



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

FACULTAD DE QUÍMICA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

## **Síntesis de nuevos antioxidantes derivados del hidroxitirosol. Interacción con ciclodextrinas.**

Memoria presentada por la Licenciada  
Azucena Maset Castro para optar al  
grado de Doctora en Química.



Vº Bª de los Directores de la Tesis

Fdo. Dr. José Mª Fernández-Bolaños Guzmán,  
Profesor Titular del Departamento de Química  
Orgánica de la Universidad de Sevilla

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

Fdo. Dra. Inés Maya Castilla,  
Catedrática de Escuela Universitaria del  
Departamento de Química Orgánica de la  
Universidad de Sevilla

## ÍNDICE

---

<b>ÍNDICE</b>	
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	6
<b>RESUMEN</b>	12
<b>RELACIÓN DE COMPUESTOS</b>	17
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	24
1.1. Polifenoles	25
1.2. Hidroxitirosol. Propiedades biológicas	28
1.2.1. Fuentes de obtención den hidroxitirosol	34
1.3. Azufre y tioderivados	36
1.4. Selenio y selenoderivados	37
<b>OBJETIVOS</b>	44
<b>2. SÍNTESIS DE ÉSTERES DERIVADOS DEL HIDROXITIRO SOL</b>	46
<b>2.1. Introducción y antecedentes</b>	47
<b>2.2. Resultados y discusión</b>	57
2.2.1. Síntesis de ésteres alifáticos derivados del hidroxitirosol mediante transesterificación catalizada por ácido	57
2.2.2. Síntesis de (3',4'-dihidroxifenil)etanoato de hidroxitirosilo	60
<b>3. SÍNTESIS DE TIO Y SELENODERIVADOS CON FRAGMENTOS DE CATECOL</b>	63
<b>3.1. Introducción y antecedentes</b>	64
3.1.1. Ácido lipoico	64
3.1.2. Oxiranos y apertura regioselectiva con distintos nucleófilos	69

---

3.1.3. Síntesis de tio y selenoureas	72
3.1.4. Catecolaminas	76
<b>3.2. Resultados y discusión</b>	<b>80</b>
3.2.1. Esterificación del hidroxitirosol con ácido lipoico	80
3.2.2. Síntesis de tioderivados del cloruro de 3,4-dihidroxiacetofenona	82
3.2.3. Síntesis del oxirano derivado del vinilcatecol di-o-protegido del hidroxitirosol y apertura regioselectiva con selenoderivados	86
3.2.4. Síntesis de tio y selenoureas derivadas de la norepinefrina	89
<b>4. SÍNTESIS DE DERIVADOS PEPTÍDICOS POLIFENÓLICOS DERIVADOS DE L-AMINOÁCIDOS</b>	<b>92</b>
<b>4.1. Introducción y antecedentes</b>	<b>93</b>
4.1.1. Acoplamiento peptídico	93
4.1.2. Grupos protectores en la síntesis peptídica	93
4.1.3. Métodos de acoplamiento peptídico	94
4.1.4. Amidas polifenólicas	101
<b>4.2. Resultados y discusión</b>	<b>106</b>
<b>5. SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL HIDROXITIRO SOL CON MÚLTIPLES FRAGMENTOS DE CATECOL VÍA <i>CLICK CHEMISTRY</i></b>	<b>114</b>
<b>5.1. Introducción y antecedentes</b>	<b>115</b>
5.1.1. Antecedentes de derivados con múltiples fragmentos de catecol	115
5.1.2. Click chemistry como estrategia para la obtención de derivados multivalentes con fragmentos de catecol	120
<b>5.2. Resultados y discusión</b>	<b>126</b>

---

<b>6. DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE <math>\beta</math>-CICLODEXTRINA CON DERIVADOS LIPÓFILOS DEL HIDROXITIROSO</b>	135
<b>6.1. Introducción y antecedentes</b>	136
<b>6.2. Resultados y discusión</b>	144
6.2.1. Determinación de la estequiometría de los complejos de inclusión	144
6.2.2. Determinación de las constantes de asociación de los complejos de inclusión	149
6.2.3. Determinación de la estructura de los complejos de inclusión	151
<b>7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA</b>	159
<b>7.1. Introducción y antecedentes</b>	160
7.1.1. Estrés oxidativo	160
7.1.2. Antioxidantes	162
7.1.3. Ensayos de antioxidación	164
7.1.4. Ensayos biológicos	171
<b>7.2. Resultados y discusión</b>	176
7.2.1. Medidas de la actividad antioxidante	176
7.2.1.1. <i>Medida de la actividad atrapadora de radicales libres (DPPH)</i>	176
7.2.1.2. <i>Medida de la actividad atrapadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	184
7.2.1.3. <i>Medida de la inhibición de la peroxidación lipídica</i>	188
7.2.1.4. <i>Medida de la actividad mimética de la glutatión peroxidasa</i>	194
7.2.2. Medidas de la actividad anticancerígena y antitumoral	199

<b>8. CONCLUSIONES</b>	208
<b>9. PARTE EXPERIMENTAL</b>	212
9.1. Métodos generales	213
9.2. Productos comerciales	222
9.3. Materias primas	225
9.4. Nuevas investigaciones	237

## **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**



**ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

°C	Grados Celsius
a	Señal ancha
Å	Ångström
Ac	Acetilo
ac.	Acuoso
Ac <sub>2</sub> O	Anhidrido acético
AcO	Acetoxi
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AM	Aceptor de Michael
Bn	Bencil
BOP	Hexafluorofosfato de benzotriazoliloxi-tris-[dimetilamino] fosfonio
<i>t</i> Bu	<i>terc</i> -Butilo
Bu	Butilo
<i>c</i>	Concentración
c.c.f.	Cromatografía en capa fina
CD	Ciclodextrina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol tetradeuterado
(CD <sub>3</sub> )CO	Acetona deuterada
CIMS	<i>Chemical Ionization Mass Spectrometry</i>
cm	Centímetro
col.	Colaboradores
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CuAAC	<i>Copper(I)-catalyzed Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition</i>
cuant.-	Cuantitativo
D <sub>2</sub> O	Óxido de deuterio
d	Doblete
dd	Doble doblete
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DHFG	3,4-Dihidroxifenilglicol
DIAD	Diisopropil-azodicarboxilato
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DM	Donador de Michael
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMP	<i>Dess-Martin Periodinane</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPAC	Ácido 3,4-dihidrimetilacético
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
dt	Doble triplete
DTT	Ditiotreitol
DTBA	Di- <i>tert</i> -butil-azodicarboxilato
EC <sub>50</sub>	<i>Half maximal effective concentration</i>
EDC	Hidrocloruro de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida
EIMS	<i>Electron Impact Mass Spectrometry</i>
equiv.	Equivalente
Et	Etilo
EtOH	Etanol
eV	Electronvoltio
g	Gramo
GPxa	Glutación peroxidasa
h	Hora
HATU	<i>N</i> -[(Dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]piridin-1-ilmetileno]- <i>N</i> -metilmetanaminio
HBTU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-oxi-1,1,3,3-tetrametiluronio
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HOBt	<i>1-Hydroxybenzotriazol</i>
HRCIMS	<i>High Resolution Chemical Ionization Mass Spectrometry</i>
HREIMS	<i>High Resolution Electron Impact Mass Spectrometry</i>
HRLSIMS	<i>High Resolution Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>

---

HT	Hidroxitirosol
Hz	Hertzios
IC <sub>50</sub>	<i>Median Inhibitory Concentration</i>
IBX	Ácido yodoxibenzoico
IR	Infrarrojos
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kV	Kilovoltios
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LSIMS	<i>Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry</i>
M	Molar
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
mbar	Milibar
Me	Metilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertzios
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
ms	Milisegundo
MS	Espectrometría de masas
N	Normal
NCS	Suero de ternero recién nacido
nm	Nanómetro
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OMW	<i>Olive mill wastewater</i>
p.f.	Punto de fusión
Ph	Fenilo
ppm	Partes por millón

iPr	Isopropilo
PS-TPP	<i>Polymer Supported Triphenylphosphine</i>
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
Py	Piridina
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazoliloxi-tris-(pirrolidino) fosfonio
q	cuartete
quint.	quintuplete
R.	Rendimiento
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROESY	<i>Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
RuAAC	<i>Ruthenium-catalyzed 1,3-Dipolar Cycloaddition</i>
s	Singulete
sat.	Saturado
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
t	Tiempo o triplete
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TEA	Trietilamina
TEMPO	<i>2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Trimetilsililo
TPP	Trifenilfosfina
Ty	Tirosol
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus del papiloma humano
$\beta$ -CD	Beta ciclodextrina
$\Delta\delta$	Diferencia de desplazamiento químico

$\delta$	Desplazamiento químico
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{A}$	Microamperio
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\nu_{\text{max}}$	Número de onda
$[\alpha]$	Rotación específica

## **RESUMEN**

## RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la preparación de derivados funcionales del hidroxitirosol (HT), con objeto de obtener nuevos polifenoles bioactivos de interés en el ámbito de los alimentos funcionales, cosmética o industria farmacéutica.

En primer lugar se describe la conversión del HT en ésteres alifáticos de cadena variable; en este contexto, se ha abordado la transesterificación quimioselectiva del hidroxilo alifático del hidroxitirosol con diversos ésteres (acetato de etilo, hexanoato, octanoato y decanoato de metilo), usando la resina de intercambio catiónico Amberlita IR-120 (H<sup>+</sup>) como catalizador heterogéneo, y el propio éster alifático como disolvente, o en presencia de THF como co-disolvente. Este método permite acceder a derivados del hidroxitirosol con mayor carácter hidrófobo, un aspecto de gran interés a la hora de mejorar la biodisponibilidad de derivados polifenólicos en sistemas biológicos. El método resultó especialmente eficaz para la obtención del acetato de hidroxitirosilo (74% de rendimiento), otro polifenol natural con excelentes propiedades biológicas. En este método además se demostró el carácter reutilizable de la resina, sin pérdida aparente de rendimiento en sucesivos ciclos.

También se ha llevado a cabo la primera síntesis del 3',4'-dihidroxifenilacetato de hidroxitirosilo **8**, un derivado del hidroxitirosol con dos grupos catecol en su estructura; cabe destacar que este compuesto ha sido recientemente aislado de un insecto, y ha sido empleado en la medicina tradicional china en el tratamiento de inflamaciones, infecciones y cáncer.

