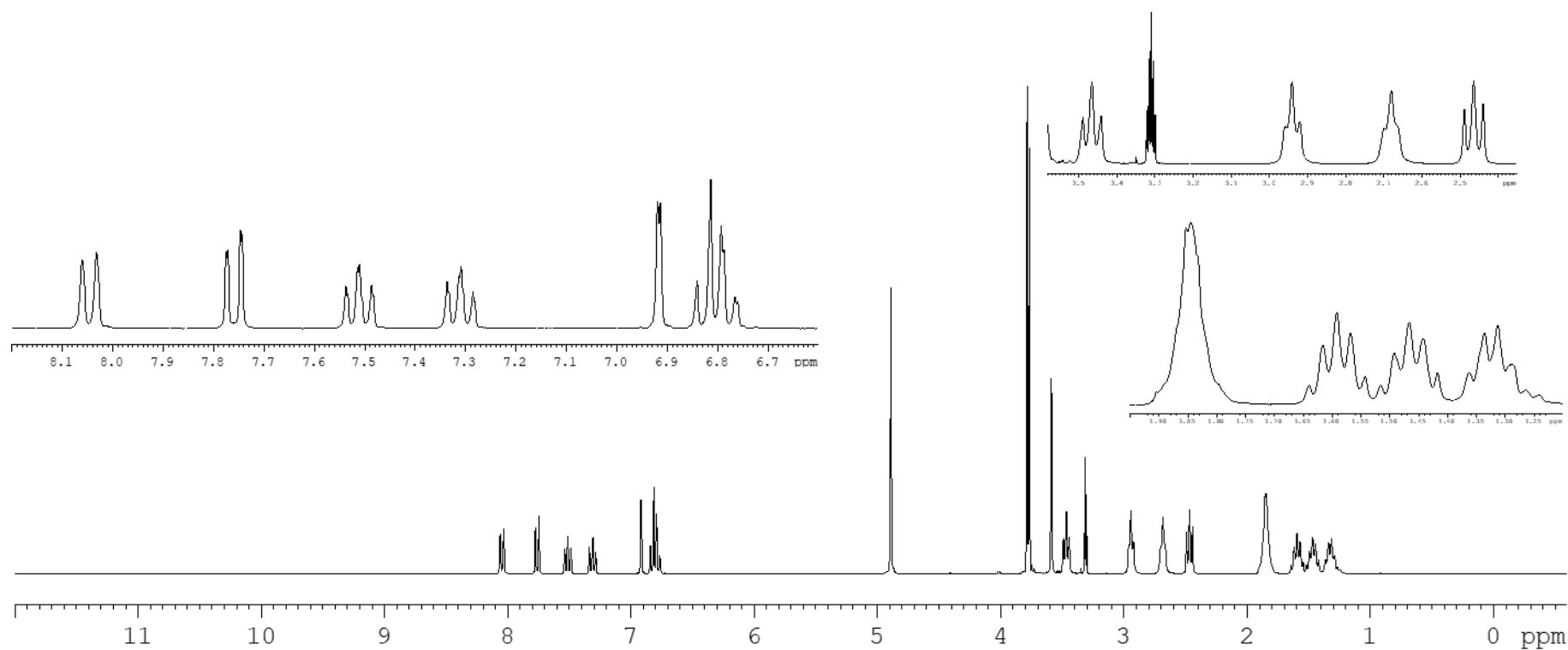
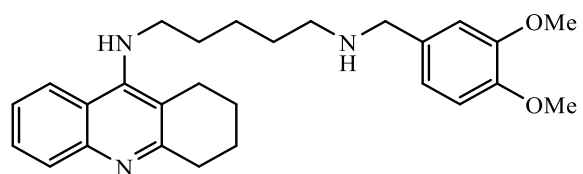


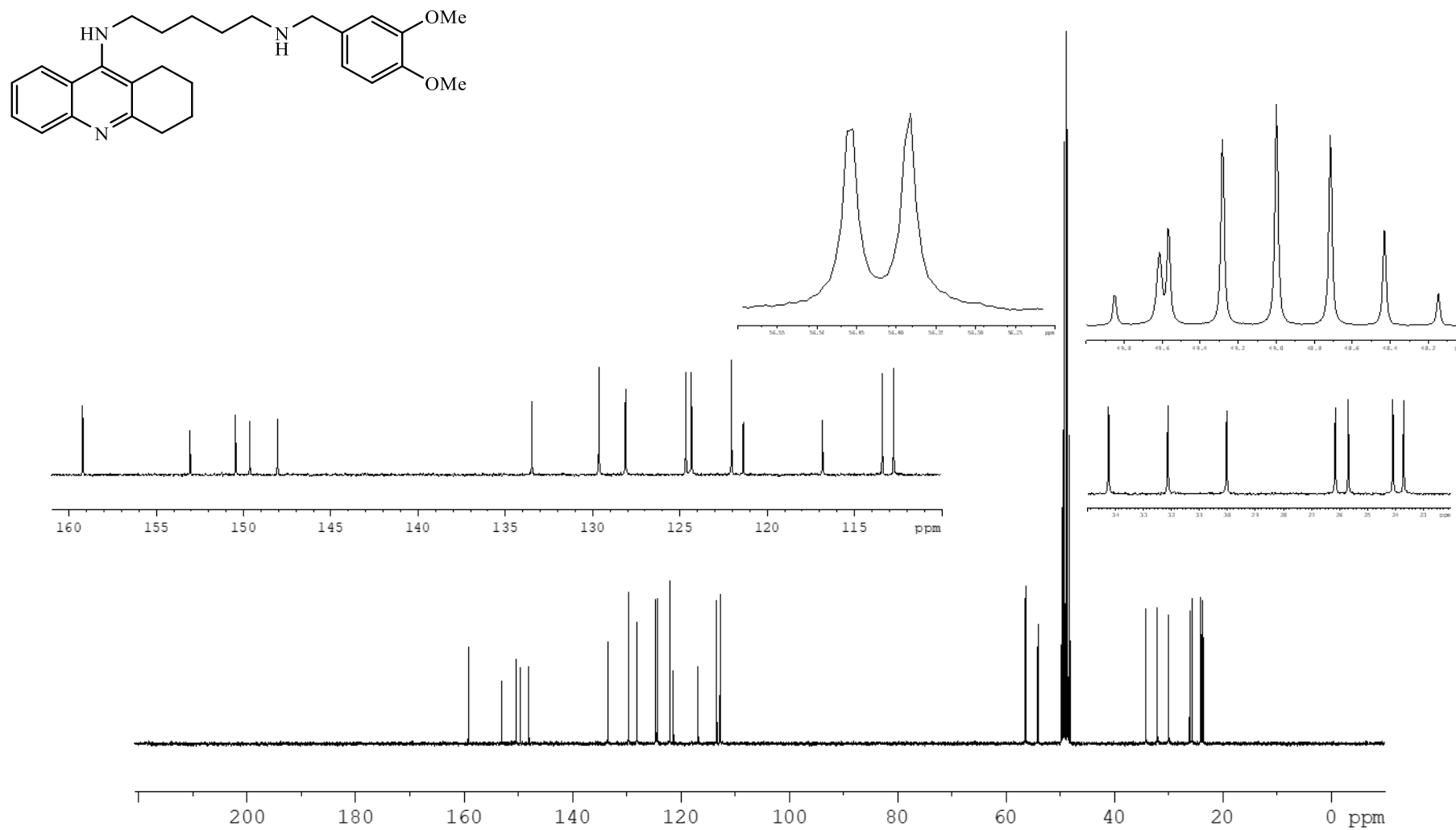
Compuesto 20¹H-RMN (500 MHz, (CD₃)₂SO) de **20**

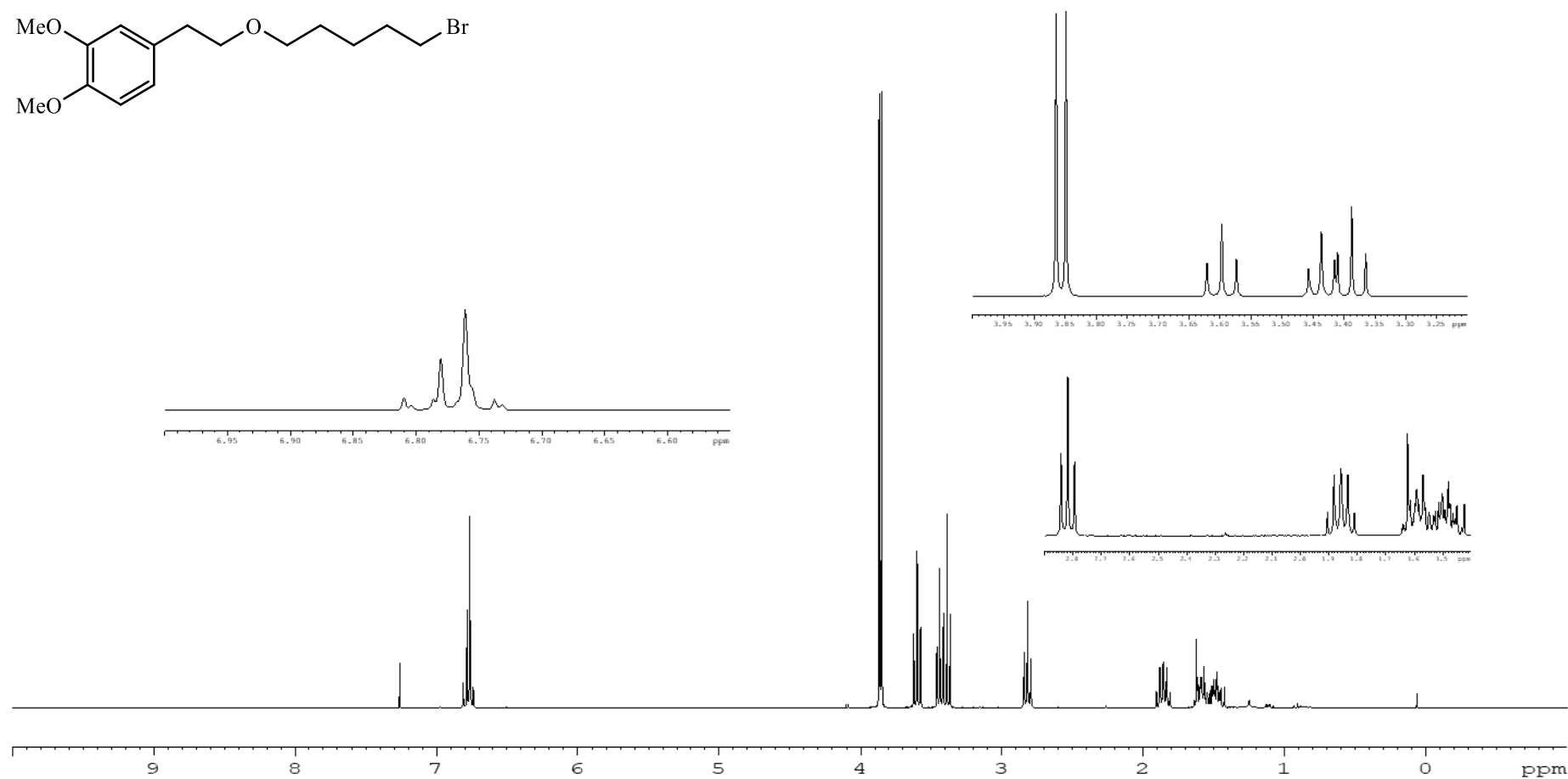
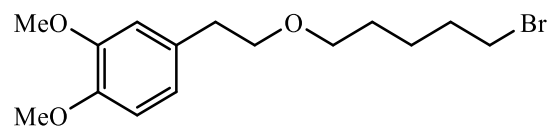
 ^{13}C -RMN (125.8 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **20**

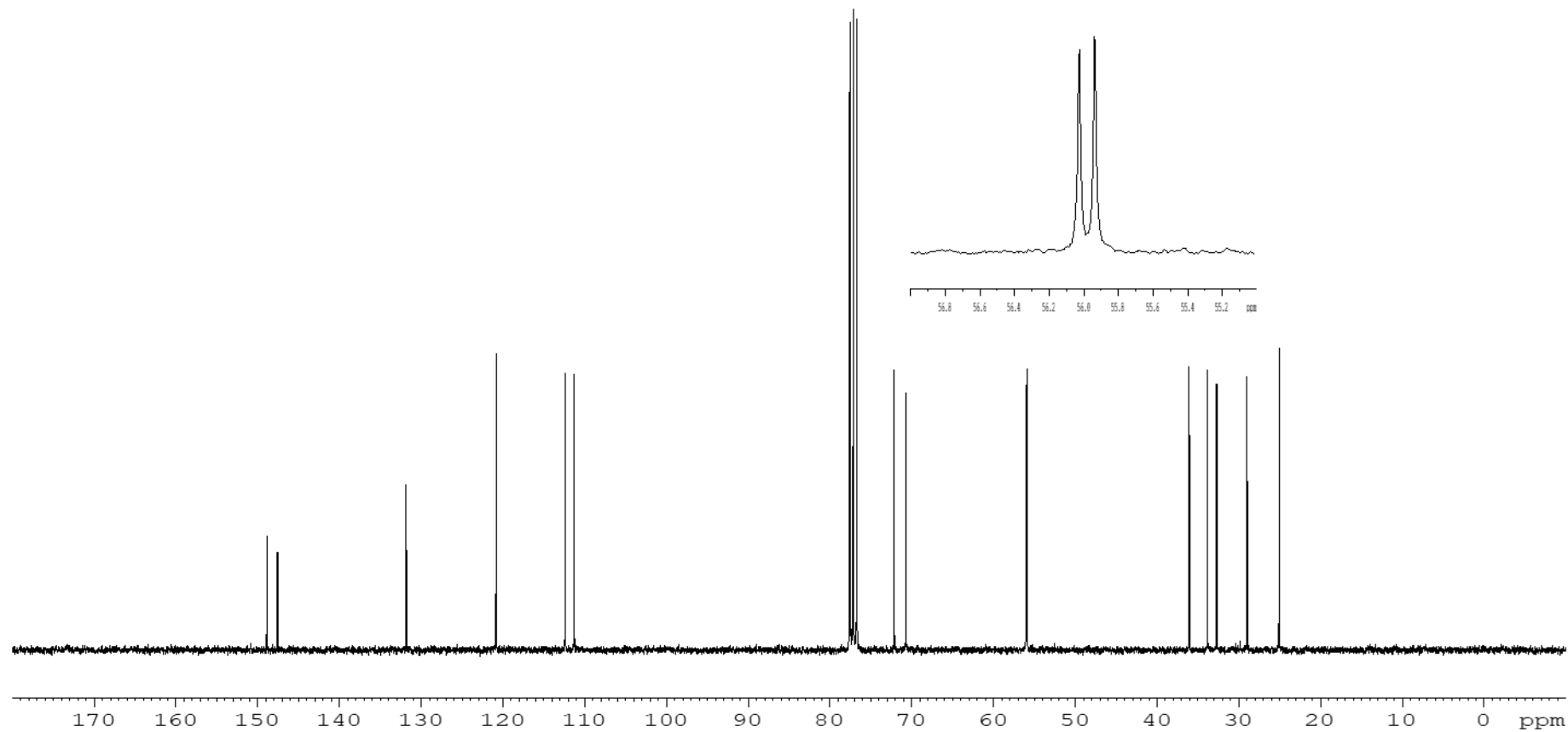
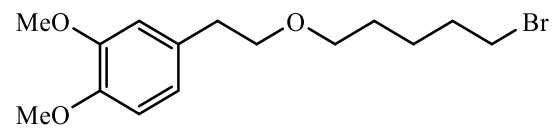


HSQC-RMN (500 MHz (^1H), 125.8 MHz (^{13}C), $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **20**

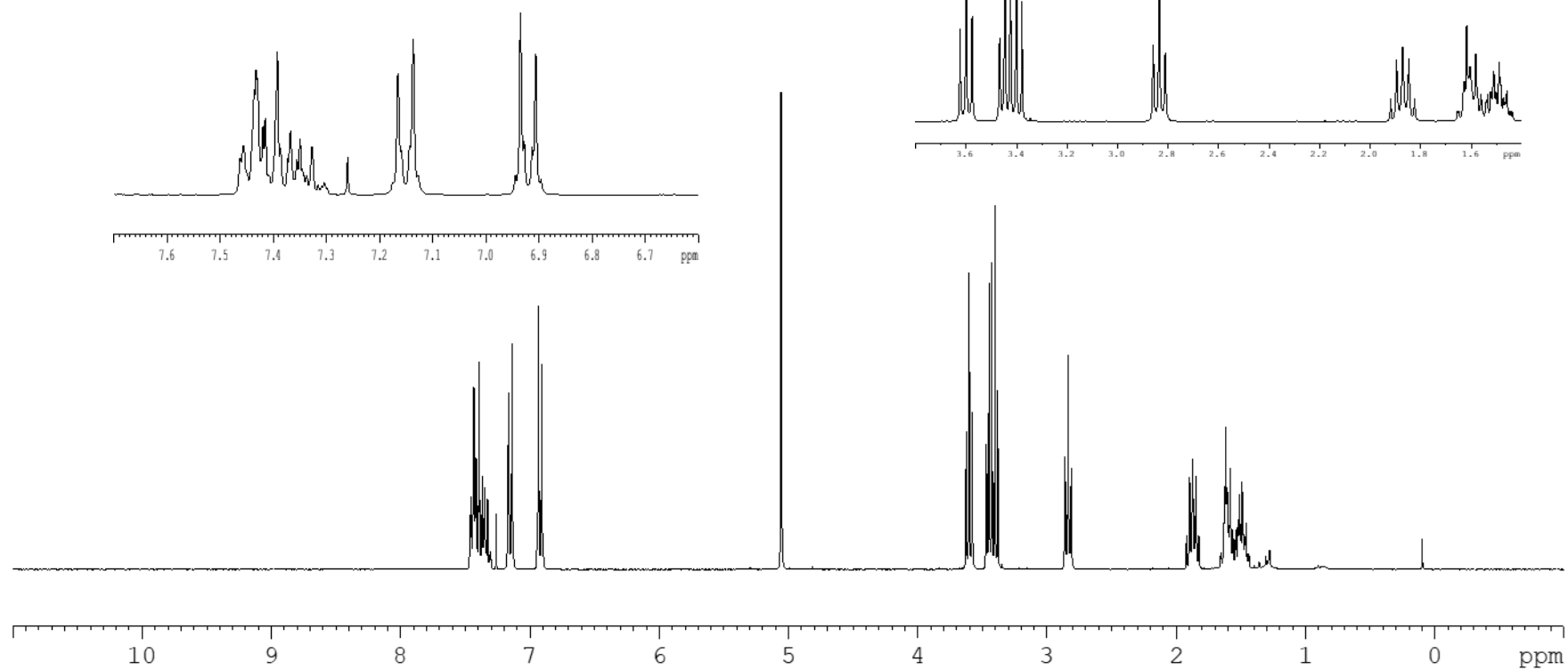
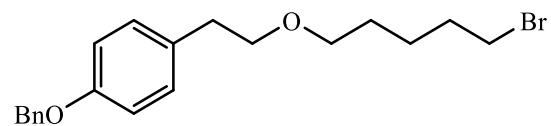
Compuesto 21 ^1H -RMN (300 MHz, MeOD) de **21**

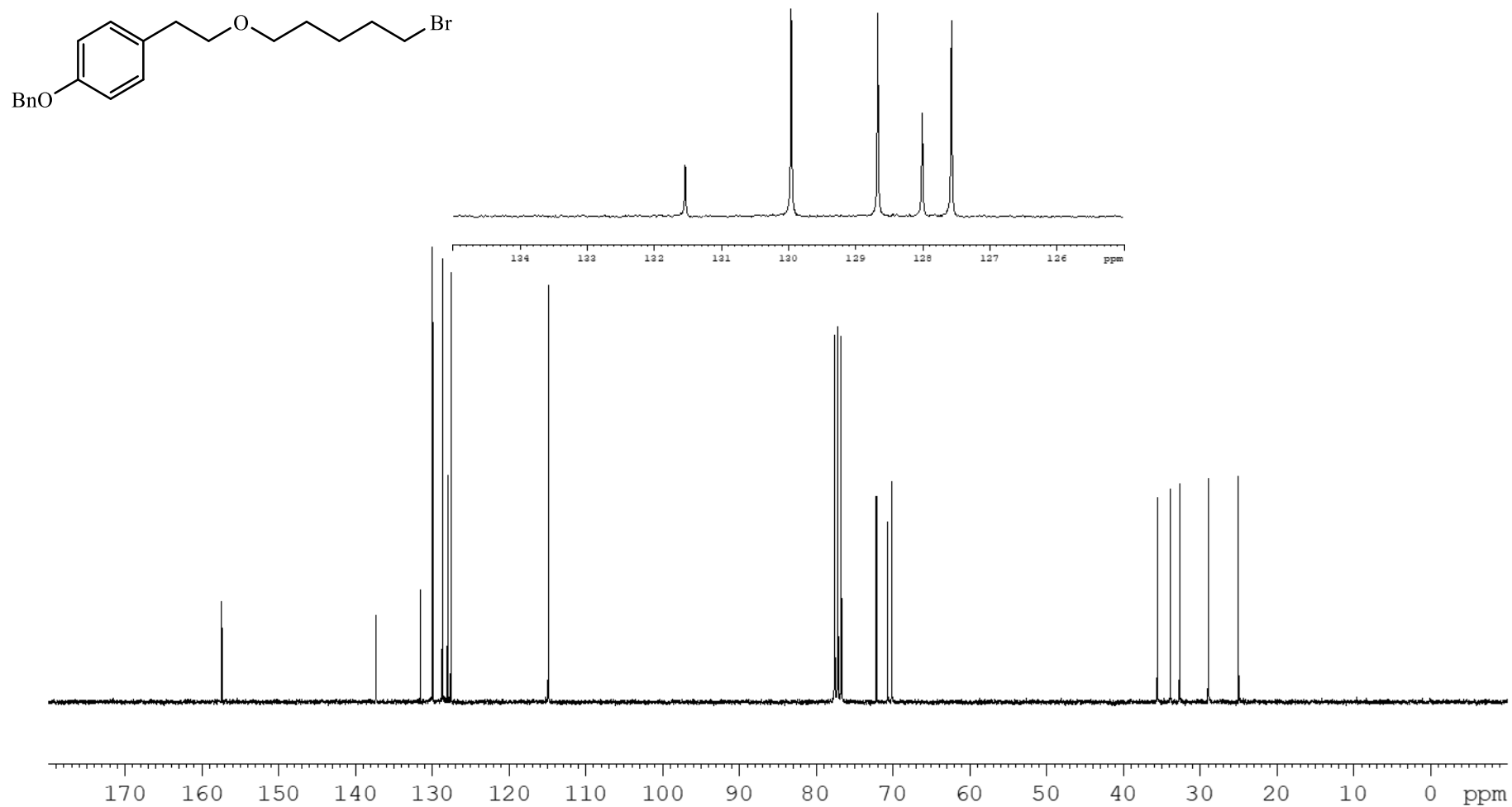
 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, MeOD) de **21**

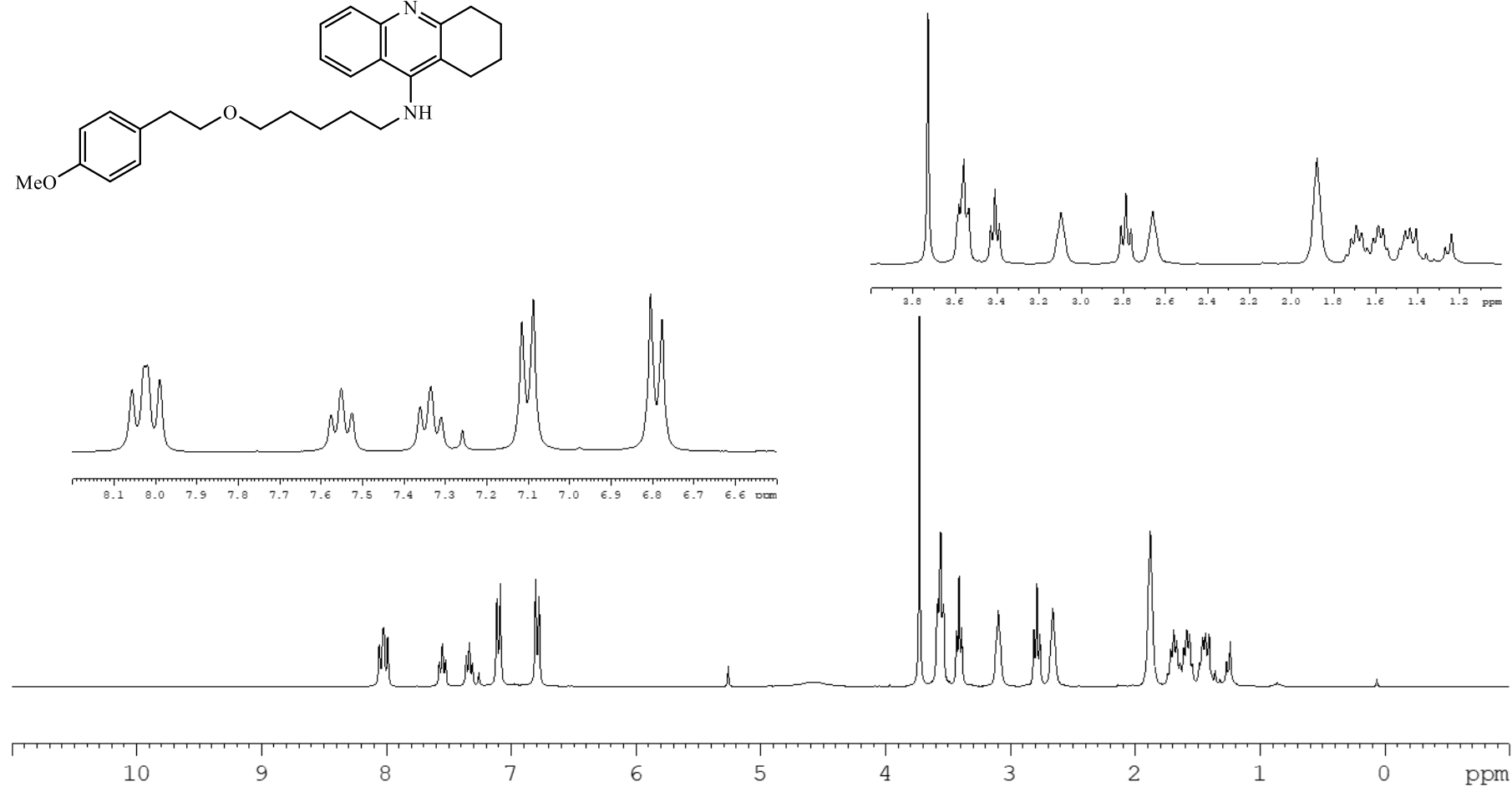
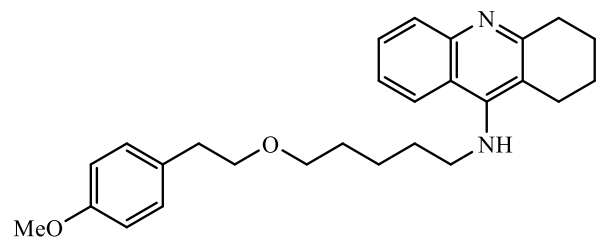
Compuesto 22 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) de **22**

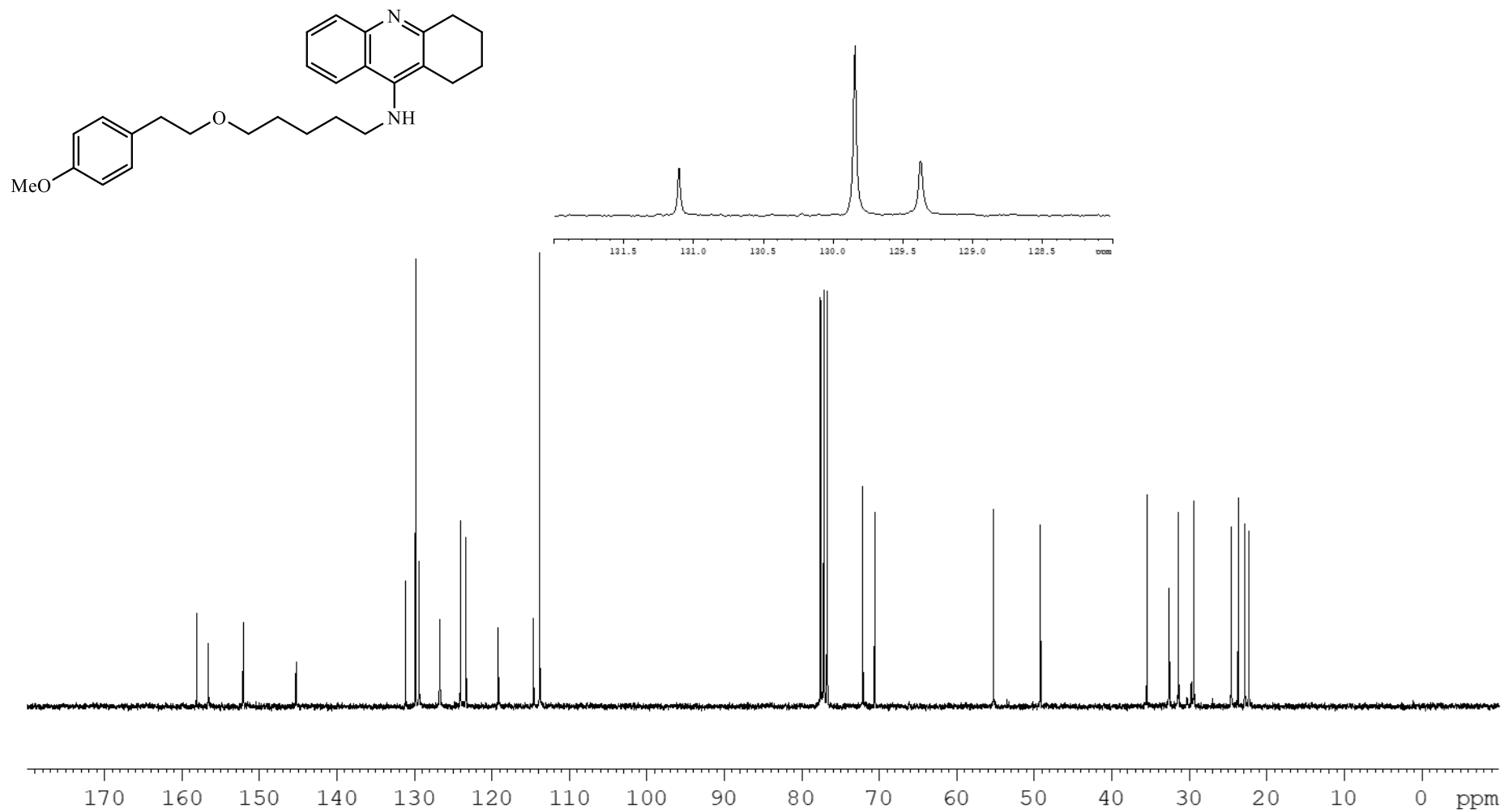


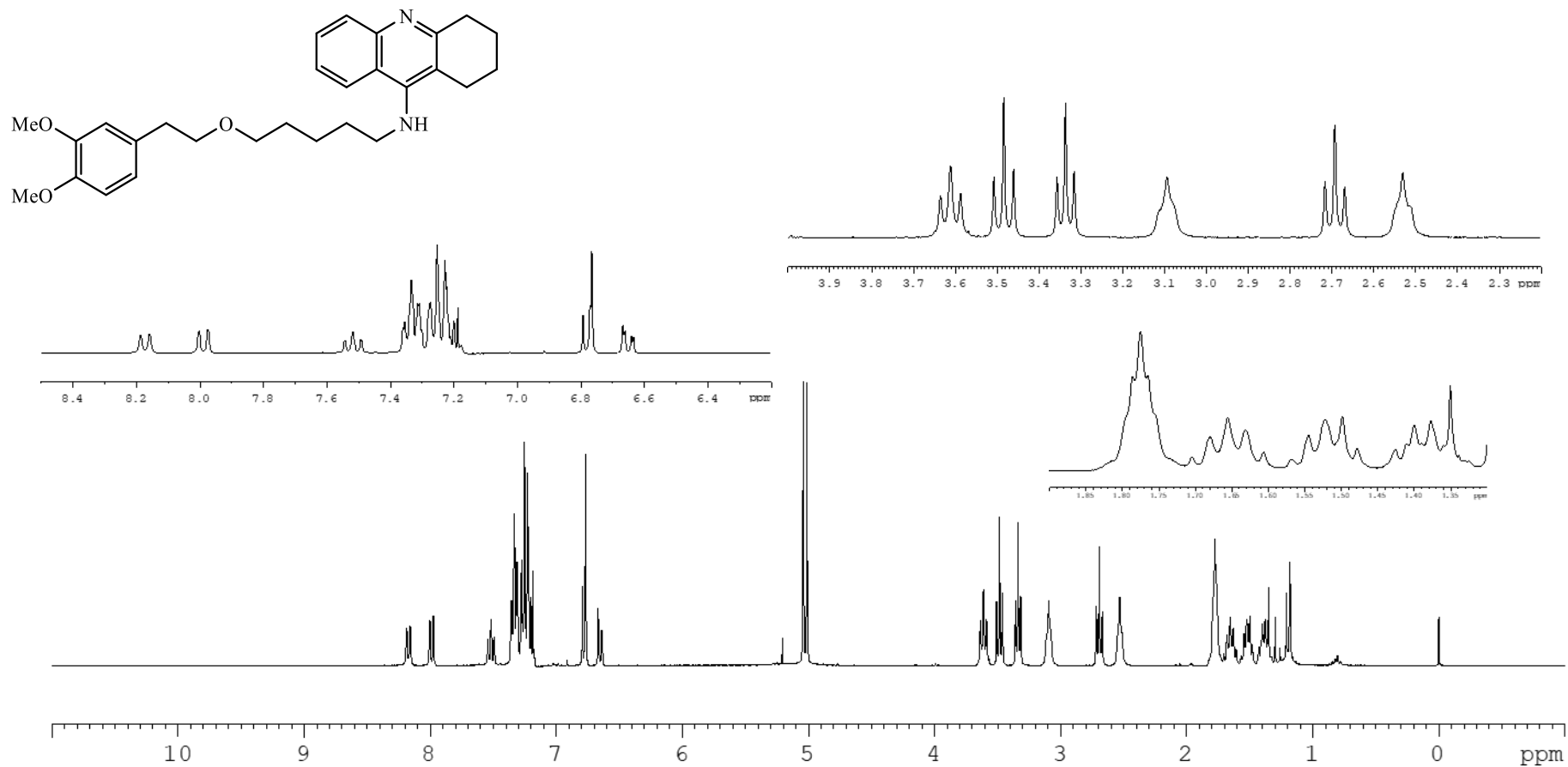
^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de **22**

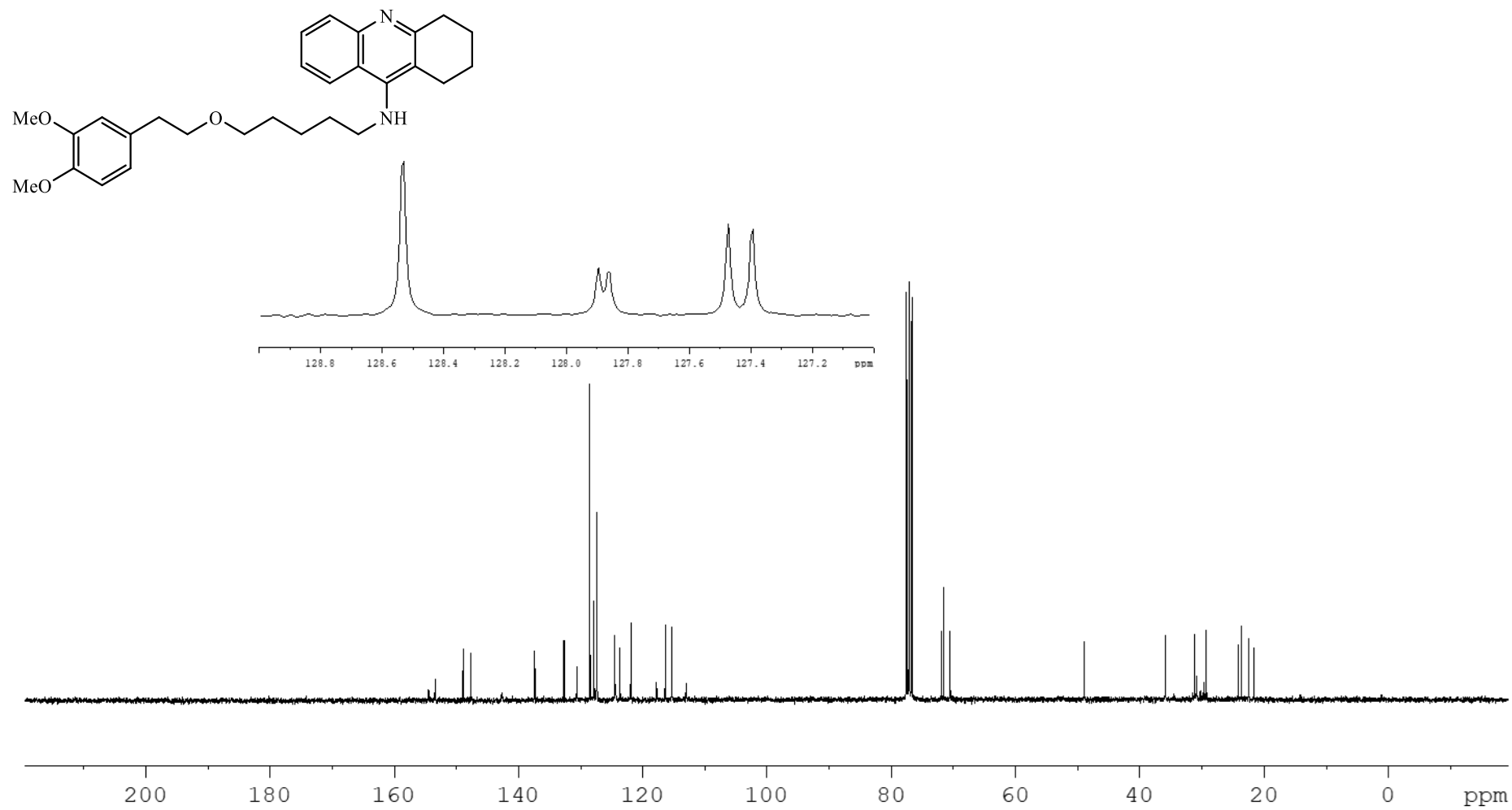
Compuesto 23 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) de **23**

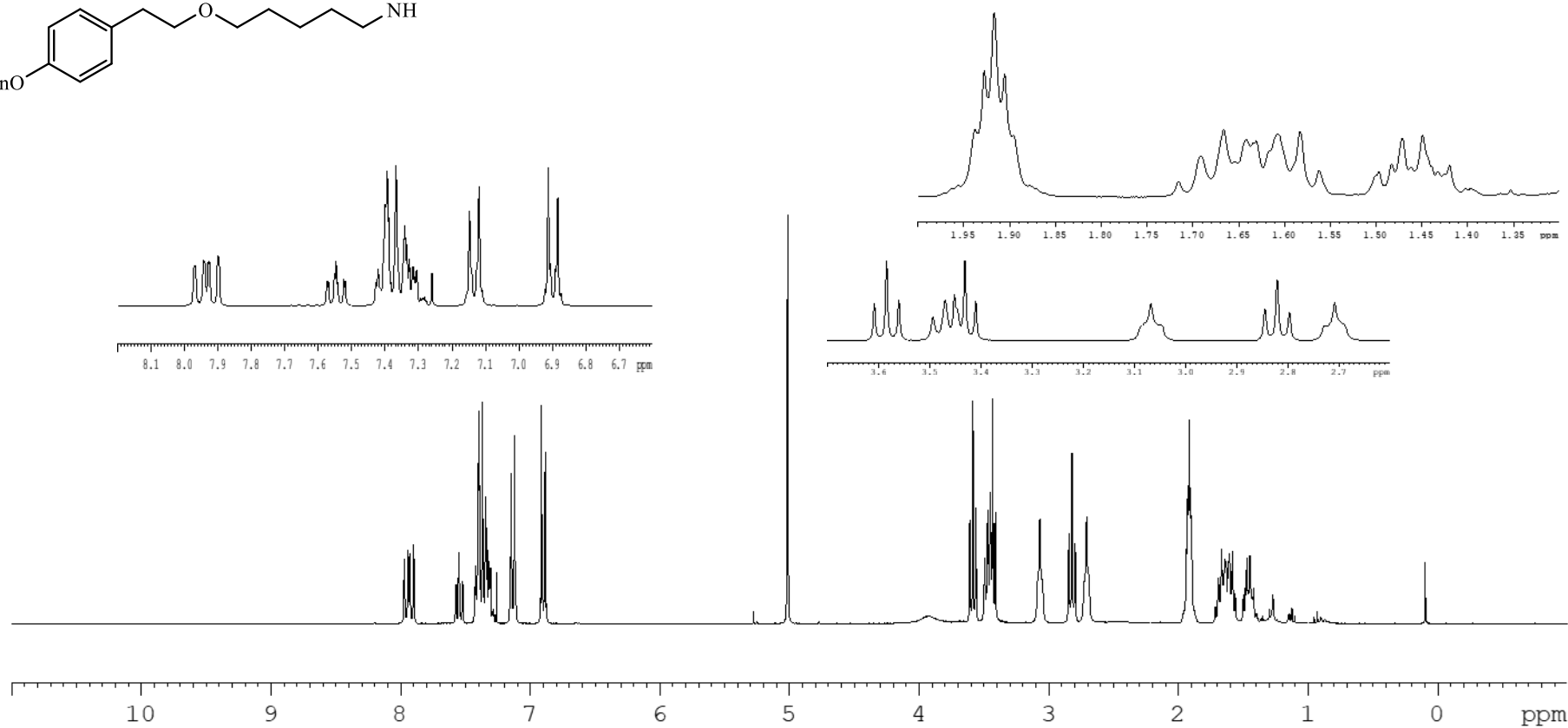
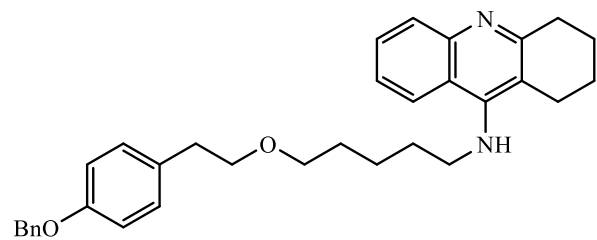
 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de **23**