El acceso a **8** se ha conseguido partiendo del hidroxitirosol, mediante una metodología sintética en 5 etapas: protección quimioselectiva de los hidroxilos fenólicos con el grupo *o*-xilileno, oxidación de éste hasta ácido carboxílico (resultó muy eficaz la oxidación directa con NaClO en presencia de TEMPO), conversión en cloruro de ácido por tratamiento con cloruro de tionilo, acoplamiento con el HT protegido con *o*-xilileno y desprotección final mediante hidrogenación catalítica.

También se han preparado derivados polifenólicos en los que se han introducido grupos funcionales conteniendo azufre o selenio, que pueden aportar interesantes propiedades biológicas. Así pues, en este contexto se ha llevado a cabo la obtención del

$\alpha$ -lipoato de hidroxitirosilo **9** el ácido  $\alpha$ -lipoico es un ácido graso natural, que contiene un disulfuro cíclico en su estructura y con importantes propiedades antioxidantes, cardioprotectoras y anticancerígenas. El acceso a dicho compuesto se ha ensayado con dos metodologías sintéticas, ambas compatibles con los hidroxilos fenólicos libres, y por tanto, interesantes desde un práctico, al obviarse procesos de protección-desprotección. La primera de estas metodologías fue la reacción de Mitsunobu, en la cual se ensayó el acoplamiento de HT con el ácido  $\alpha$ -lipoico en presencia de trifenilfosfano soportado sobre resina y azodicarboxilato de di-*tert*-butilo; no obstante, el rendimiento de dicho proceso fue especialmente bajo (17%).

Como alternativa, se obtuvo el éster **9** de manera eficaz transformando en primer lugar el ácido  $\alpha$ -lipoico en el correspondiente cloruro de ácido por tratamiento con cloruro de tionilo y acoplamiento *in situ* con HT, en un proceso catalizado por  $\text{CeCl}_3$ , incrementándose el rendimiento global hasta el 65%.

También se ha llevado a cabo la preparación del tioacetato de (3',4'-dihidroxifenacilo) **11** a partir de 2-cloro-3',4'-dihidroxiacetofenona usando dos metodologías sintéticas. La primera de ellas implica la protección de los hidroxilos fenólicos en forma de acetatos, seguido de desplazamiento nucleofílico del cloro con tioacetato y desprotección; no obstante, se consiguió un mejor rendimiento, aunque moderado (30%), llevando a cabo directamente el desplazamiento nucleofílico del cloro con tioacetato en una sola etapa. La reducción del carbonilo en el tioacetato protegido, usando  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  produjo además la hidrólisis del grupo tioéster y la oxidación del correspondiente tiol intermedio, dando lugar al disulfuro **14**.

Además, se ha estudiado la apertura regioselectiva de un epóxido derivado del vinilcatecol *O*-protegido usando nucleófilos de selenio, generados por el tratamiento de diselenuro de difenilo con Rongalita® en medio básico; de esta manera, se obtuvieron los  $\beta$ -hidroxi-alkil selenuros regioisoméricos **15** y **16**.

En este capítulo también se ha llevado a cabo la preparación de tio y selenoureas polifenólicas mediante acoplamiento del hidrocloreto de norepinefrina con isotiocianatos comerciales, y con isoselenocianatos preparados según la metodología desarrollada en nuestro grupo de investigación, para estudiar la posible sinergia entre el



grupo catecol y los grupos tiona/selona en las propiedades biológicas de los productos finales.

Con objeto de obtener derivados polifenólicos con distinto grado de lipofilia, se han obtenido diversos peptidomiméticos mediante acoplamiento peptídico entre el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), un metabolito de la dopamina, y aminoésteres derivados de L-aminoácidos; se han ensayado diversos agentes activantes clásicos, obteniéndose los mejores resultados (rendimientos de excelentes a cuantitativos) cuando se empleó PyBOP en presencia de Et<sub>3</sub>N. Dentro de esta familia destaca el disulfuro **40**, derivado de la L-cistina, y un análogo estructural al disulfuro de hidroxitirosilo, sintetizado previamente en nuestro grupo de investigación, y un potente agente antiproliferativo. El compuesto **40** fue a su vez transformado en el derivado de L-cisteína **41** mediante un proceso de óxido-reducción mediado por (±)-ditiotreitól (DTT).

También se ha llevado a cabo la preparación de sistemas multivalentes, conteniendo varios anillos polifenólicos con objeto de estudiar un posible efecto positivo de la multivalencia en las propiedades biológicas. La reacción clave en este capítulo fue la cicloadición 1,3-dipolar azido-alquino (*click chemistry*) entre una azido derivado del HT y un *core* con varios grupos alquino. Se han obtenido así los derivados di- y trivalentes **53** y **54**, así como varios derivados tetravalentes, que no han podido ser desprotegidos.

En los últimos dos capítulos de la presente Tesis Doctoral, se han evaluado diversas propiedades biológicas de un número significativo de compuestos preparados.

Así pues, se ha demostrado la formación de complejos de inclusión con β-ciclodextrina del acetato y hexanoato de hidroxitirosilo **1** y **2**, el éster dimérico **8** y el peptidomimético derivado de cistina **40**, caracterizándose los complejos de inclusión mediante <sup>1</sup>H-RMN y experimentos ROESY.

Se ha evaluado además la capacidad antioxidante de todas las familias de compuestos sintetizados, utilizando 4 técnicas distintas: medida de la capacidad antirradicalaria (método del DPPH), inhibición de la peroxidación lipídica (método del tiocianato férrico, o de la oxidación primaria), captación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y evaluación como miméticos de la glutatión peroxidasa, este último en el caso de las tio- y selenoureas **17-27**. Son especialmente destacables las actividades del éster dimérico **8**, las tio- y

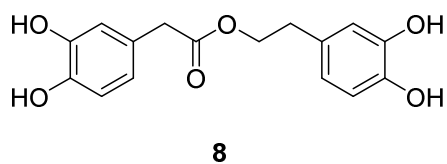
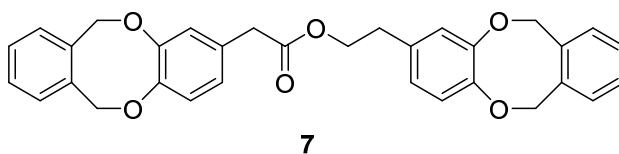
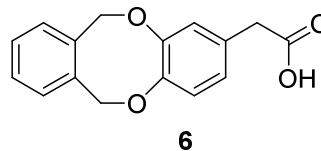
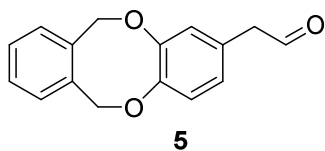
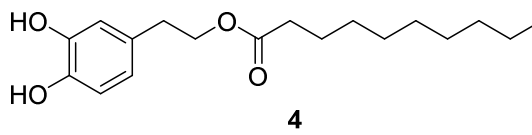
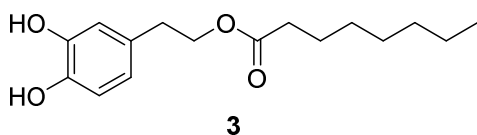
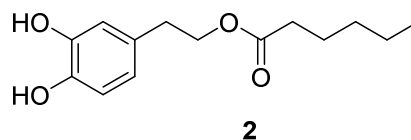
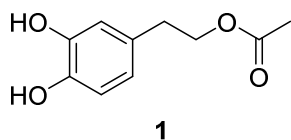
selenoureas **17-27**, el péptido **40**, y los triazolil derivados **53** y **54**, que presentan actividades sustancialmente mejoradas con respecto al HT.

Finalmente, en colaboración con el Dr. Luis Sánchez, de la Universidad Autónoma de México, se ha llevado a cabo la evaluación de las propiedades antiproliferativas del HT, DOPAC y los peptidomiméticos **34-41** frente a tres líneas celulares del cáncer cervico-uterino (HeLa, ViBo, CaSki). De entre todos los compuestos, destaca especialmente el disulfuro **40**, con valores de  $IC_{50}$  comprendidos entre 108.2-121.8  $\mu$ M, aproximadamente dos veces más potente que los compuestos naturales HT y DOPAC; además, el derivado **40** mostró una alta selectividad frente a las células cancerosas, al no inhibir la proliferación de células sanas de tipo linfocito del sistema inmune.