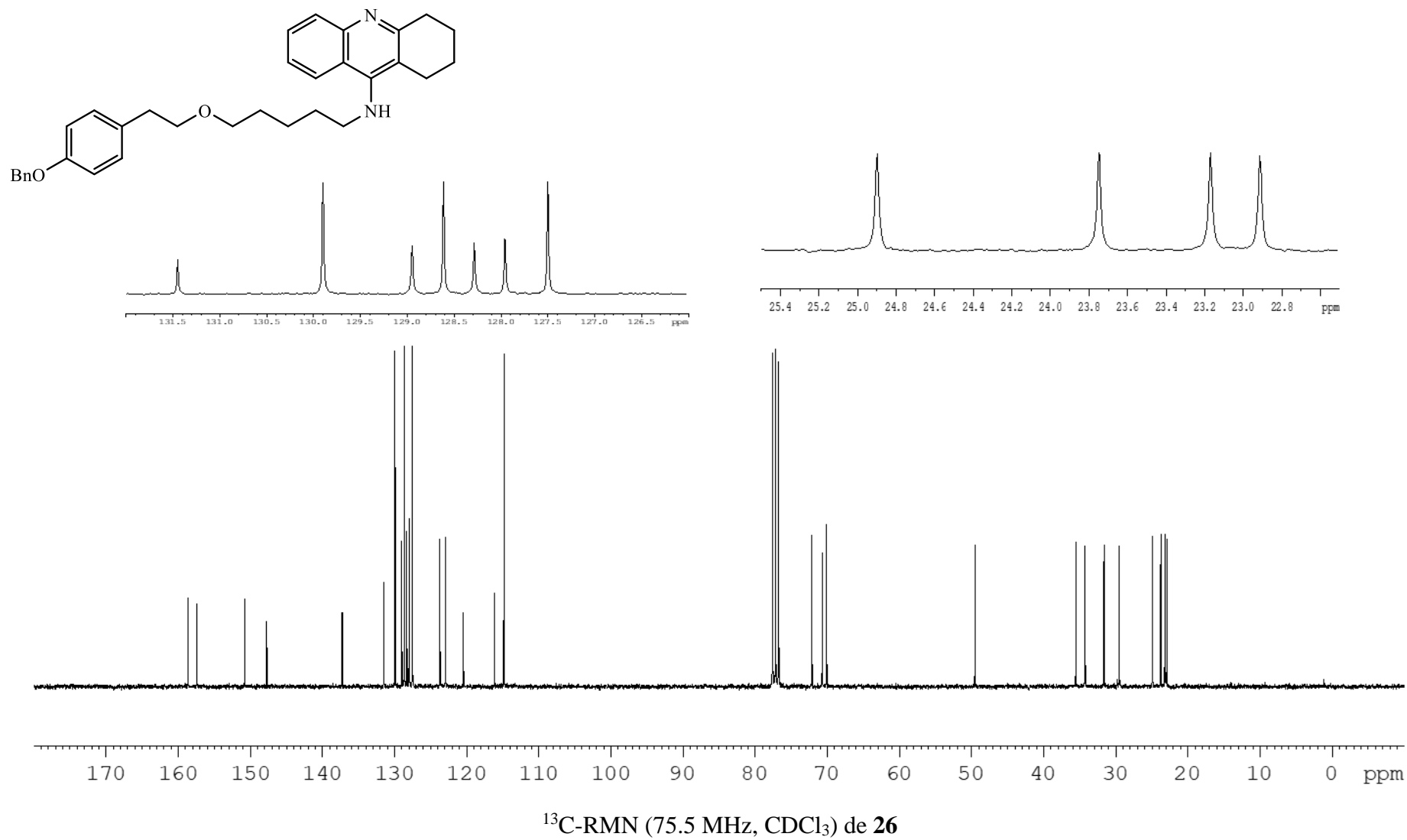
Compuesto 24¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) de **24**

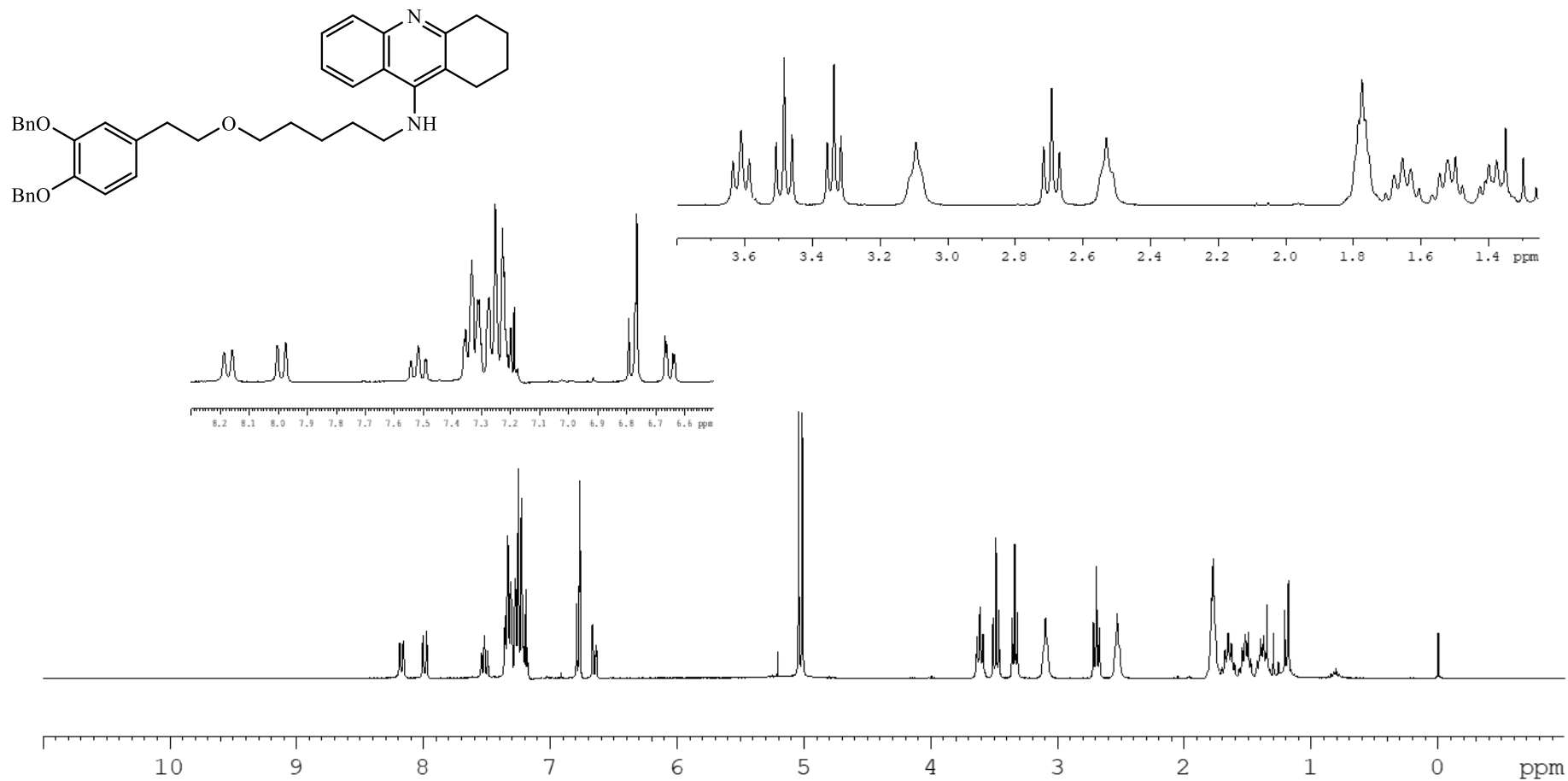


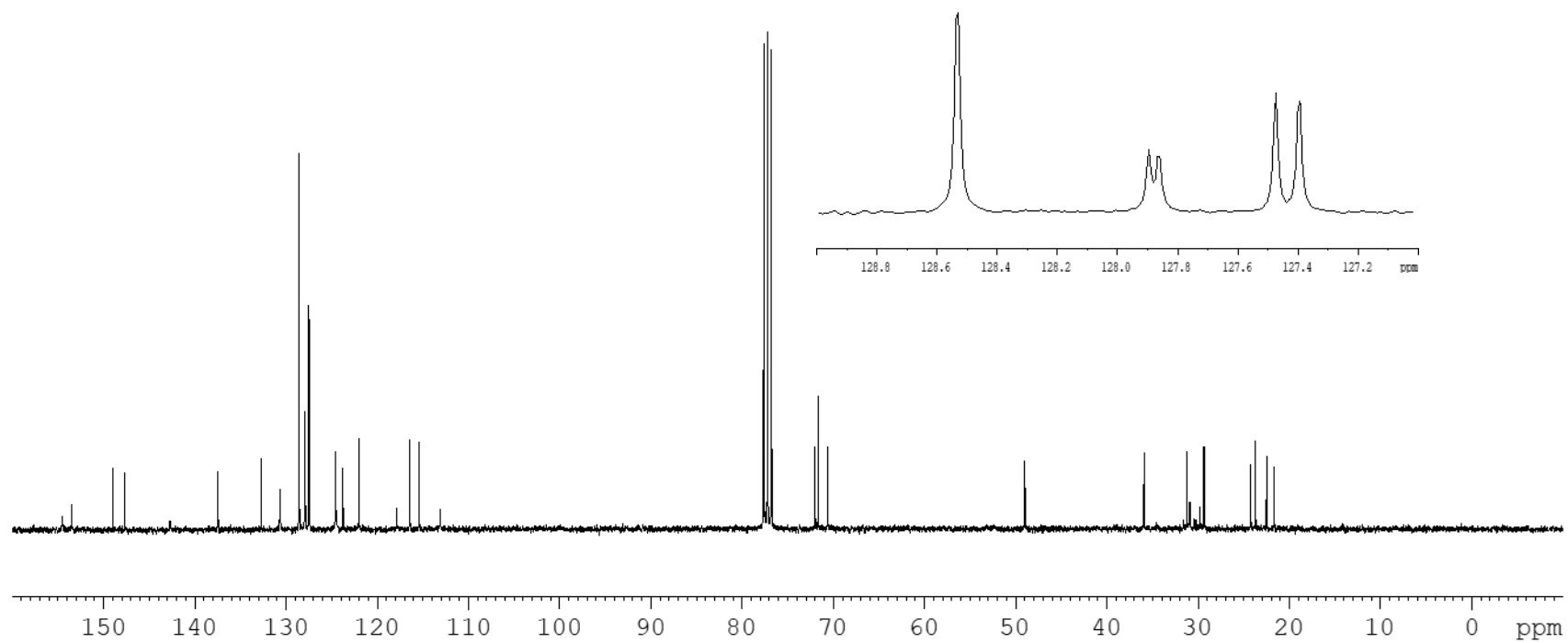
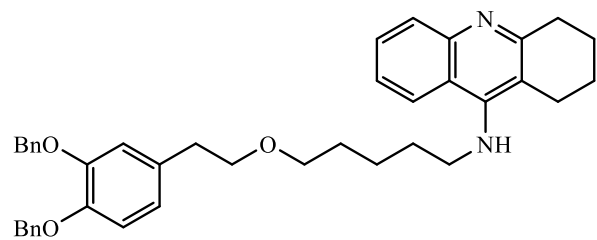
Compuesto 25

 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de 25

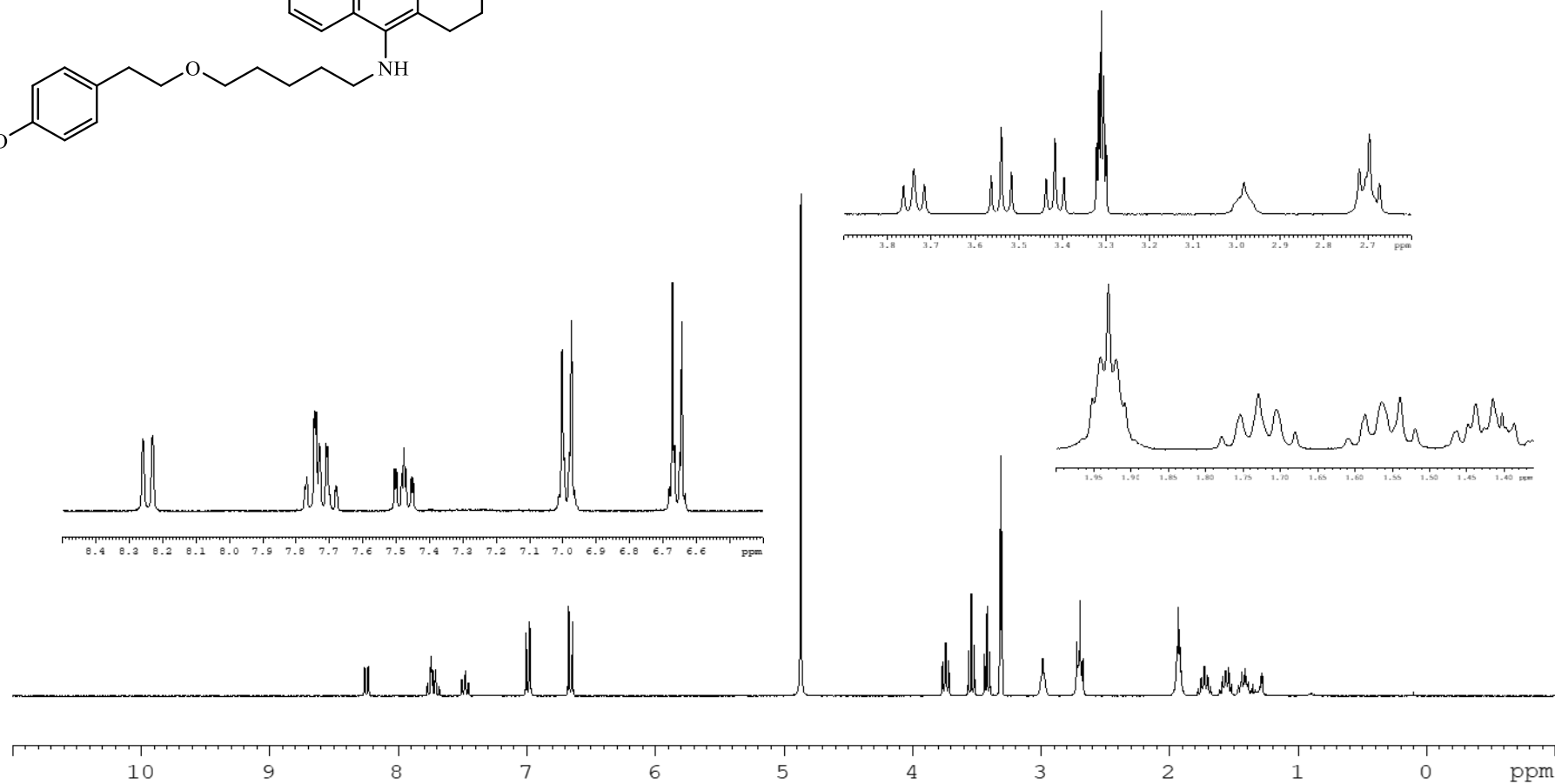
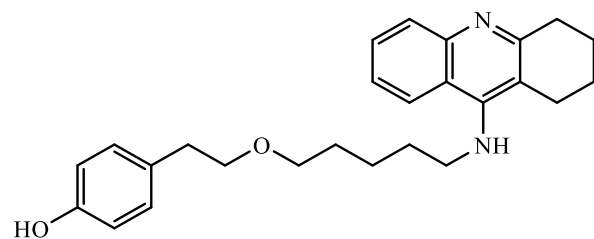
Compuesto 26 $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) de **26**

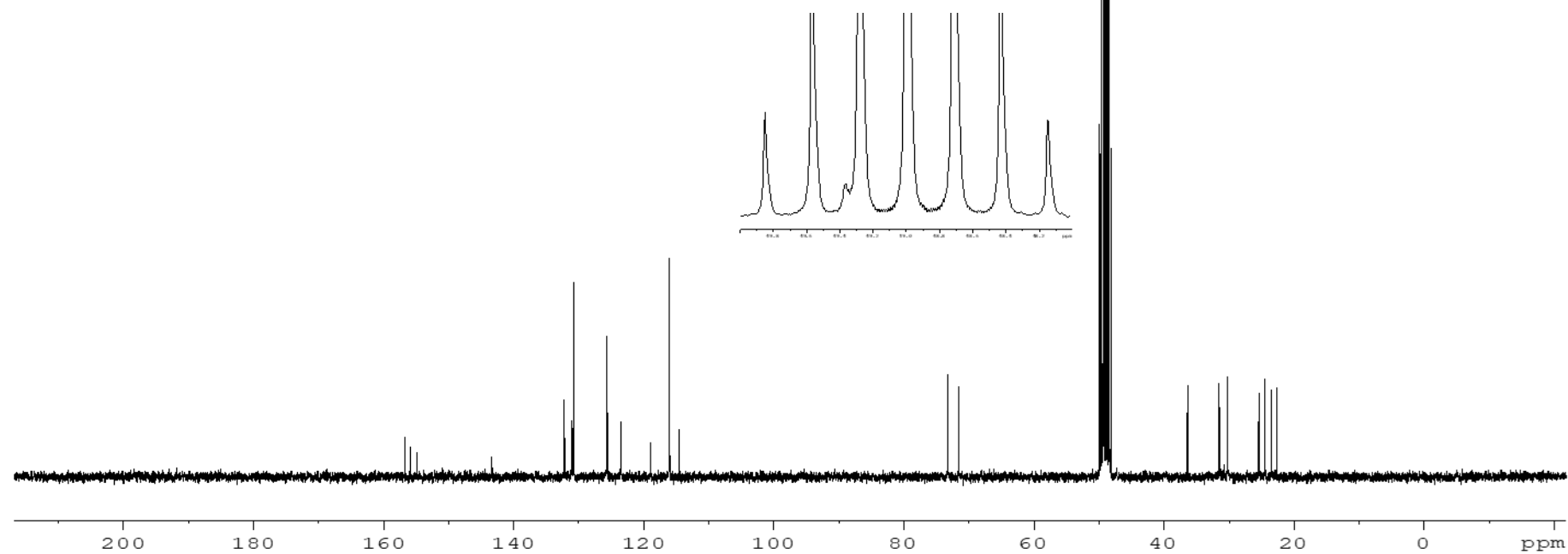
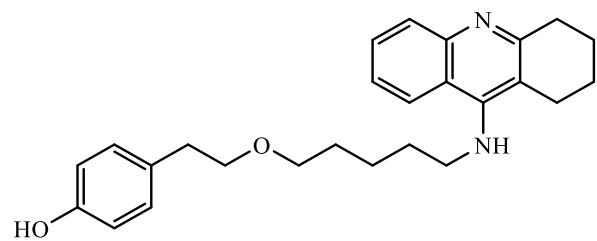


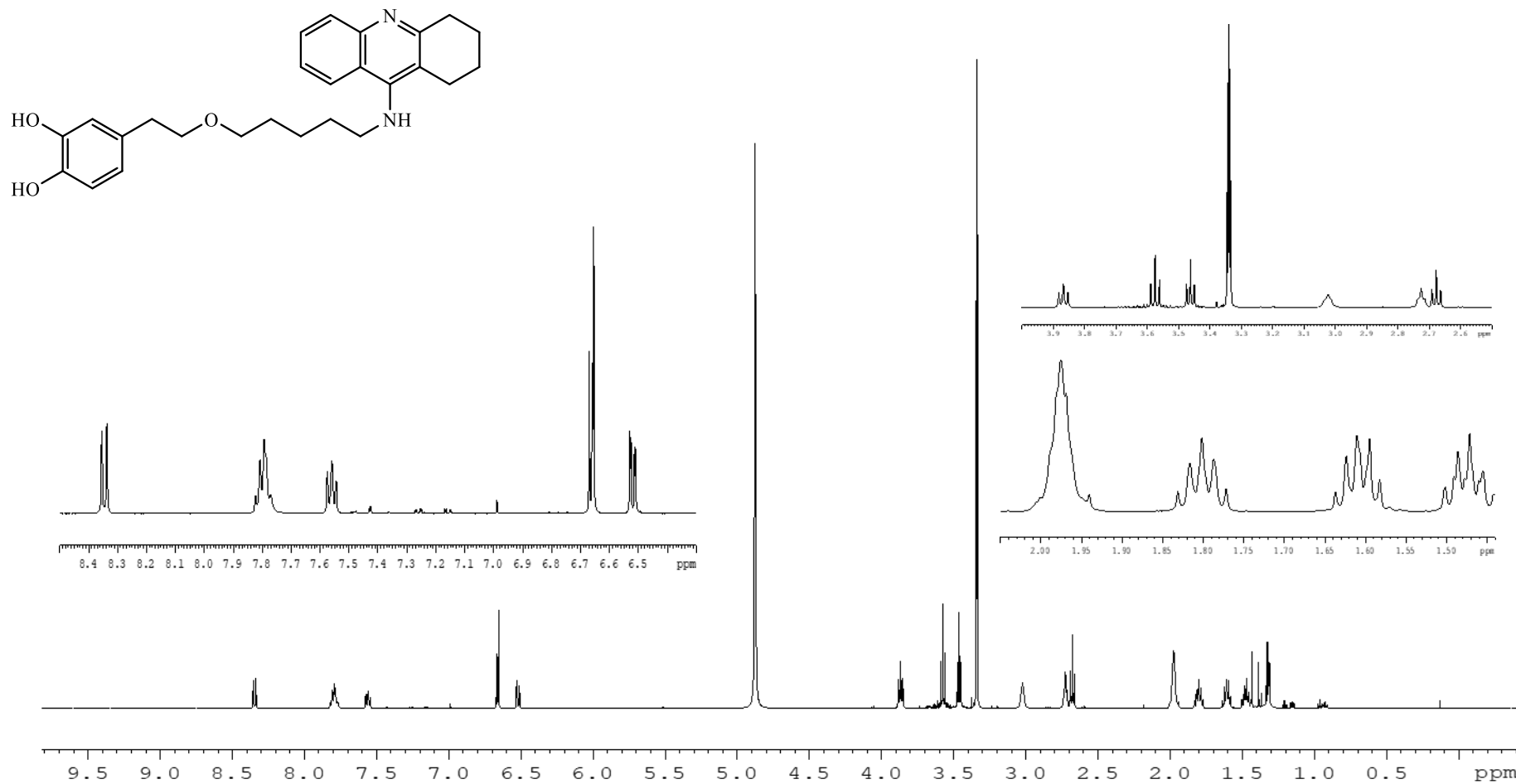
Compuesto 27 ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de **27**

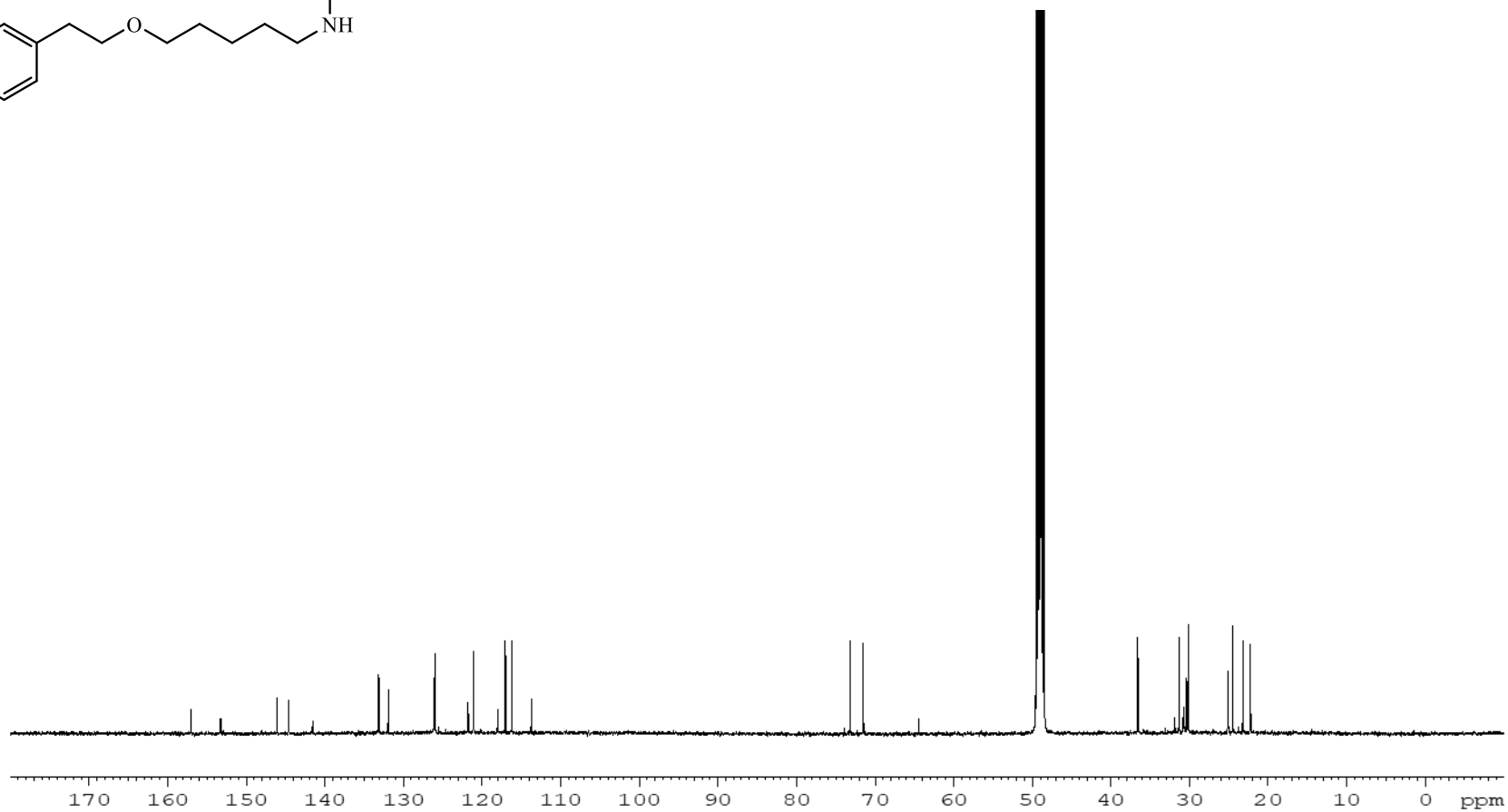
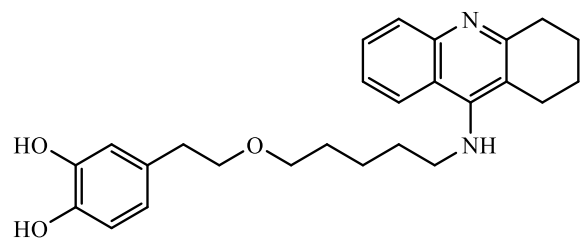


^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de 27

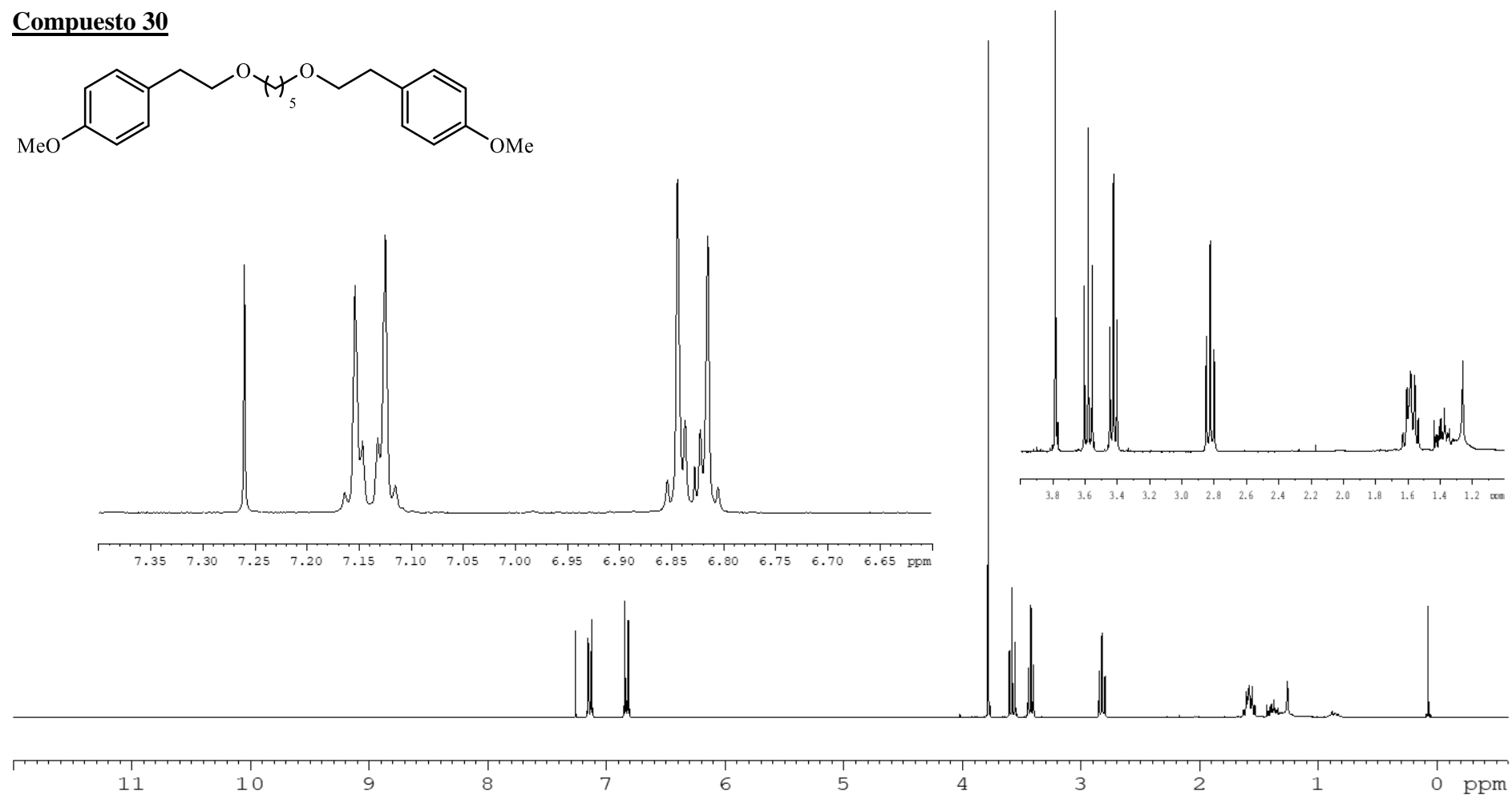
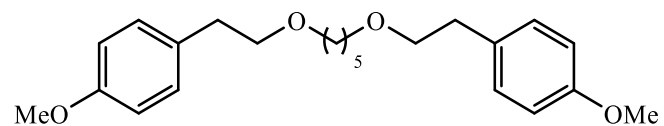
Compuesto 28¹H-RMN (300 MHz, MeOD) de **28**

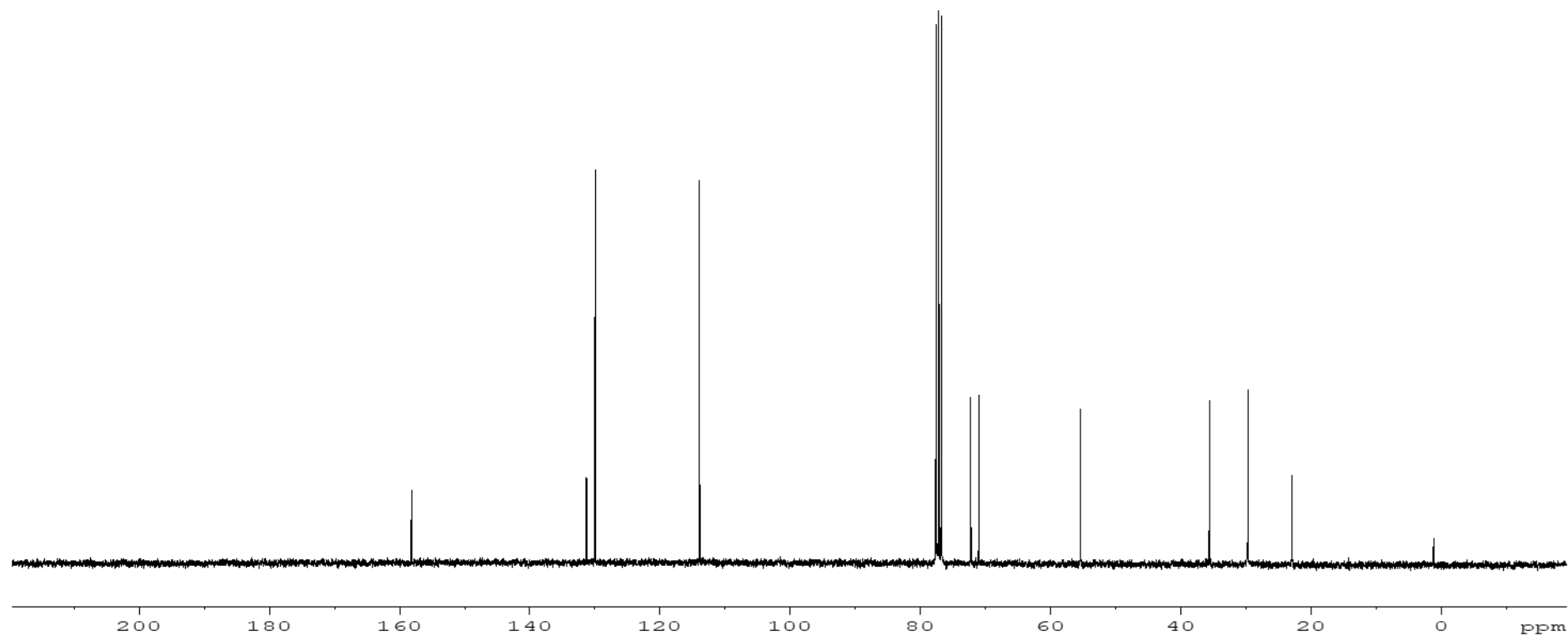
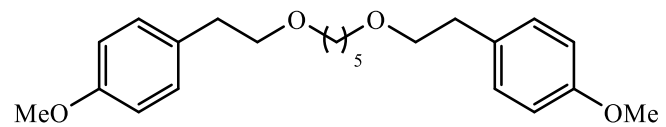
 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, MeOD) de 28

Compuesto 29¹H-RMN (500 MHz, MeOD) de **29**

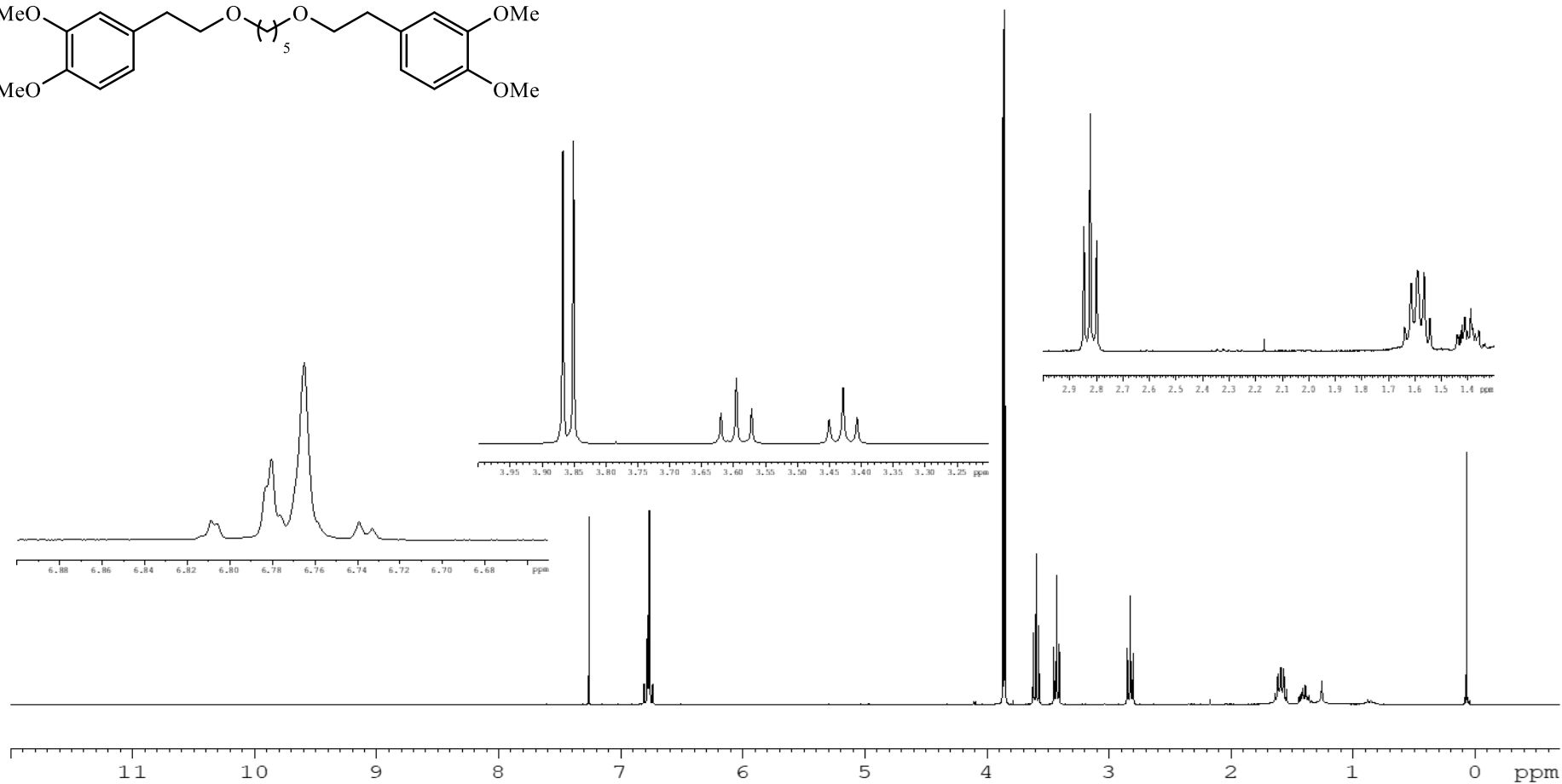
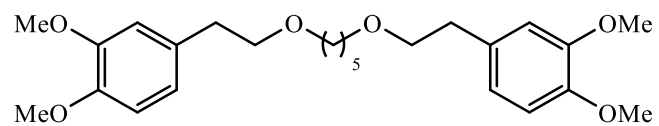


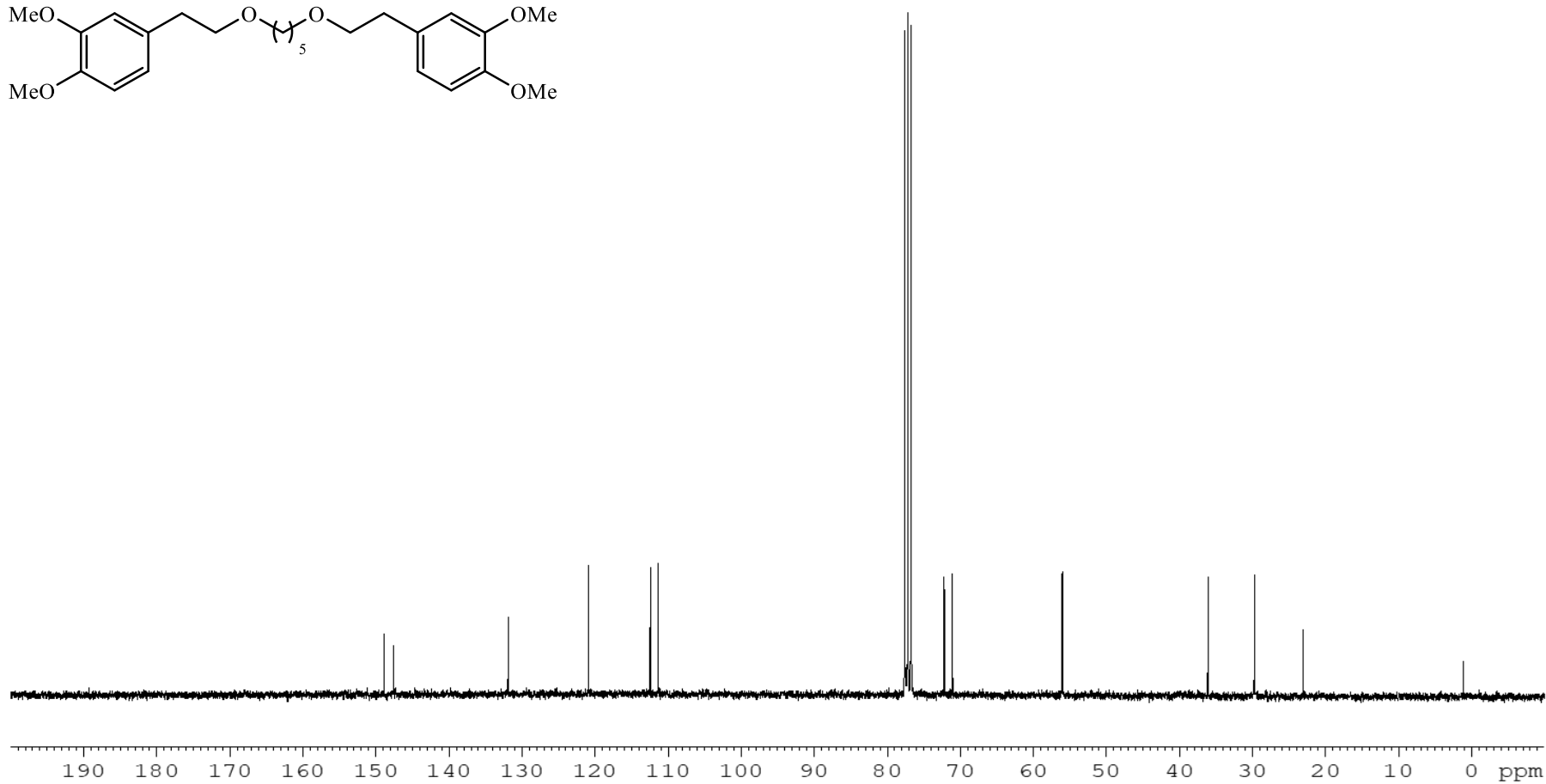
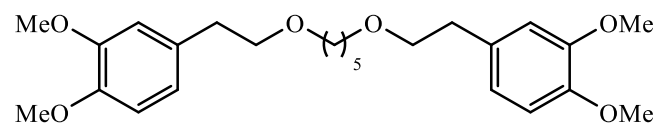
^{13}C -RMN (75.5 MHz, MeOD) de **29**

Compuesto 30¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) de **30**

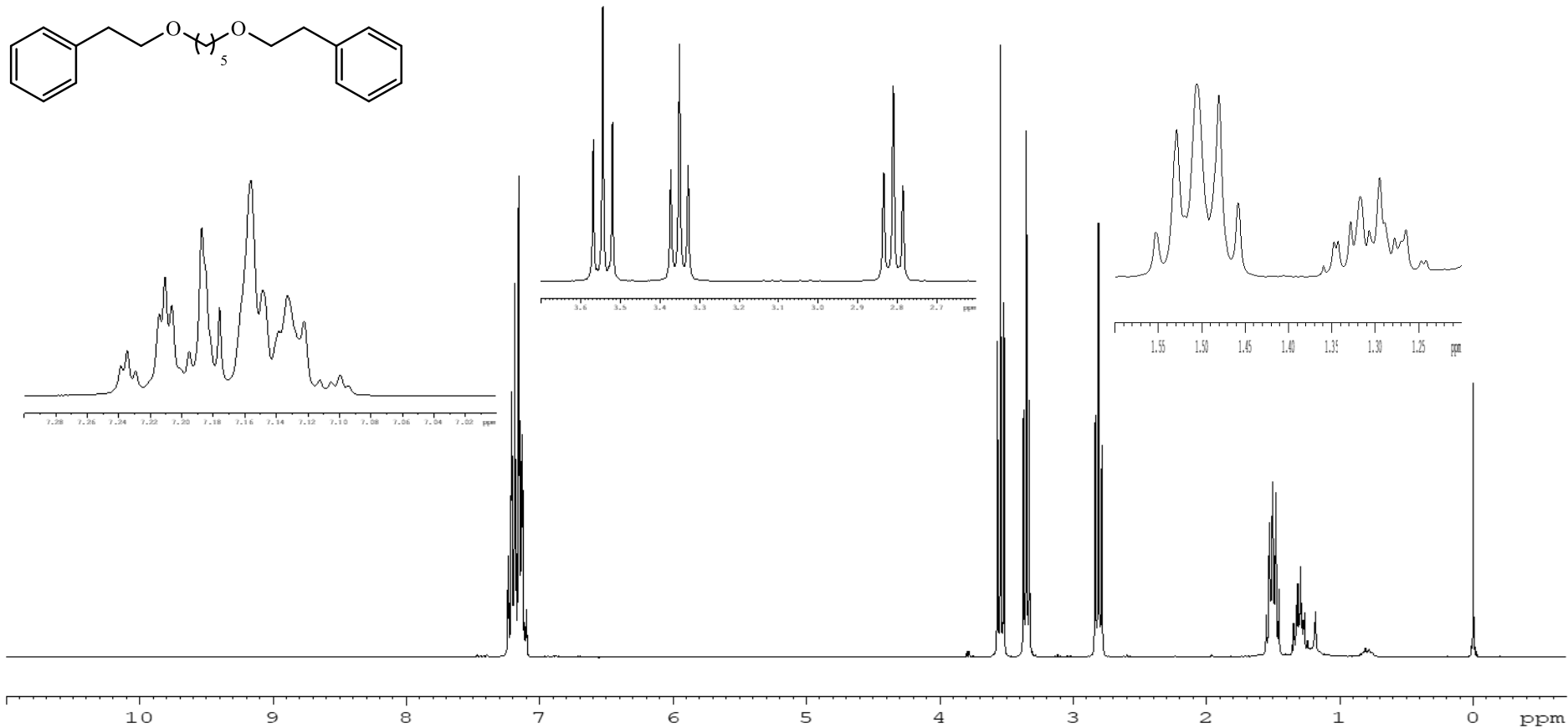


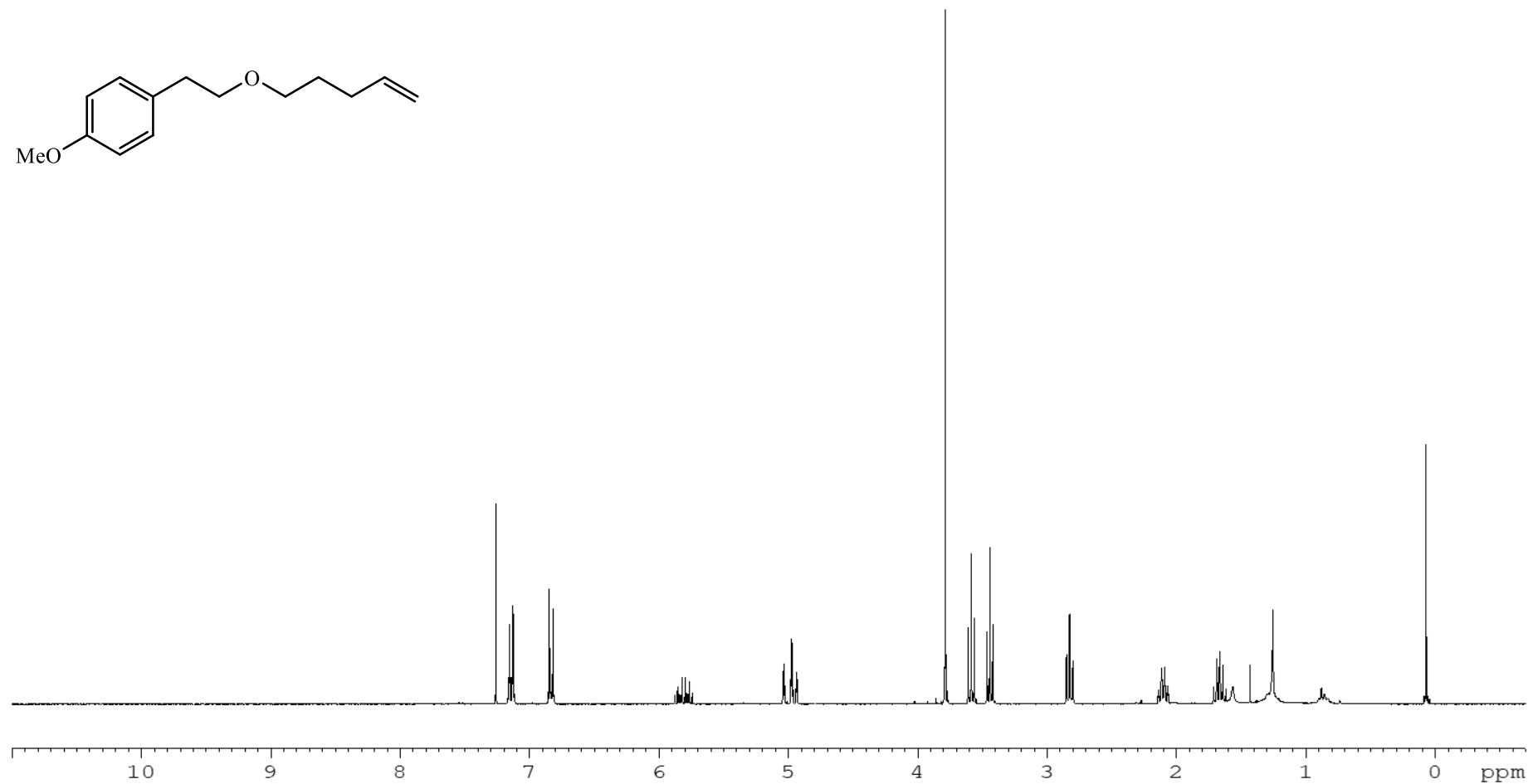
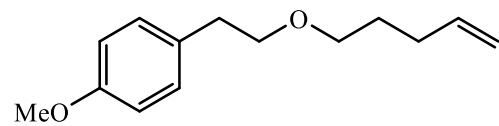
^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de 30

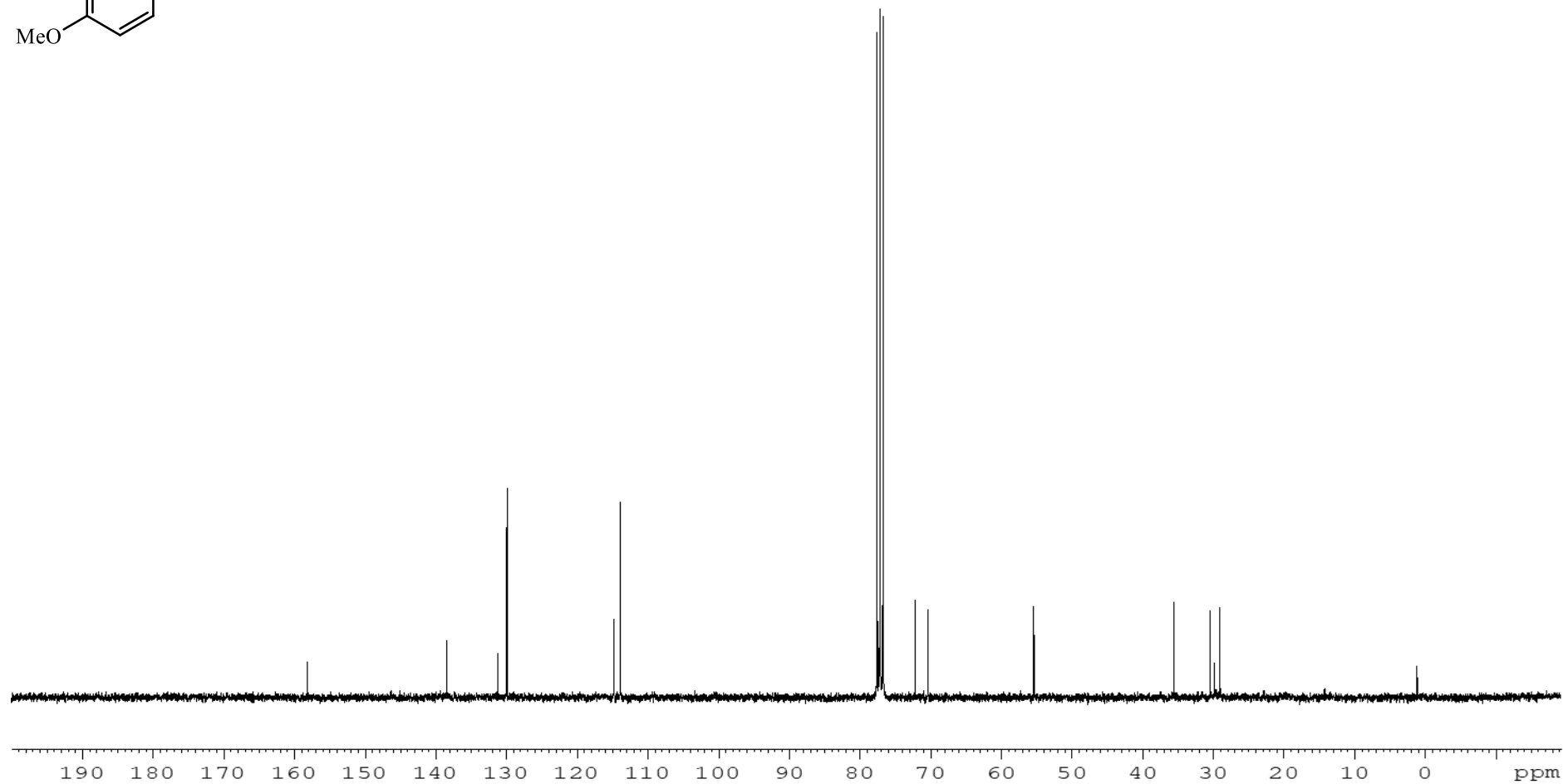
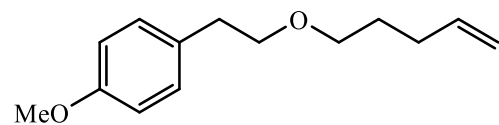
Compuesto 31¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) de **31**



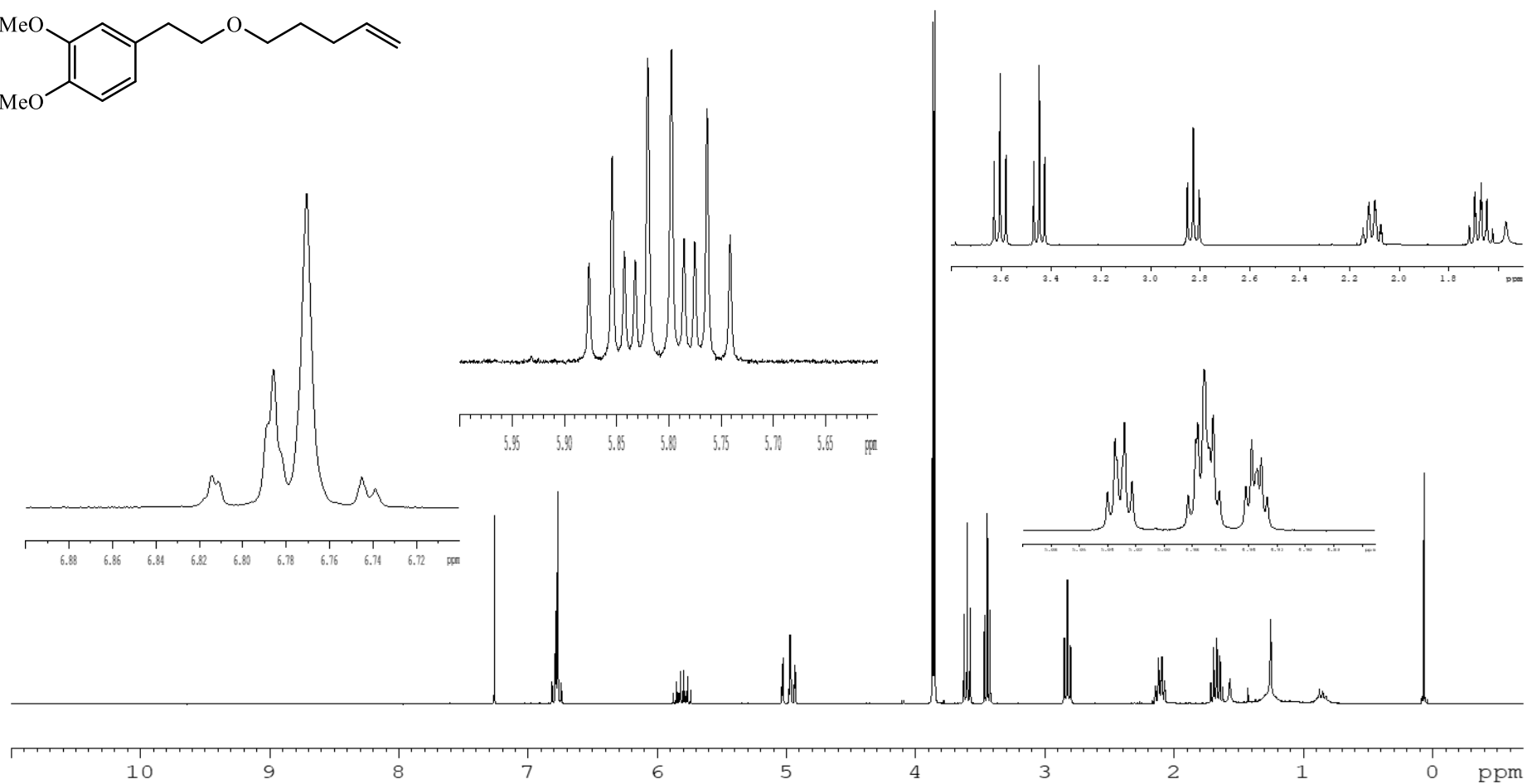
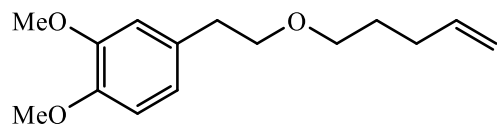
^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de **31**

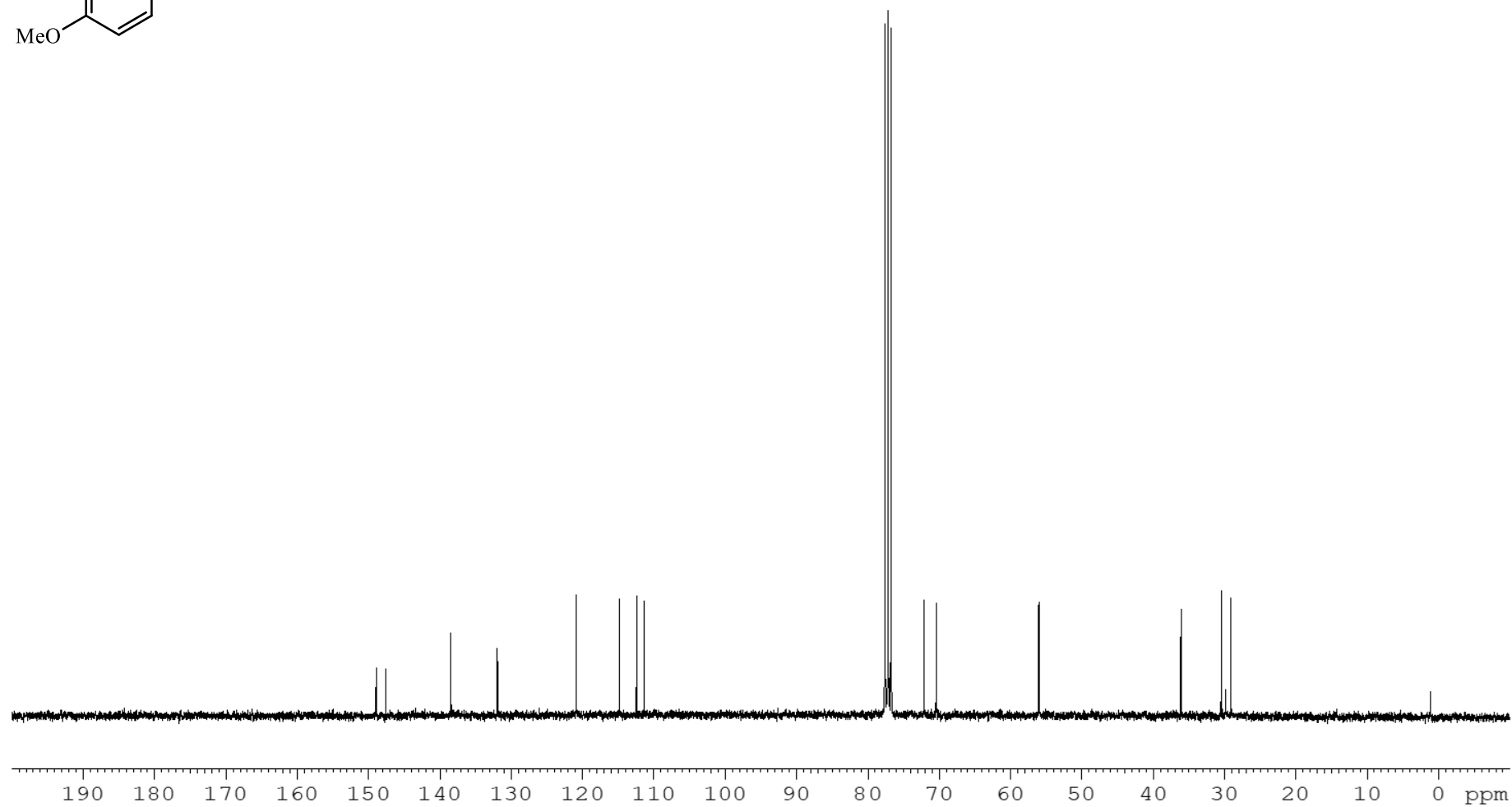
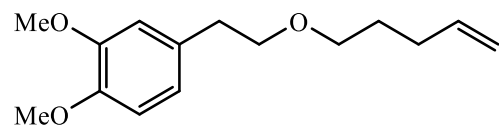
Compuesto 32 ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de **32**

Compuesto 33 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) de **33**

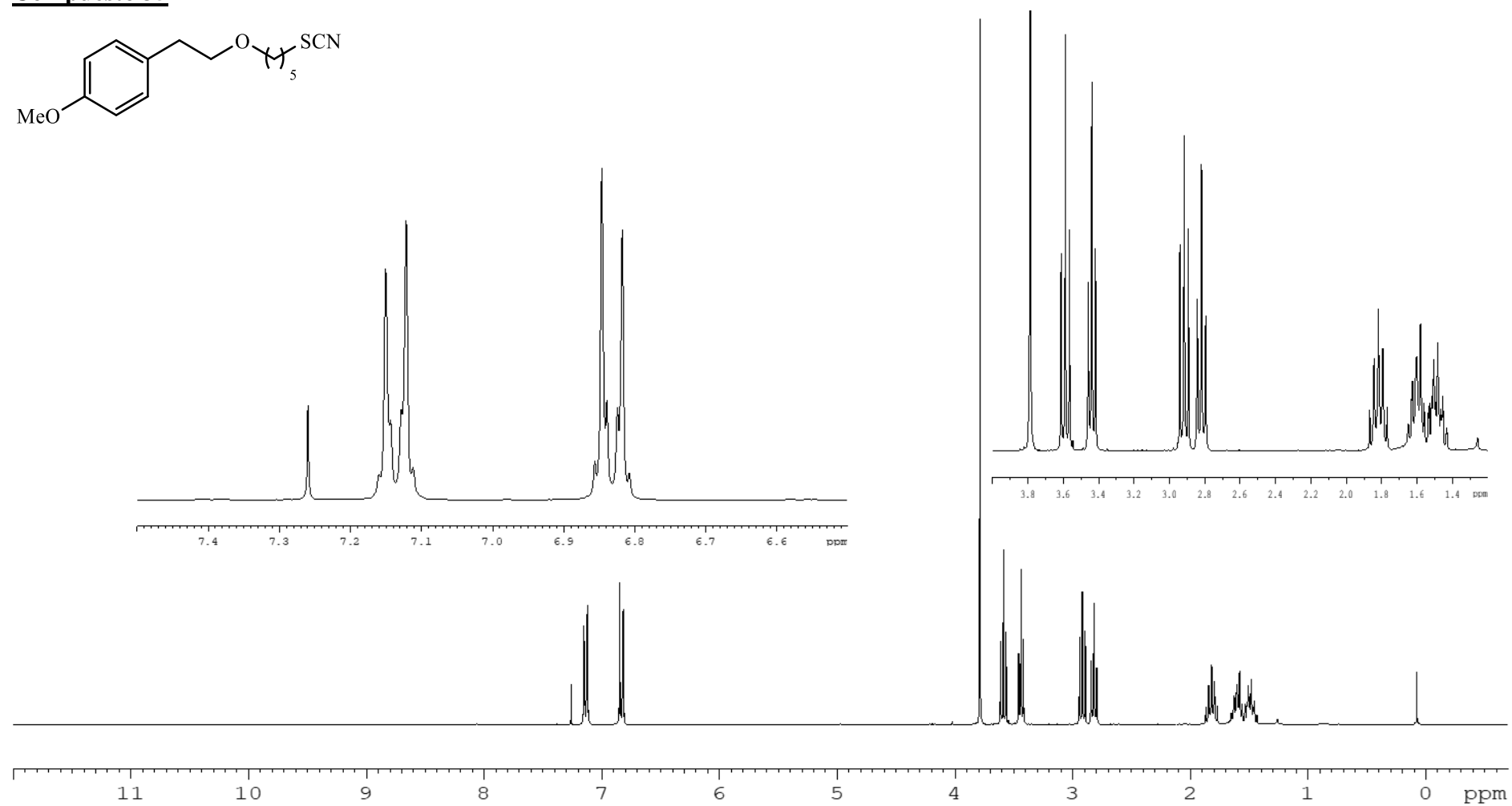
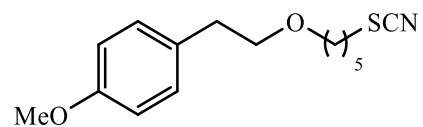


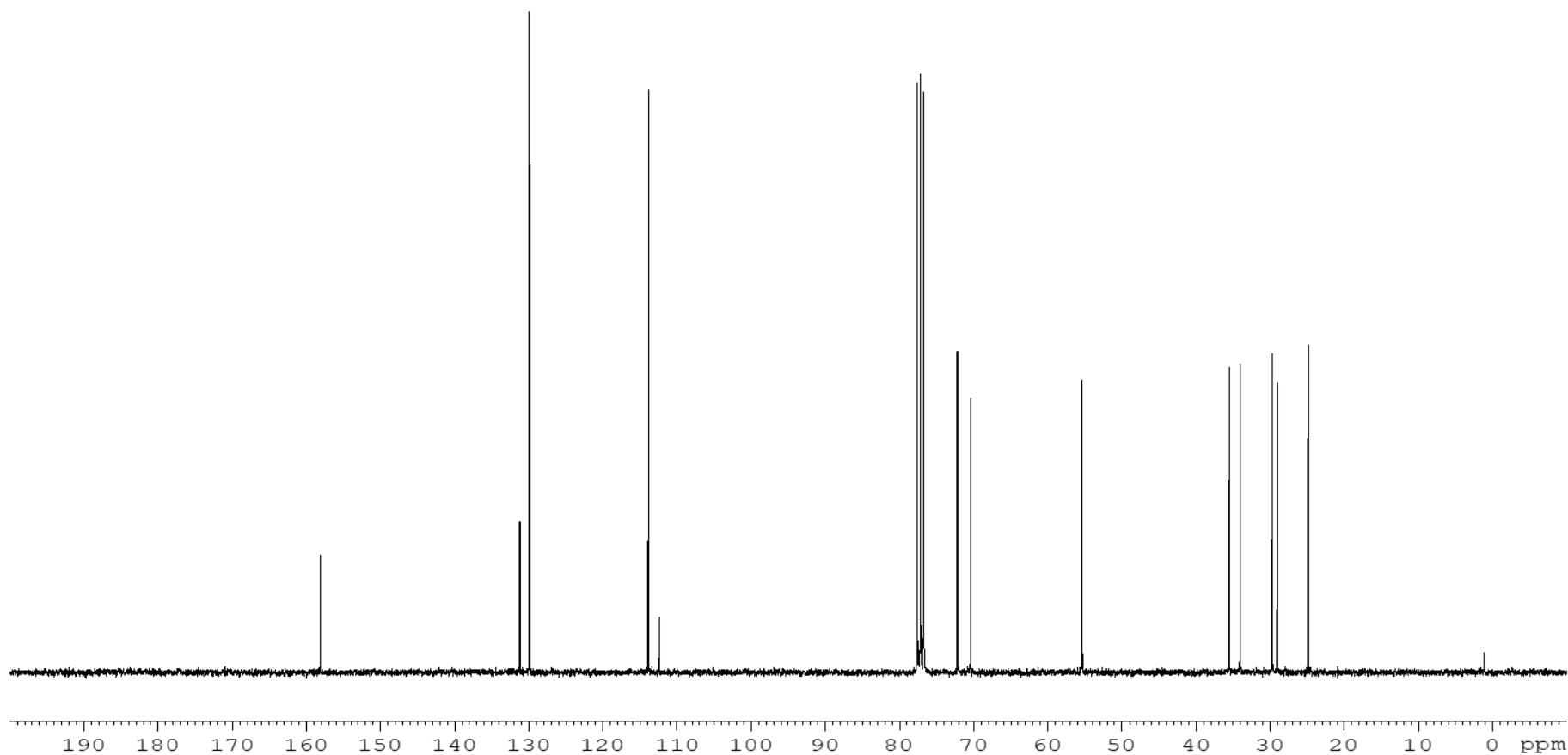
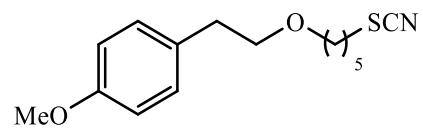
^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de 33

Compuesto 34 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) de **34**

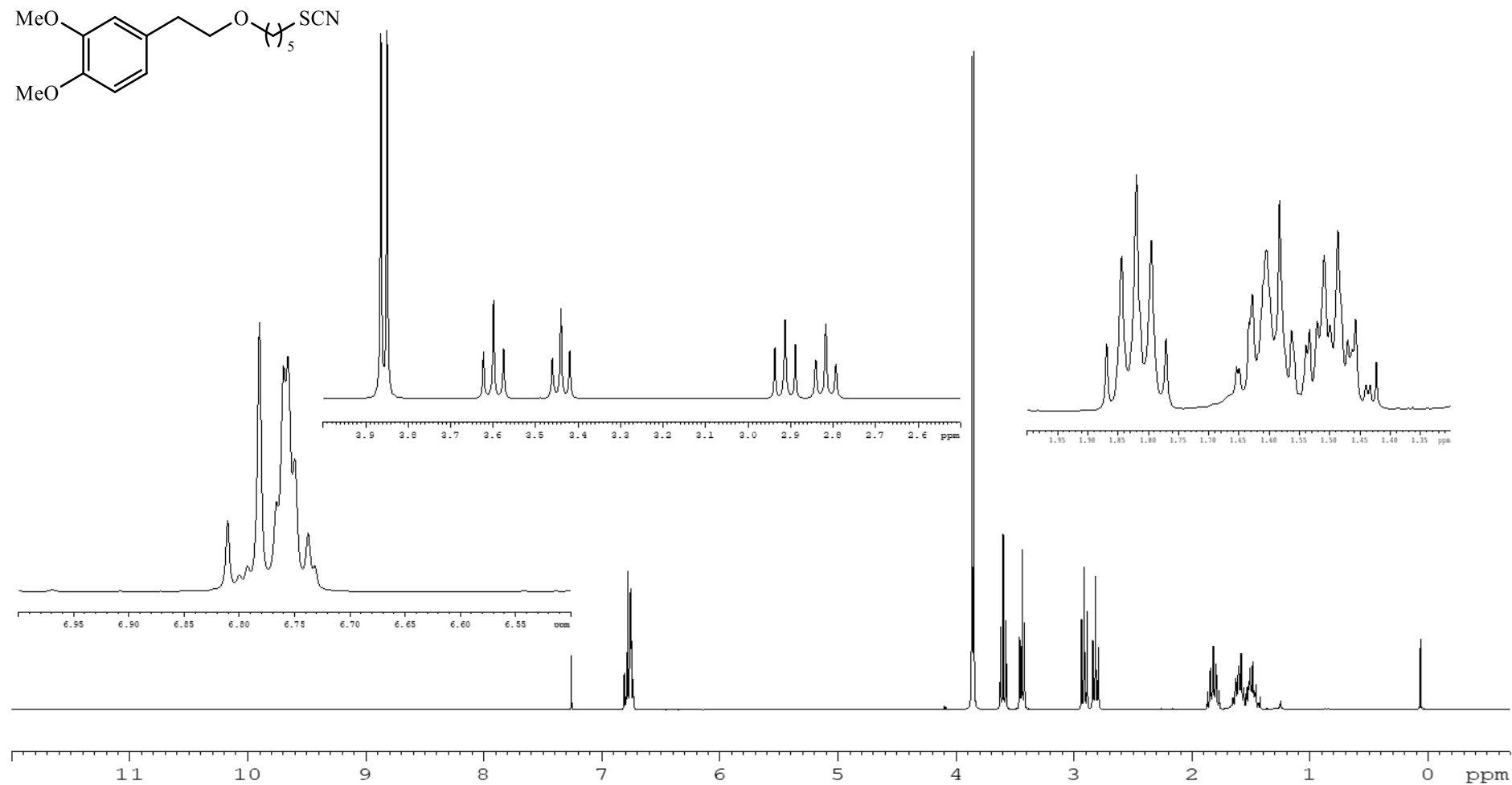
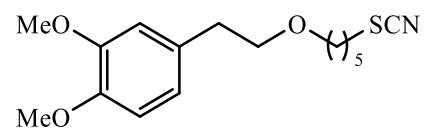


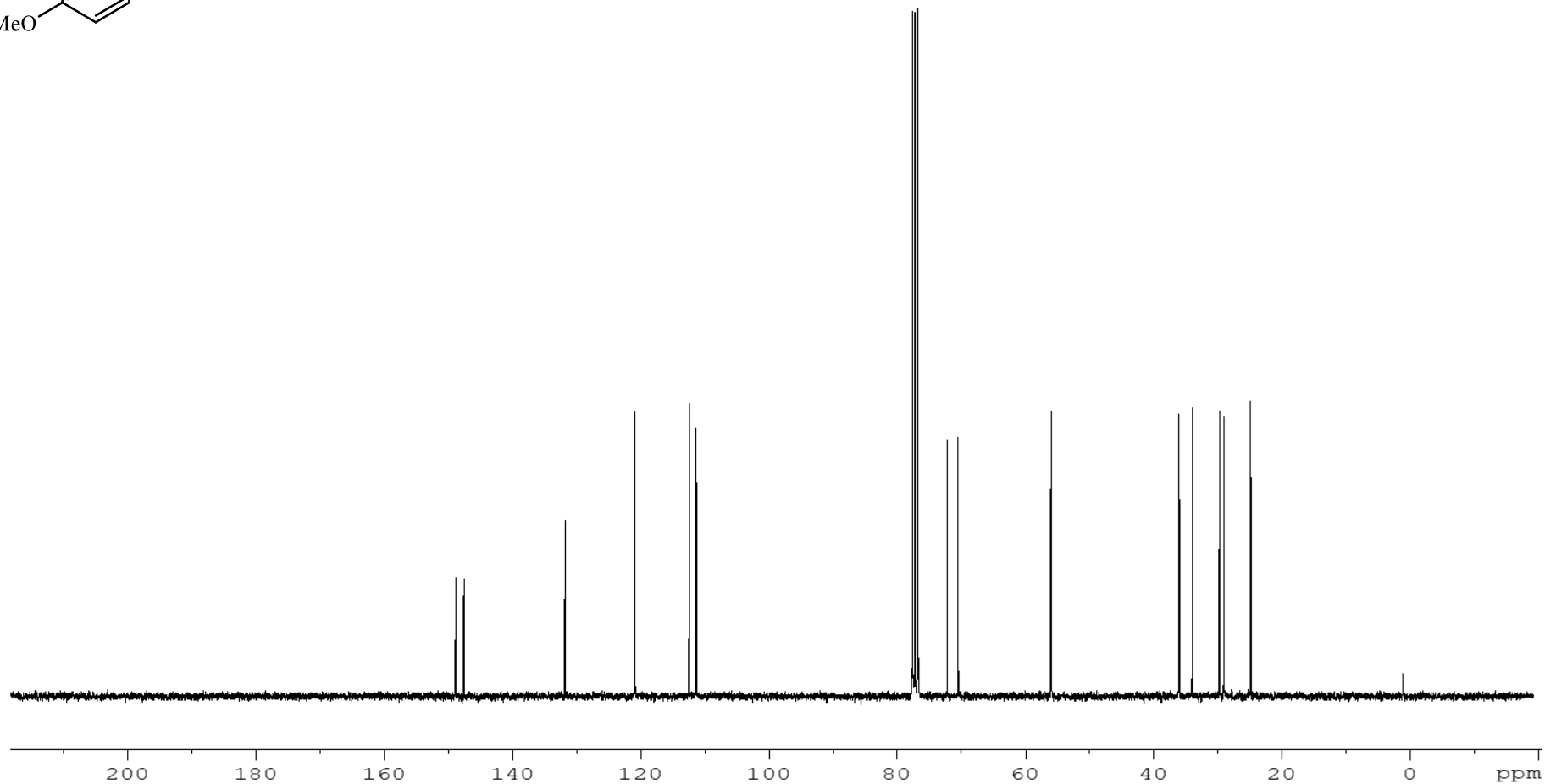
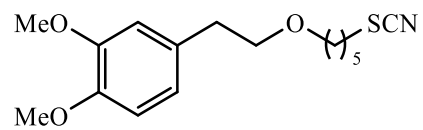
^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de 34

Compuesto 35 ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de **35**

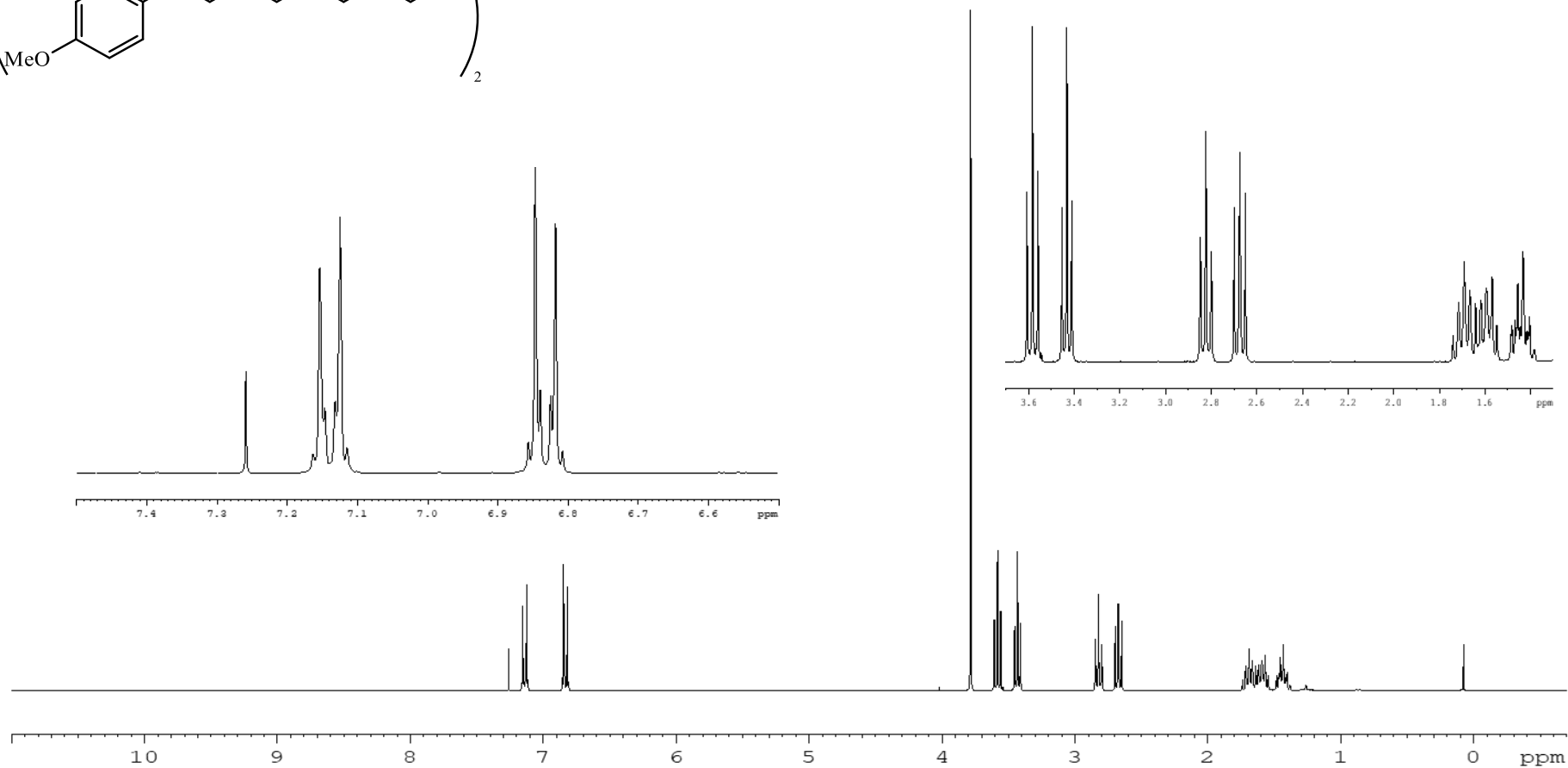
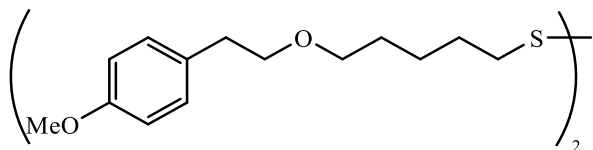


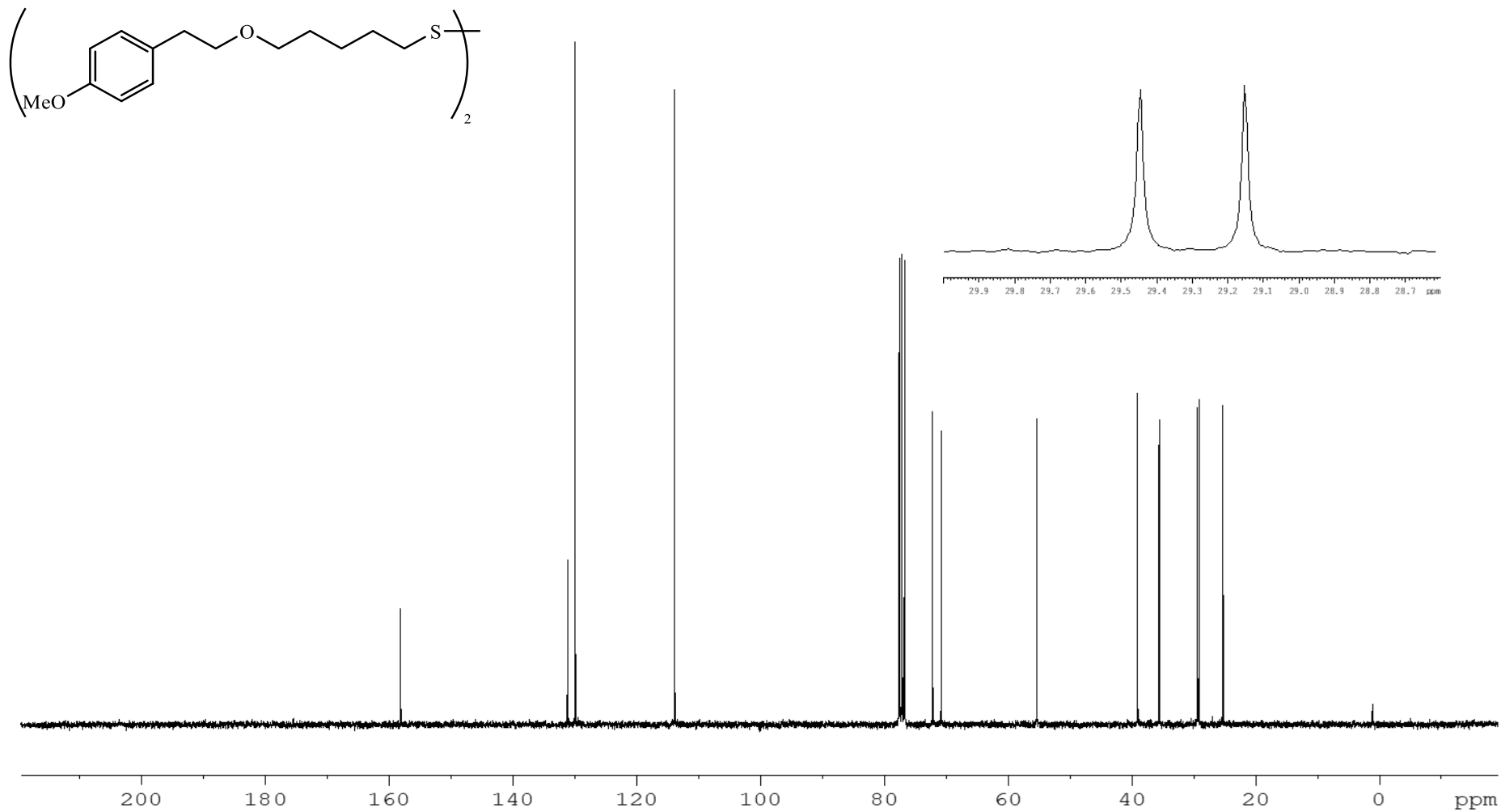
^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de 35