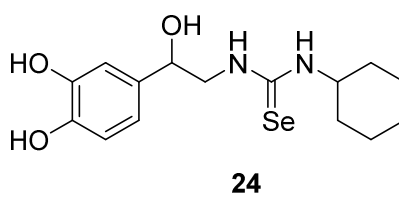
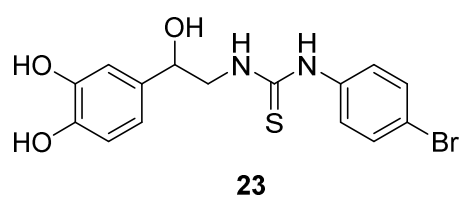
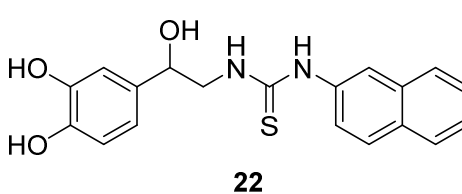
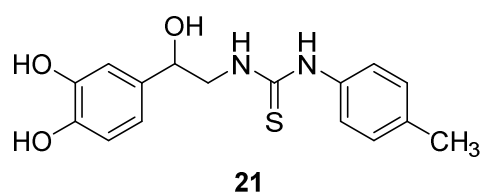
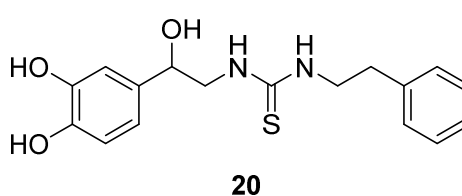
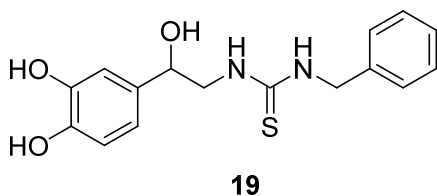
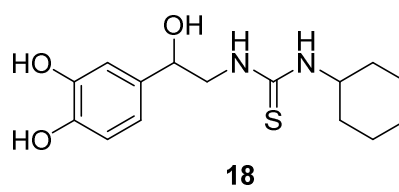
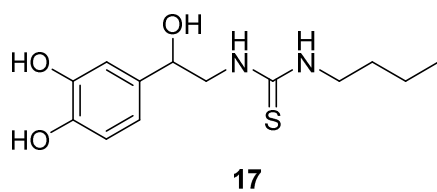
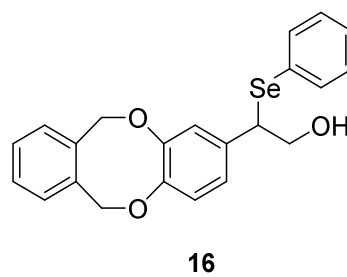
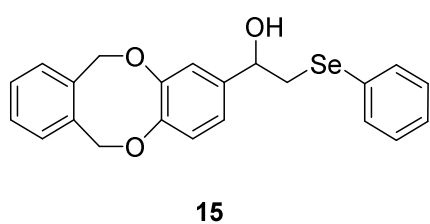
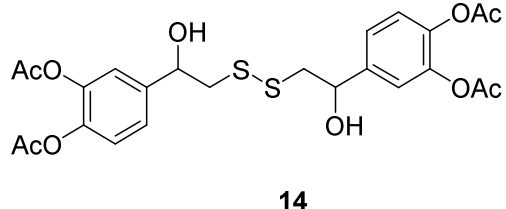
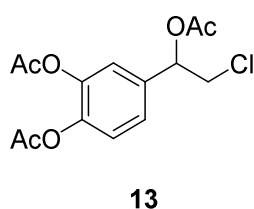
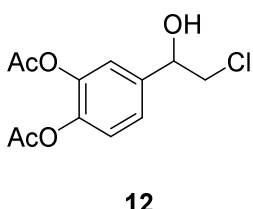
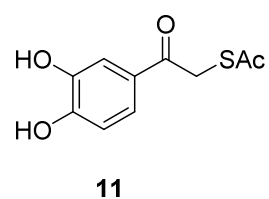
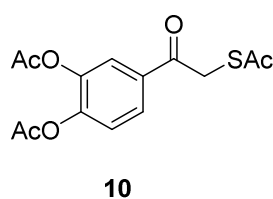
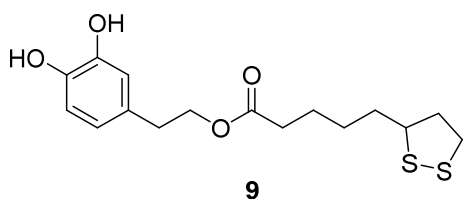
## **RELACIÓN DE COMPUESTOS**

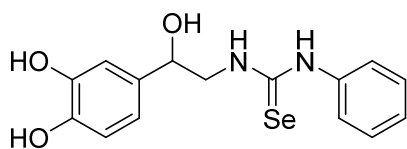
**RELACIÓN DE COMPUESTOS**

A continuación se indican los nuevos productos preparados en cada uno de los capítulos de esta Tesis Doctoral:

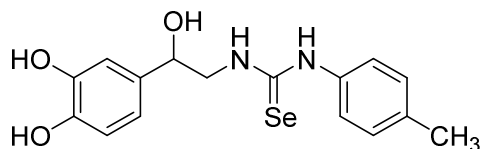
**SÍNTESIS DE ÉSTERES DERIVADOS DEL HIDROXITIRO SOL**

## SÍNTESIS DE TIO Y SELENODERIVADOS CON FRAGMENTOS DE CATECOL

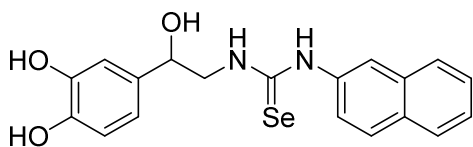




25

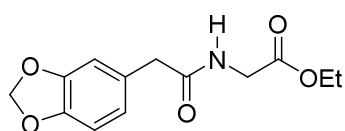


26

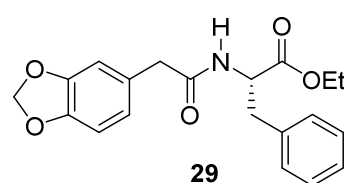


27

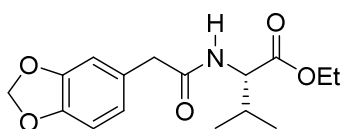
### SÍNTESIS DE DERIVADOS PEPTÍDICOS POLIFENÓLICOS DERIVADOS DE L-AMINOÁCIDOS



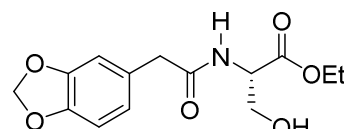
28



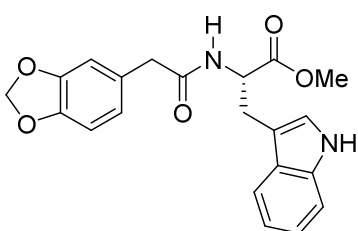
29



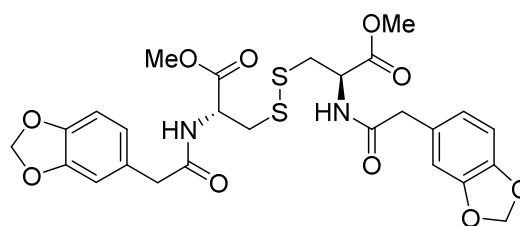
30



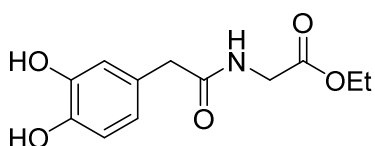
31



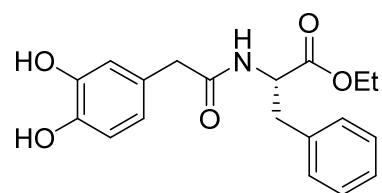
32



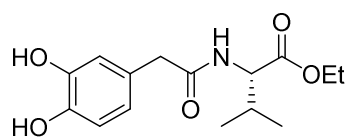
33



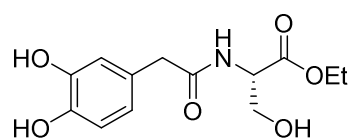
34



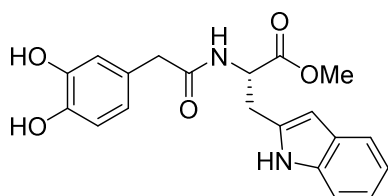
35



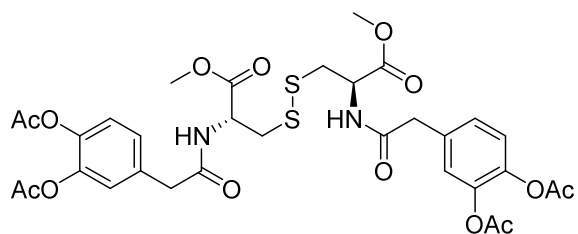
36



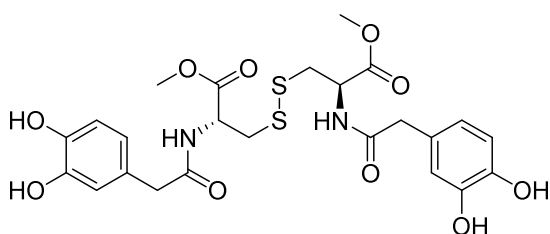
37



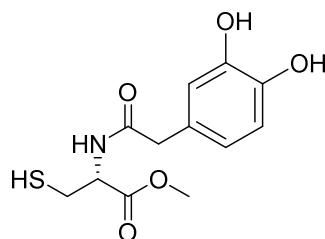
38



39

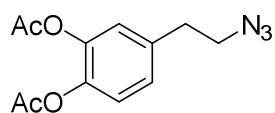


40

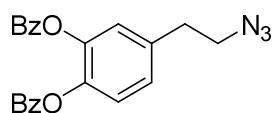


41

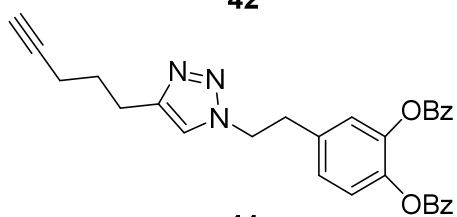
**SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL HIDROXITIROSOL CON MÚLTIPLES FRAGMENTOS DE CATECOL VÍA *CLICK CHEMISTRY*.**