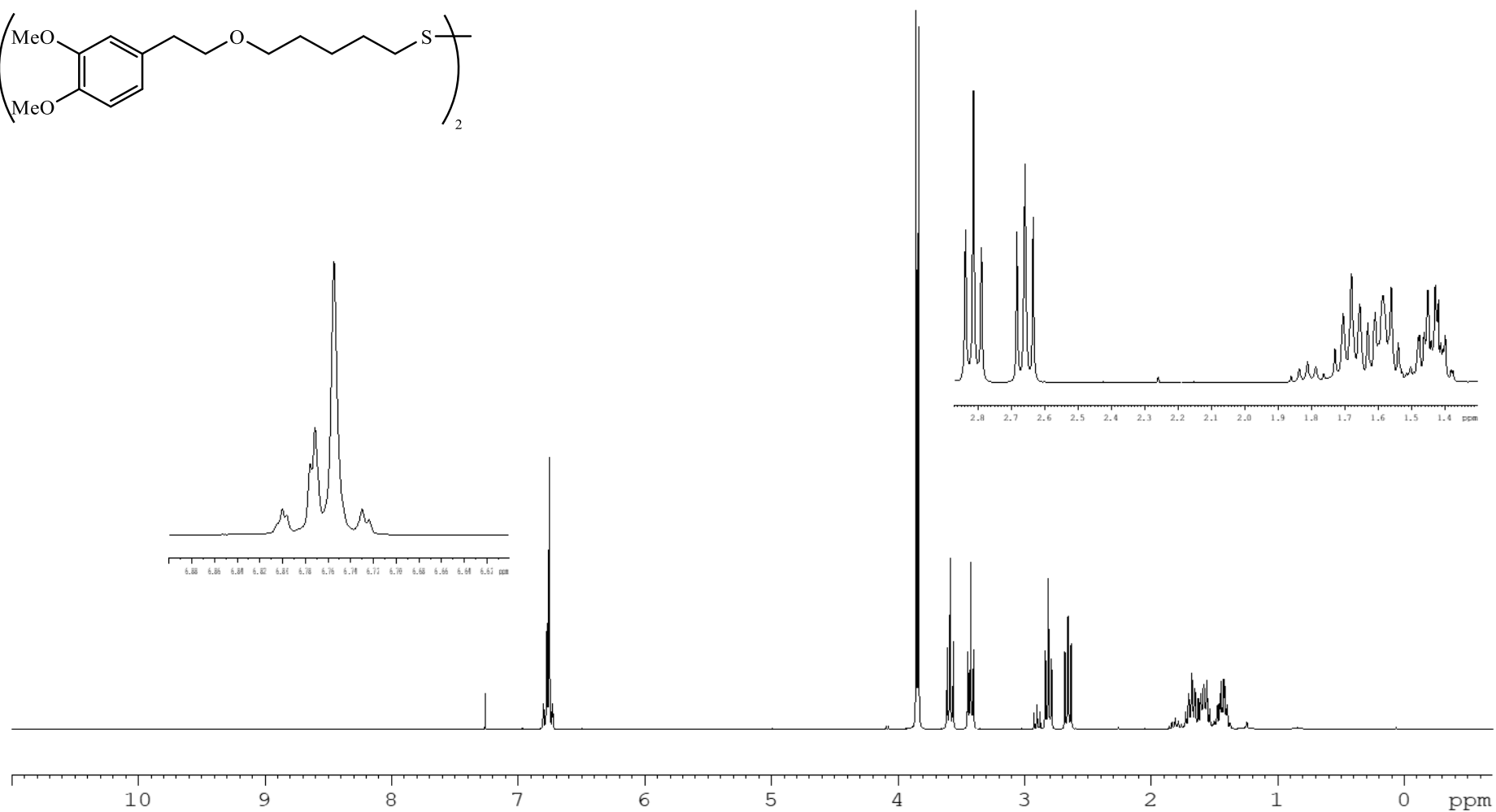
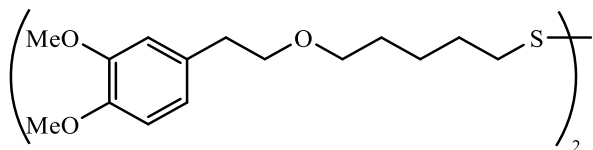
Compuesto 36 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) de **36**

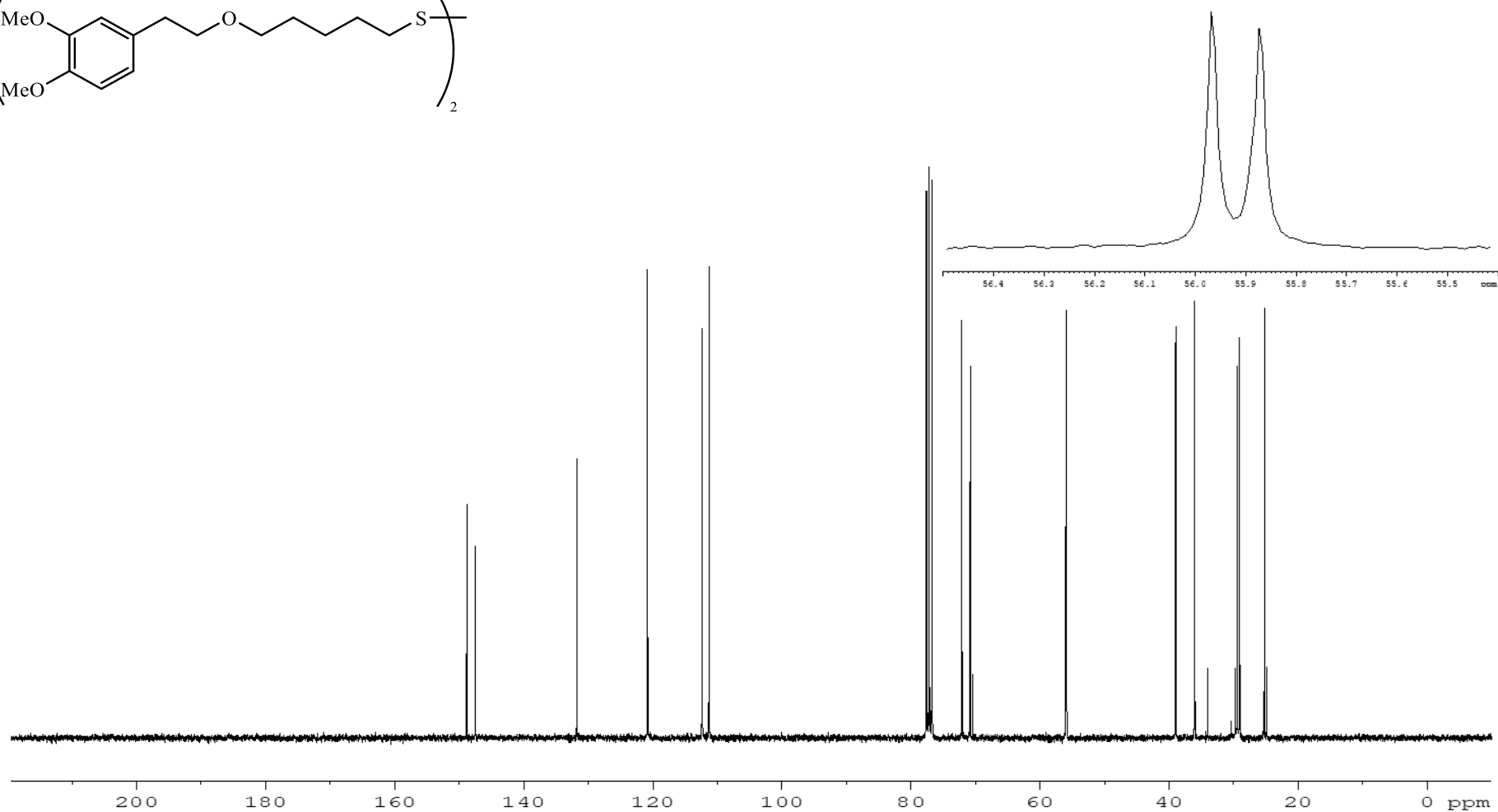
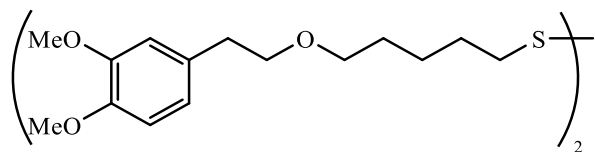


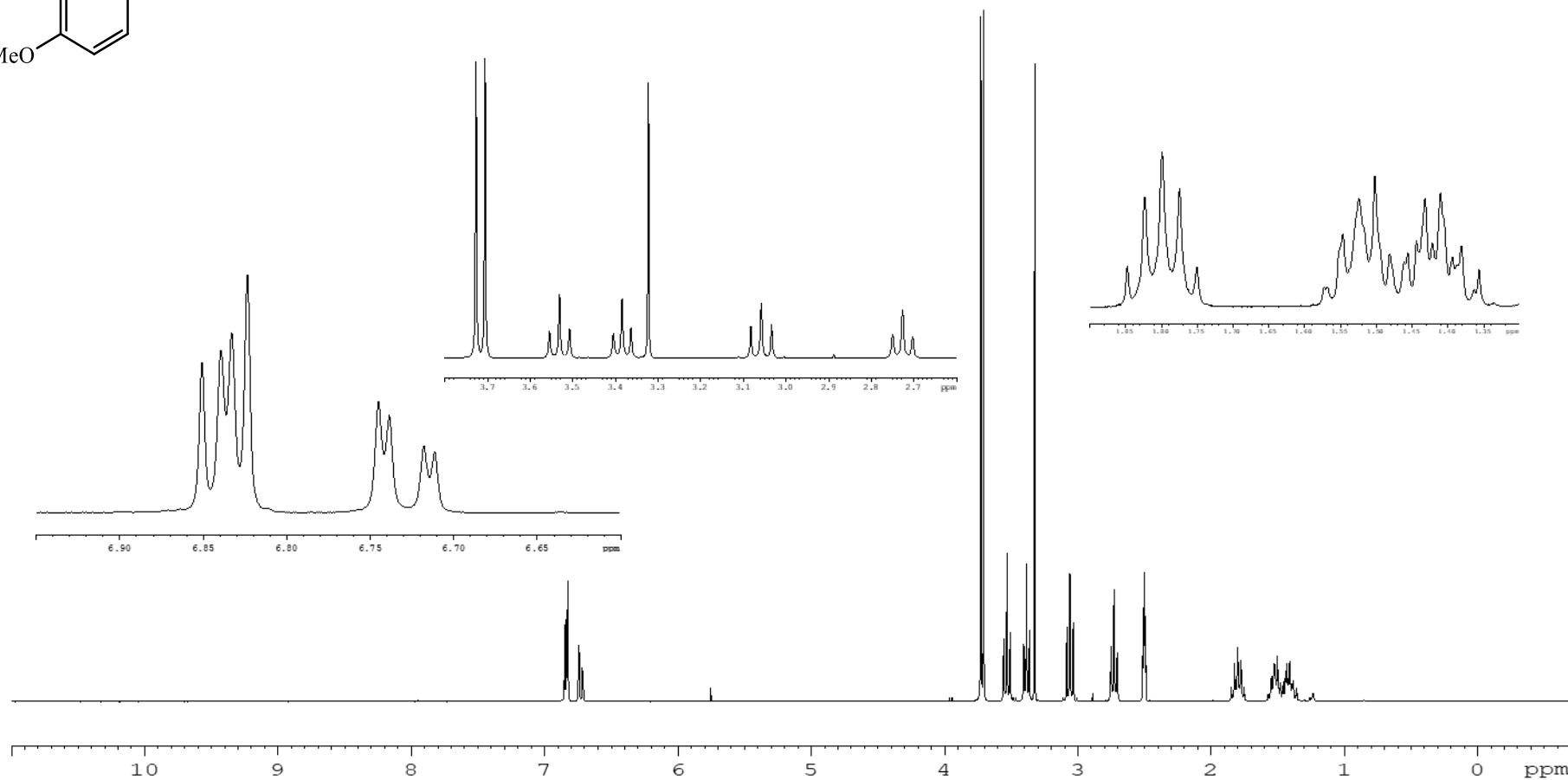
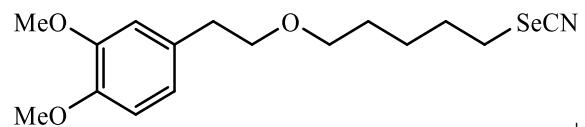
^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de **36**

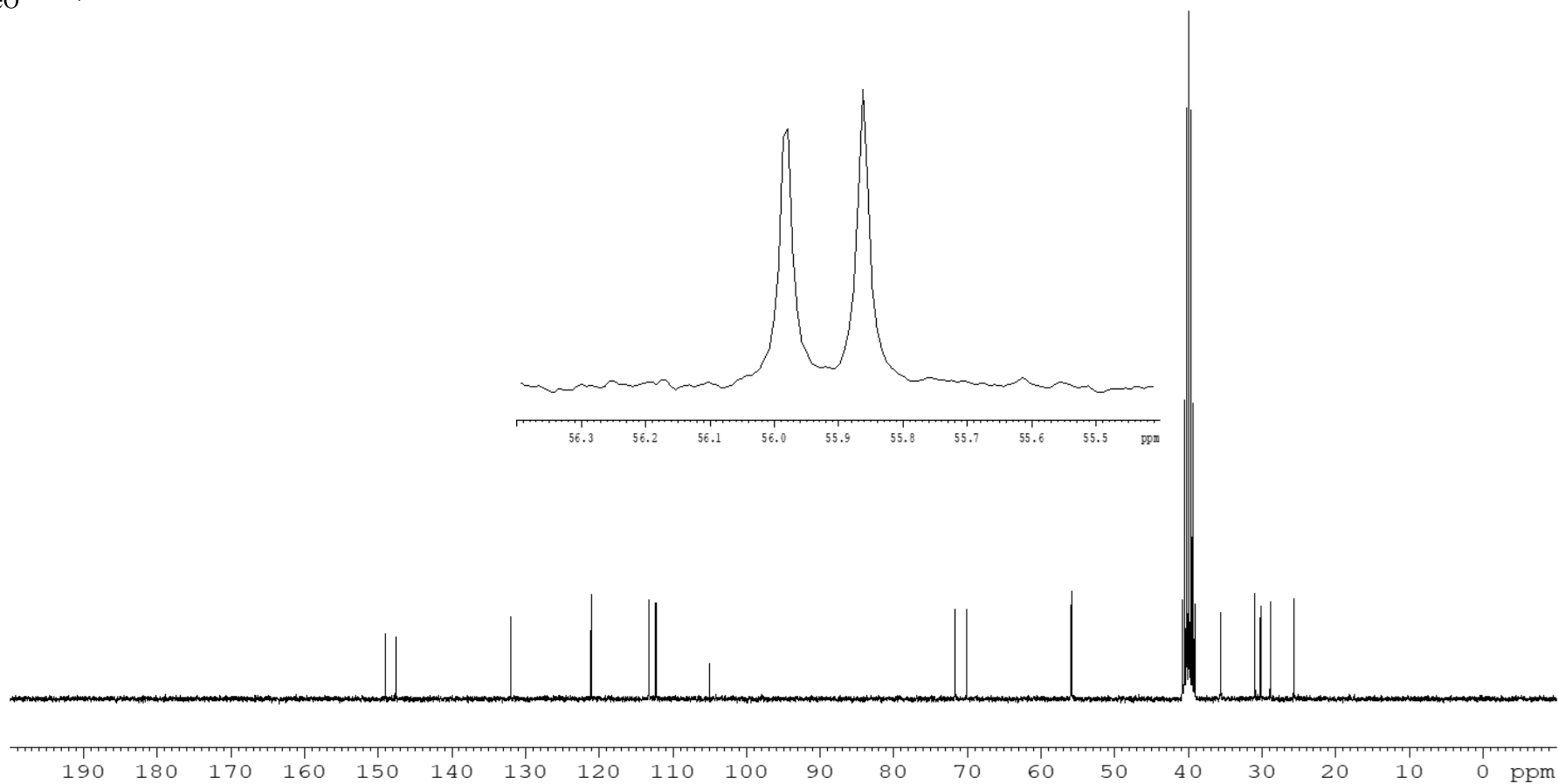
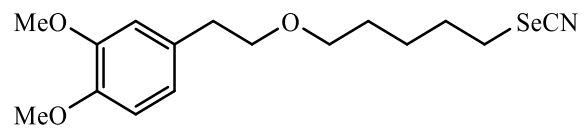
Compuesto 37 ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de **37**

 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de **37**

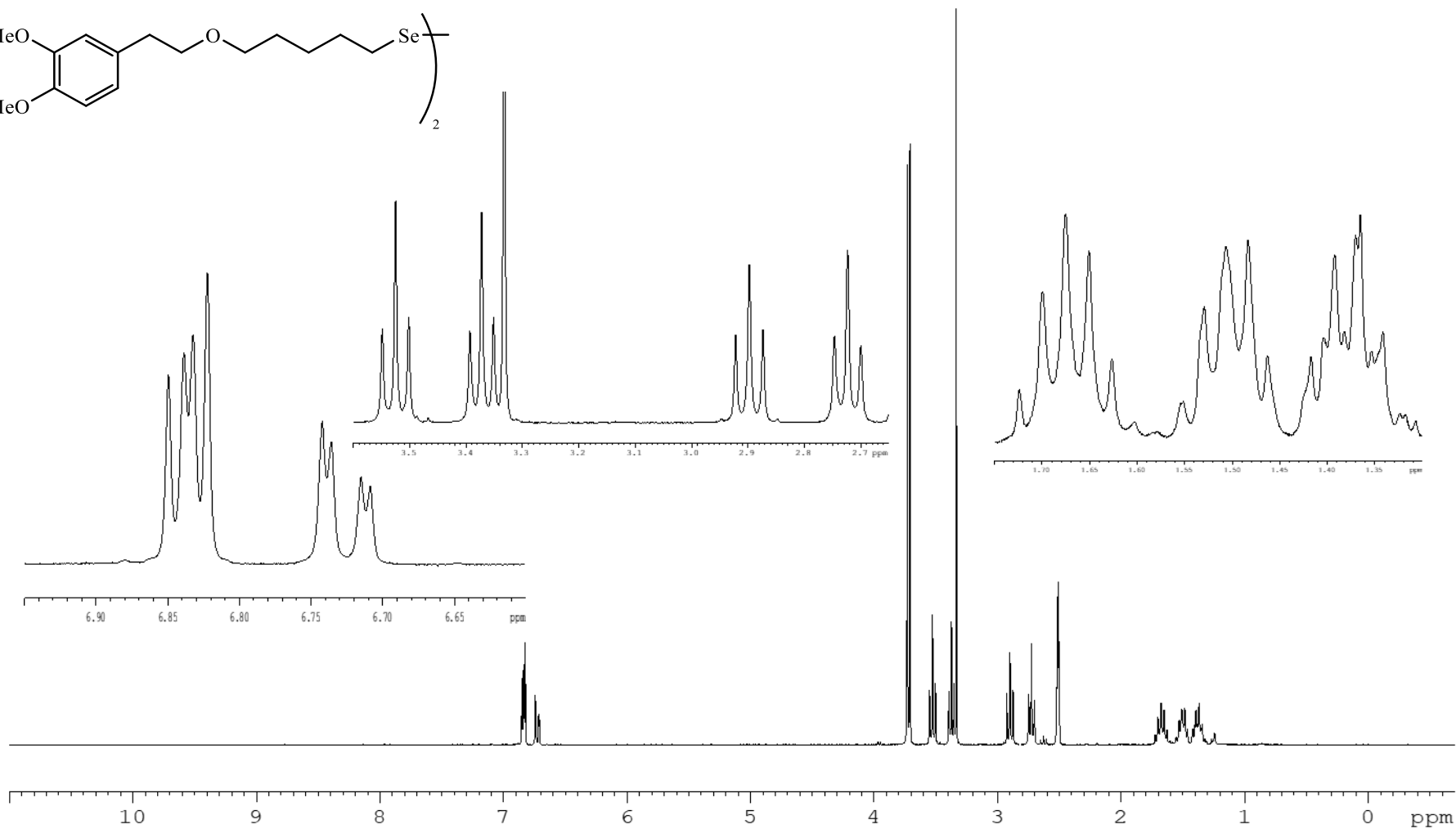
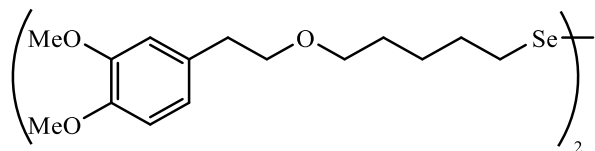
Compuesto 38 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) de **38**

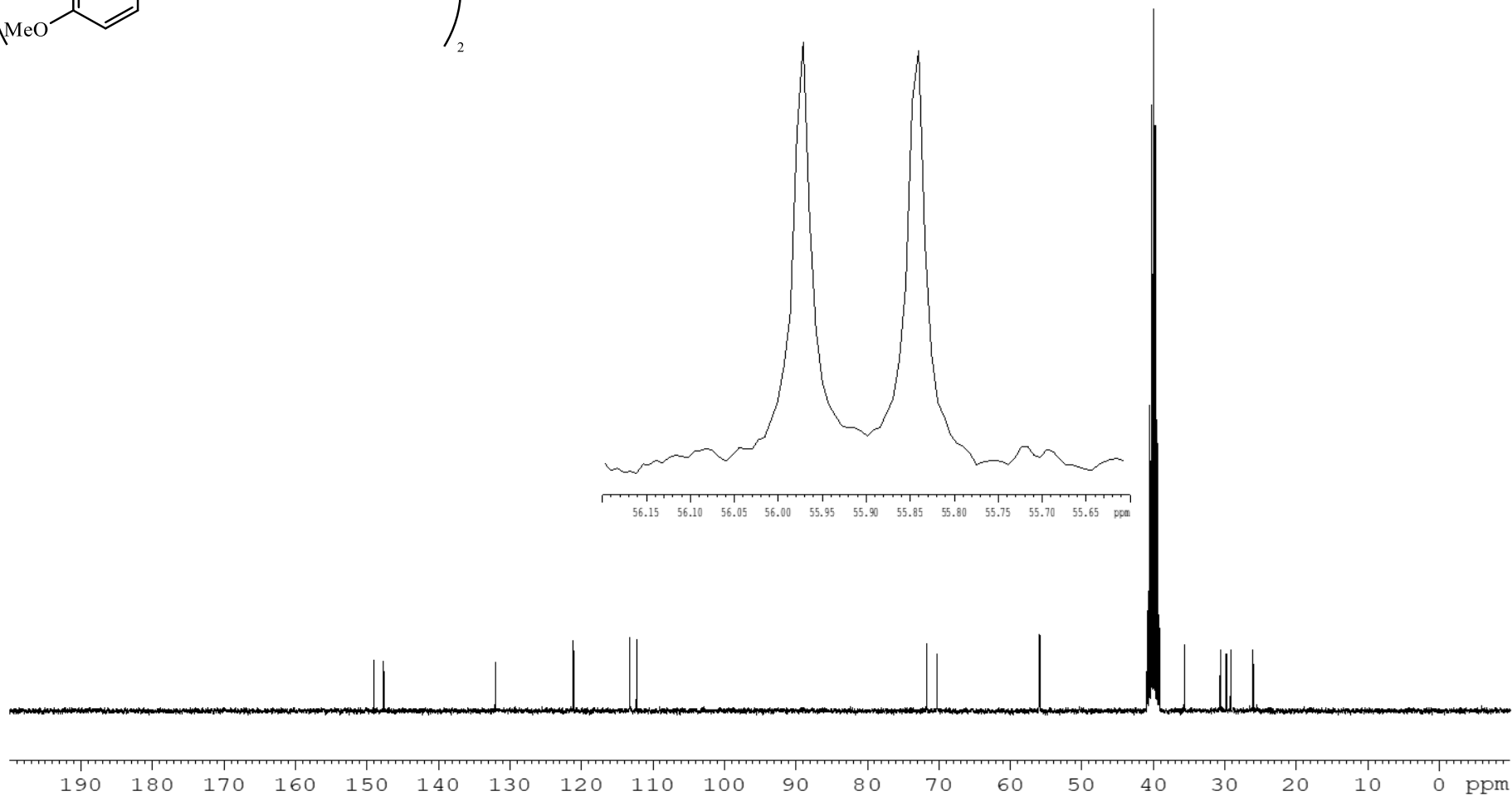
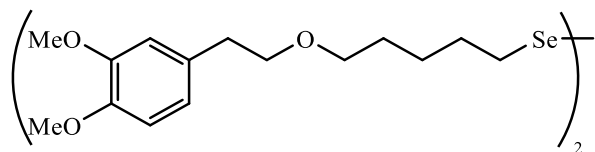


Compuesto 39 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **39**

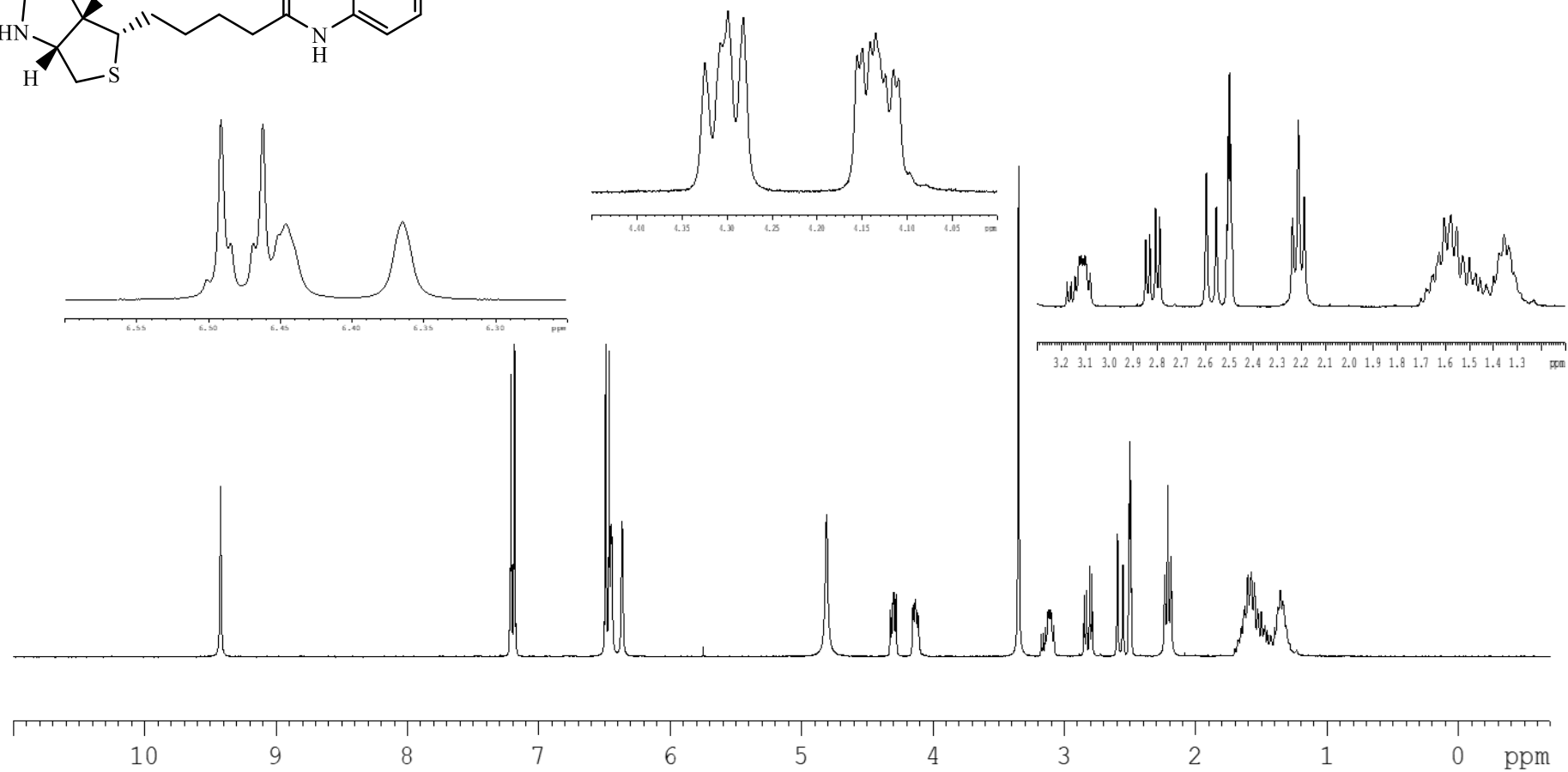
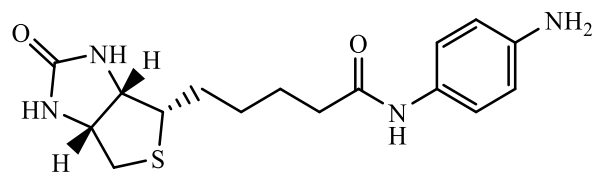


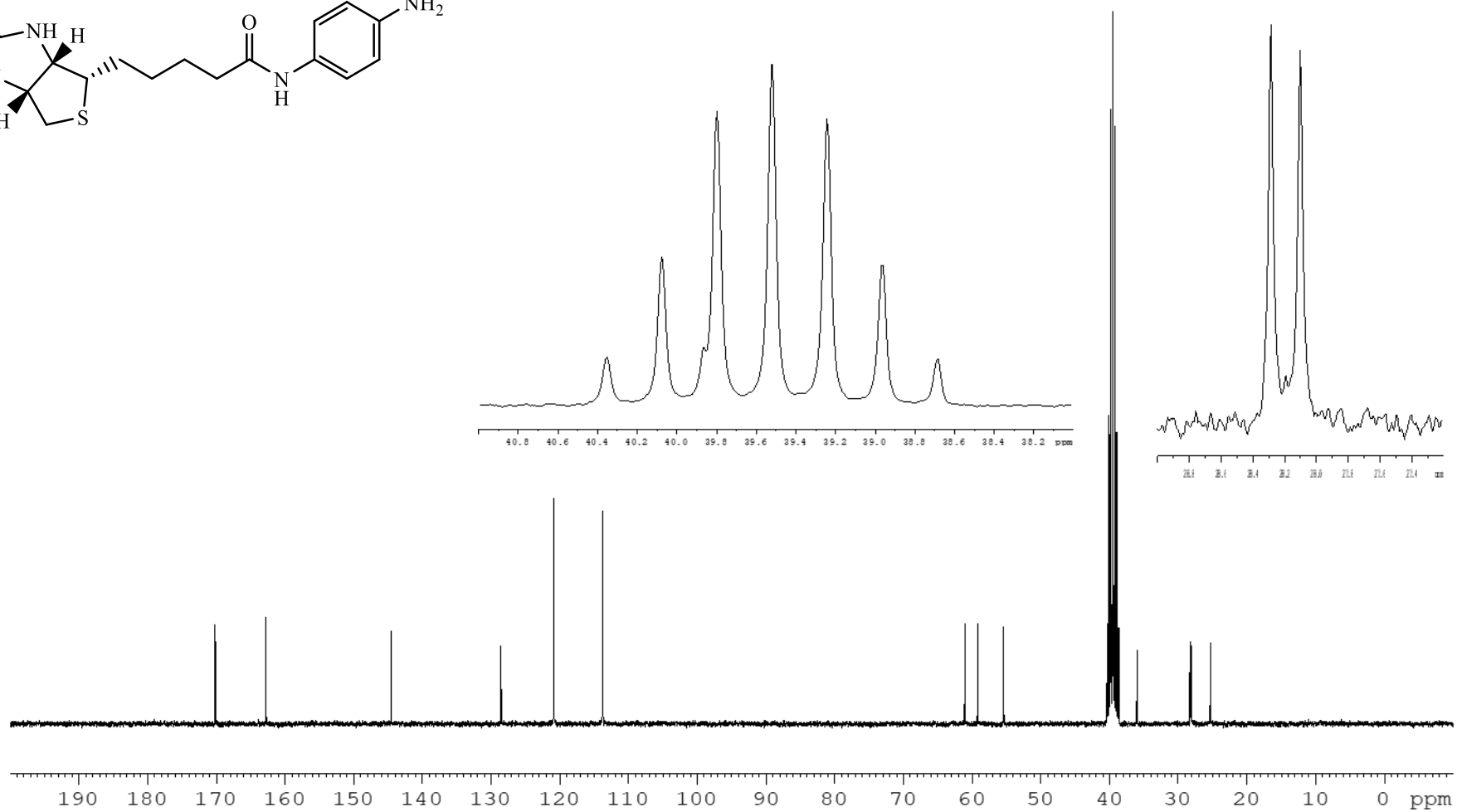
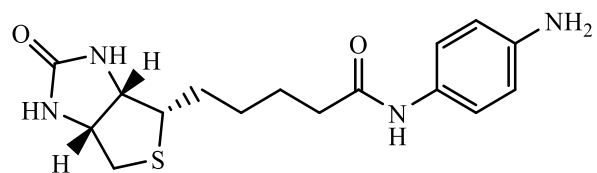
^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **39**

Compuesto 40 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **40**

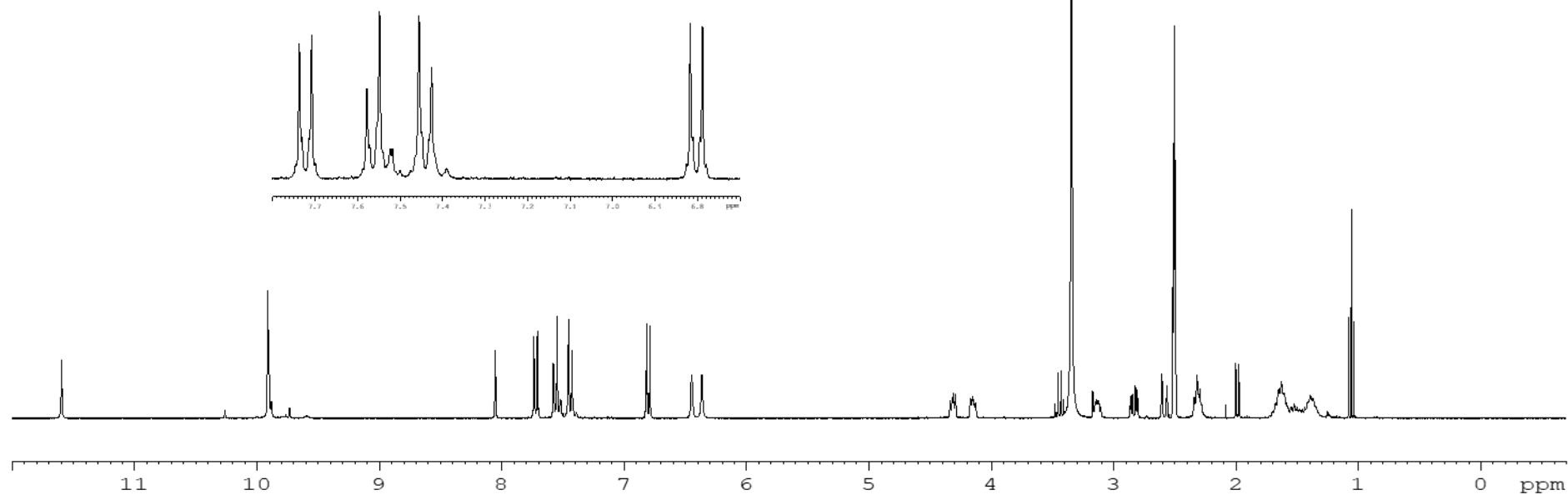
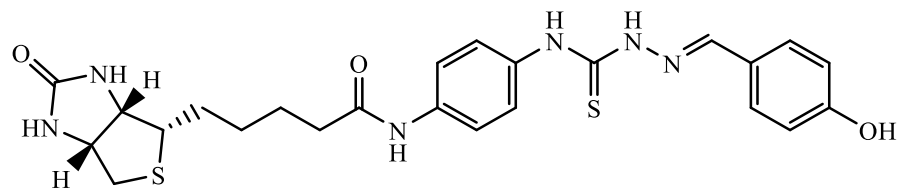


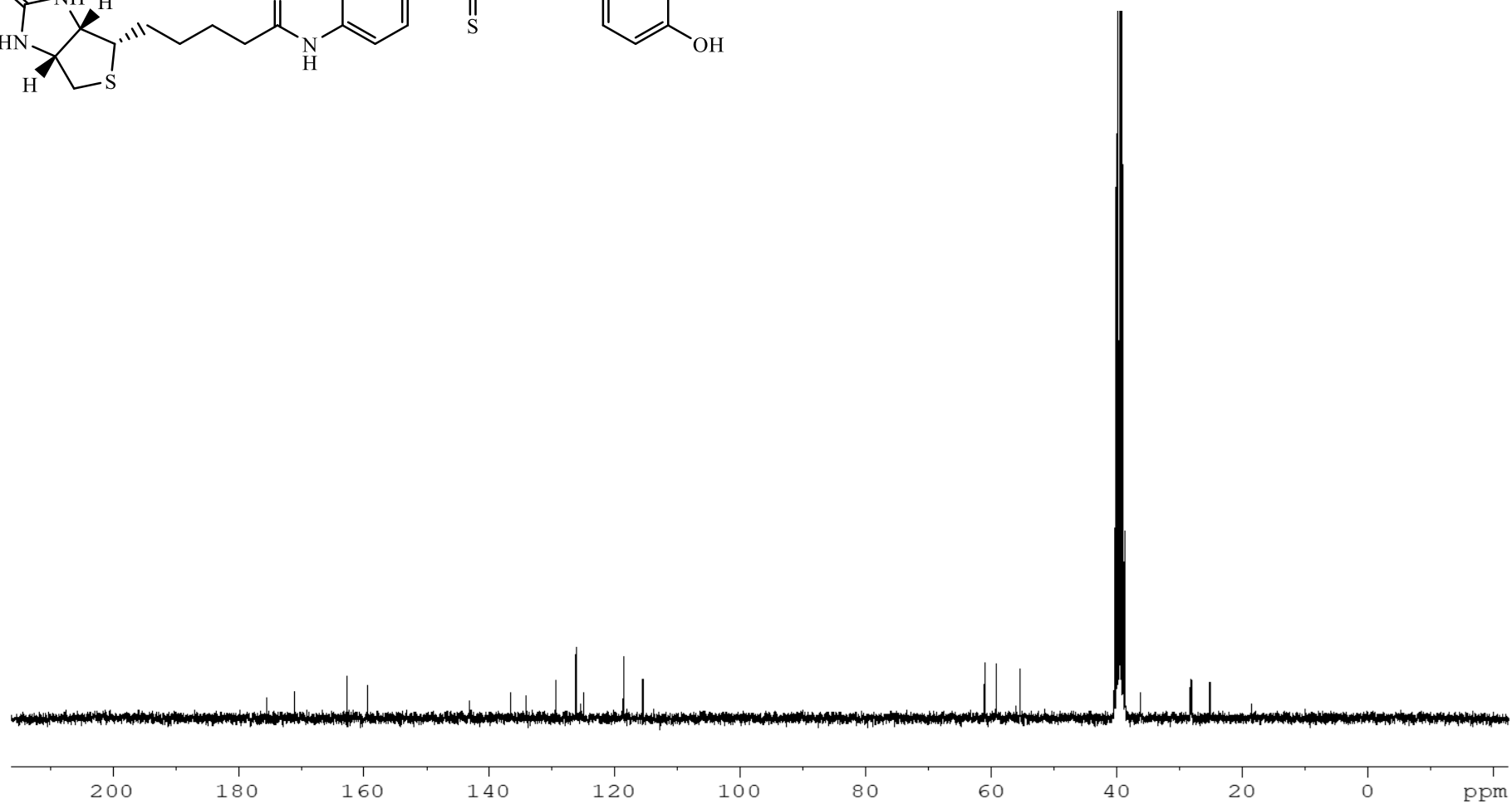
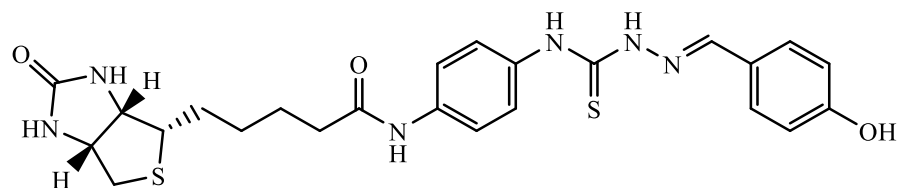
^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **40**