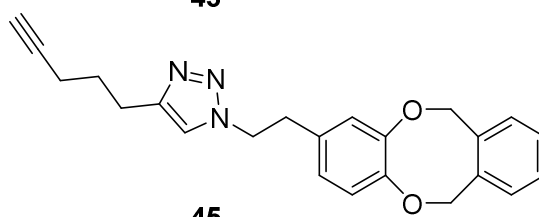
42



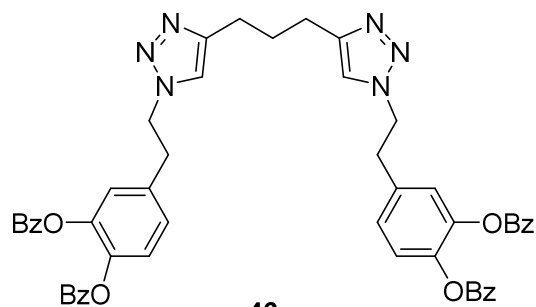
43



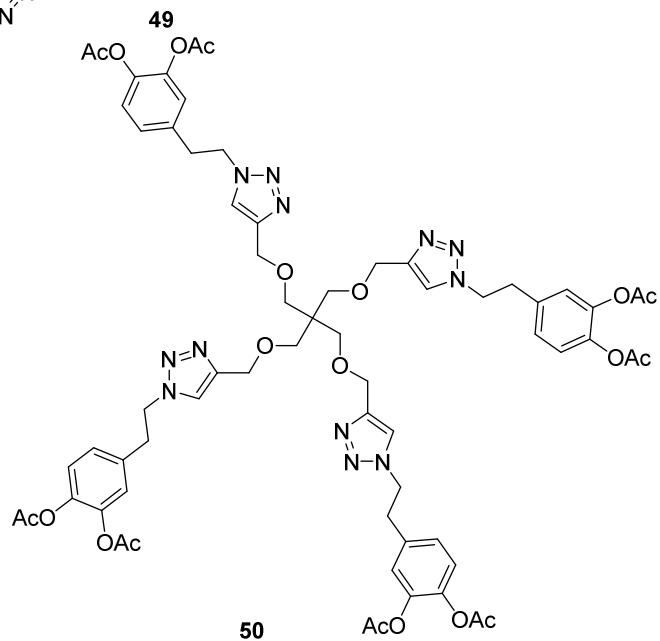
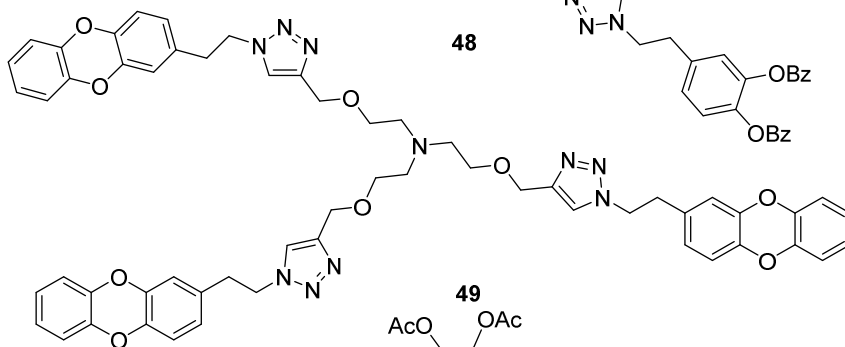
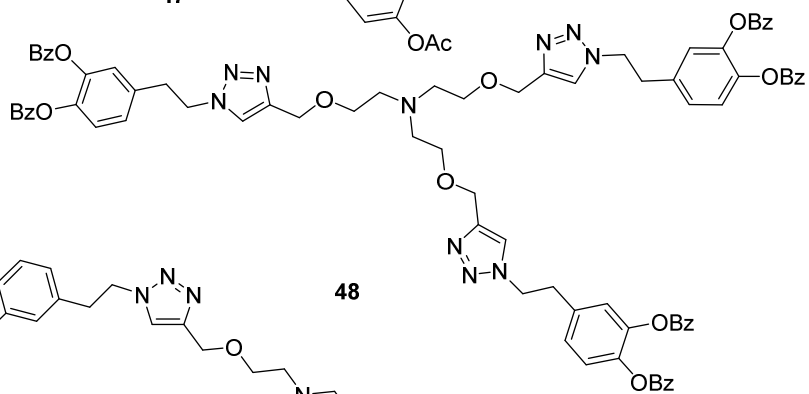
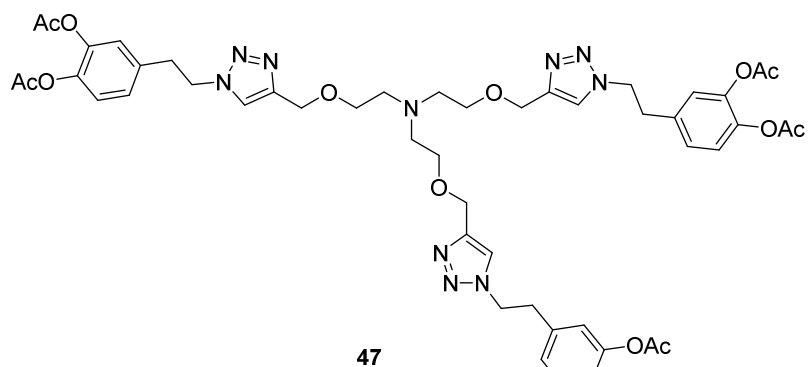
44



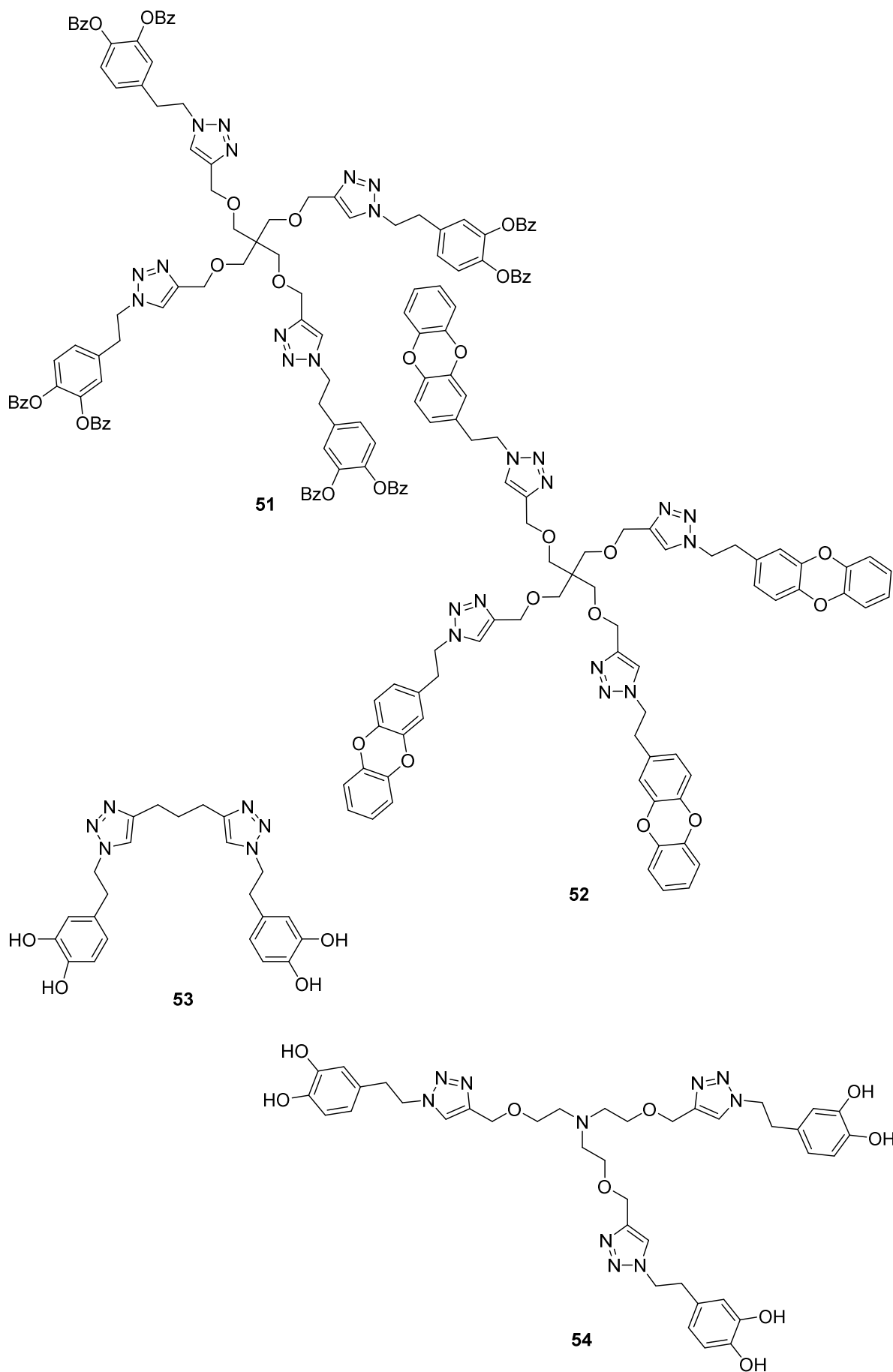
45



46







## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La presente Tesis Doctoral se encuadra dentro del proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía “Optimización del aislamiento de polifenoles de la aceituna. Complejación con ciclodextrinas, derivatización y evaluación como agentes antioxidantes” (P08-AGR-03751).

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido la preparación de derivados funcionales del hidroxitirosol, debido a las importantes propiedades biológicas y farmacológicas exhibidas por el mismo; estos nuevos derivados podrían tener un amplio abanico de aplicaciones, que van desde aditivos en la obtención de alimentos funcionales, preparados cosméticos, o industria farmacéutica.

Se incluye a continuación una descripción general de los compuestos polifenólicos: tipos, fuentes naturales y principales propiedades biológicas.

### 1.1. Polifenoles

Los polifenoles constituyen una extensa familia de metabolitos secundarios ampliamente distribuida en el reino vegetal, donde constituyen un mecanismo de defensa frente a la radiación solar y frente a patógenos, debido a su acción antimicrobiana y antifúngica.<sup>1</sup> En los alimentos, los polifenoles son importantes ya que influyen sobre las propiedades organolépticas del mismo, tales como el color, sabor y textura. Fuentes clásicas de polifenoles en la dieta son frutas, verduras, cereales, vino, té, cacao y aceite de oliva virgen extra.<sup>1,2</sup>

Estructuralmente, los polifenoles se caracterizan por contener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Una clasificación de este tipo de compuestos puede verse en tabla 1.1.

---

<sup>1</sup> Soto-Vaca, A.; Gutiérrez, A.; Losso, J.N.; Xu, Z.; Finley, J.W.; *J. Agric. Food. Chem.* **2012**, *60*, 6658-6677.

<sup>2</sup> Martín-Peláez, S.; Covas, M.I.; Fitó, M.; Kusar, A.; Pravst, I. *Mol. Nutr. Food. Res.* **2013**, *57*, 760-771 y referencias contenidas.

Se ha demostrado que estos compuestos muestran una poseen una importante actividad antioxidante y antirradicalaria,<sup>3</sup> lo que se traduce en una contrastada actividad en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, osteoporosis,<sup>4</sup> actividad antioxidante en plasma,<sup>5</sup> incremento en la concentración de colesterol HDL,<sup>6</sup> e inhibición de agregación plaquetaria.<sup>7</sup>

**Tabla 1.1.** Clasificación simplificada de los distintos tipos de polifenoles.<sup>8,9</sup>

Tipo	Subtipo	Ejemplos	
Flavonoides	Antocianinas	Cianidina, luteolinidina	
	Flavonoles	Kaempferol, quercetina	
	Flavonas	Apigenina, luteolina	
	Flavanonas	Naringenina	
	Isoflavonoides	Isoflavonas	
		Isoflavanos	
	Flavanoles	Monómeros	Catequina, epicatequina, epigallocatequina
Oligómeros y polímeros		Taninos	
No flavonoides	Ácidos fenólicos	Derivados ác. cinámico	Ác. <i>p</i> -cumárico, ác. cafeico, ác. ferúlico
		Derivados ác. benzoico	Ác. gálico, ác. protocatecuico, ác. vanílico, DOPAC
	Alcoholes fenólicos	Hidroxitirosol	
	Lignanós	Pinorresinol, 1-acetoxipinorresinol	
	Estilbenos	Resveratrol	

El aceite de oliva virgen es el zumo natural de la aceituna obtenido mediante procedimientos exclusivamente mecánicos y físicos, lo que lo diferencia del resto de

<sup>3</sup> Fernández-Bolaños, J. G.; López, O.; Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez-Gutiérrez, G. *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 442-463.