Compuesto 41¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) de **41**

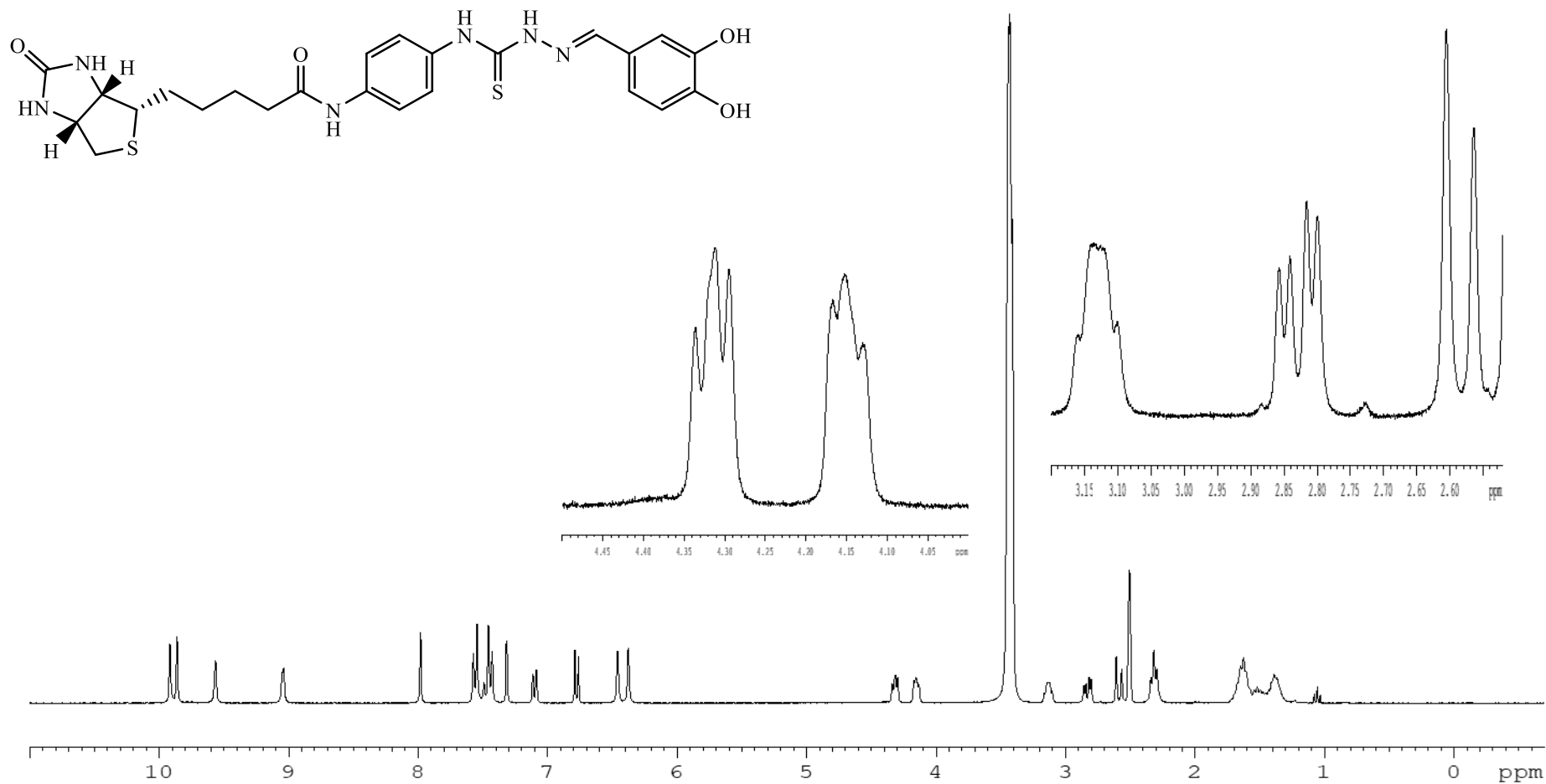


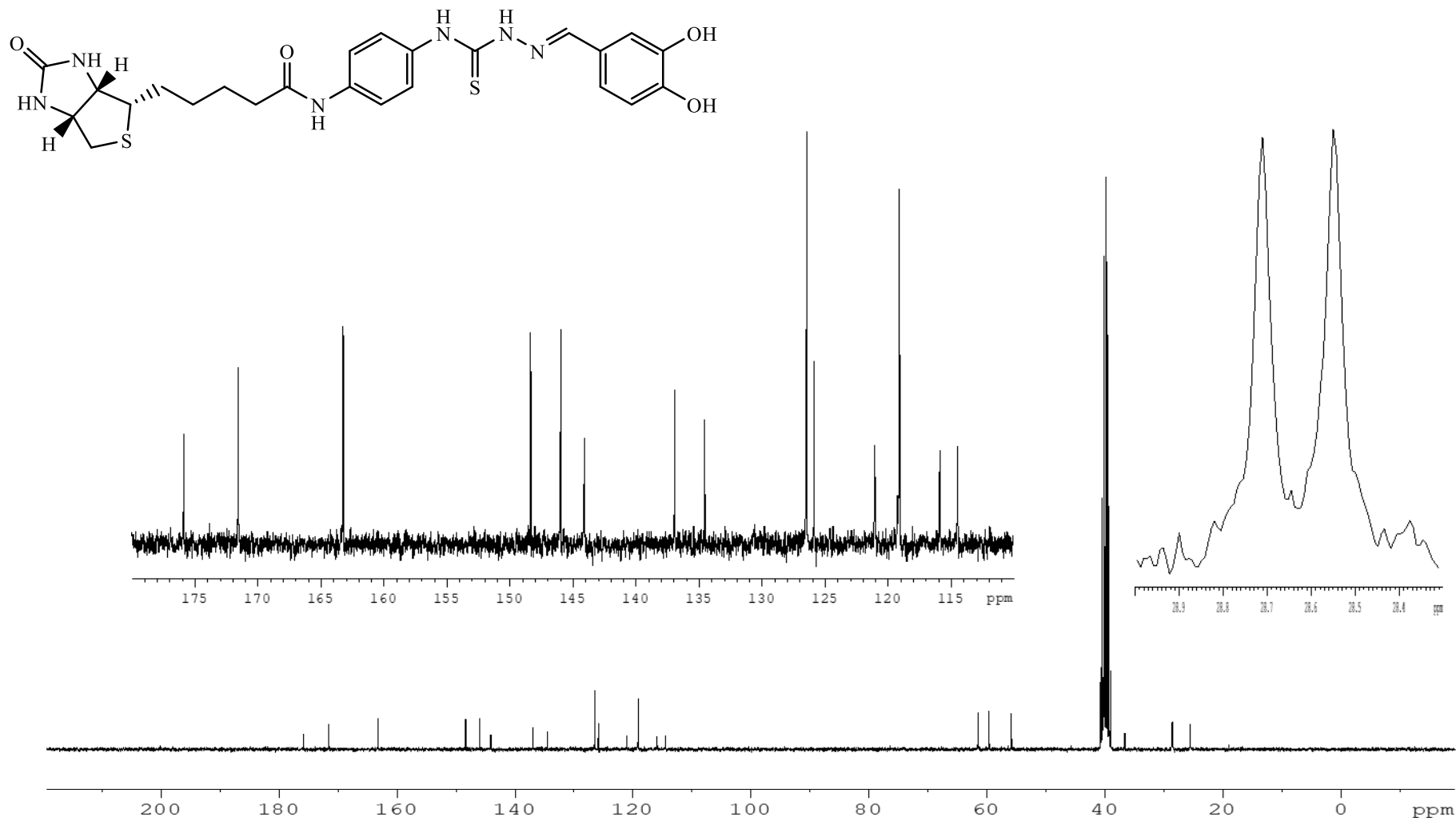
¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) de **41**

Compuesto 42¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) de **42**

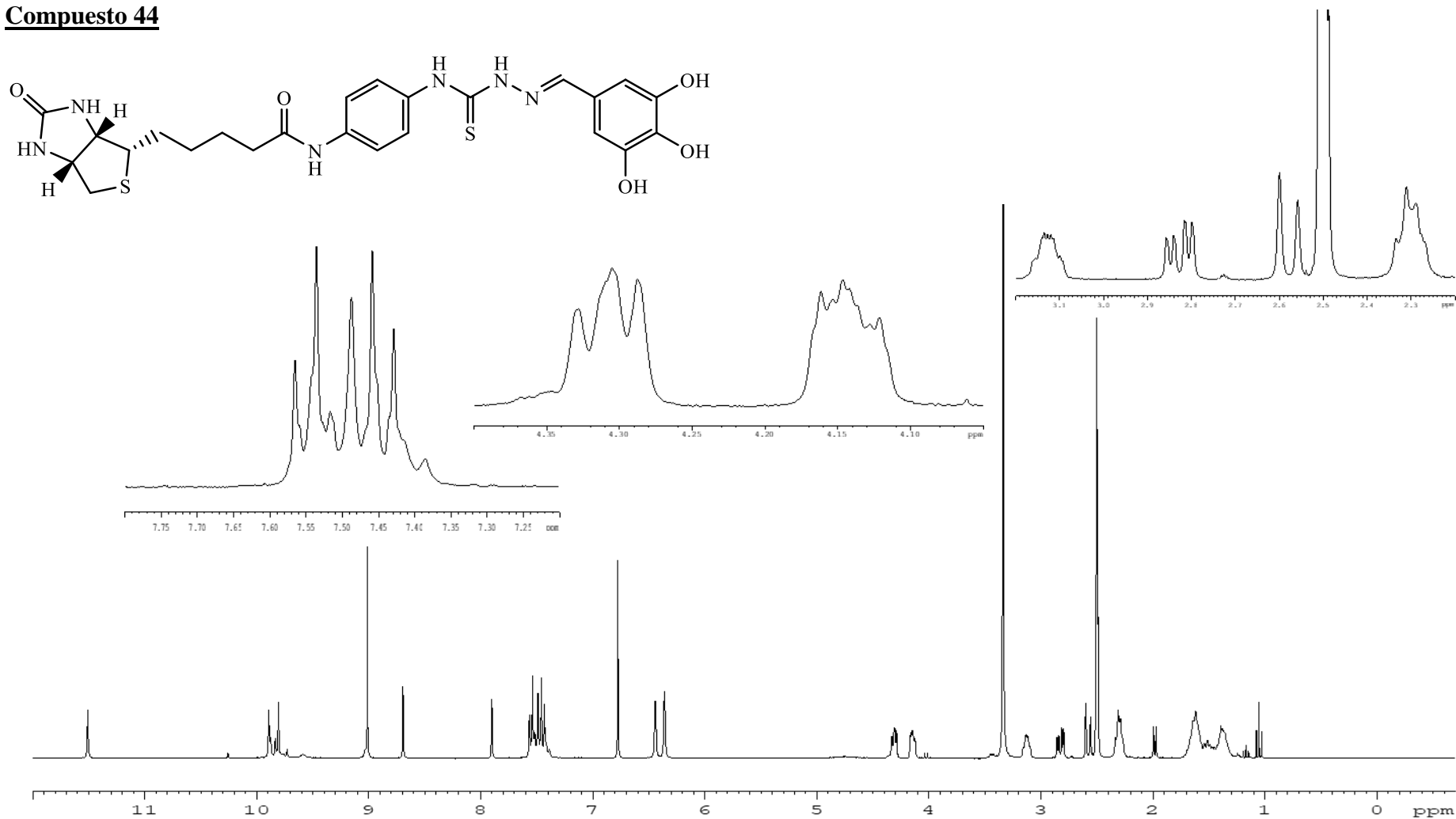


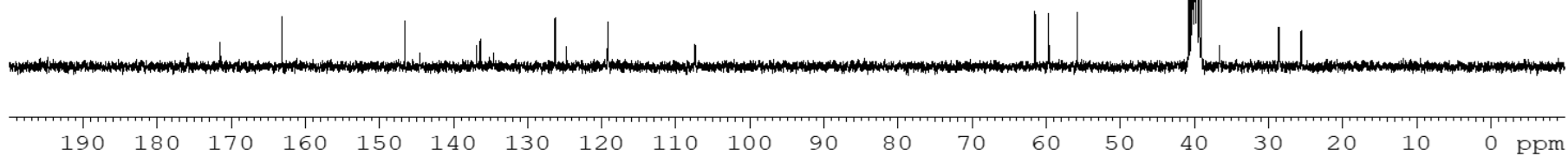
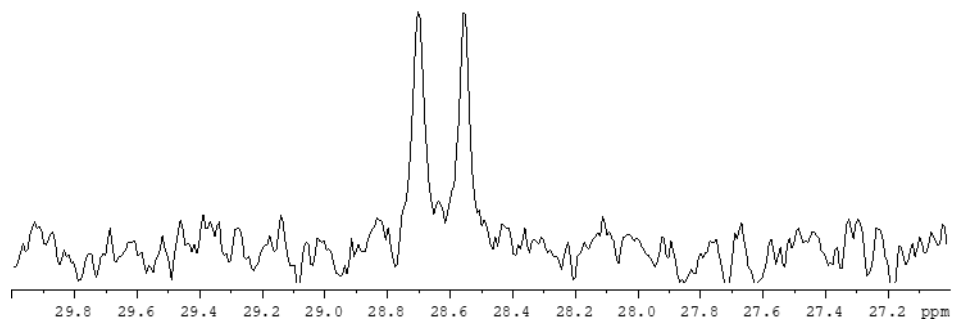
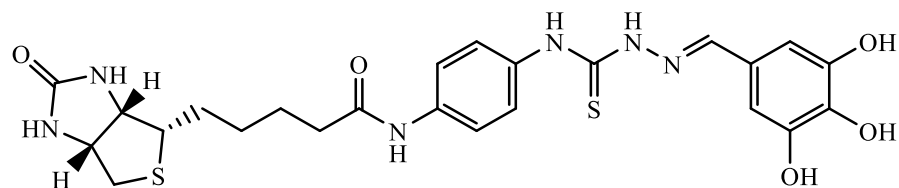
¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) de **42**

Compuesto 43 ^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **43**

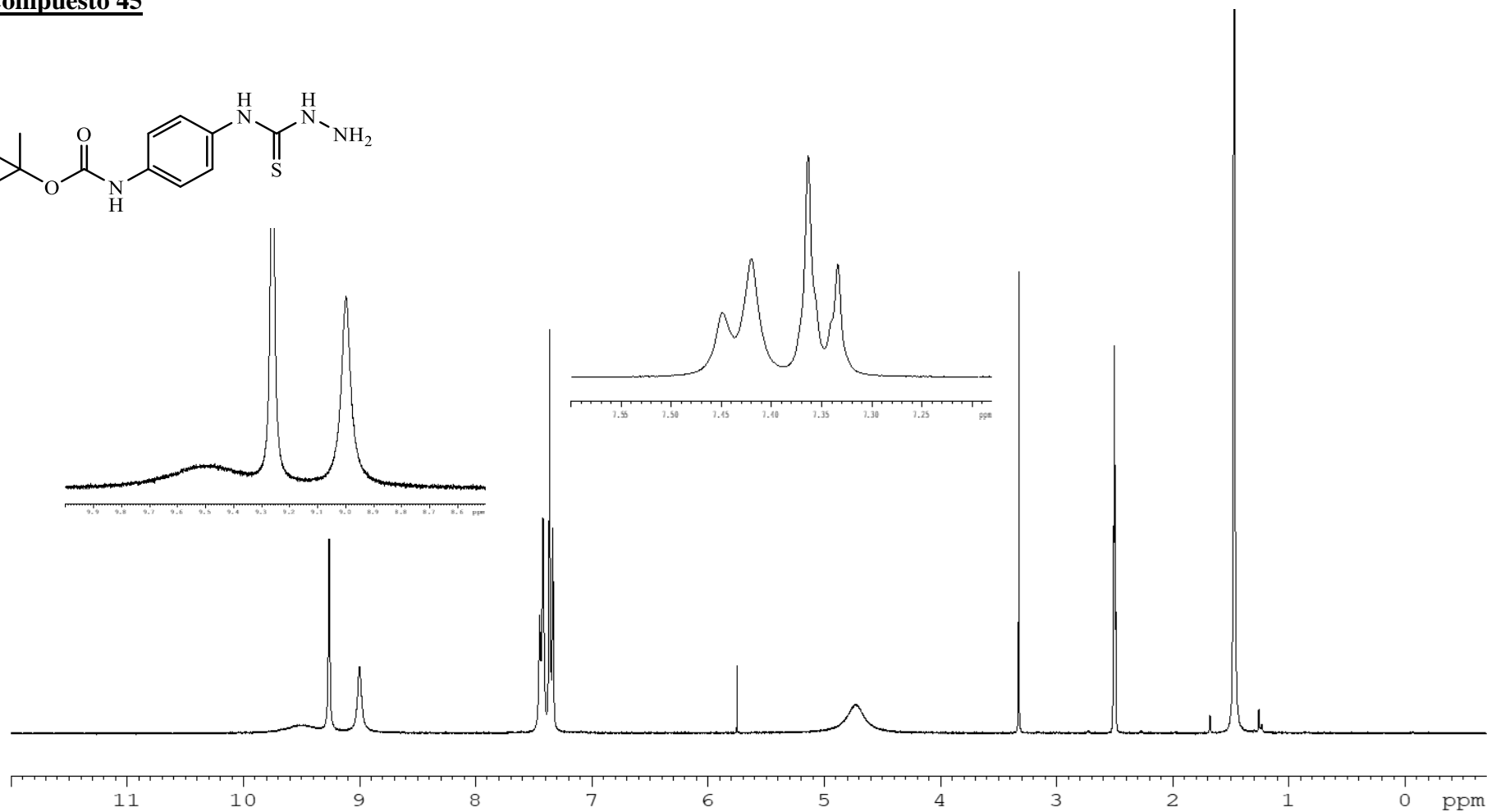
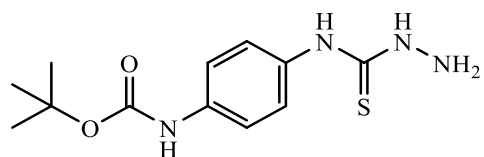


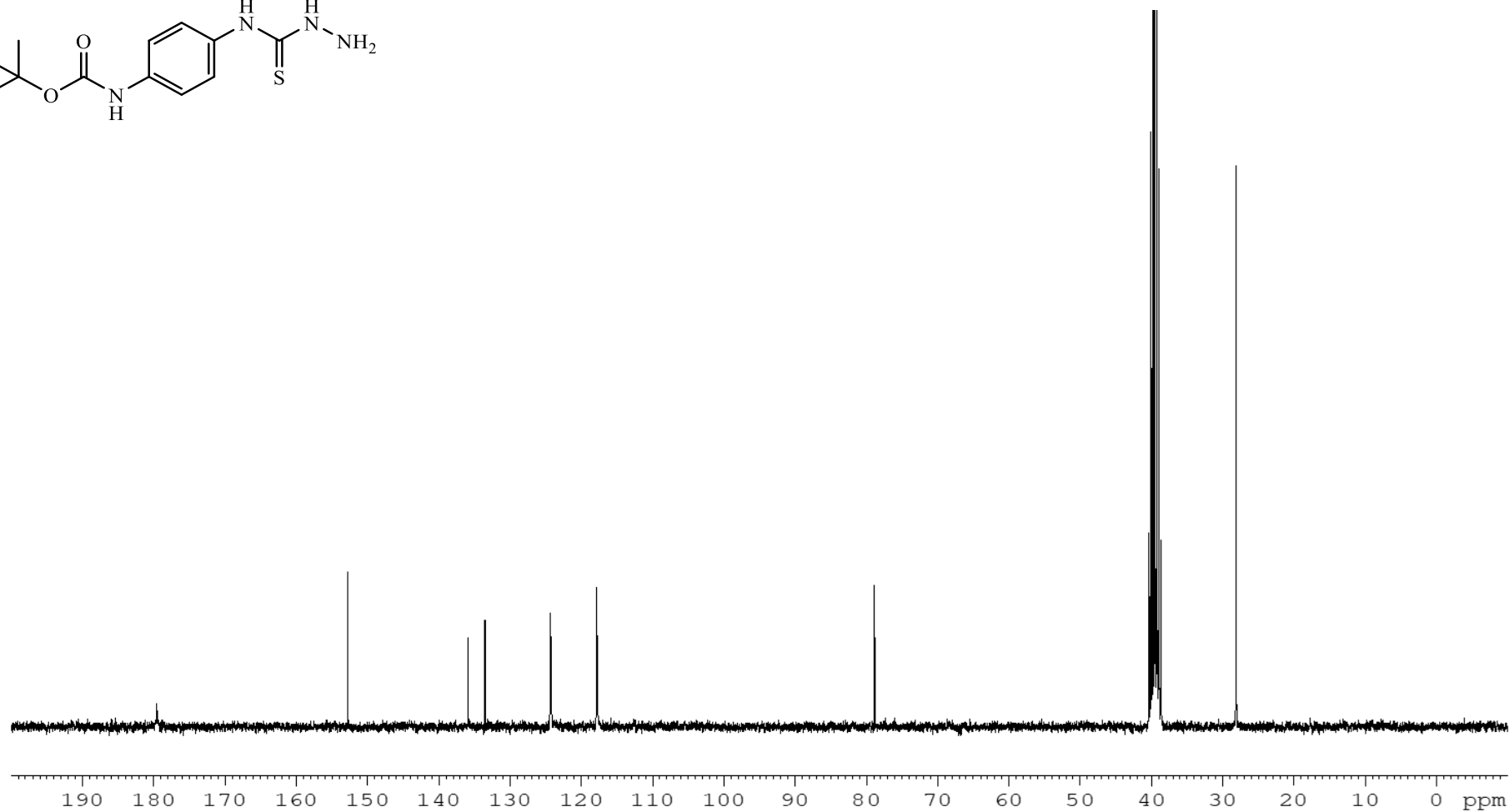
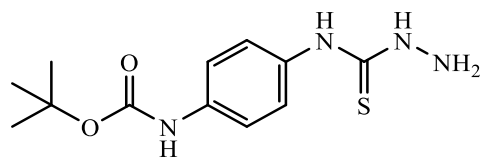
^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **43**

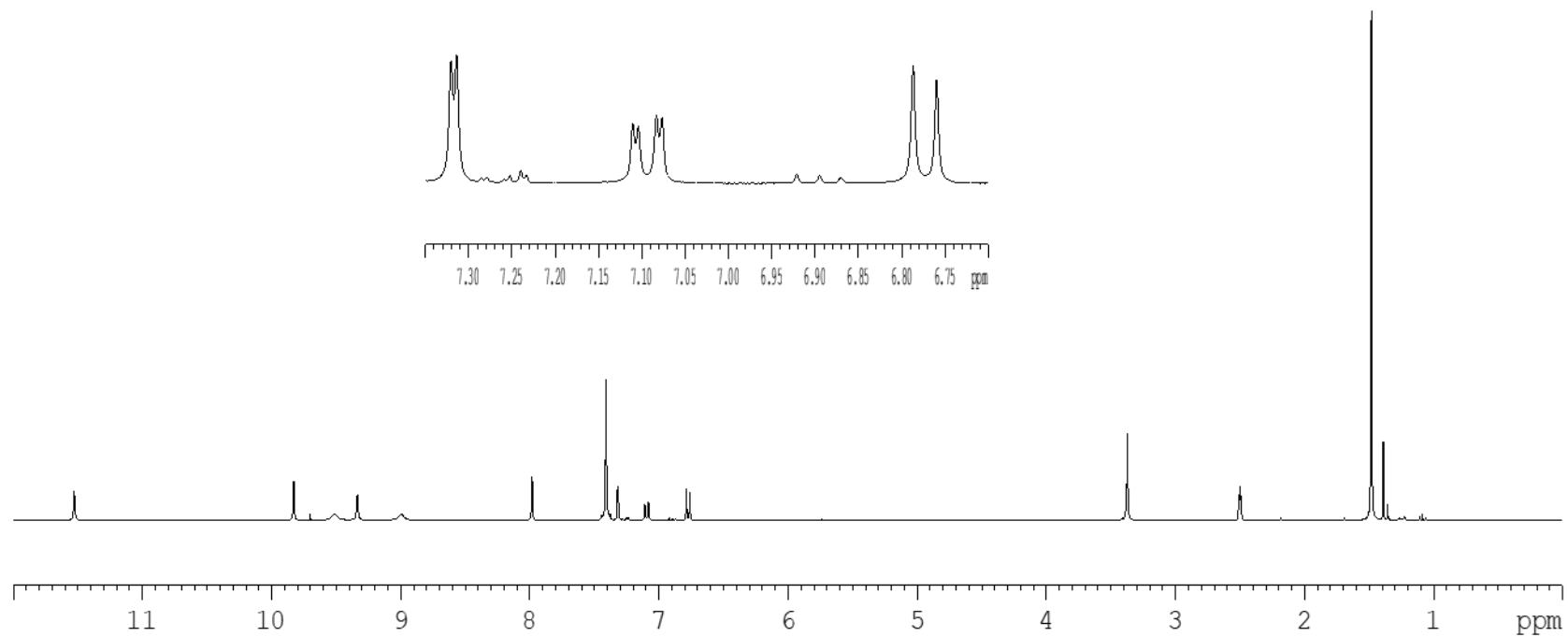
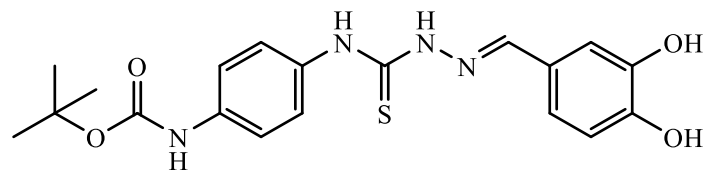
Compuesto 44 ^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **44**

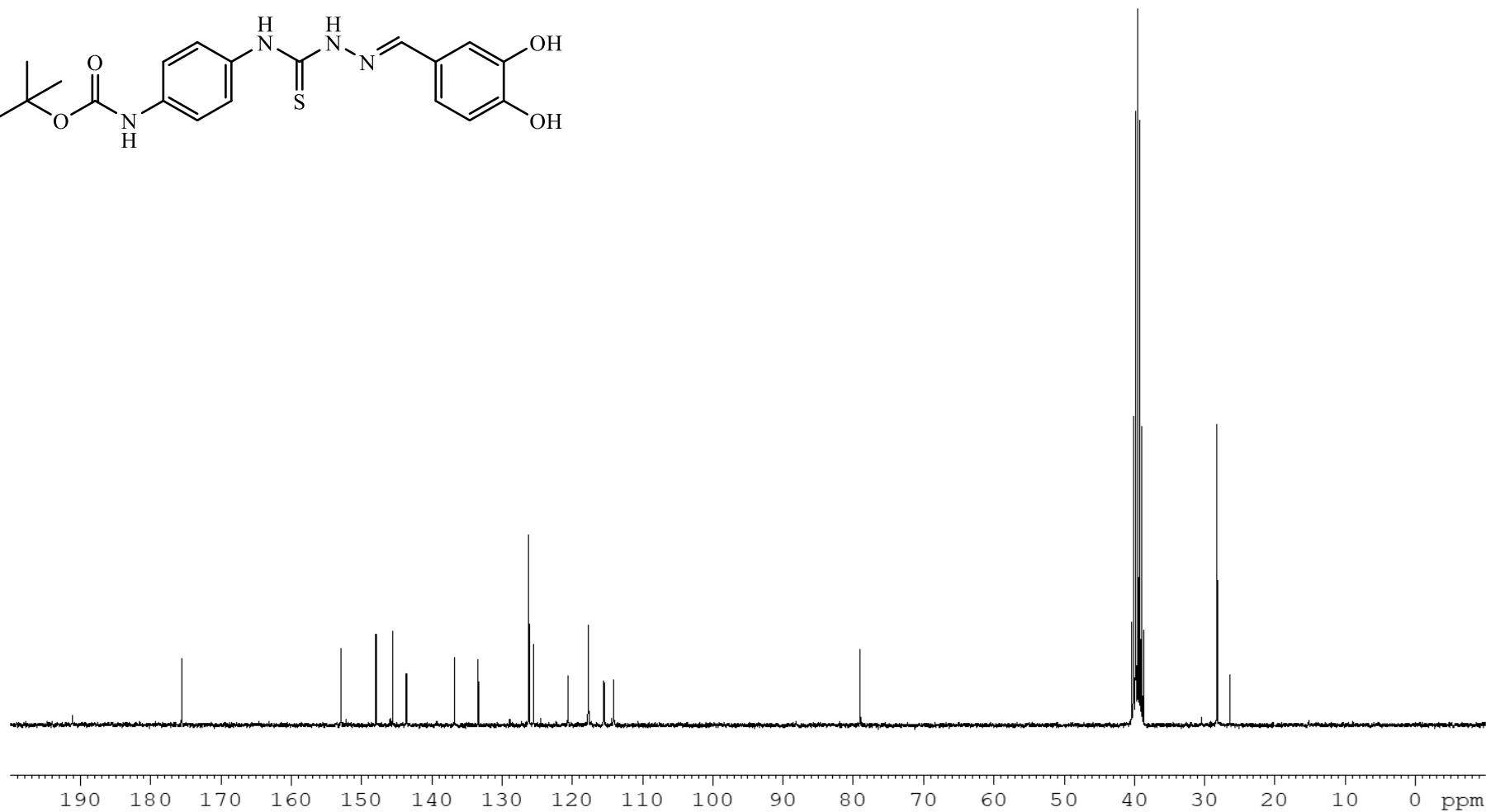
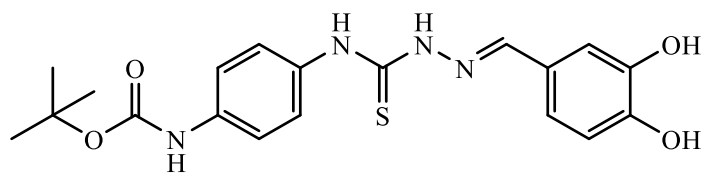


^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **44**

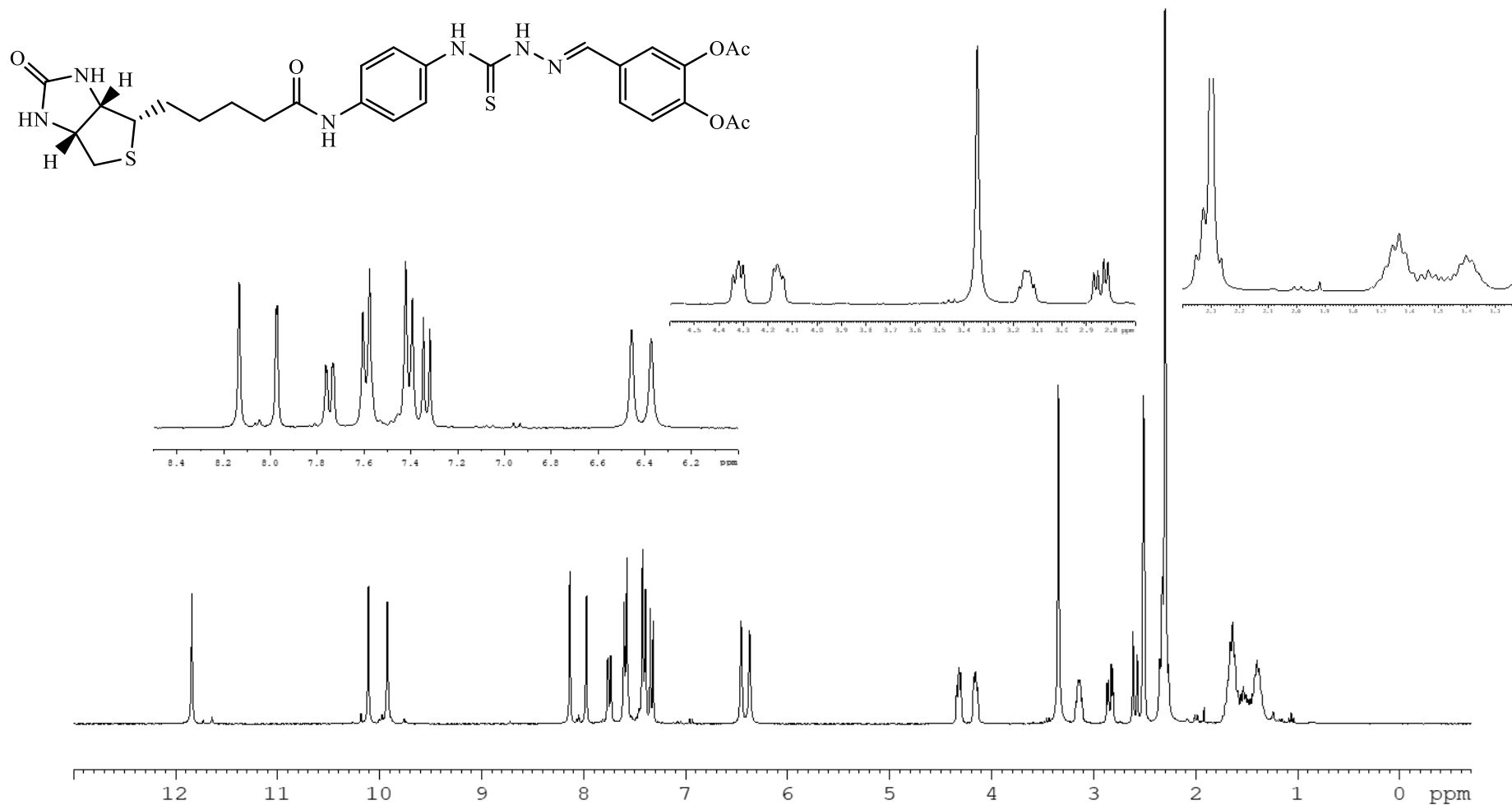
Compuesto 45 ^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **45**

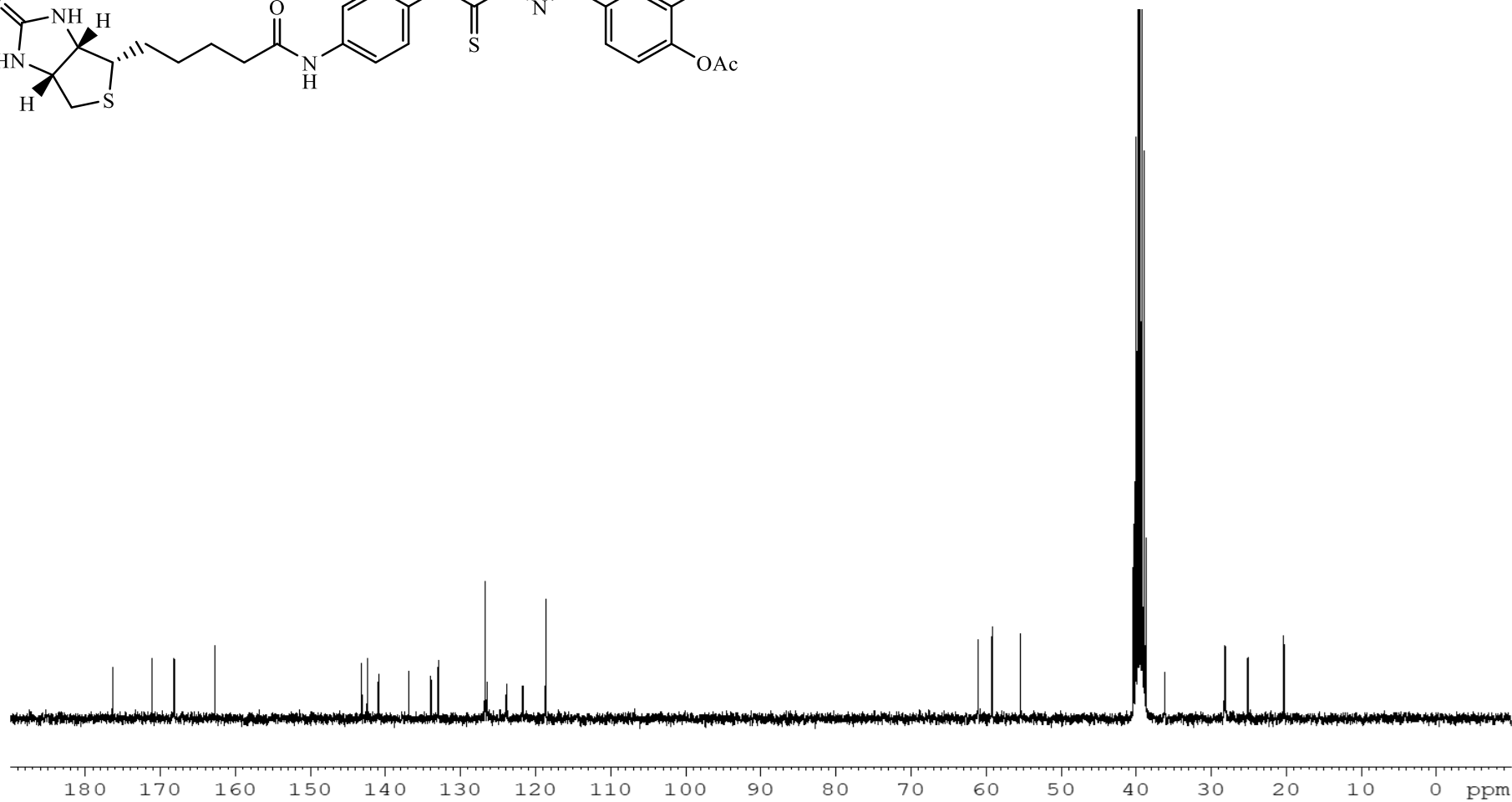
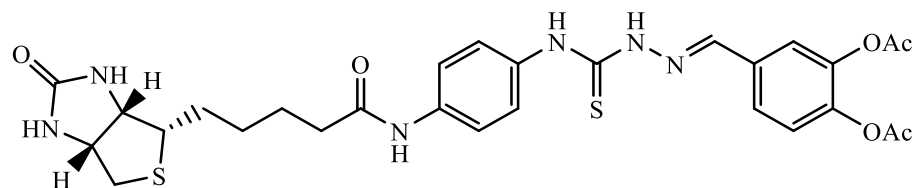
 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **45**

Compuesto 46 ^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **46**

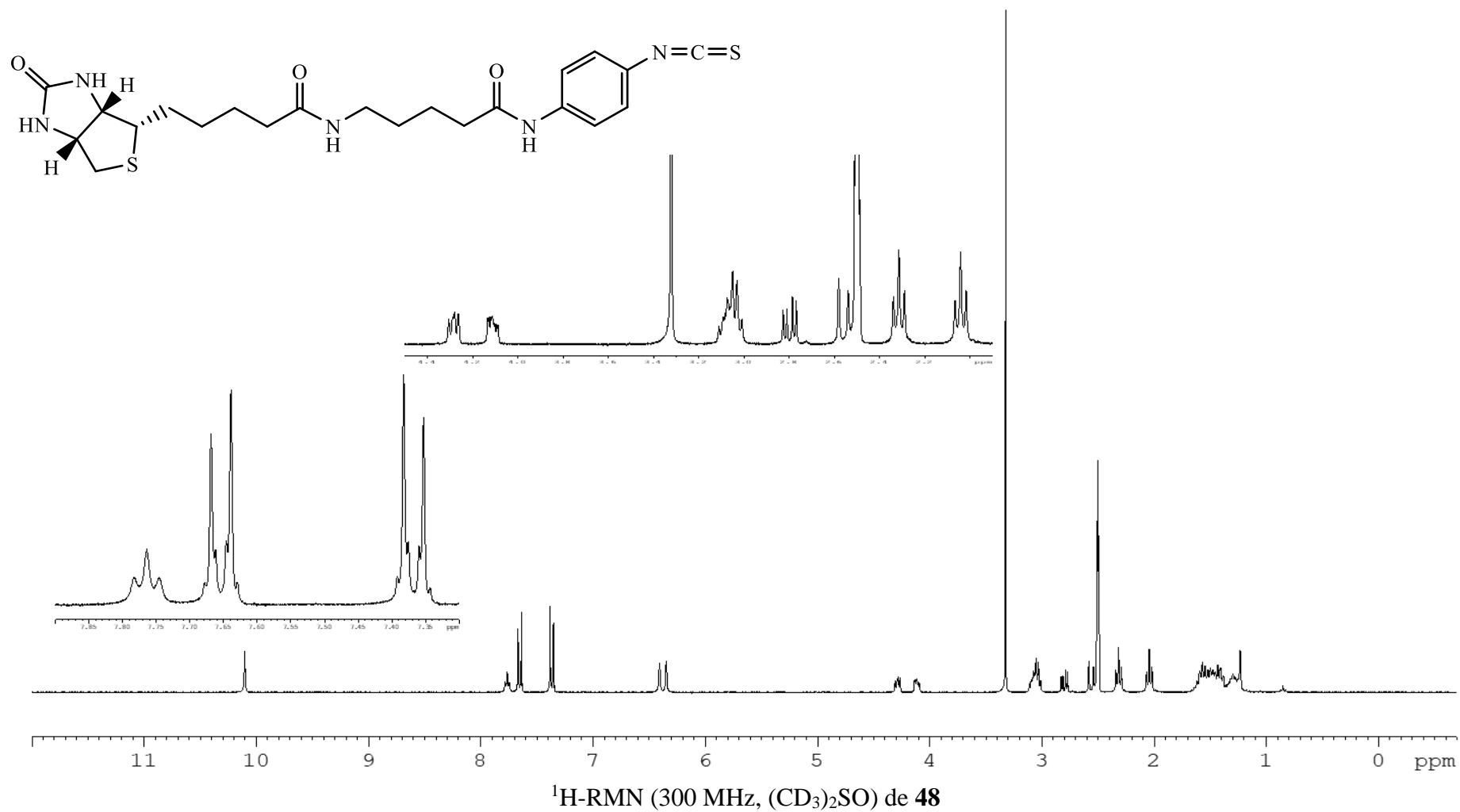


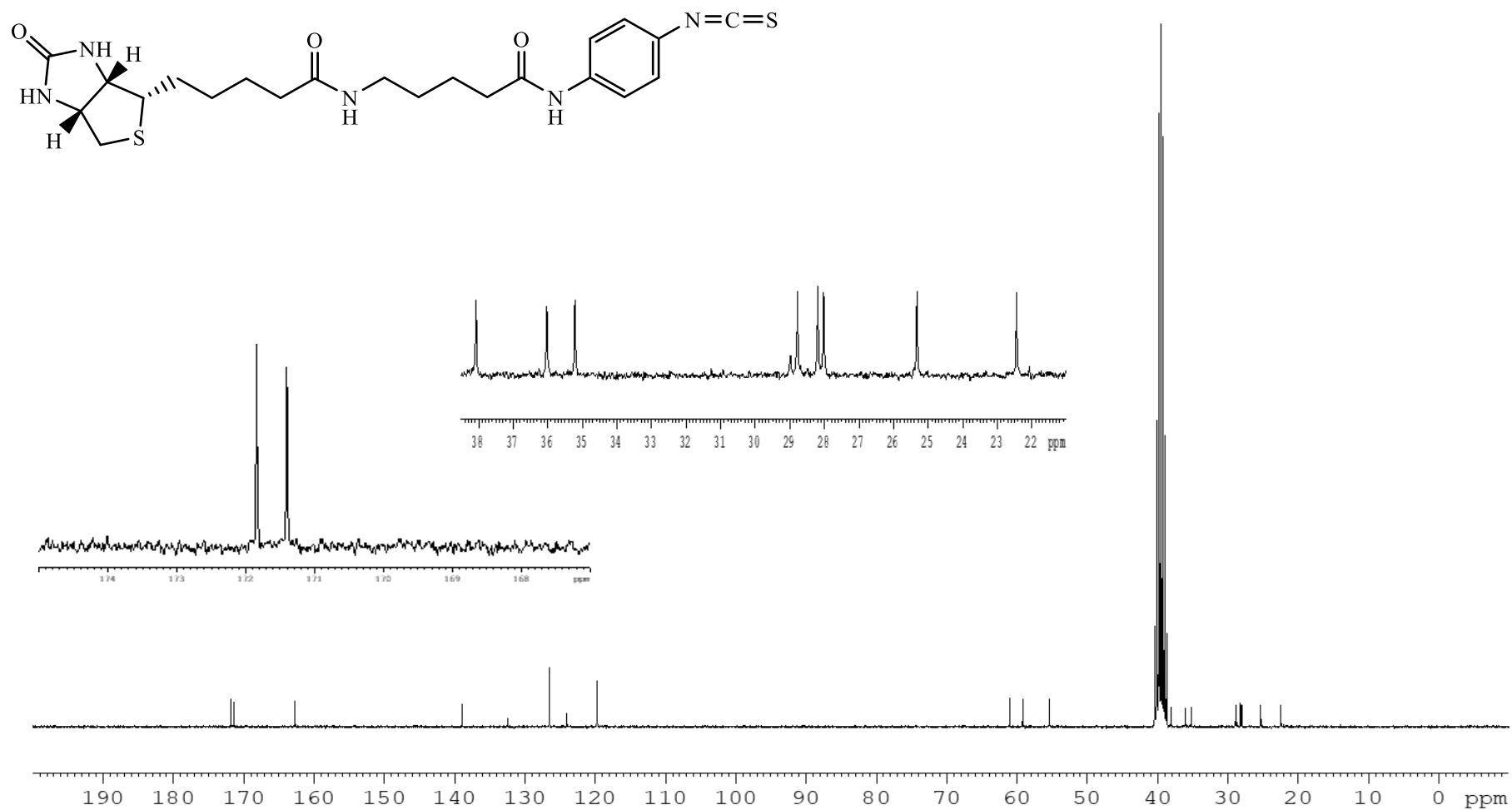
¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) de **46**