<sup>4</sup> Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Révész, C. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2005**, *45*, 287-306.

<sup>5</sup> Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, Sirtori C, Galli C. *Eur. J. Nutr.* **2005**, *44*, 121-127.

<sup>6</sup> Edeas, M. *Phytotherapie*, **2010**, *8*, 16-20.

<sup>7</sup> Ostertag, L. M.; O'Kennedy, N.; Kroon, P. A.; Duthie, G.; de Roos, B.; *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, *54*, 60-81.

<sup>8</sup> Ebrahimi, A.; Schluesener, H. *Ageing Res. Rev.* **2012**, *11*, 329-345.

<sup>9</sup> Haminiuk, C. W. I.; Giselle M. Maciel, G.M.; Plata-Oviedo, M.S.V.; Peralta, R.M. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2012**, *47*, 2023-2044.

aceites vegetales, los cuales se someten a procedimientos químicos de refinado para ser aptos para el consumo.<sup>10</sup> El procedimiento de elaboración del aceite de oliva virgen ha experimentado cambios significativos a lo largo del último siglo, pasando de un sistema de prensado al actualmente más extendido sistema de centrifugación de dos fases.<sup>11</sup> La producción de aceite mediante este sistema genera un único subproducto denominado *alperujo*, de consistencia semisólida y con un contenido en agua que oscila entre el 65-70%.<sup>12</sup>

En la composición del aceite de oliva virgen, se puede distinguir una fracción mayoritaria (98-99%) compuesta fundamentalmente por triglicéridos, y una fracción que engloba a los denominados *componentes minoritarios* y que supone alrededor del 1-2% en peso.<sup>13</sup> Esta fracción de componentes minoritarios comprende más de 230 compuestos químicos, entre los que se incluyen alcoholes alifáticos y triterpénicos, esteroides, hidrocarburos y compuestos volátiles. Entre estos compuestos minoritarios se distingue una fracción polifenólica comprendida entre 50-800 mg/L, cuya concentración y contenido depende de muchos factores, tales como las condiciones de cultivo, variedad, grado de maduración del fruto y las condiciones de elaboración y almacenamiento del aceite.<sup>2</sup> Se han aislado al menos treinta compuestos de naturaleza fenólica en el aceite de oliva, entre dichos derivados se encuentran flavonoides como la apigenina y la luteolina, lignanos como el pinorresinol y el 1-acetoxipinorresinol, alcoholes y ácidos fenólicos, y secoiridoides derivados del 2-(4'-hidroxifenil)etanol, (tirosoles, Ty) y 2-(3', 4'-dihidroxifenil)etanol (hidroxitirosoles, HT) (Figura 1.1).<sup>14</sup>

---

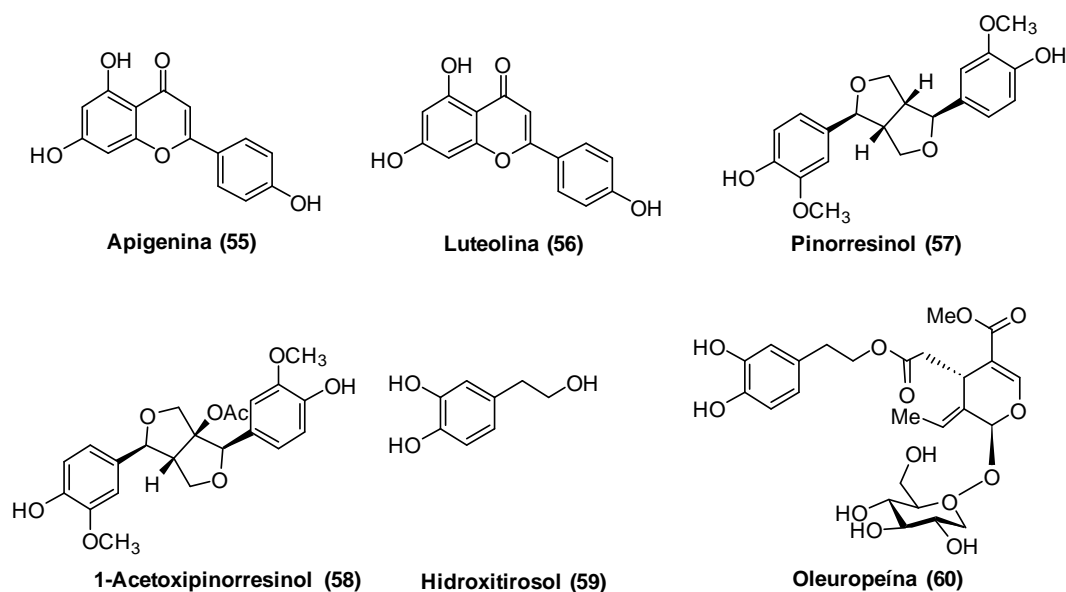
<sup>10</sup> López-Beceiro, J.; Artiaga, R.; Gracia, C.; Tarrío-Saavedra, J.; Naya, S.; Mier, J. L. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2011**, *104*, 169-175.

<sup>11</sup> Alba, J.; Hidalgo, F.; Ruiz, M.A.; Martínez, F.; Moyano, M.J.; Cert, A.; Pérez, M.C.; Ruiz, M.V. *Grasas y aceites*, **1996**, *47*, 163-181.

<sup>12</sup> Albuquerque, J.A.; González, J.; García, D.; Cegarra, J. *Biores. Tech.* **2004**, *91*, 195-200.

<sup>13</sup> Servili, M.; Montedoro, G.; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2002**, *104*, 602-612.

<sup>14</sup> Mateos, R.; Domínguez, M.M.; Espartero, J.L.; Cert, A. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7170-7175.

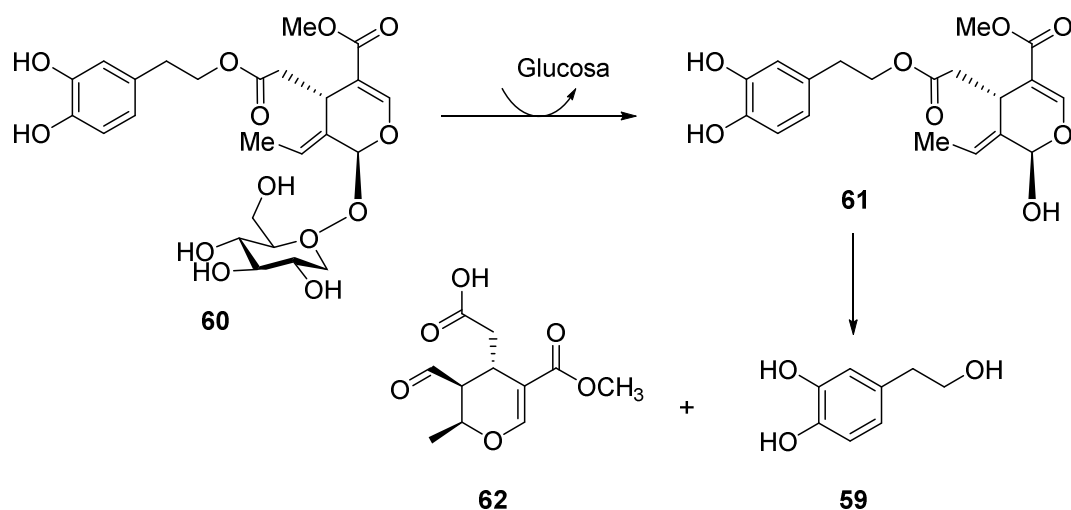


**Figura 1.1.** Algunos polifenoles presentes en el aceite de oliva.

## 1.2. Hidroxitirosol. Propiedades biológicas y terapéuticas.

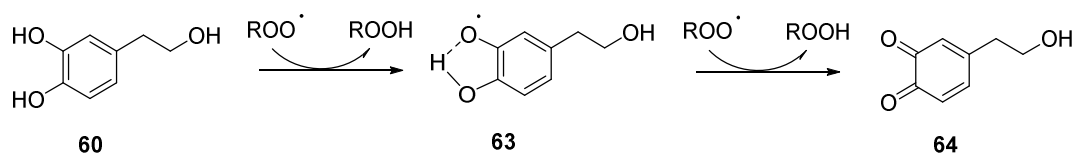
El hidroxitirosol (HT) es un derivado de la oleuropeína, un componente de la pulpa de las aceitunas verdes, y uno de los polifenoles más abundantes y estudiados en este fruto. Durante el proceso de maduración y molienda de la aceituna, la oleuropeína se hidroliza dando lugar al aglicón de la oleuropeína **61**, que a su vez se hidroliza a hidroxitirosol **59** y al ácido elenólico, según el proceso indicado en el esquema 1.1.<sup>15</sup>

<sup>15</sup> Brenes, M.; Rejano, L.; Garcia, P.; Sanchez, A.H.; Garrido, A. *J. Agric Food Chem.*, **1995**, *43*, 2702-2706.



Esquema 1.1

Debido a su estructura, que contiene un fragmento de tipo catecol, el HT es un potente antioxidante ya que puede actuar como atrapador de radicales libres.<sup>16</sup> Esta actividad se debe a la presencia del grupo *o*-dihidroxifenilo, que actúa interrumpiendo la etapa de propagación de los radicales alquilperoxilo formados durante la oxidación primaria lipídica, mediante la donación de dos radicales hidrógeno para dar lugar a un derivado quinonoide (Esquema 1.2). La estabilización del radical intermedio sobre el HT debido a la presencia de un grupo hidroxilo fenólico, evita que este radical inicie o propague la reacción radicalaria.