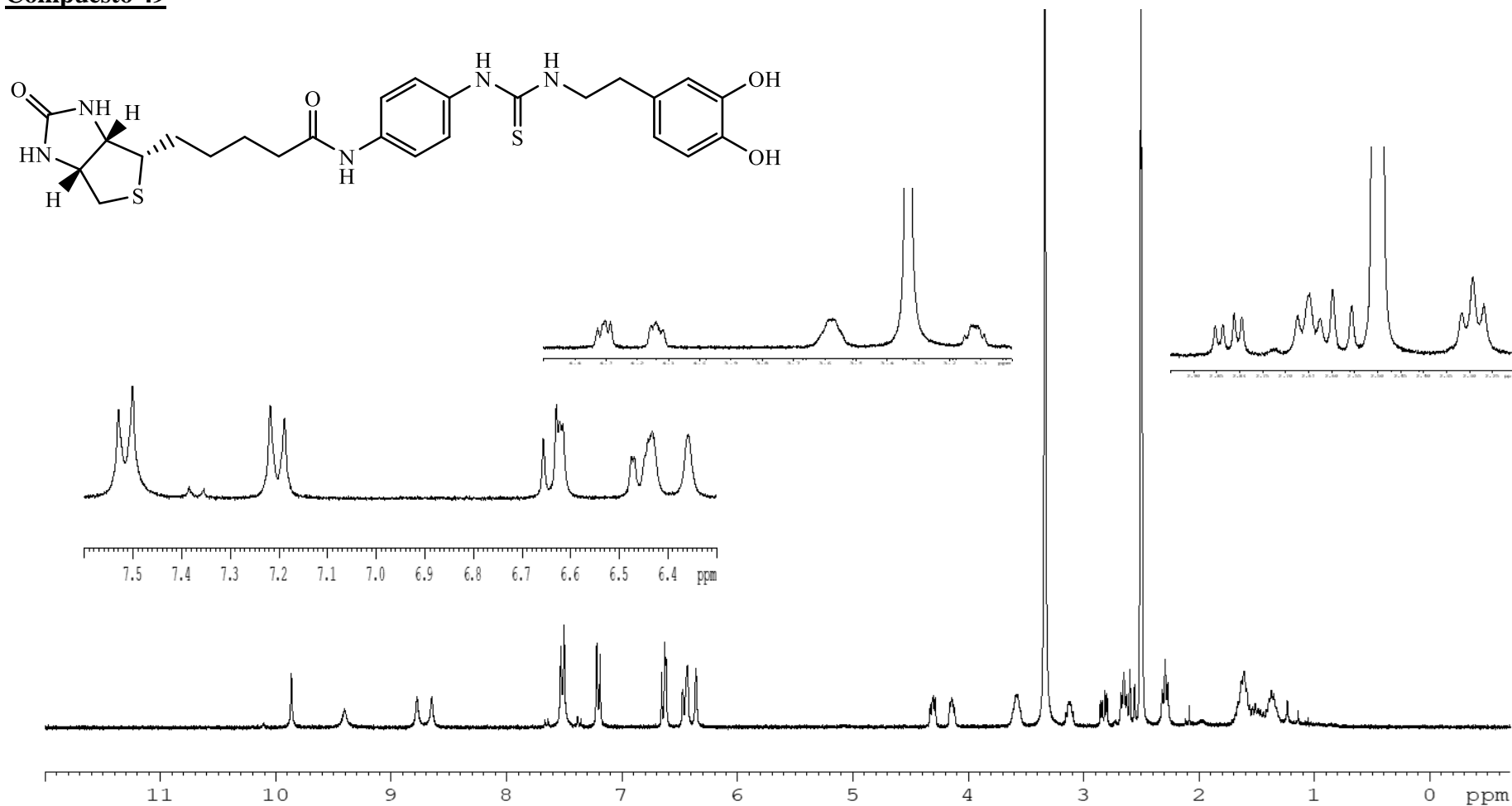
Compuesto 47 ^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **47**

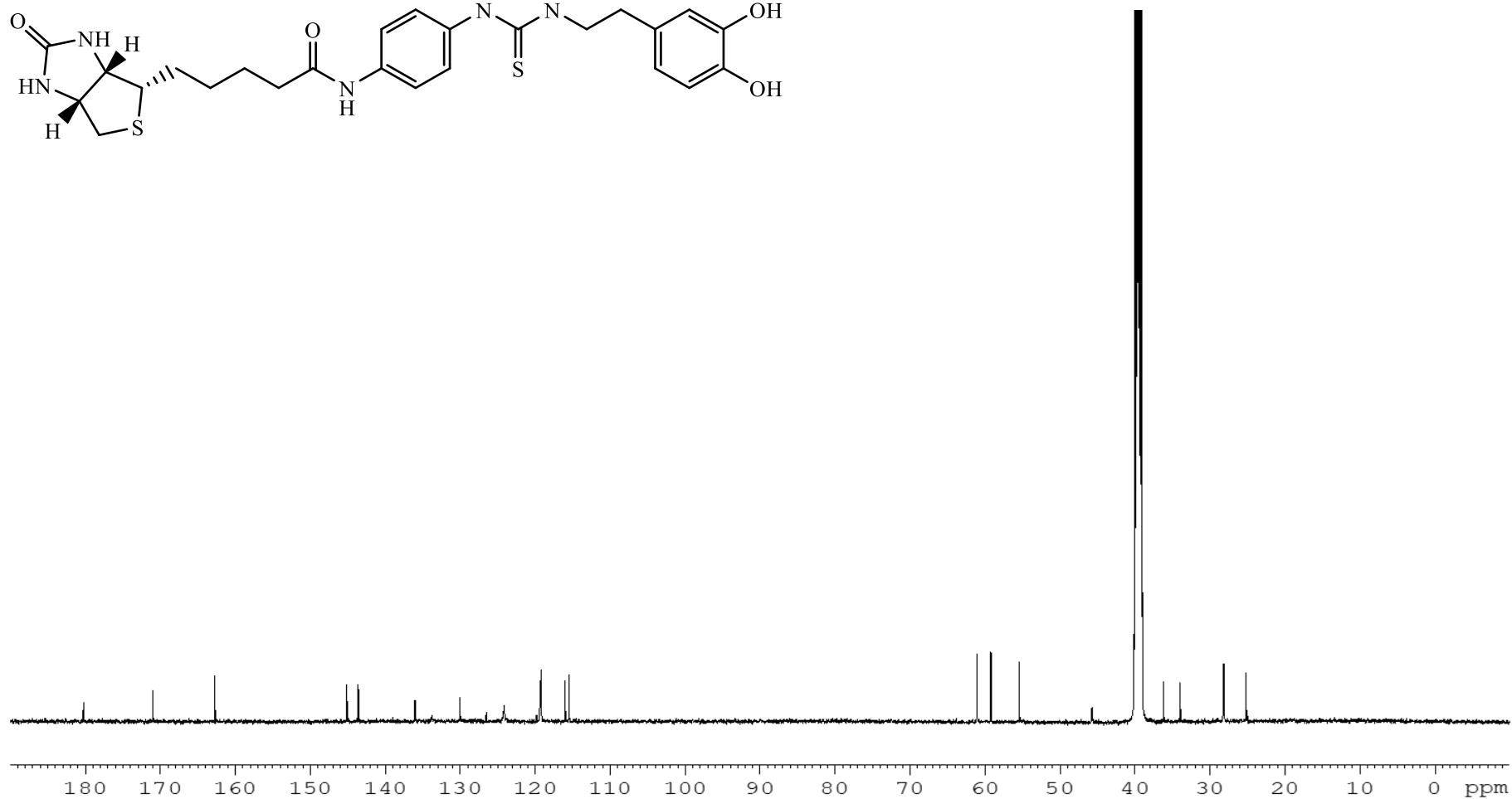
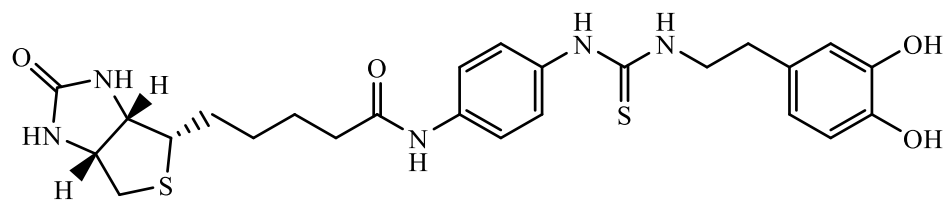


¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂SO) de **47**

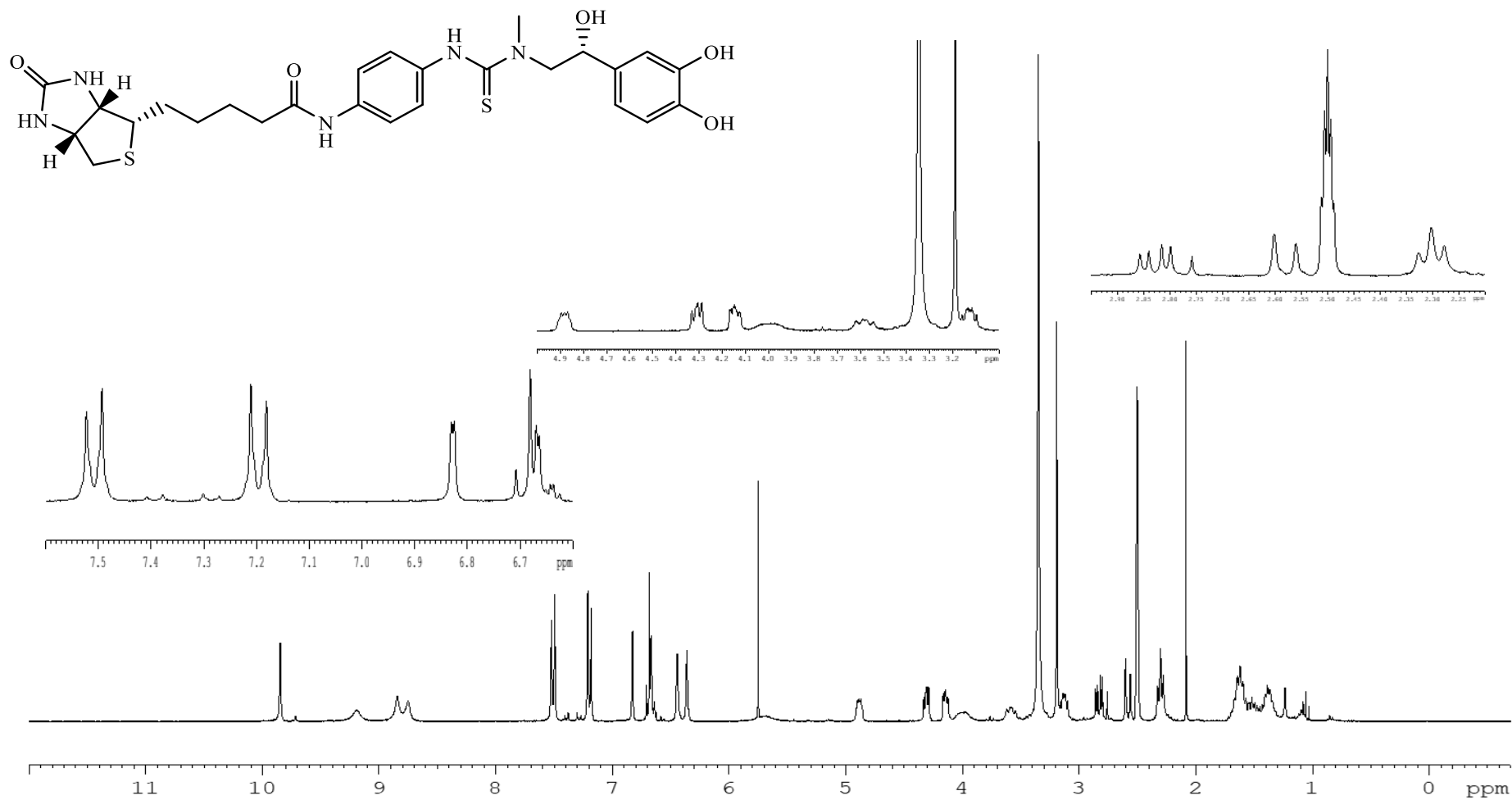
Compuesto 48

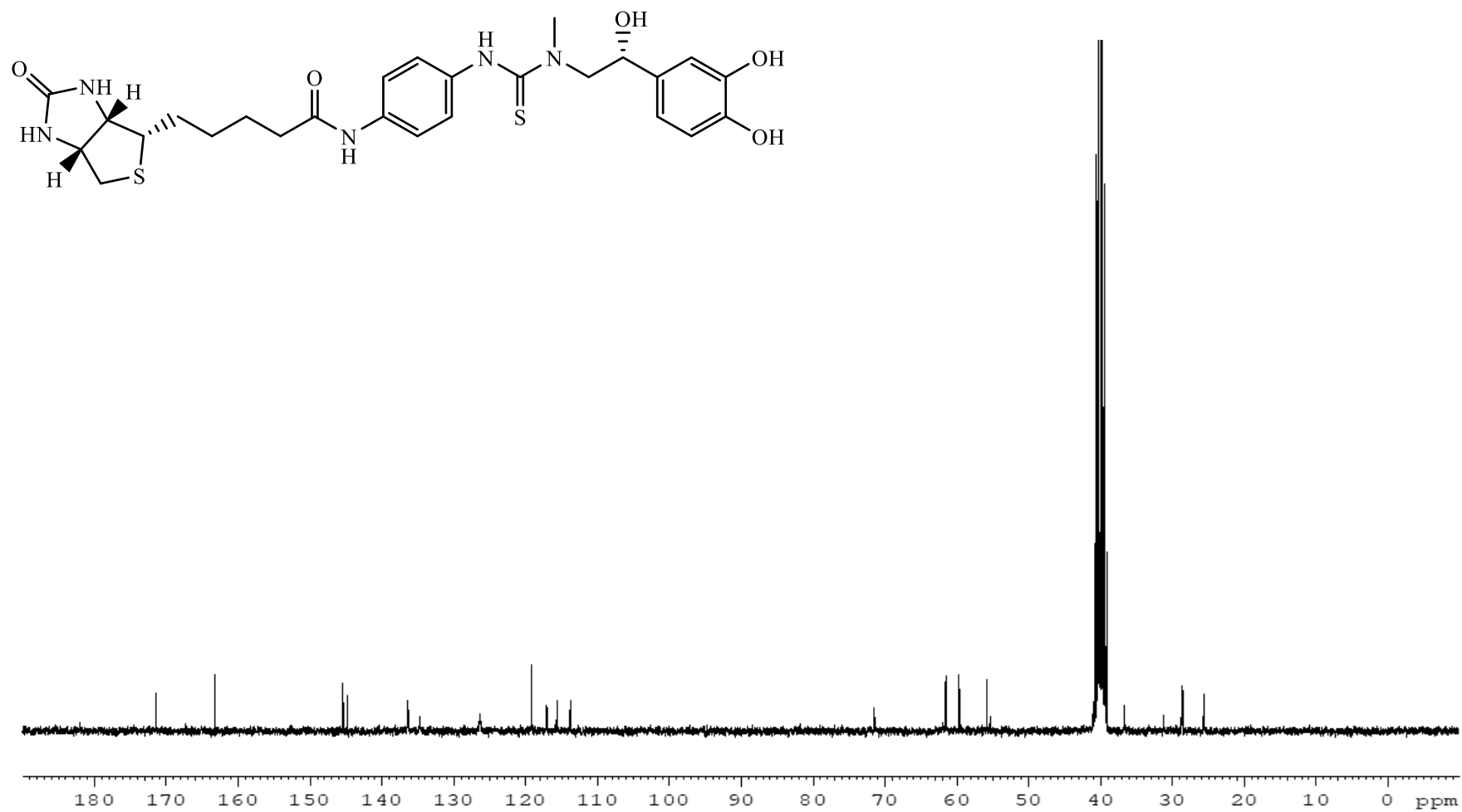
 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **48**

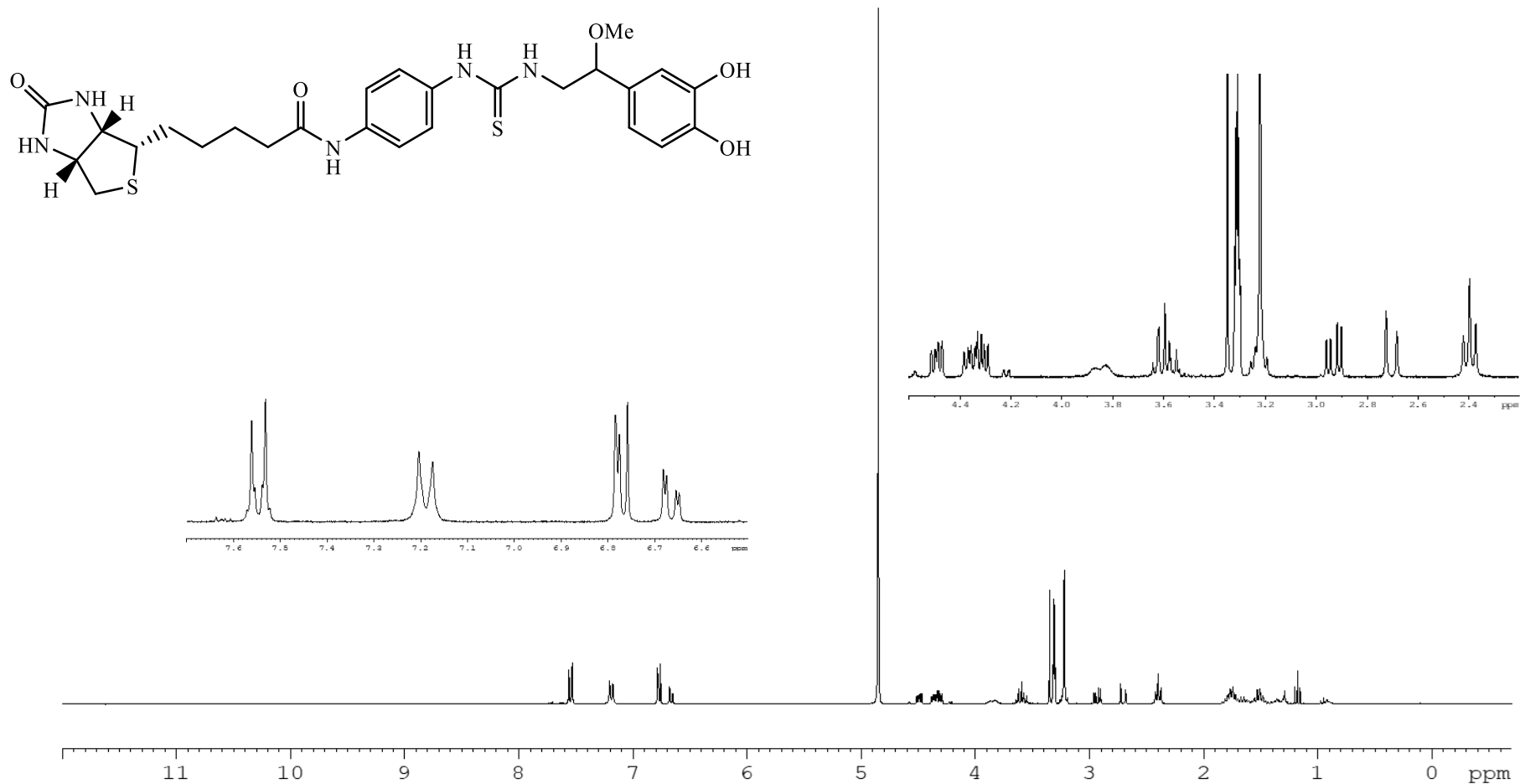
Compuesto 49 ^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **49**

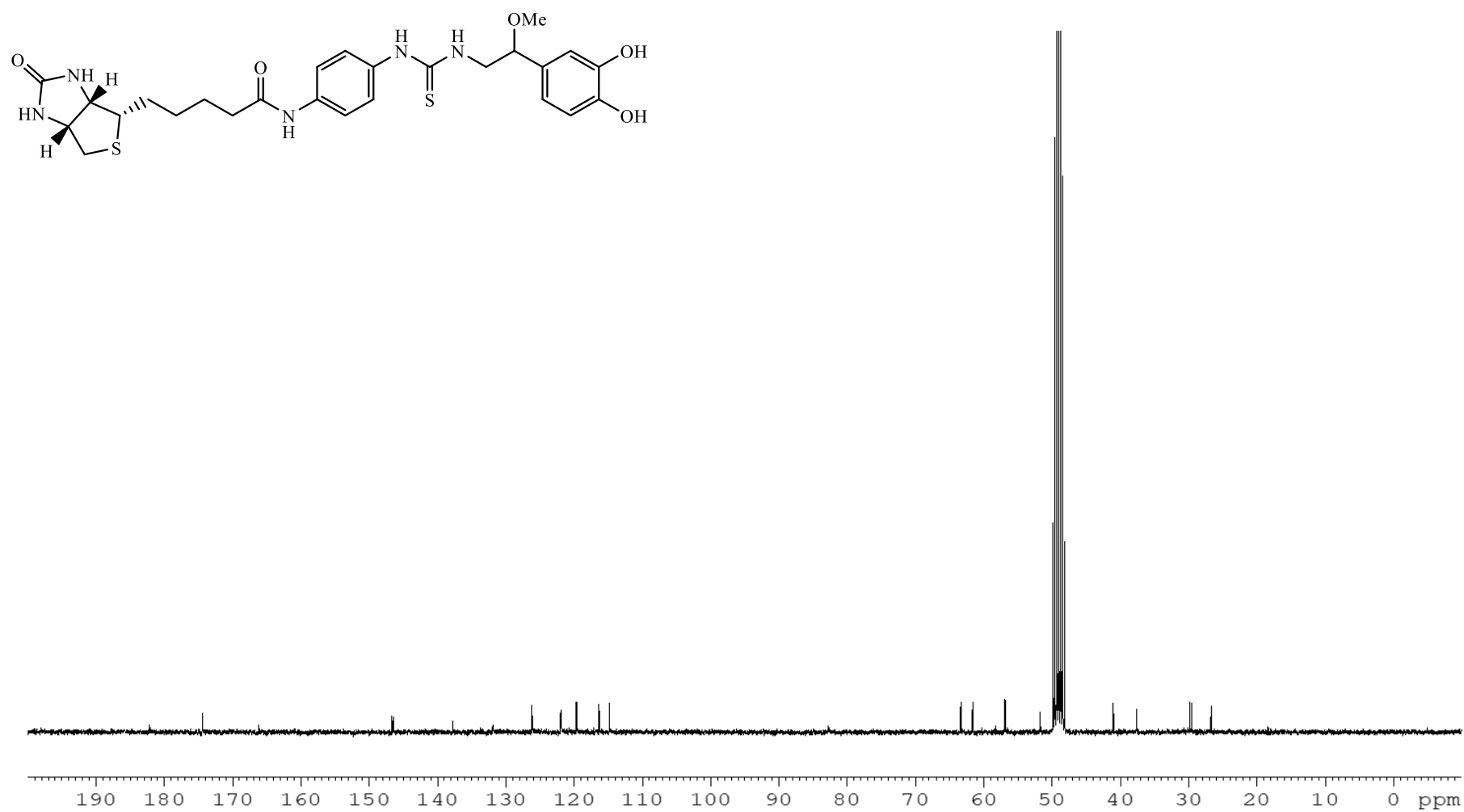


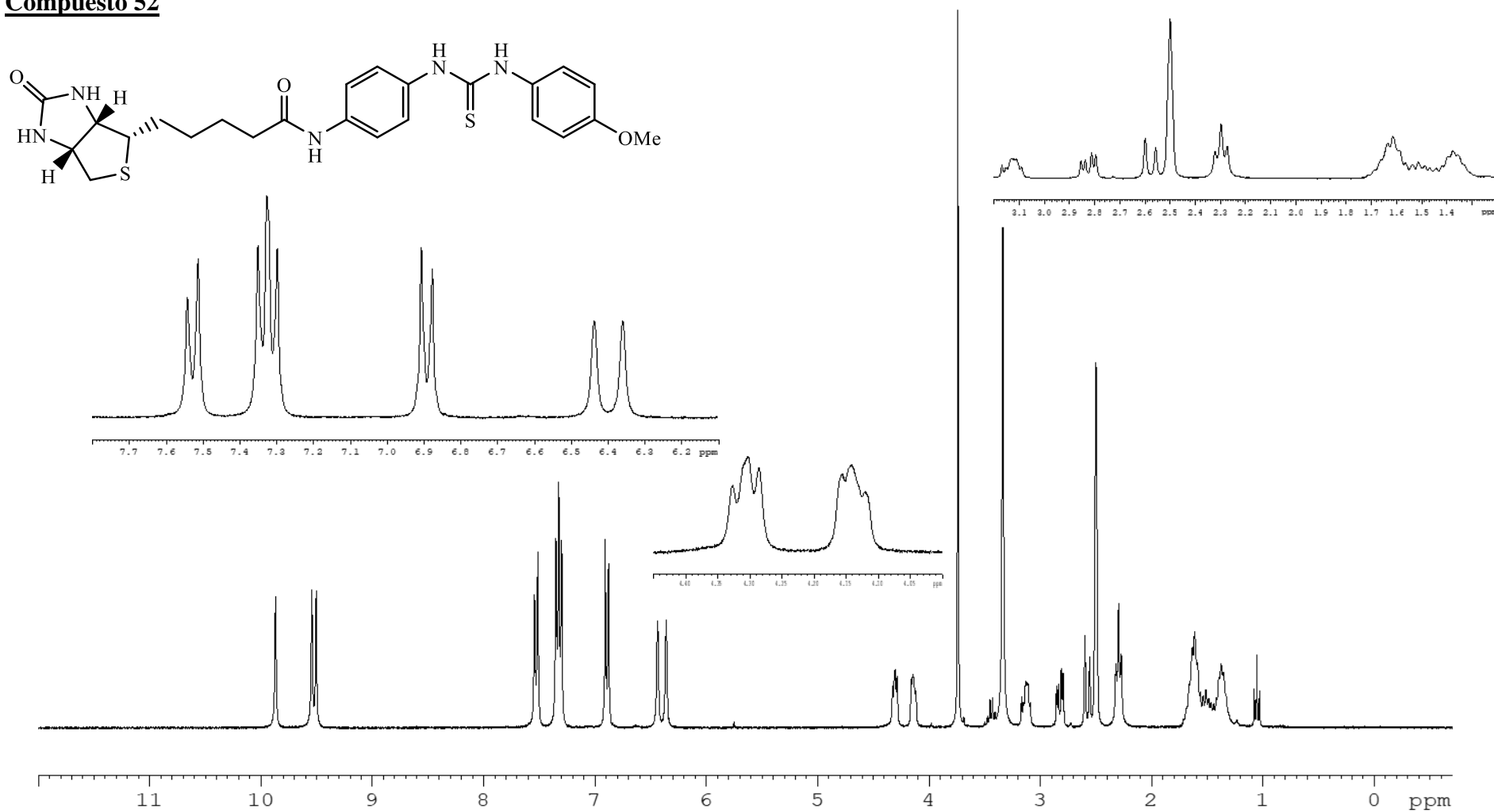
^{13}C -RMN (125.8 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **49**

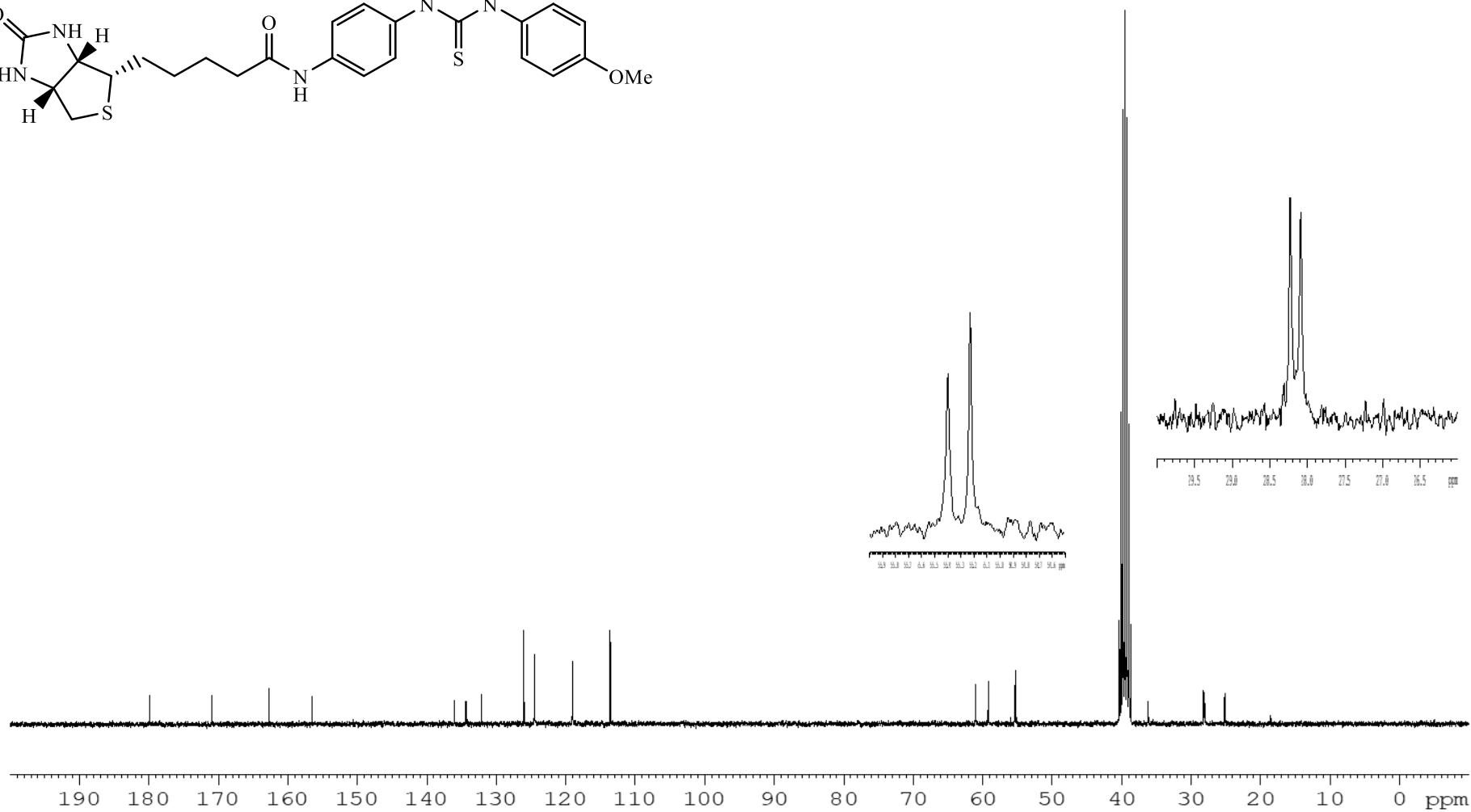
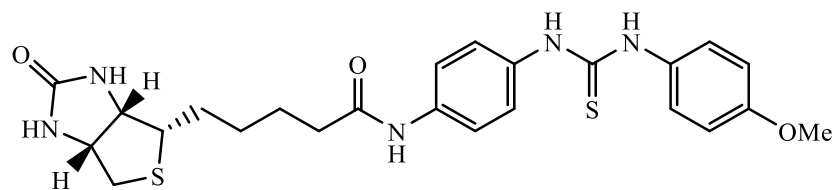
Compuesto 50 ^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **50**

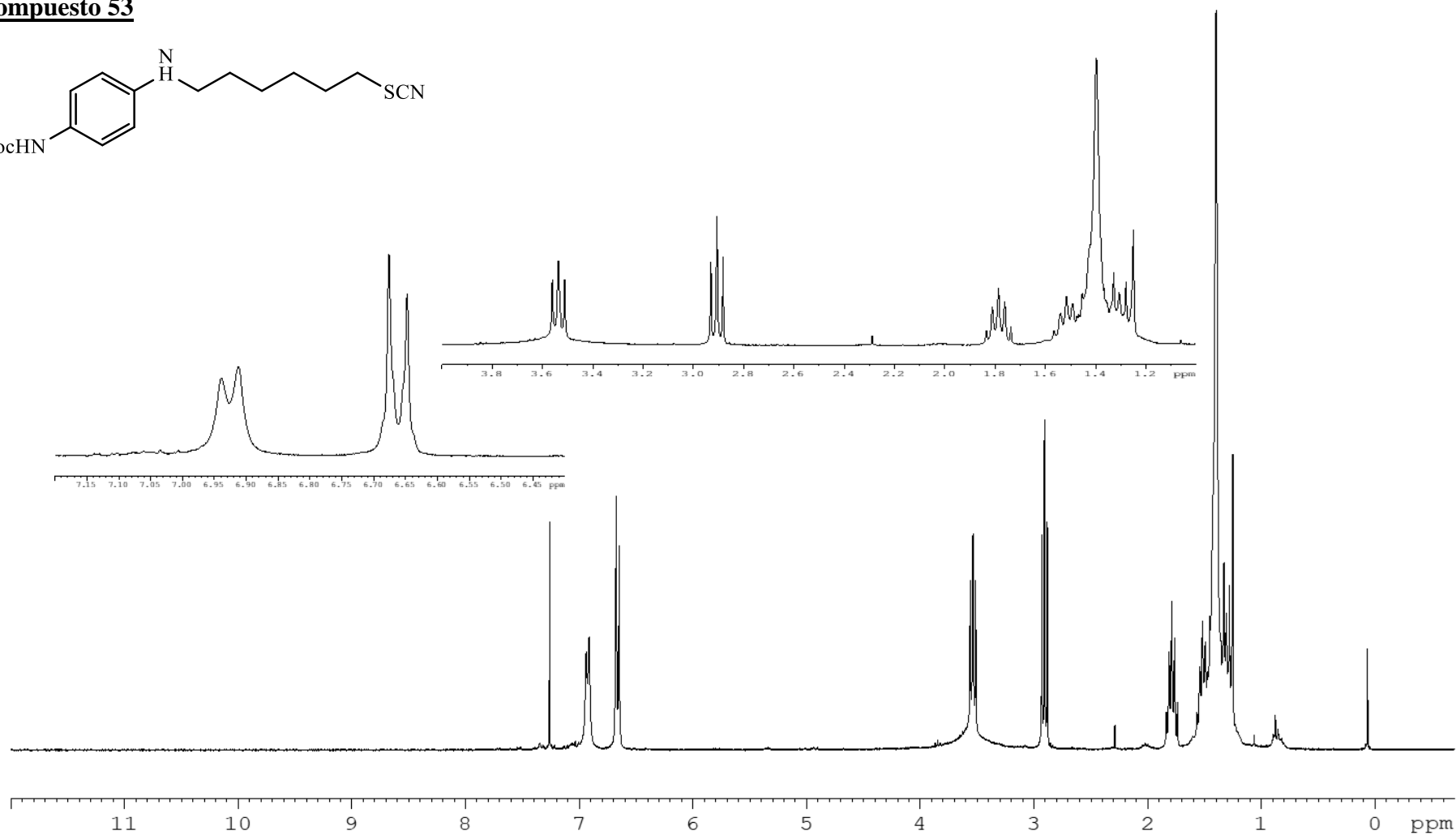
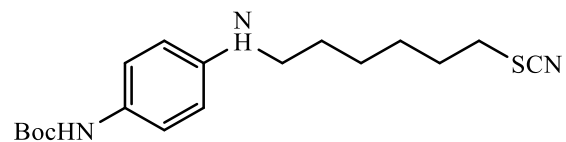
 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **50**

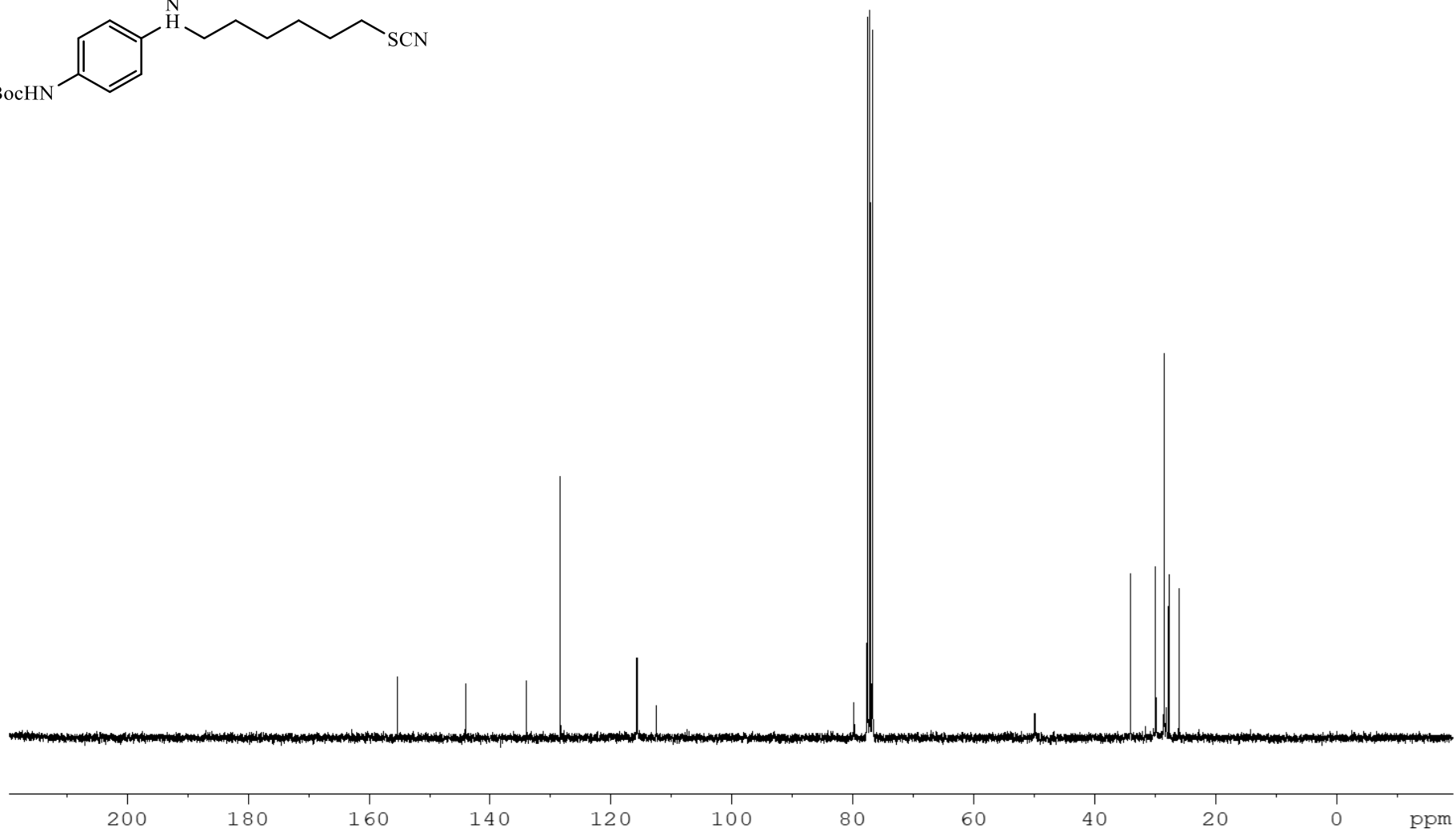
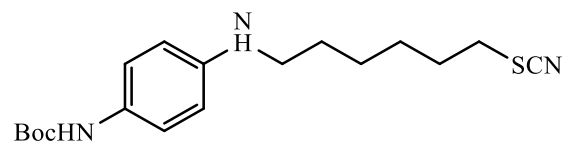
Compuesto 51 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) de **51**

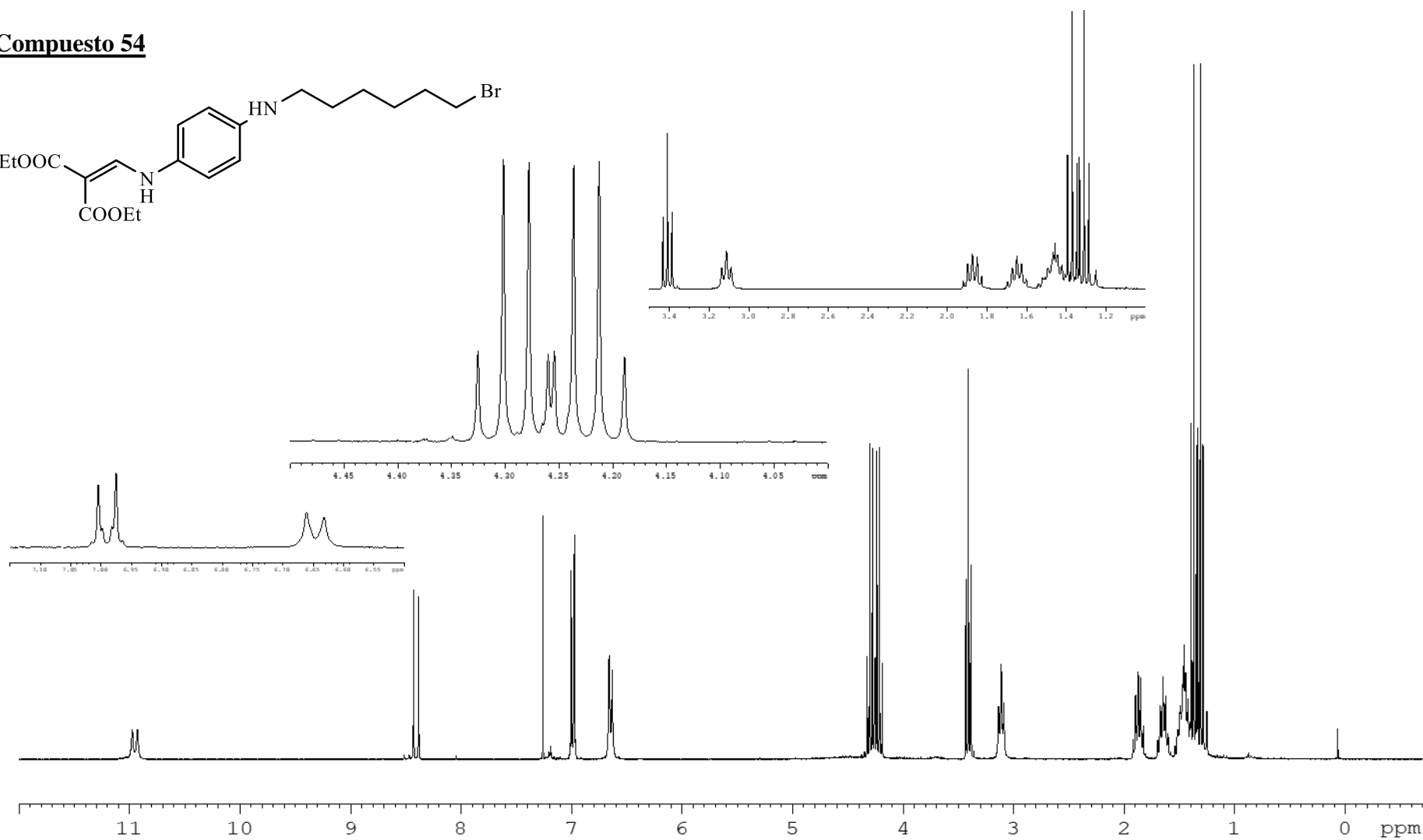
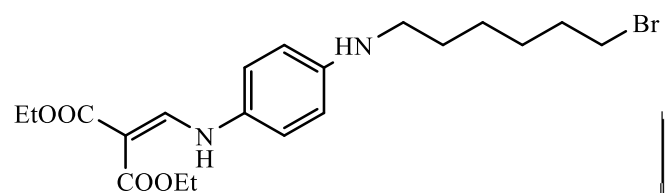


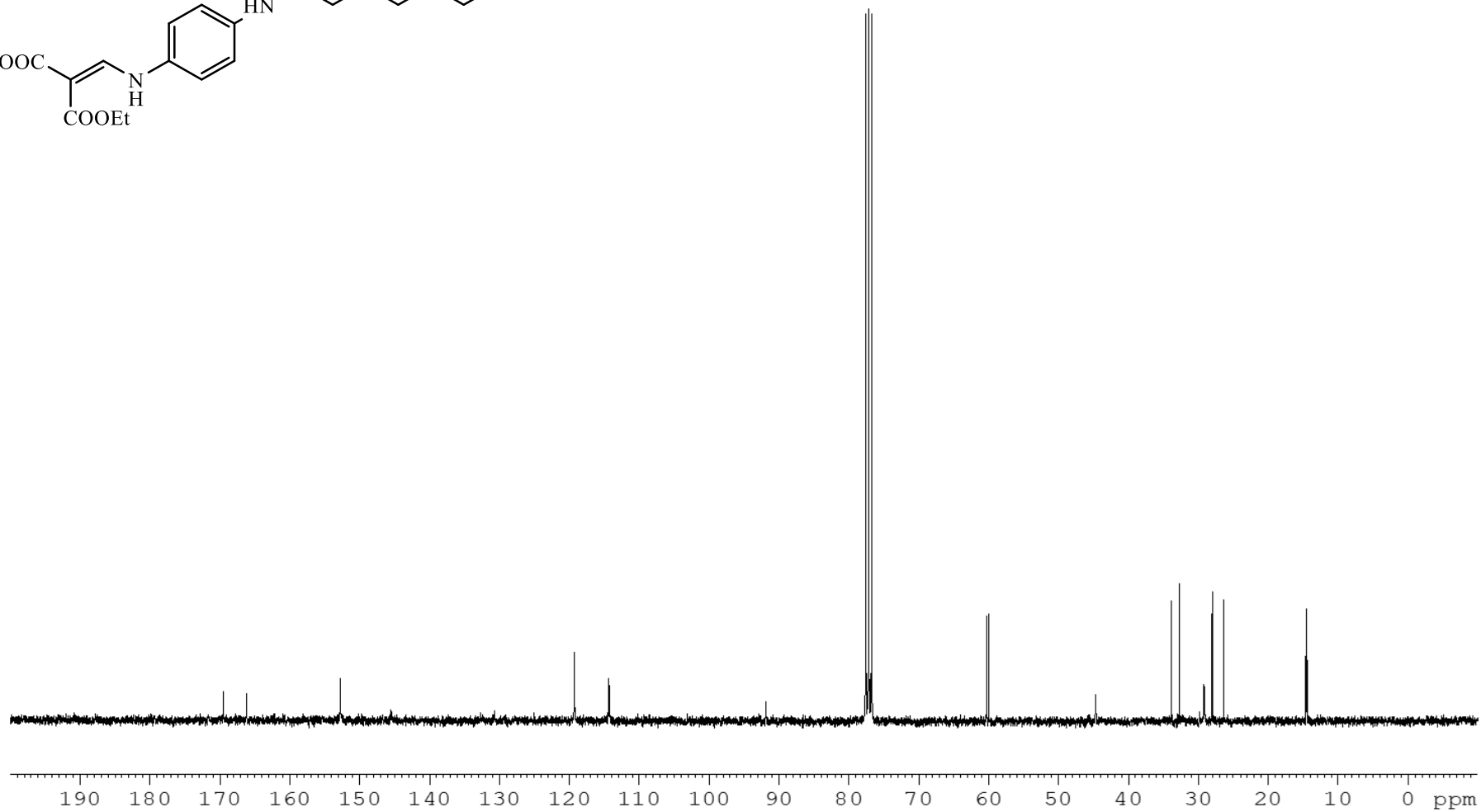
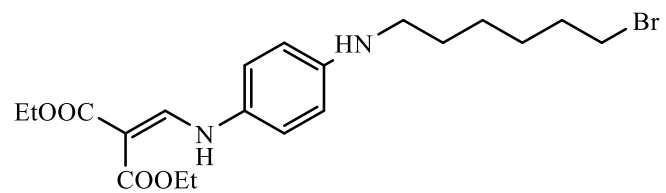
Compuesto 52 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de 52

 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de 52

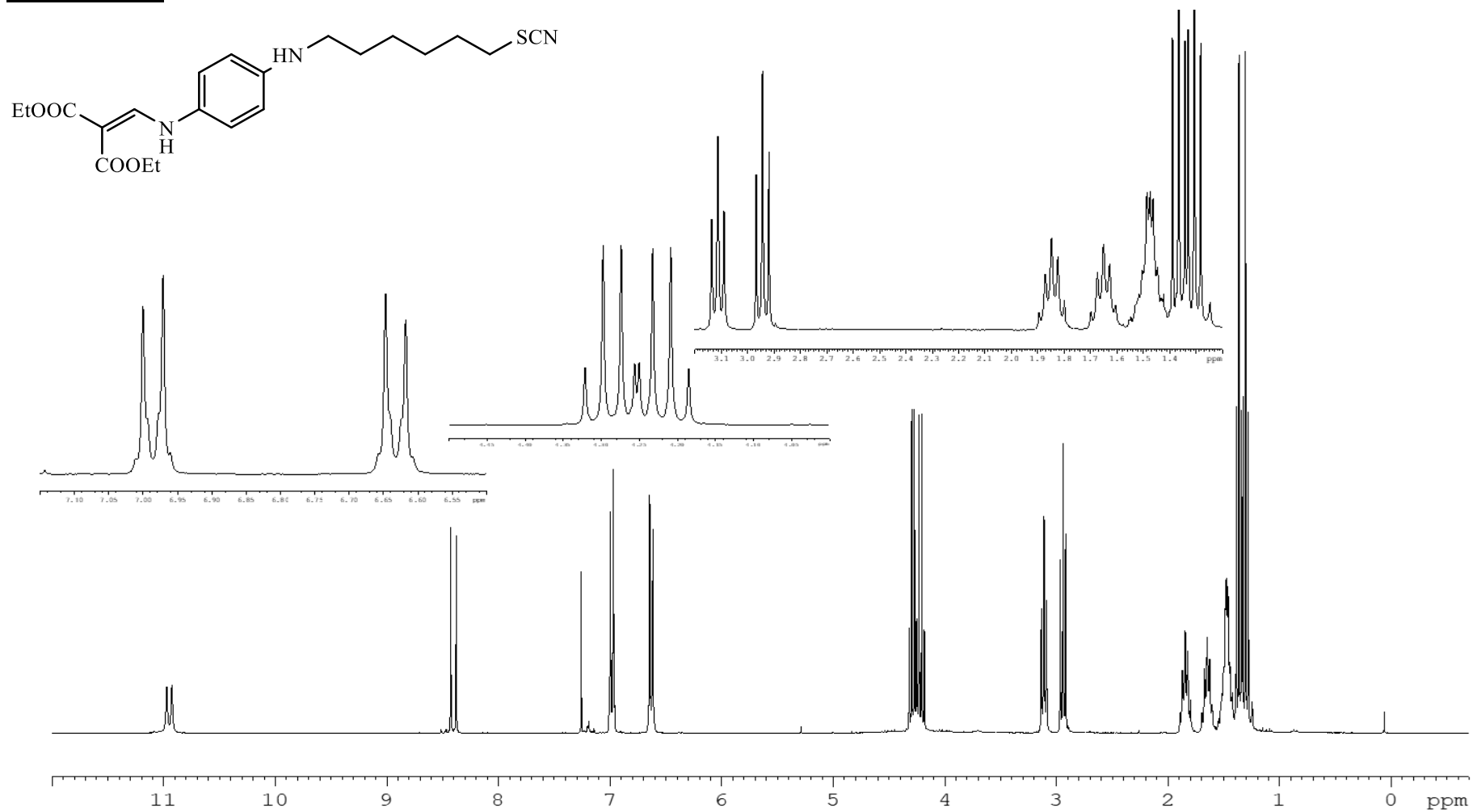
Compuesto 53 $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) de **53**

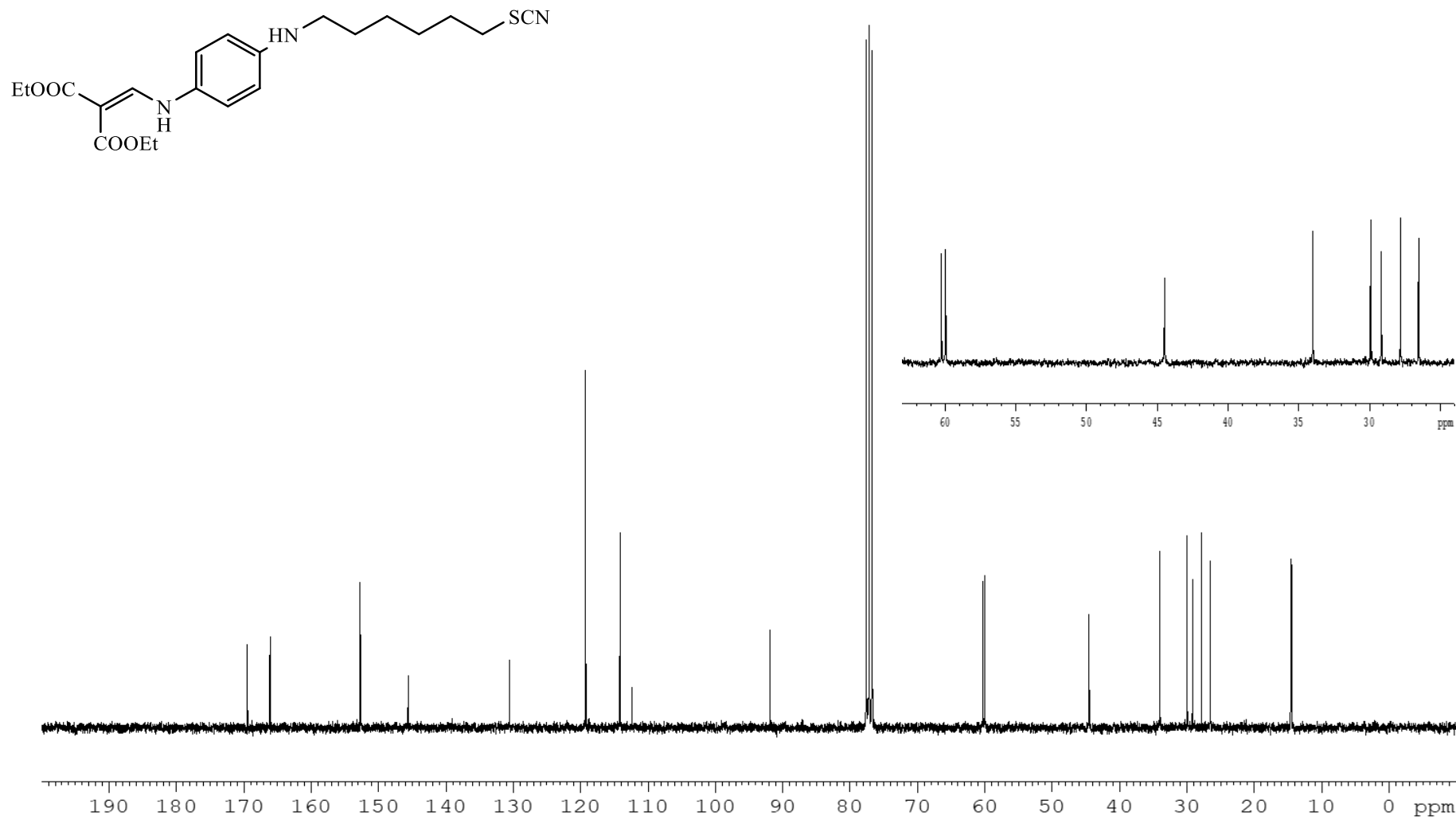
 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de **53**

Compuesto 54¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) de **54**

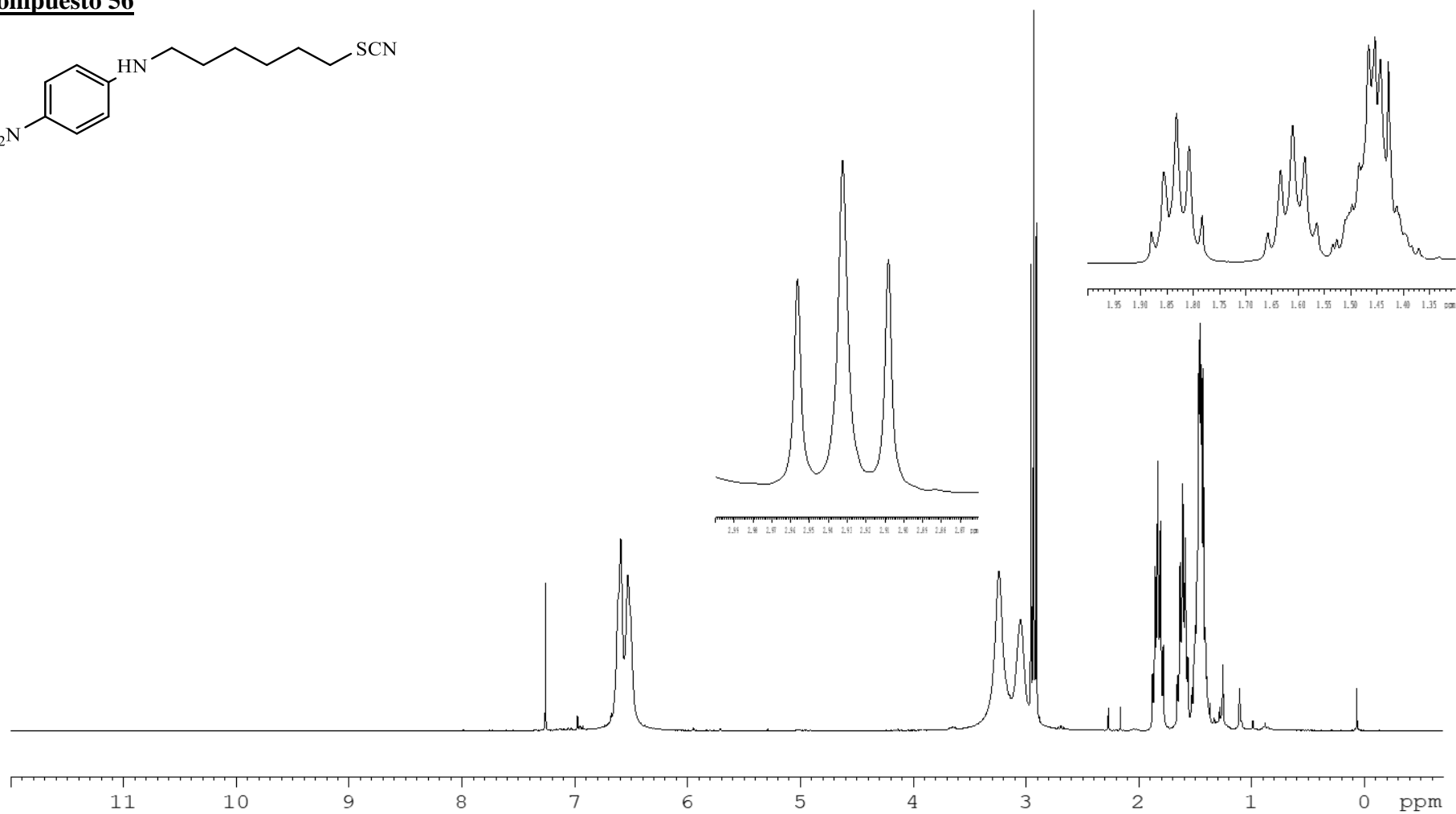
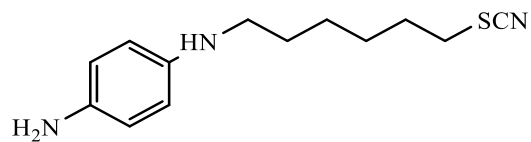


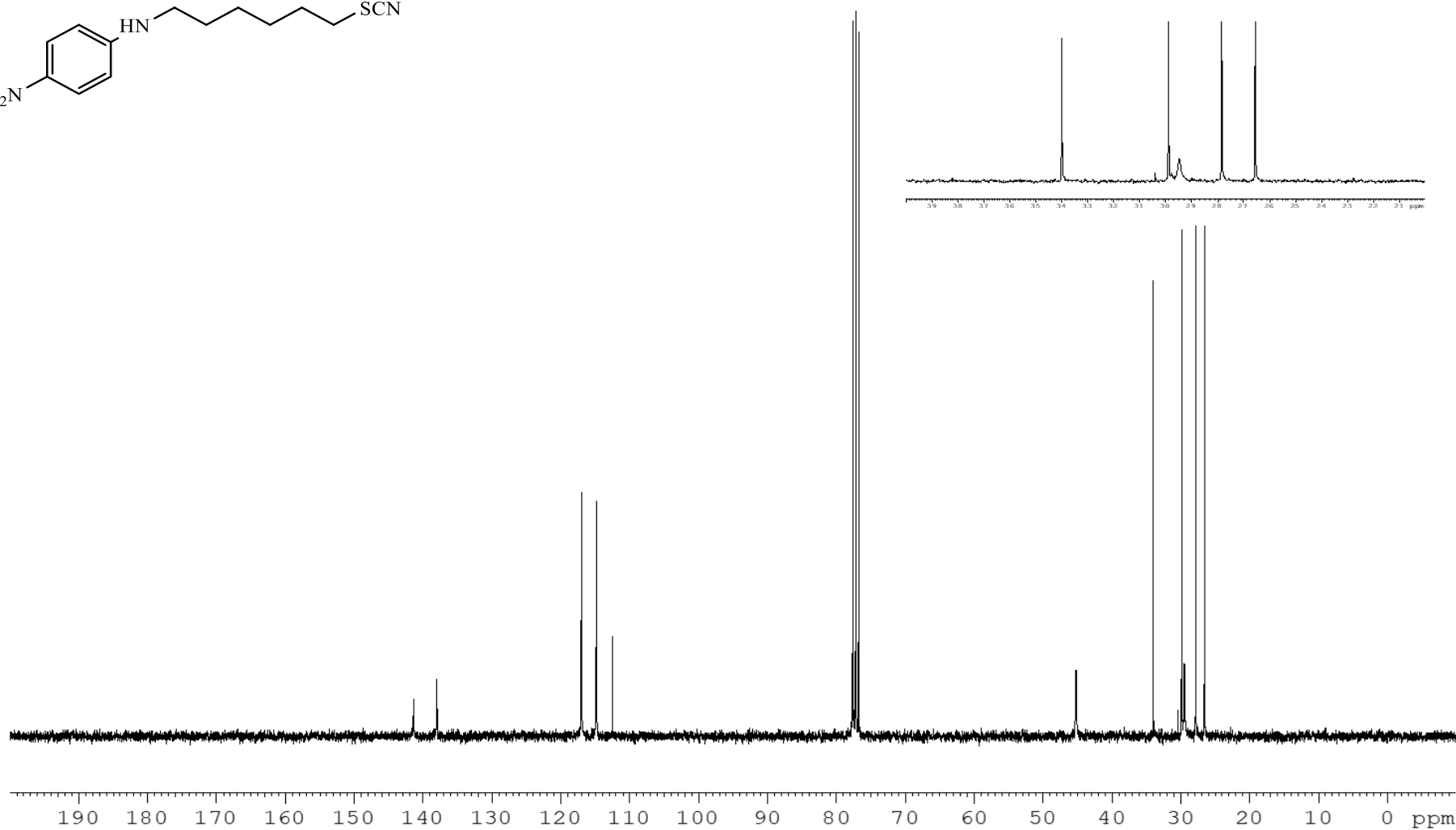
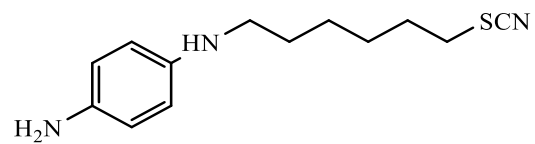
^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de **54**

Compuesto 55 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) de **55**

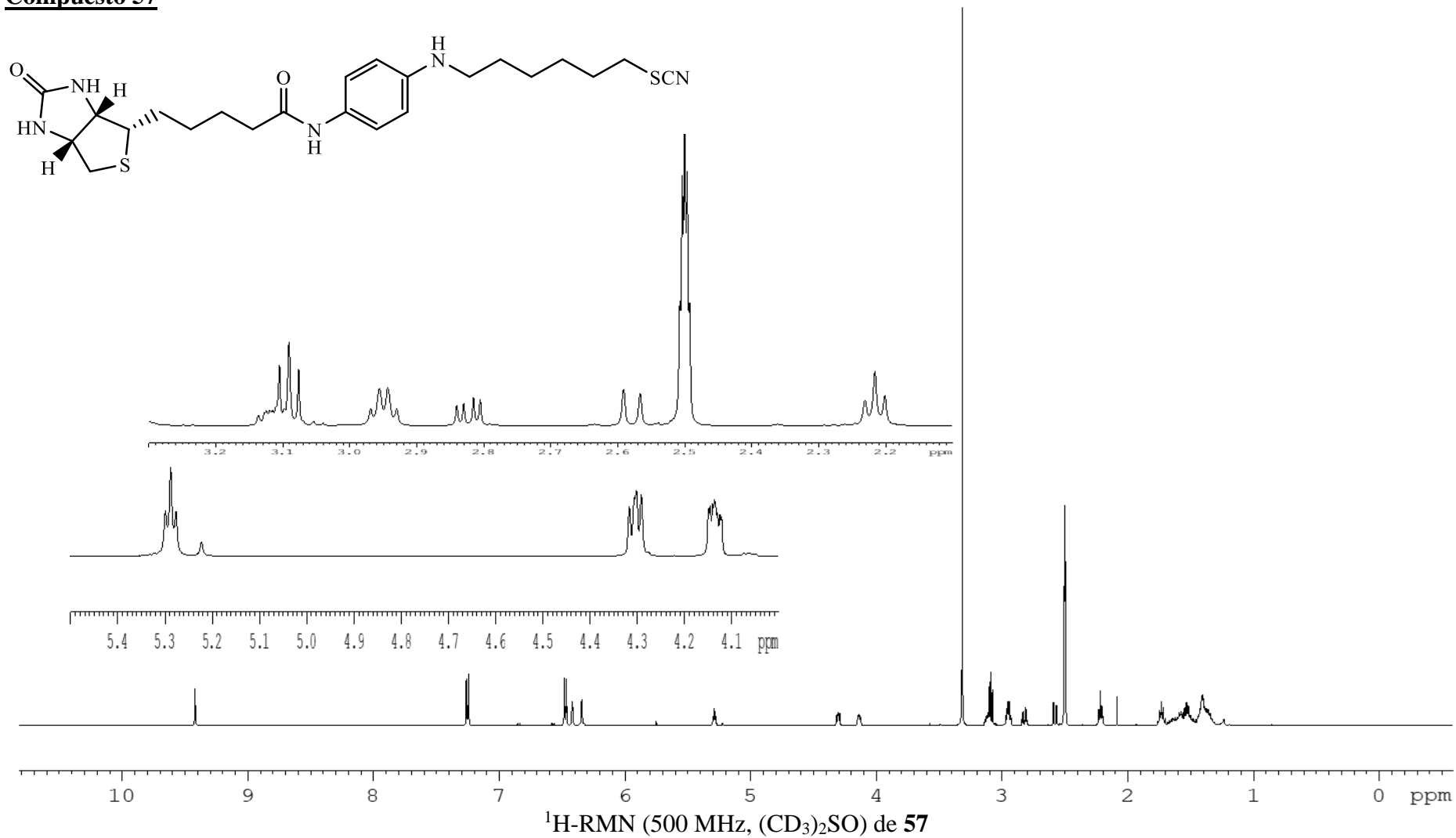


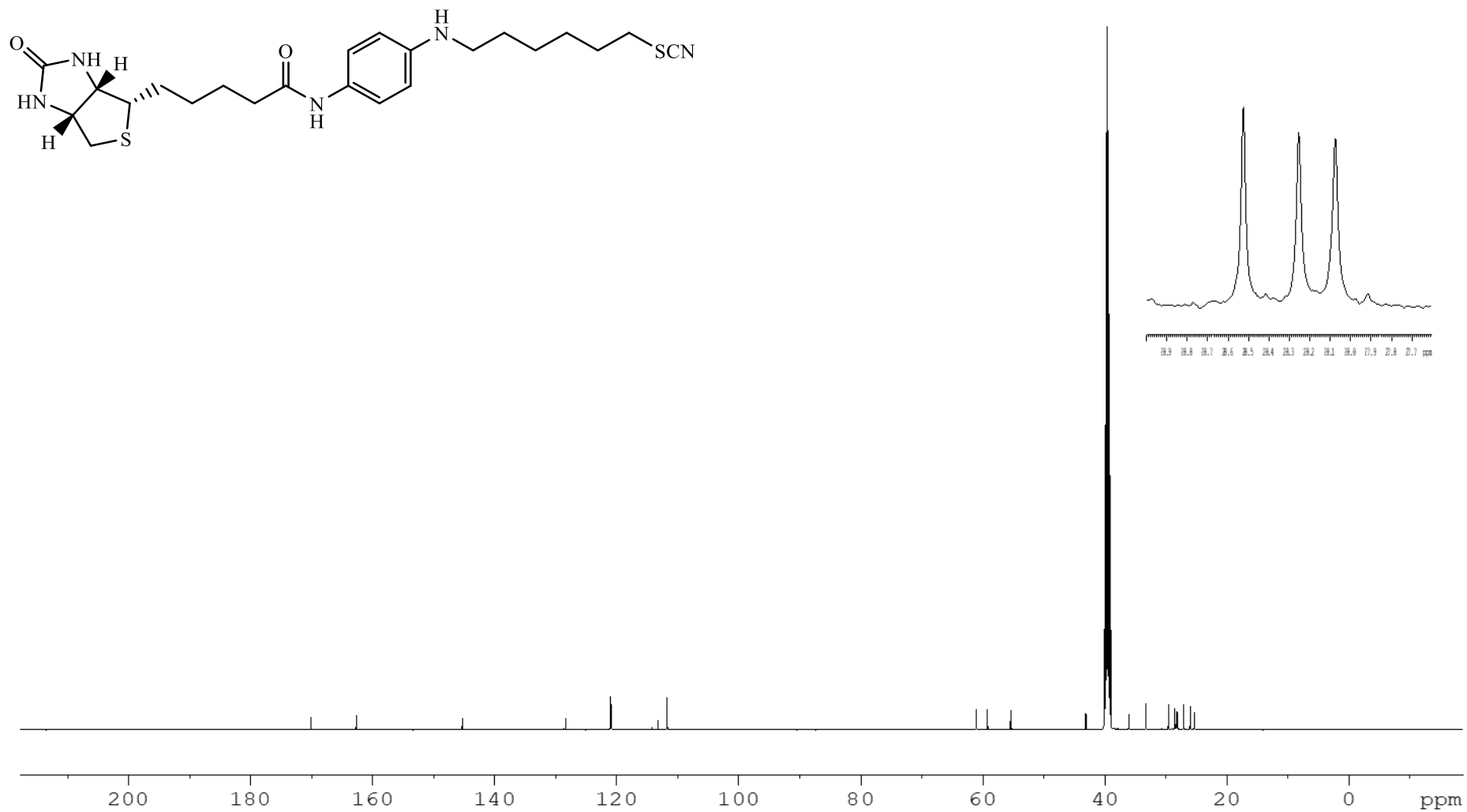
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) de 55

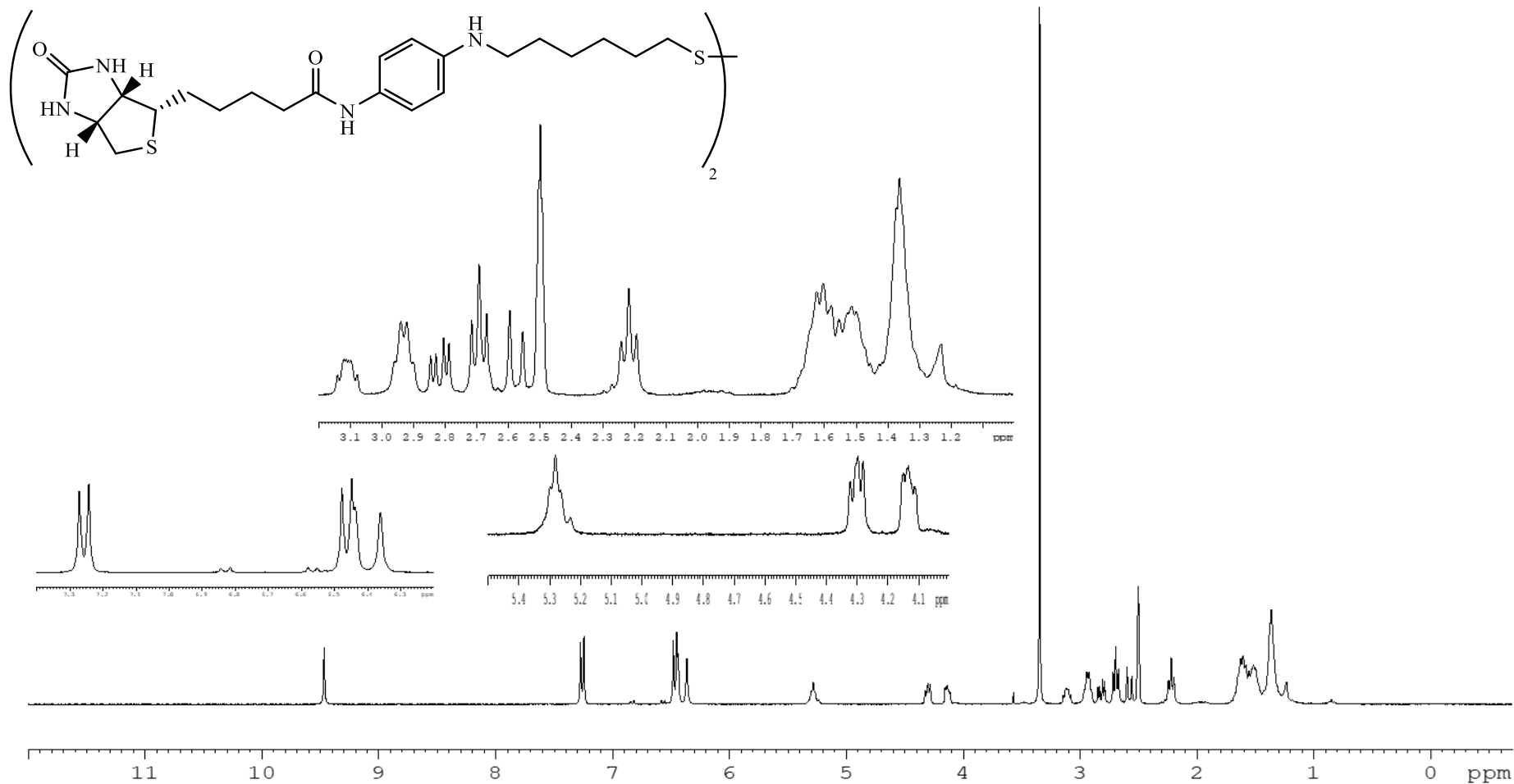
Compuesto 56 ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de **56**

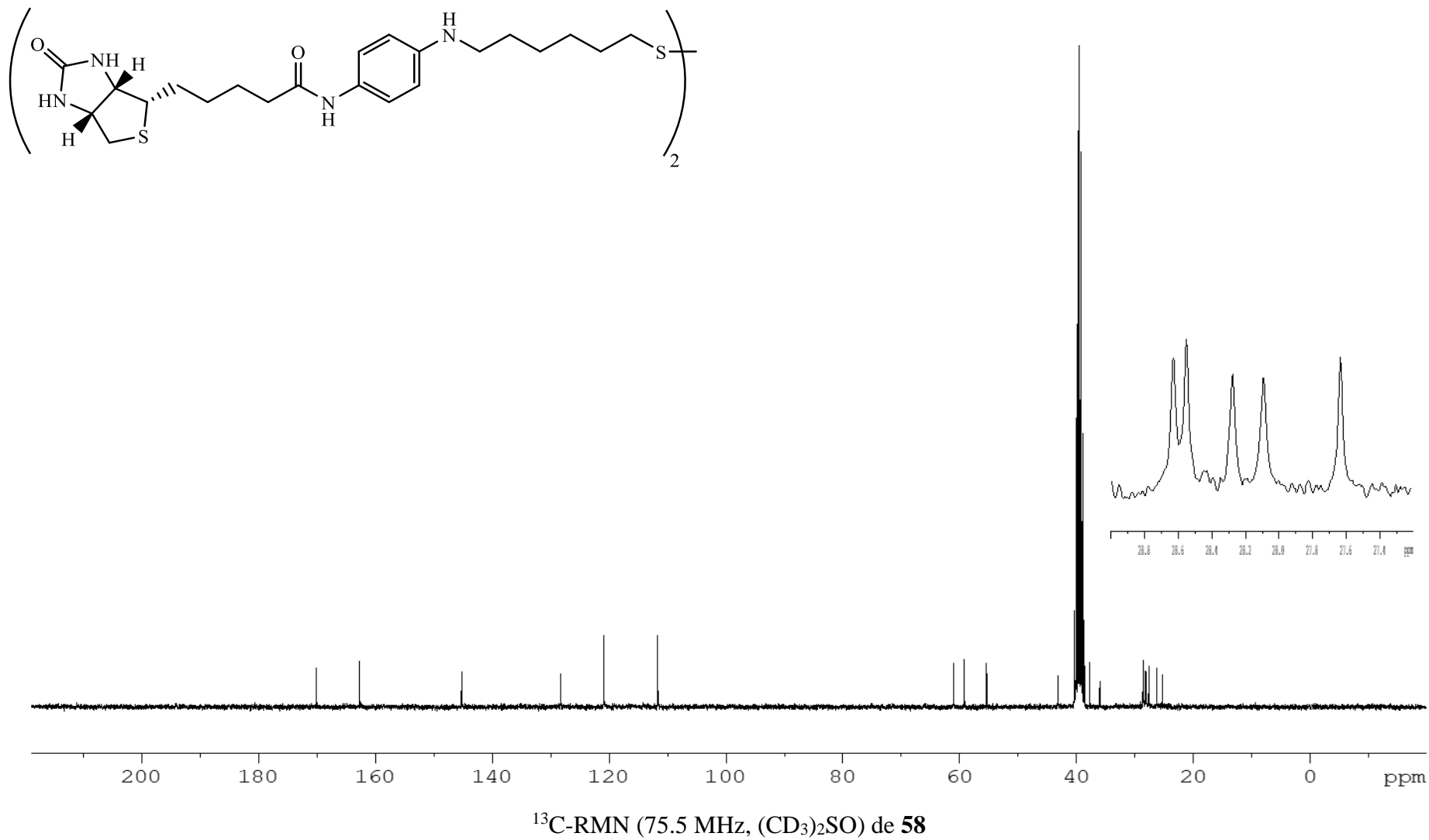


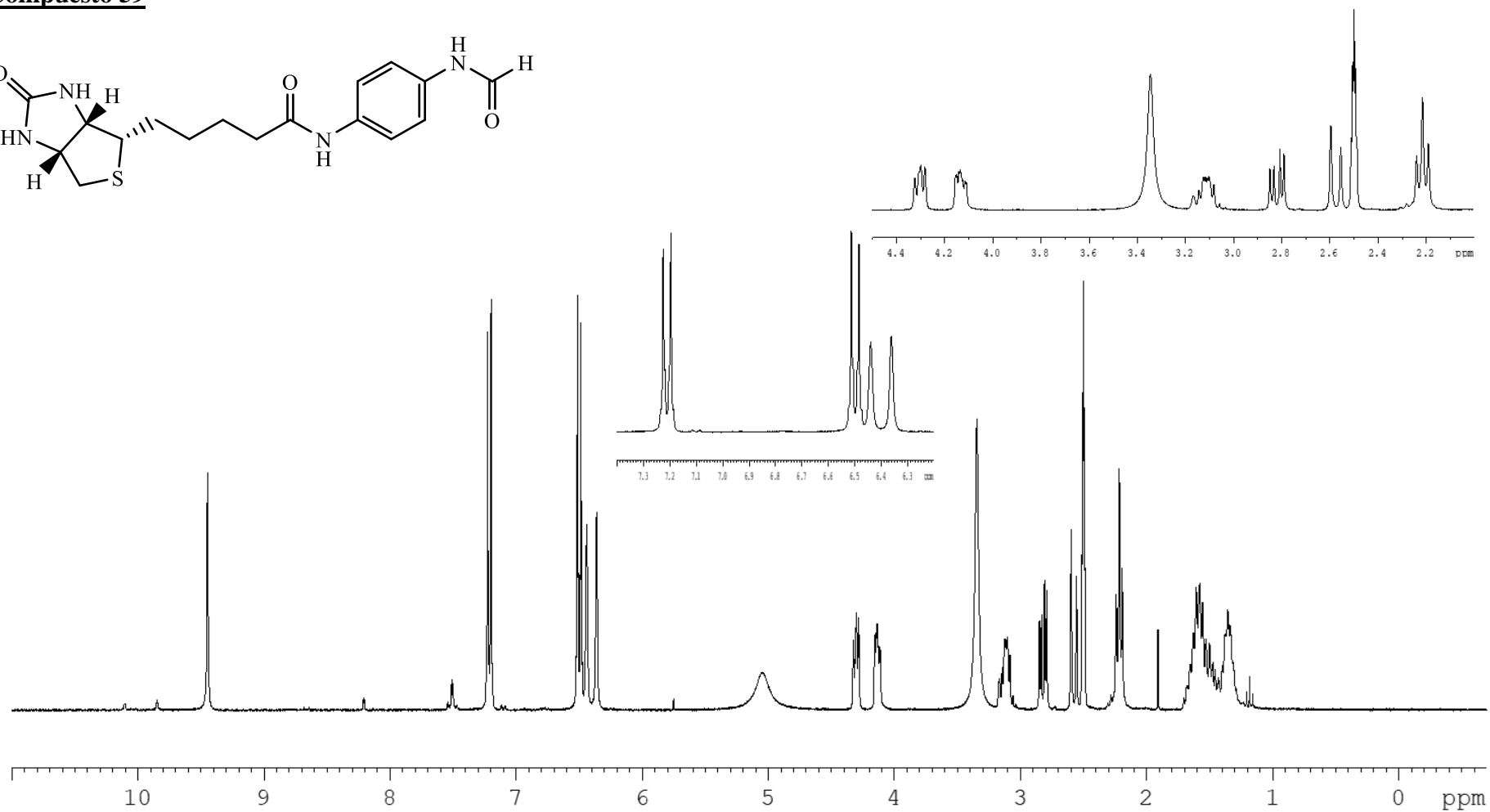
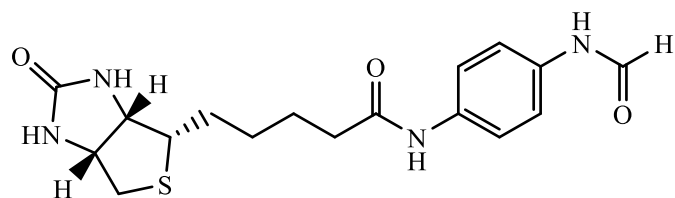
^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de **56**