Esquema 1.2

Asociada a esta actividad, durante las últimas dos décadas ha habido un auge en la investigación de las propiedades terapéuticas de este compuesto, algunos de los descubrimientos más significativos son los que se detallan a continuación:

<sup>16</sup> Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca, A.M.; Segura-Carretero, A.; Fernández Gutiérrez, A.; Lercker, G.; *Molecules*, **2007**, *12*, 1679-1719.

### *Actividad anticancerígena*

Los antioxidantes procedentes de la dieta pueden reducir el riesgo de padecer cáncer debido a que minimizan el daño en el ADN, la peroxidación lipídica y la generación de ROS.<sup>17-19</sup> En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios donde se ha correlacionado el consumo de aceite de oliva y la prevención del cáncer. En este contexto se ha demostrado el efecto proapoptótico del HT en diferentes células cancerosas humanas, como las células de la leucemia HL60.<sup>20</sup> Además, también se ha demostrado el papel del HT en la inhibición de la proliferación de células de diversos tipos de cáncer, como el cáncer de mama,<sup>21,22</sup> de colon,<sup>23</sup> de próstata<sup>24</sup> y el melanoma humano.<sup>25</sup>

### *Actividad cardioprotectora*

La mayor parte de las afecciones cardiacas tienen lugar debido al desarrollo de una placa aterosclerótica dentro de las arterias. Esta placa se forma por la acumulación de LDL-colesterol que atraviesa el endotelio y se acumulan en la capa interna de las arterias. En respuesta, los macrófagos tratan de eliminar las moléculas LDL oxidadas, pero si hay demasiadas se forman las llamadas células espumosas. Esto genera una respuesta inflamatoria y en ocasiones enfermedades trombóticas como el infarto de miocardio, paradas cardiacas o muerte súbita cardiaca.<sup>26</sup> Numerosos estudios sobre pacientes humanos han demostrado que la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), un proceso clave en la patogénesis de la aterosclerosis, disminuye al aumentar el contenido

<sup>17</sup> Omar SH. *Saudi Pharm. J.* **2010**, *18*, 111-121.

<sup>18</sup> Manna, C.; Migliardi, V.; Sannino, F.; De Artino, A.; Capasso, R. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9602-9607.

<sup>19</sup> Hillestrom, P.R.; Covas, M.I.; Poulsen, H.E. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *41*, 1133-1138.

<sup>20</sup> Fabiani, R.; Rosignoli, P.; De Bartolomeo, A.; Fuccelli, R.; Servili, M.; Morozzi, G. *Food Chem.* **2011**, *125*, 1249-1255.

<sup>21</sup> Sirianni, R.; Chimento, A.; De Luca, A.; Casaburi, I.; Rizza, P.; Onofrio, A.; Iacopetta, D.; Puoci, F.; Andò, S.; Maggiolini, M.; Pezzi, V.; *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 833-840.

<sup>22</sup> Bulotta, S.; Corradino, R.; Celano, M.; D'Agostino, M.; Maiuolo, J.; Oliverio, M.; Procopio, A.; Iannone, M.; Rotiroti, D.; Russo, D. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1609-1614.

<sup>23</sup> Guichard, C.; Pedruzzi, E.; Fay, M.; Marie, J.C.; Braut-Boucher, F.; Daniel, F.; Grodet, A.; Gougerot-Pocidalo, M.A.; Chastre, E.; Kotelevets, L.; Lizard, G.; Vandewalle, A.; Driss, F.; Ogier-Denis, E. *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 1812-1827.

<sup>24</sup> Luo, C.; Li, Y.; Wang, H.; Cui, Y.; Feng, Z.; Li, H.; Li, Y.; Wang, Y.; Wurtz, K.; Weber, P.; Long, J.; Liu, J. *Curr. Cancer Drug Targ.* **2013**, *13*, 625-639.

<sup>25</sup> D'Angelo S, Ingrosso D, Migliardi V, Sorrentino A, Donnarumma G, Baroni A, Masella, L.; Tufano, M.A.; Zappia, M.; Galletti, P. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 908-919.

<sup>26</sup> Barderas, M.G.; Vivanco, F.; Álvarez-Llamas, G. *Meth. Mol. Biol.* **2013**, *1000*, 1-20.



en polifenoles del aceite de oliva suministrado;<sup>27</sup> recientemente, Vázquez-Velasco y colaboradores observaron un descenso en el nivel de LDL oxidado en voluntarios sanos tras la ingesta regular (3 veces a la semana, 40-50 mg/día) de aceite de girasol enriquecido con hidroxitirosol.<sup>28</sup>

### *Osteoporosis*

El HT interviene en la formación y el mantenimiento óseo, por lo que puede ser empleado como un remedio efectivo para los síntomas de osteoporosis al estimular el depósito de calcio e inhibir la formación de osteoclastos multinucleados, además de impedir la pérdida de hueso.<sup>29</sup>

### *Actividad antimicrobiana y antifúngica*

La actividad antimicrobiana de la oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol ha sido evaluada *in vitro* frente a bacterias, virus y protozoos.<sup>30</sup> La actividad antimicoplasmática del HT *in vitro* ha sido investigada por Furneri y colaboradores, quienes concluyeron que este compuesto debe ser considerado como un agente antimicrobiano para el tratamiento de infecciones humanas causadas por cepas bacterianas o agentes del tracto intestinal o respiratorio.<sup>31</sup> Otros estudios han demostrado que los polifenoles procedentes del aceite de oliva actúan eficazmente *in vitro* frente a la bacteria *Helicobacter pylori*, relacionada con úlceras pépticas y con algunos tipos de cáncer gástrico.<sup>32</sup> Esta actividad tiene una potencial aplicación en la industria alimentaria, habiéndose demostrado la eficiencia de la

---

<sup>27</sup> a) Ramirez-Tortosa, M. C.; Urbano, G.; Lopez-Jurado, M.; Nestares, T.; Gómez, M.C.; Mir, A.; Ros, E. Mataix, J.; Gil, A. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 2177-2183. b) Weinbrenner, T.; Fito, M.; de la Torre, R.; Saez, G.T., Rijhen, P.; Tormos, C.; Coolen, S.; Farré-Albaladejo, M.; Abanades, S.; Schroder, H.; Marrugat, J.; Covas, M.I.; et al.,. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 2314-2321 c)Covas, M.I.; de la Torre, K.; Farré-Albaladejo, M.; Kaikkonen, J.; Fitó, M.; López-Sabater, C.; Pujadas-Bastardes, M.A.; Joglar, J.; Weinbrenner, T.; Lamuela-Raventó, R.M.; de la Torre, R. *Free Rad. Biol. Med.* **2006**, *40*, 608- 616.

<sup>28</sup>Vázquez-Velasco, M.; Díaz, e.; Lucas, R.; Gómez-Martínez, S.; Bastida, S.; Marcos, A.; Sánchez-Muniz, F.J. *Brit. J. Nutr.* **2011**, *105*,1448-1452.

<sup>29</sup> Hagiwara, K.; Goto, T.; Araki, M.; Miyazaki, H.; Hagiwara, H. *Eur. J.Pharm.* **2011**, *662*, 78-84

<sup>30</sup> Bisignano, G.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Crisafi, G.; Uccella, N.; Saija, A. *J. Pharm. Pharmacol* **1999**, *51*, 971-974.

<sup>31</sup> Furneri, P.M.; Piperno, A.; Saija, A.; Bisignano, G.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 4892-4894.

<sup>32</sup> Romero, C.; Medina, E.; Vargas, J.; Brenes, M.; de Castro, A. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 680-686.

incorporación de extractos de hoja de olivo rico en hidroxitirosol a plásticos biodegradables frente a *Staphylococcus aureus*.<sup>33</sup>

#### *Actividad antiinflamatoria*

La inflamación y sus consecuencias juegan un papel crucial en el desarrollo de la aterosclerosis y de enfermedades cardiovasculares. Los polifenoles han demostrado disminuir la producción de los marcadores de la inflamación, tales como CRP (proteína c-reactiva), IL-1 (interleucina-1), IL-6, o TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral).<sup>34</sup>

El efecto del hidroxitirosol en la función plaquetaria ha sido evaluado, demostrándose la inhibición de los siguientes procesos relacionados: la agregación plaquetaria químicamente inducida, la acumulación del agente pro-agregante tromboxano en sérum humano, la producción de leucotrienos y de la araquidonato lipoxigenasa.<sup>35</sup>

Recientemente, se ha demostrado que el HT-20, un extracto de aceite de oliva con un contenido en HT del 20%, inhibe la hinchazón inflamatoria y la hiperalgesia, es decir, la sensibilidad al dolor, y suprime la citoquina proinflamatoria en modelos llevados a cabo en ratas.<sup>36</sup>

#### *Actividad antiviral*

El hidroxitirosol y la oleuropeína han demostrado ser inhibidores del VIH-1, al prevenir la fusión viral y la entrada del VIH en la célula huésped; de esta manera, ambos compuestos constituyen el primer grupo de moléculas pequeñas capaz de llevar a cabo a la vez tanto la inhibición de la entrada viral como de la integración del virus del SIDA.<sup>37</sup>

El HT y sus derivados son eficaces como microbicidas de uso tópico para prevenir el contagio del VIH, además de otras enfermedades sexuales causadas por

<sup>33</sup> Erdohan, Z. Ö.; Çama, B.; Turhan, K.N. *J. Food Eng.* **2013**, *119*, 308-315.

<sup>34</sup> Wu, X.; Schauss, A.G. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 6703-6717 y referencias contenidas.

<sup>35</sup> Visioli, F.; Poli, A.; Galli, C. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 65-75.

<sup>36</sup> Gong, D.; Geng, C.; Jiang, L.; Cao, J.; Yoshimura, H.; Zhong, L. *Phytoth. Res.* **2009**, *23*, 646-650.

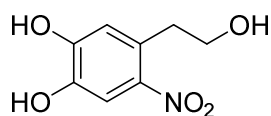
<sup>37</sup> a) Lee-Huang, S.; Lin Huang, P.; Zhang, D.; Wook Lee, J.; Bao, J.; Sun, Y.; Chang, Y.; Zhang, J.; Huang, P.L. *Biochem. Bioph. Res. Commun.* **2007**, *354*, 872-878. b) Lee-Huang, S.; Lin Huang, P.; Zhang, D.; Wook Lee, J.; Bao, J.; Sun, Y.; Chang, Y.; Zhang, J.; Huang, P.L. *Biochem. Bioph. Res. Commun.* **2007**, *354*, 879-884.

Lee-Huang, S.; Huang, P.L., Huang, P.L., Zhang, D.; Zhang, J.Z.H.; Chang, Y.T.; Lee, J. W.; Bao, J.; Sun, Y. US Pat Appl. **2009**, US 20090061031 A1 20090305.

hongos, bacterias o virus.<sup>38</sup> Además, se ha demostrado que el HT desactiva otros tipos de virus, como los subtipos H3N2, H5N1, H9N2 y H1N1 de la gripe, éste último correspondiente a la gripe A.<sup>39</sup>

#### *Hidroxitirosol como agente antinitrosante*

Las propiedades antinitrosantes del HT y otros polifenoles vegetales procedentes de la dieta han sido investigadas, demostrándose que el HT reacciona con el nitrito de sodio a pH 3 para generar 2-nitrohidroxitirosol, actuando por tanto como atrapador de especies nitrosantes.<sup>40</sup>



**2-Nitrohidroxitirosol (65)**

#### *Prevención de enfermedades neurodegenerativas*

Geerlings y colaboradores han registrado el uso de formulaciones a base de derivados fenólicos, principalmente el HT, para el tratamiento o la prevención de enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la demencia de cuerpos de Lewy, Parkinson, la enfermedad de Pick, esclerosis lateral amiotrófica, neurofibromatosis, lesiones cerebrales, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, pérdida de memoria o demencia por infarto múltiple.<sup>41</sup>

<sup>38</sup> Gómez-Acebo, E.; Alcamí Pertejo, J.; Aunon Calles, D. Pat. Appl. **2011**, WO2011067302A1.

<sup>39</sup> Yamada, K.; Ogawa, H.; Hara, A.; Yoshida, Y.; Yonezawa, Y.; Karibe, K.; Nghia, V.B.; Yoshimura, H.; Yamamoto, Y.; Yamada, M.; Nakamura, K.; Imai, K. *Antiviral Res.* **2009**, *83*, 35-44.

<sup>40</sup> De Lucia, M.; Panzella, L.; Pezzella, A.; Napolitano, A.; D'Ischia, M.; *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 2407-2413.

<sup>41</sup> Geerlings, A.; López-Huertas León, E.; Morales Sánchez, J.C.; Boza Puerta, J.; Jiménez López, J. Pat. Appl **2006**, ES2256472.

### 1.2.1. Fuentes de obtención del hidroxitirosol.

Debido a las propiedades anteriormente expuestas, han sido numerosas las rutas propuestas para sintetizar hidroxitirosol a lo largo de los últimos años;<sup>42</sup> sin embargo, los costes de obtención de HT mediante síntesis química resultan extremadamente elevados, por lo que la recuperación del mismo de subproductos de la elaboración del aceite de oliva supone una excelente alternativa para su obtención y comercialización.

El carácter hidrofílico de los polifenoles, provoca que, durante el proceso de extracción del aceite de oliva un porcentaje importante de los mismos se pierda, quedando disuelto en los subproductos acuosos de la elaboración del aceite, como el alperujo, que puede aprovecharse como fuente de obtención de estos compuestos mediante procesos de extracción y purificación. Los métodos propuestos para recuperar compuestos fenólicos a partir estos subproductos incluyen el empleo de resinas cromatográficas, técnicas como la microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración, ósmosis inversa, y extracciones sólido-líquido o líquido-líquido.<sup>43</sup>

Han sido numerosos los intentos de aislar grandes cantidades de HT partiendo de subproductos del olivar, pero muchos de ellos no han sido económicamente factibles a escala industrial. Uno de los sistemas que ha sido empleado satisfactoriamente a escala industrial ha sido desarrollado por Fernández-Bolaños y colaboradores en el Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla);<sup>44</sup> en este sistema se emplea una resina de intercambio iónico para atrapar los antioxidantes de la fracción acuosa de los residuos tanto de la elaboración del aceite como de la producción de aceitunas de mesa, seguida de una elución con agua y

---

<sup>42</sup> a) Bernini, R.; Mincione, E.; Barontini, M. Crisante, F. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8897-8904. b) Breunninger, M.; Joray, M. *PCT Int. Appl.* **2008**, WO2008107109A1. c) Bernini, R.; Mincione, E.; Barontini, M. Crisante, F. *PCT Int. Appl.* **2008**, WO2008110908A1. d) Brouk, M.; Fishman, A. *Food Chem.* **2009**, *116*, 114-121. e) Álvarez De Manzaneda Roldán, E.; Chahboun, R.; Haidouour Benamin, A. *PCT Int. Appl.* **2009**, WO2009153374A1. f) Piersanti, G.; Retini, M.; Espartero, J.L.; Madrona, A.; Zappia, G. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 4938-4940. g) Yang, Z.; Tan, F.; Wong, H.; Hanselmann, Pat. *Appl.* **2012**, WO2012003625A1. h) Barontini, M.; Proietti Silvestri, I.; Nardi, V.; Bovicelli, P.; Pari, L.; Gallucci, F.; Spezia, R.; Righi, G. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 5004-5006.

<sup>43</sup> Frankel, E. Barkhouche, A.; Lozano-Sánchez, J.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutierrez, A. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 5179-5188 y referencias contenidas.

<sup>44</sup> Fernández-Bolaños, J.; Heredia, A.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Guillén, R.; Jiménez, A. *Pat Appl.* **2002**, WO02064537.

tratamiento con una resina adsorbente no iónica XAD. Esta matriz se lava con mezclas MeOH o EtOH–H<sub>2</sub>O (30-33%), obteniéndose así extractos de HT de diferentes grados de pureza a escala semiindustrial; la colaboración del grupo de Fernández-Bolaños con la empresa Genosa ha obtenido de este modo extractos de pureza del 43% y del 95%, que permitirían su comercialización a precios de 0.03 €/g y 0.12 €/g respectivamente, una diferencia significativa con el precio actual de mercado del HT, de 619.00 €/100mg (Sigma-Aldrich).

Otro procedimiento bajo patente para la recuperación de los compuestos fenólicos en alperujo incluye el ajuste a pH ácido del mismo, seguido de una hidrólisis enzimática y posterior separación de la fase líquida mediante centrifugación, para, por último someterla a técnicas de micro, ultra, nanofiltración y ósmosis inversa.<sup>45</sup>

Agalias y colaboradores han optimizado un procedimiento a escala de planta piloto para el tratamiento del alperujo,<sup>46</sup> que consta de cuatro etapas: (1) filtración sucesiva para la reducción de sólidos suspendidos en las aguas residuales, (2) empleo de resinas adsorbentes con el fin de desodorizar y decolorar las aguas y simultáneamente recuperar los compuestos fenólicos y lactonas, (3) evaporación térmica de las aguas y recuperación de los disolventes orgánicos empleados para regenerar las resinas, y (4) separación de los polifenoles por cromatografía de partición centrífuga. Este método, además de lograr la separación de los componentes fenólicos, logra reducir la demanda química de oxígeno del alperujo, lo que facilitaría la gestión de este residuo.

Dado el carácter hidrófilo del HT, la absorción del mismo cuando es suministrado a humanos como complemento en disolución acuosa es muy baja.<sup>47</sup> Es por tanto que, con objeto de aumentar la lipofilia del HT y, por tanto, facilitar su absorción y transporte a través de membranas lipídicas, se han sintetizado un elevado número de derivados, como ésteres alifáticos, o derivados como el galato y cafeato de hidroxitirosilo, cuyas

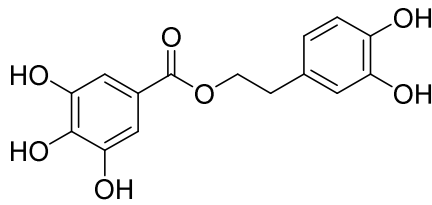
---

<sup>45</sup> Pizzichini, M. PCT Pat. Appl. **2005**, WO2005123603.

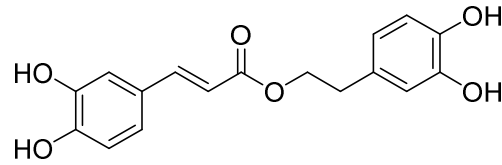
<sup>46</sup> Agalias, A.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A. L.; Mikros, E.; Tzarbopoulos, A.; Gikas, E.; Spanos, J.; Manios, T. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2671–2676.

<sup>47</sup> Bailly, F.; Cotellet, P. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1811-1818.

propiedades como antiagregantes plaquetarios son claramente superiores a las de los productos de partida.<sup>48</sup>



Galato de hiroxitirosilo (66)

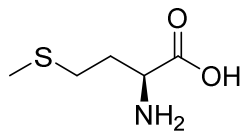


Cafeato de hiroxitirosilo (67)

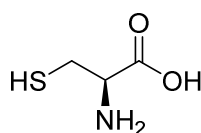
### 1.3. Azufre y tioderivados

El azufre es un elemento esencial para llevar a cabo de manera apropiada numerosas funciones fisiológicas; se encuentra en aminoácidos, proteínas, enzimas y micronutrientes. Las necesidades nutricionales de azufre se satisfacen mediante la dieta; alimentos ricos en azufre incluyen leche, queso, ajo, cebollas, puerros, huevos, fruta y vegetales crucíferos como la coliflor o las coles de Bruselas.<sup>49</sup>

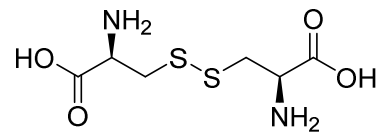
Compuestos organosulfurados de origen biológico, como la cistina, metionina, taurina, glutatión o *N*-acetilcisteína han sido ampliamente estudiados por sus propiedades antioxidantes.