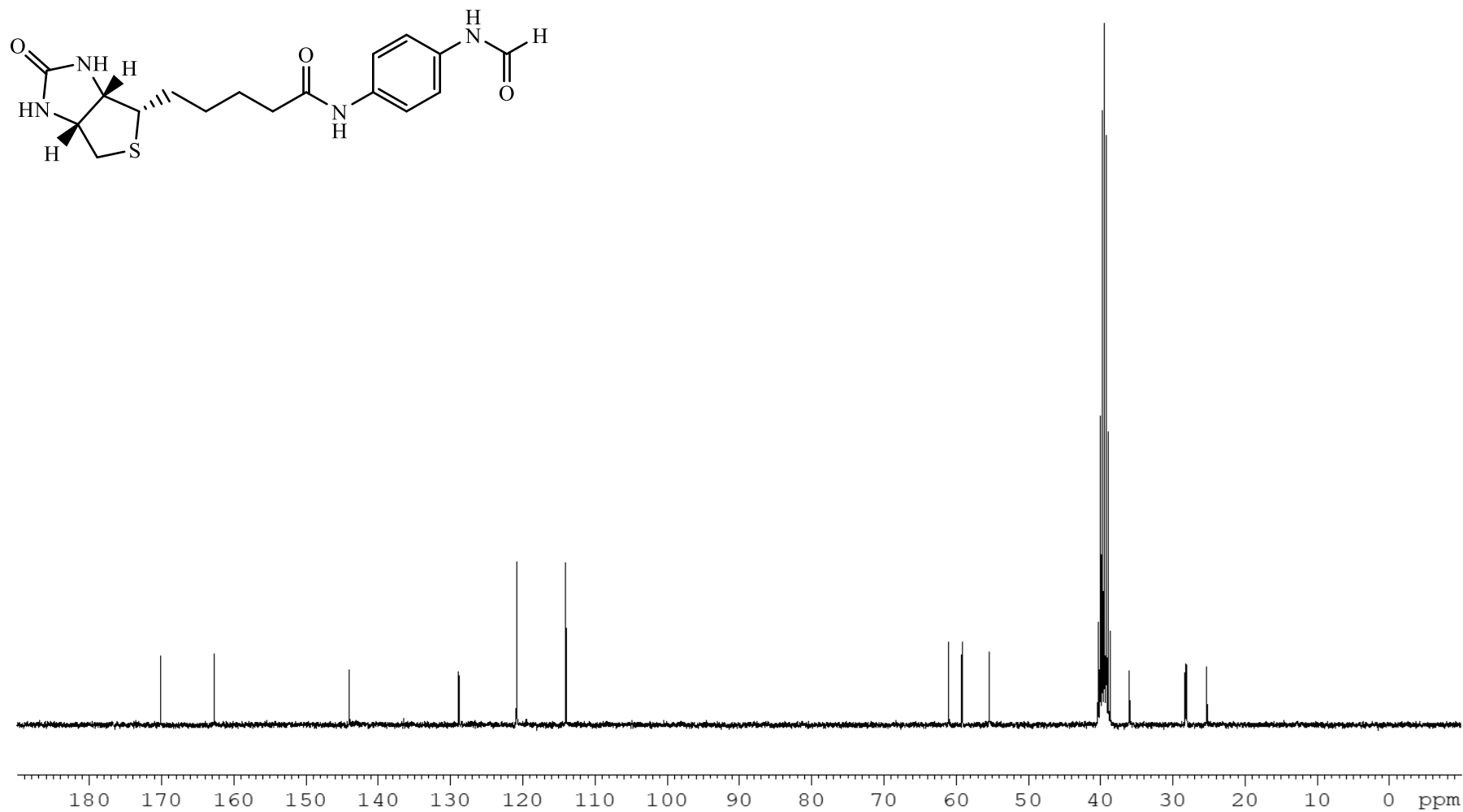
Compuesto 57

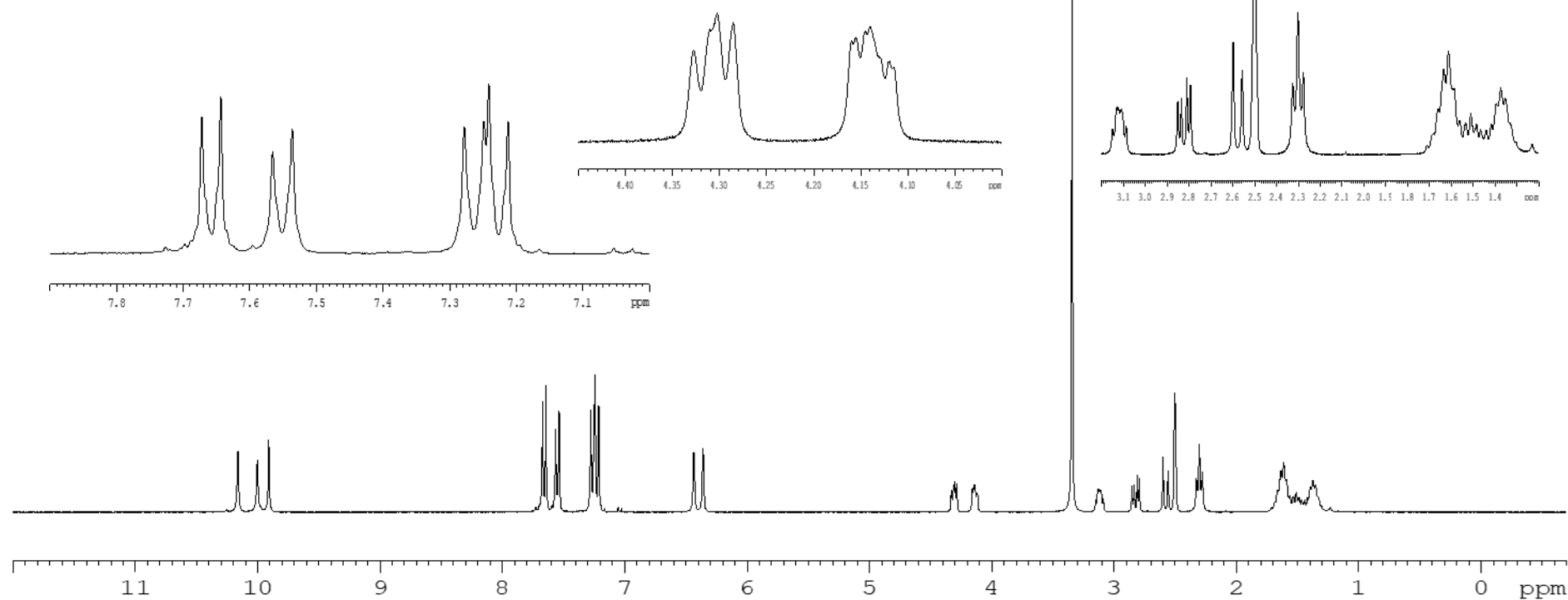
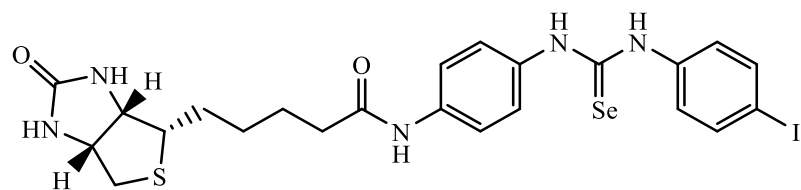


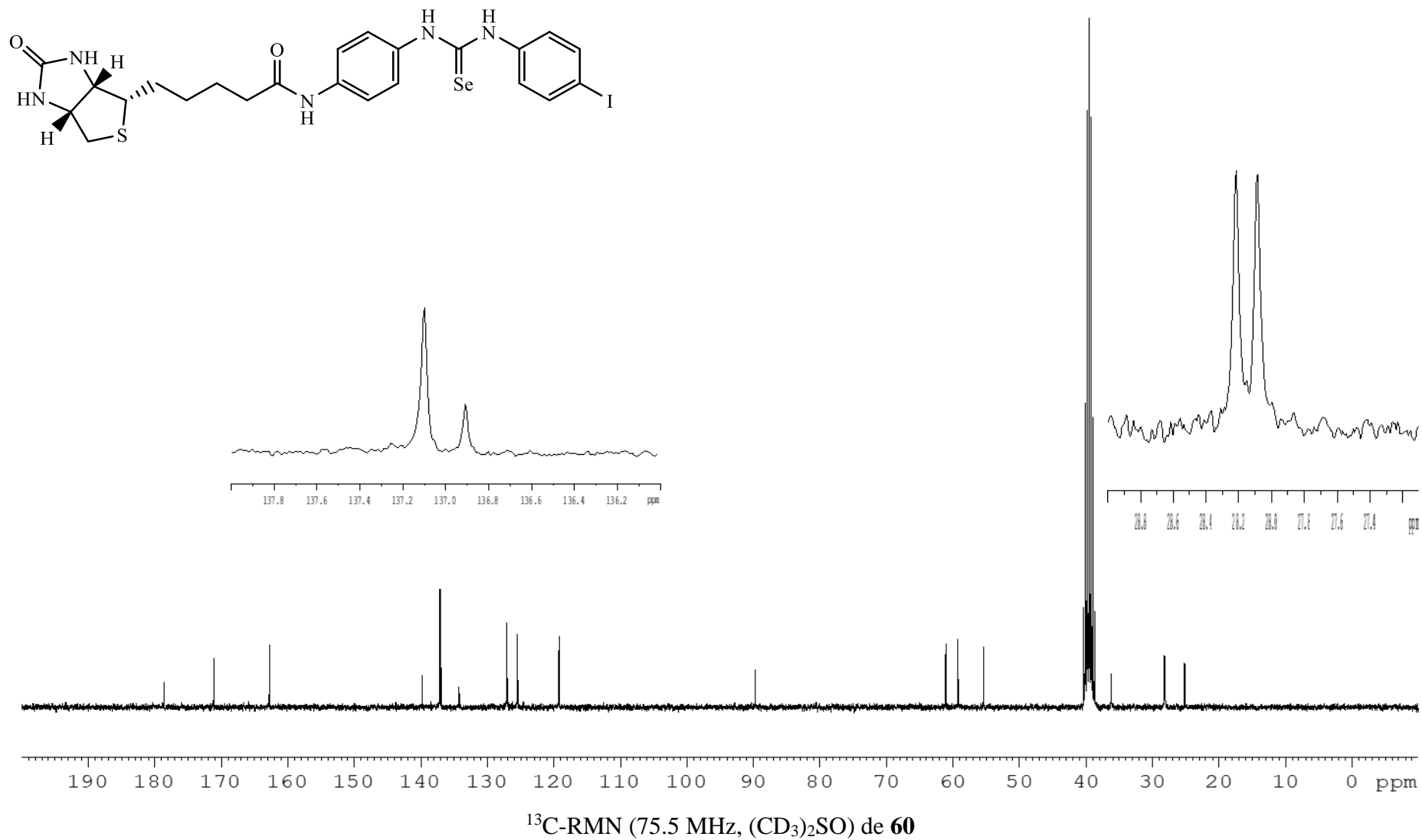
Compuesto 58

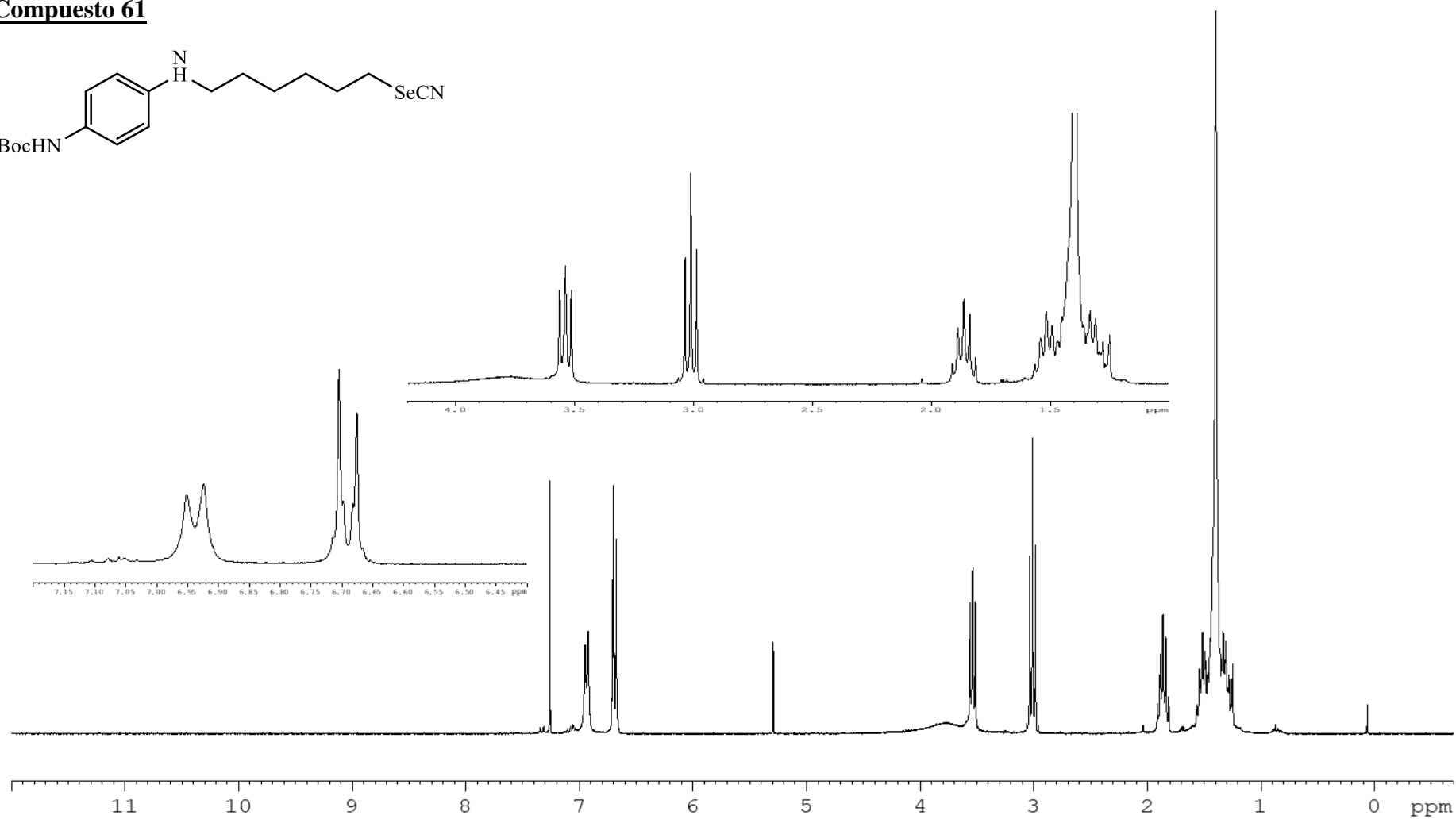
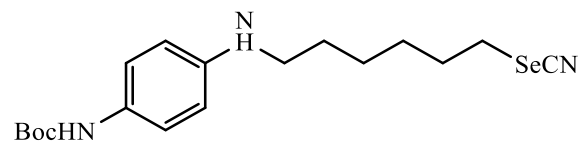


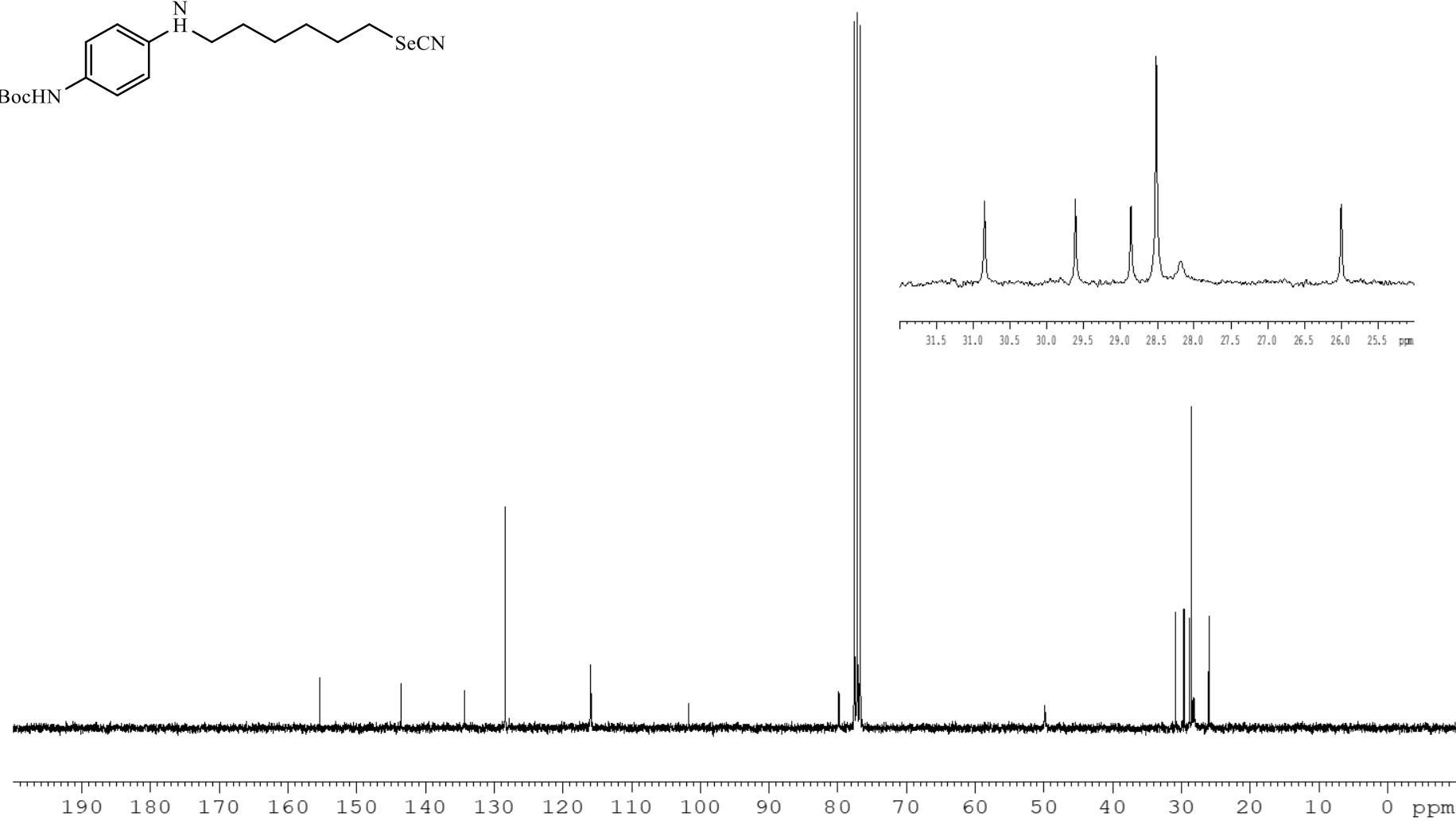
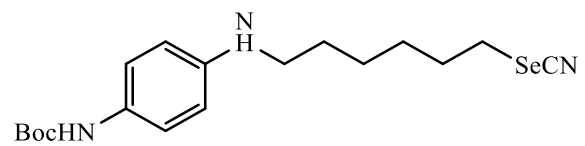
Compuesto 59 $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **59**

 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **59**

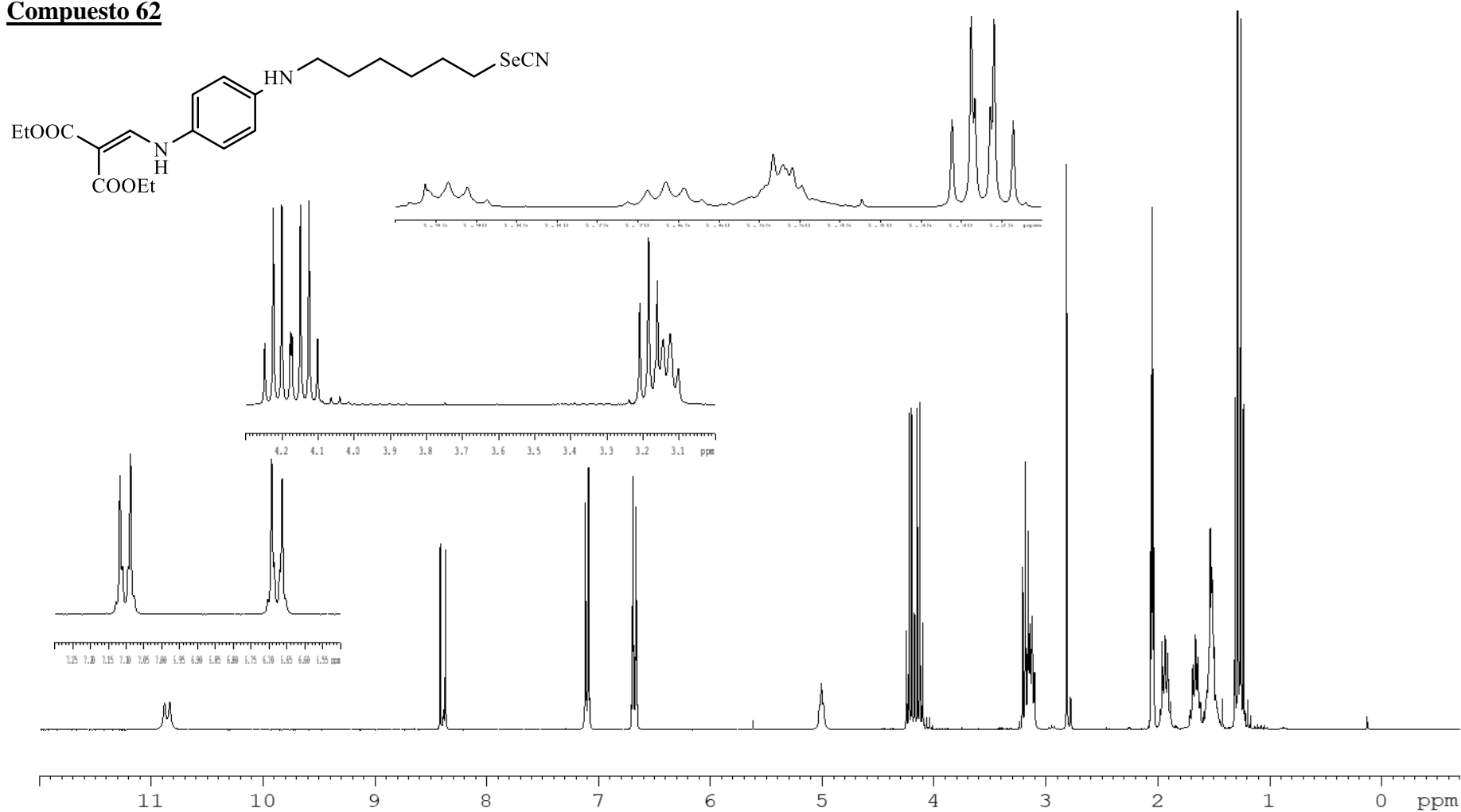
Compuesto 60¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) de **60**

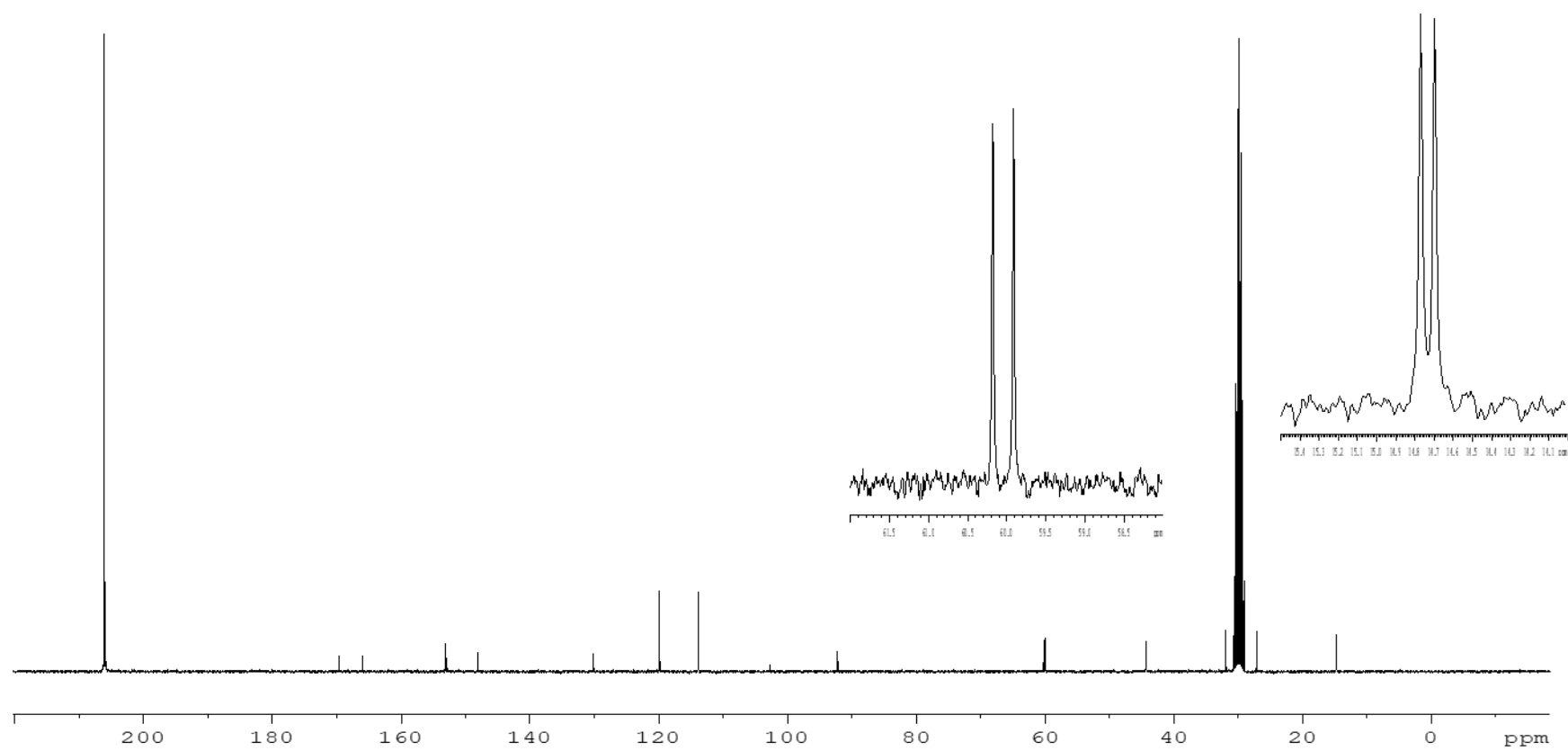
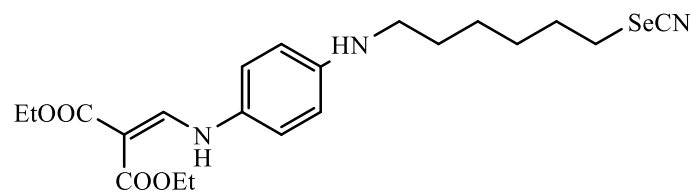


Compuesto 61¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) de **61**

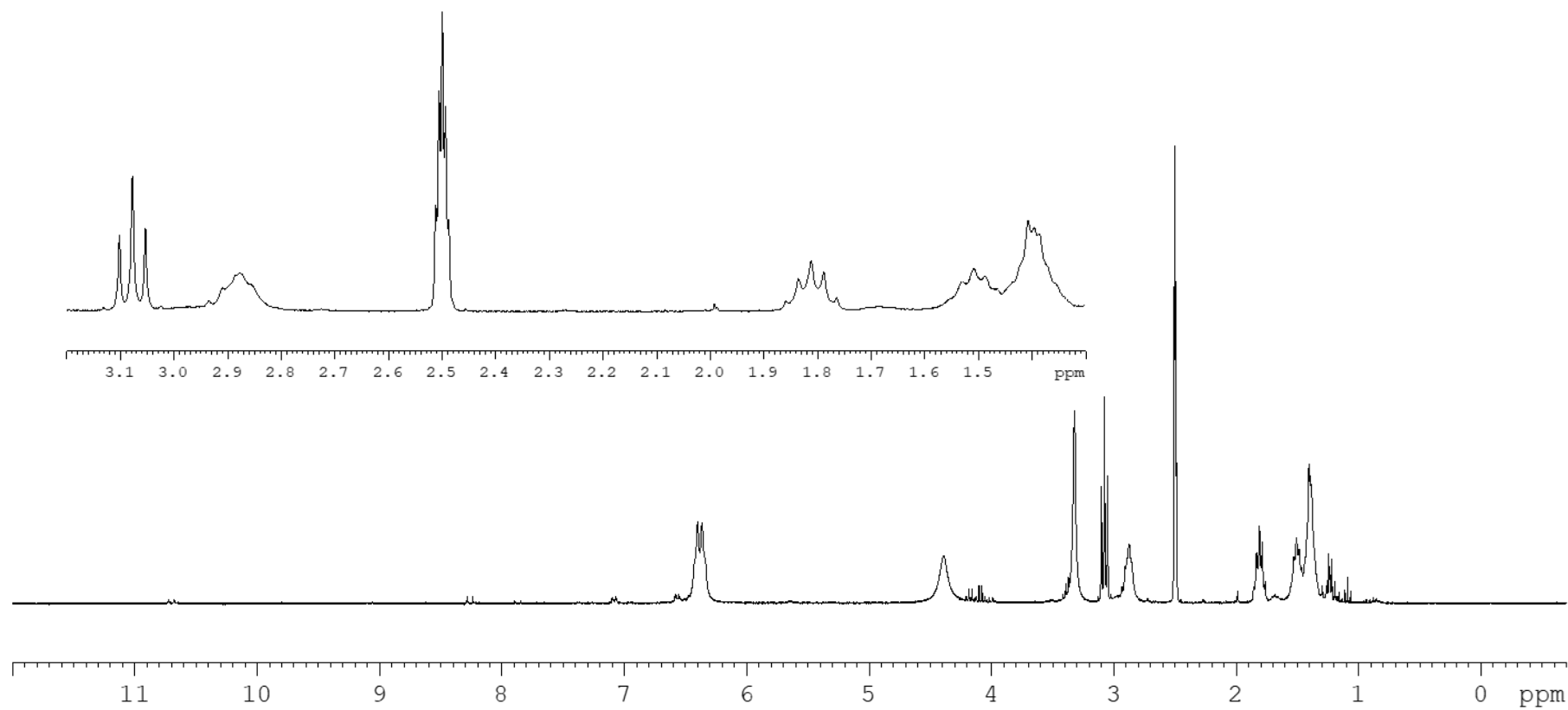
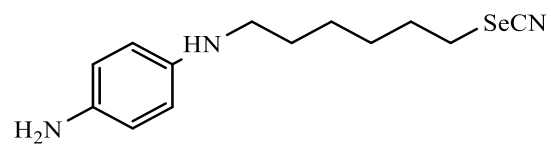


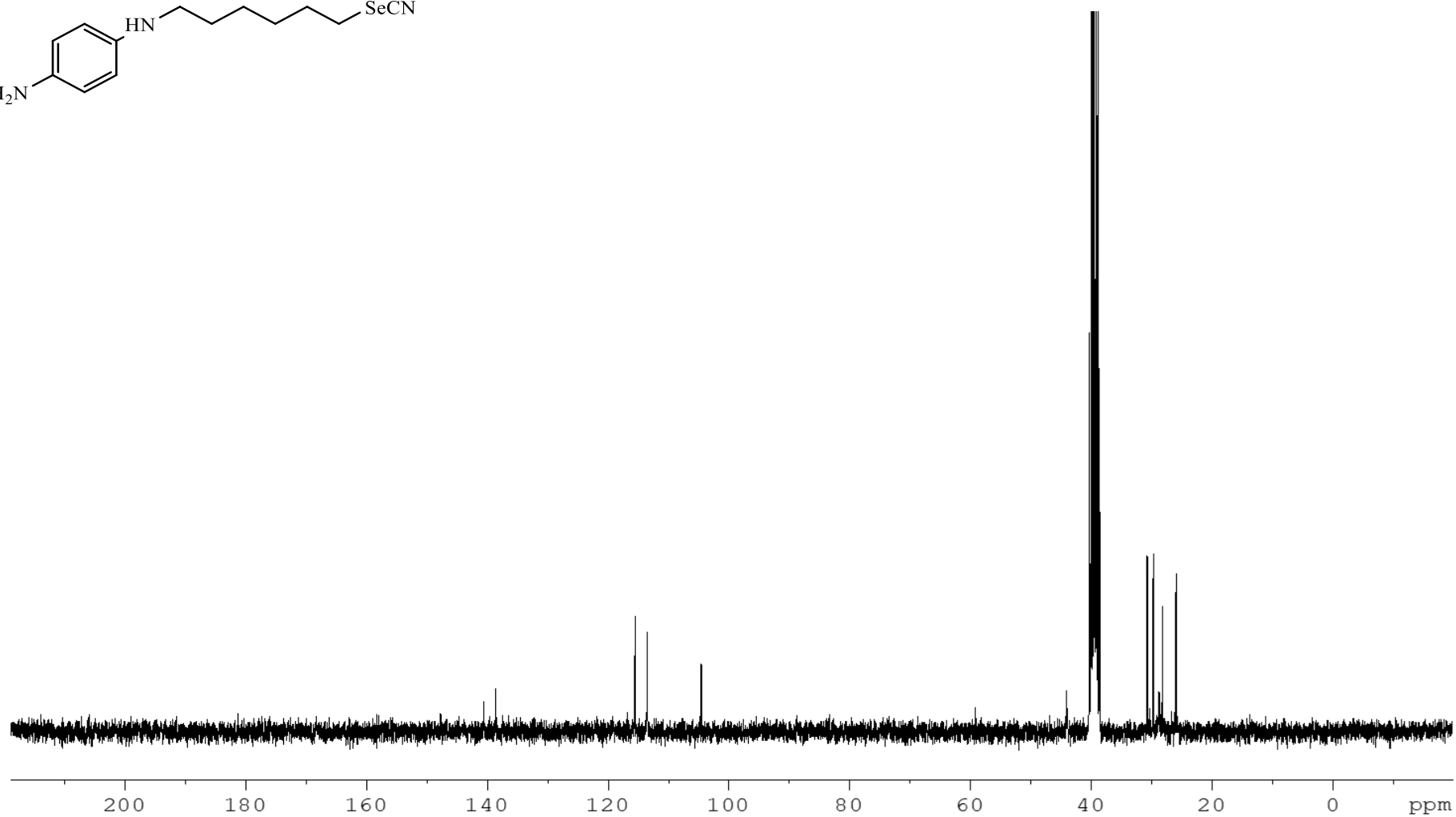
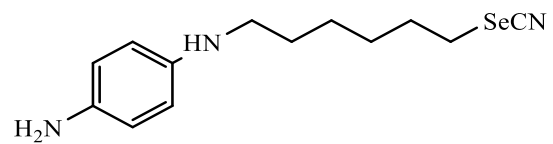
^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) de **61**

Compuesto 62

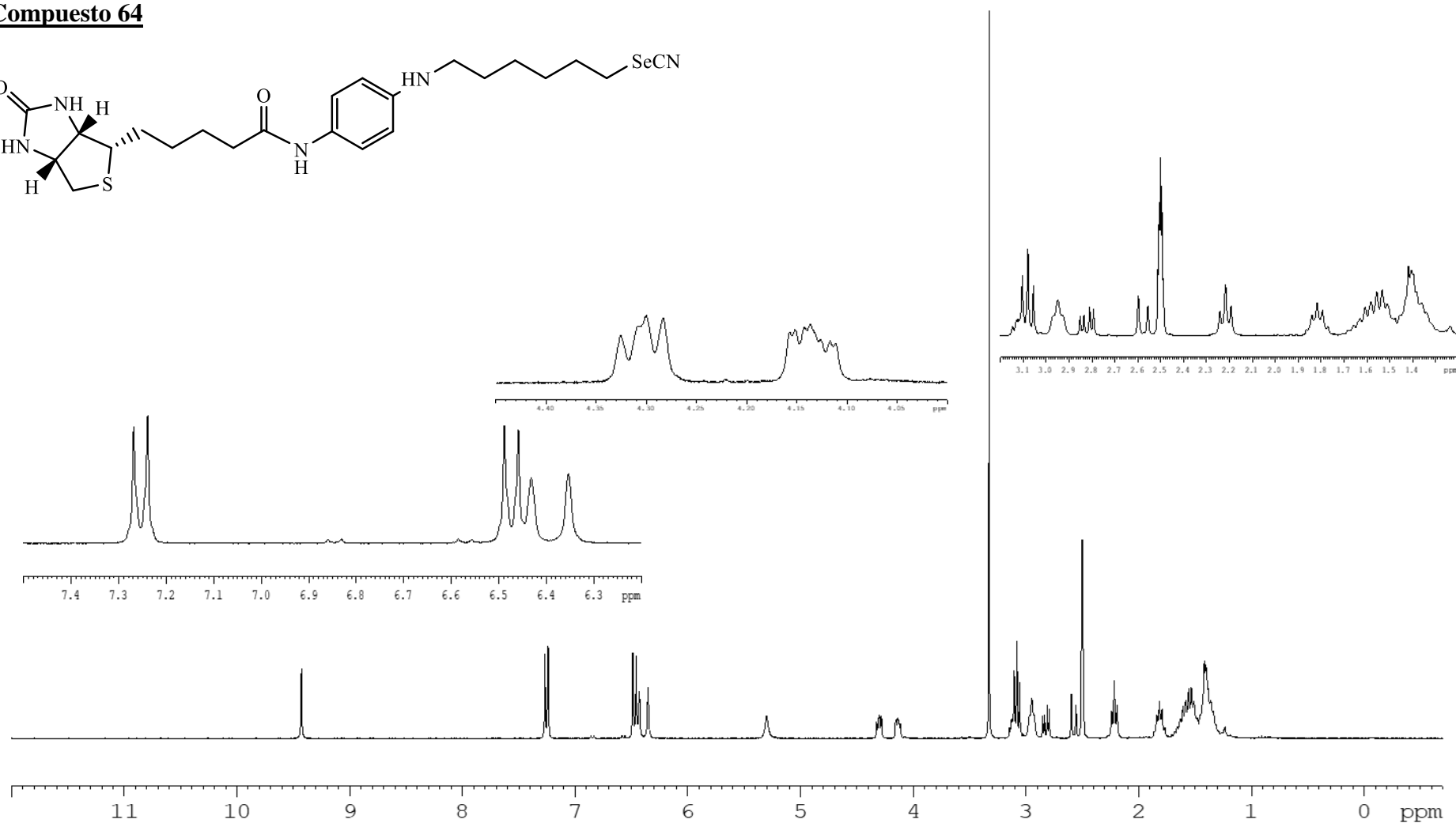
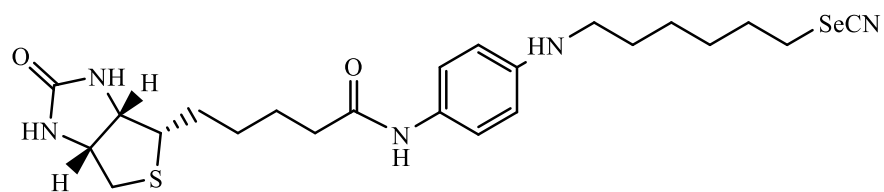


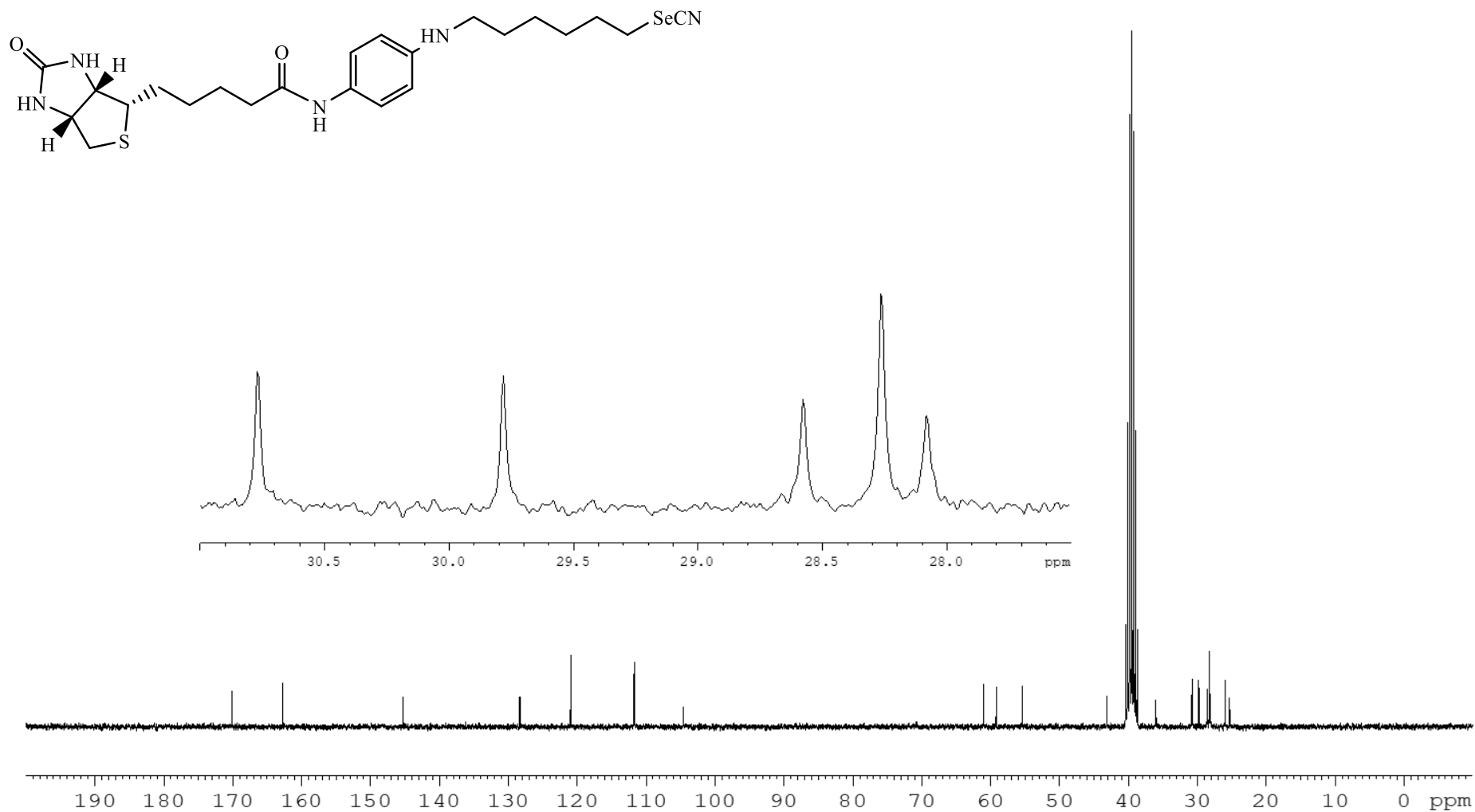
^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de **62**

Compuesto 63 ^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **63**



^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **63**

Compuesto 64¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO) de **64**

 ^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de **64**