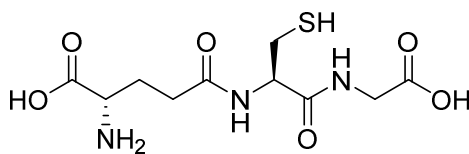
L-metionina (68)



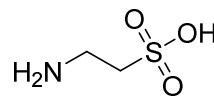
L-cisteína (69)



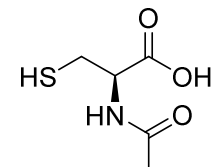
L-cistina (70)



glutatión reducido (71)



taurina (72)

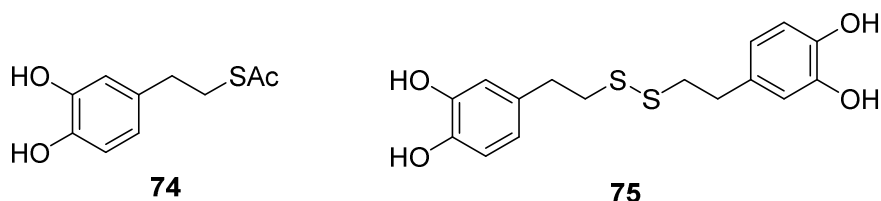
*N*-acetilcisteína (73)

<sup>48</sup> Chapado, L.; Linares-Palomino, P.; Salido, S.; Altarejos, J.; Rosado, J.A.; Salido G.M. *Bioorg. Chem.* **2010**, 38, 108–114.

<sup>49</sup> Battin, E.E.; Brumaghain, J.L. *Cell. Biochem. Biophys.*, **2009**, 55, 1-23.

Además, es conocida la capacidad de ciertos compuestos sulfurados de prevenir algunas enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatorias y cáncer.<sup>50</sup> También se han descrito compuestos organosulfurados con propiedades antiaterosclerótica, antiproliferativa, antibacteriana, inhibición de la agregación plaquetaria, reducción de la presión sistólica de la sangre y reducción de los niveles de colesterol.<sup>51</sup> Debido a que el azufre es tan abundante en nuestro cuerpo y en los alimentos a base de proteínas, no se ha establecido la cantidad diaria recomendada. Sin embargo, su consumo excesivo y prolongado puede resultar tóxico para el organismo y causar efectos adversos en la salud debido a su actividad prooxidante.<sup>52</sup>

En nuestro grupo de investigación, se ha llevado a cabo la síntesis de tioderivados polifenólicos con interesantes propiedades biológicas, como el tioacetato de hidroxitirosilo **74** y el disulfuro **75**.<sup>44</sup> Estos compuestos demostraron tener una actividad proapoptótica frente a células de la leucemia humana HL60 y HL60R; el tioacetato, a concentración 100  $\mu$ M, indujo un porcentaje de apoptosis y necrosis del 76 y 1.5%, respectivamente, en células HL60, y del 42 y 9%, respectivamente, en células HL60R, mientras que el disulfuro, a concentración 50  $\mu$ M, indujo una relación apoptosis/necrosis de 88/8% en células HL60 y 73/8% en células HL60R.



#### 1.4. Selenio y selenoderivados

El selenio es un importante micronutriente que se encuentra en los suelos y que normalmente entra en la cadena alimentaria a través de las plantas, de modo que se incorpora al organismo mediante la ingesta de diferentes alimentos entre los que se

<sup>50</sup> Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D. *Biomed. Pharmacother.* **2004**, *58*, 183-193 y referencias contenidas.

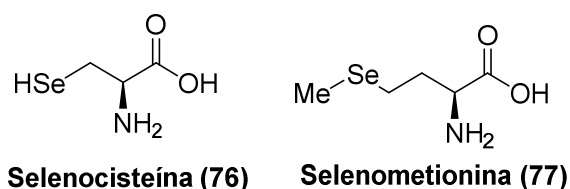
<sup>51</sup> Vazquez-Prieto, M. A.; Miatello, R. M. *Mol. Aspects Med.* **2010**, *31*, 540-545.

<sup>52</sup> Sahu, S. C. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **2002**, *20*, 61-76.

incluyen cereales, legumbres, verduras, carne y marisco. La cantidad diaria recomendada (CDR) de este compuesto es de 55 µg/día, hasta un límite de 350-400 µg/día.<sup>53</sup>

Desde un punto de vista químico, el selenio es análogo al azufre, sin embargo, ambos elementos presentan una serie de diferencias, puesto que el selenio posee un mayor carácter metálico que el azufre, y por consiguiente es menos electronegativo, a la vez que más nucleófilo que el azufre debido a su mayor carácter polarizable.<sup>54</sup>

En el organismo, el Se en forma de selenocisteína, forma parte de 25 clases de selenoproteínas, entre las que se incluyen glutatión peroxidasas (GPxs), selenoproteínas P, W y R, y tiorredoxinas; muchas de ellas actúan como defensas naturales frente al estrés oxidativo, debido precisamente a la presencia de Se en el centro activo, y a su implicación en procesos redox con especies de tipo ROS.<sup>49</sup>



La selenometionina (SeMet) es un compuesto presente en muchos alimentos como las nueces de Brasil y la soja. *In vivo* puede sustituir a la metionina de manera aleatoria y se acumula en los músculos.<sup>55</sup> Las formas inorgánicas del selenio, como el selenato y el selenito, se metabolizan a selenuro, que puede incorporarse a ciertas proteínas en forma de selenocisteína (SeCys).<sup>55</sup> Los derivados metilados probablemente producen metabolitos que según algunos estudios pueden actuar como anticarcinógenos primarios.<sup>55</sup> En el esquema 1.3 se muestra de manera simplificada la ruta metabólica del selenio.<sup>56</sup>

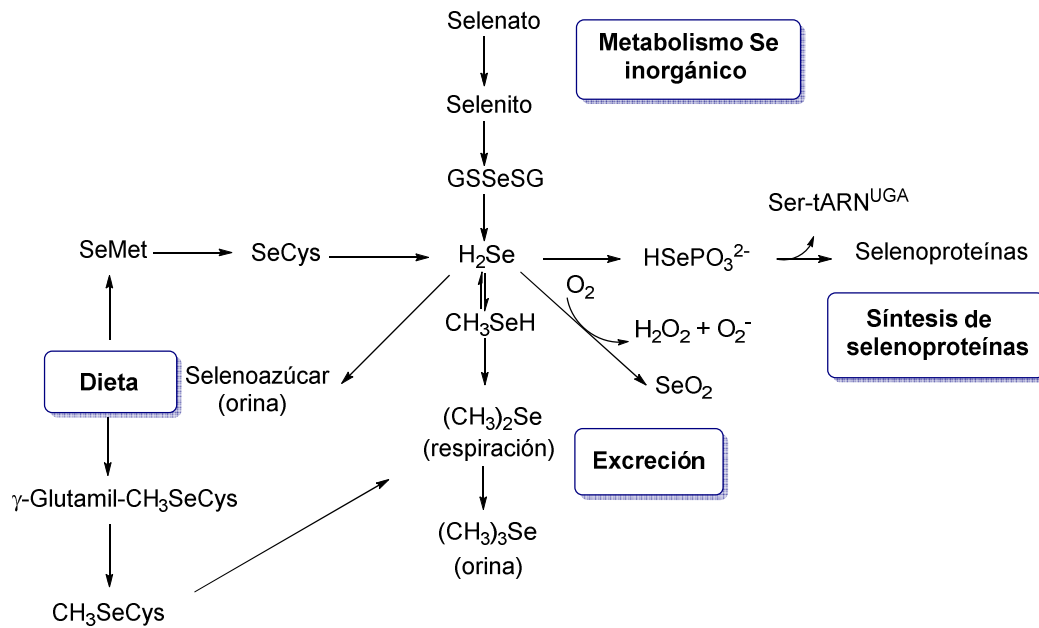
<sup>53</sup> Ramoutar, R.R.; Brumaghim, J.L. *Cell. Biochem. Biophys.*, **2010**, 58, 1-23 y referencias contenidas.

<sup>54</sup> Witzack, Z. J.; Czernecki, S. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1998**, 53, 143-199.

<sup>55</sup> Finley, J. W.; Grusak, M. A.; Keck, A.-S.; Gregoire, B. R. *Biol. Trace Elemen. Res.* **2004**, 99, 191-209.

<sup>56</sup> Chen, Y.C.; Prabhu, S.; Mastro, A.M. *Nutrients* **2013**, 5, 1149-1168.





SeMet: selenometionina; SeCys: selenocisteína; GSSeSG: selenodiglutación;  $\gamma$ -Glutamyl-CH<sub>3</sub>SeCys:  $\gamma$ -glutamyl-Se-metil-selenocisteína; CH<sub>3</sub>SeCys: Se-metilselenocisteína

**Esquema 1.3**

La deficiencia de selenio en el organismo, que normalmente tiene lugar en regiones donde el contenido de este elemento en el suelo es bajo, provoca diversas afecciones tanto en animales como en humanos. En animales de granja, como corderos y terneros, se ha demostrado que una deficiencia en selenio puede causar distrofia muscular, que se manifiesta mostrando rigidez y disfunción motora, debilidad, cansancio, respiración acelerada, fiebre, dificultad para ingerir alimentos e incluso la muerte.<sup>53</sup> En humanos, una dieta seleno y yodo-deficiente puede conducir a afecciones como hipotiroidismo, enfermedades cardiovasculares y debilitamiento del sistema inmunitario. Se ha demostrado que una dieta seleno y yododeficiente es la causa de la enfermedad de Keshan, una cardiomiopatía que afecta a niños y mujeres en edad fértil con consecuencias como la insuficiencia cardíaca o incluso la muerte súbita. Otro ejemplo de afección debido a una dieta pobre en selenio es la enfermedad de Kashin-Beck, que se da en ciertas regiones de China y que se manifiesta, entre otros síntomas, en deformaciones óseas.<sup>53</sup> La deficiencia de este elemento también afecta a la habilidad del organismo de metabolizar fármacos, lo cual se asocia a un mayor riesgo de intoxicación con algunos de ellos, y a un

descenso de la eficiencia de otros.<sup>57</sup> La carencia de selenio también se ha asociado al cáncer; numerosos estudios demuestran que una baja concentración de Se en la sangre incrementa el riesgo de padecer algún tipo de cáncer,<sup>58</sup> mientras que existen suficientes evidencias que apoyan el efecto protector de un suplemento de selenio frente a la carcinogénesis, tanto en las fases tempranas como tardías del cáncer. El mecanismo de actuación del Se frente al cáncer aún no está completamente elucidado, sin embargo, parece estar asociado a aspectos como la protección antioxidante, mejora de la respuesta inmune, modulación de la proliferación celular (intervención tanto en el ciclo celular como en la apoptosis), inhibición de la metástasis e inhibición de la angiogénesis.<sup>59,60</sup>

Por el contrario, una ingesta superior a 350-400 µg/día puede llevar a una intoxicación por selenio, conocida como selenosis. En animales, un aporte excesivo de selenio puede conducir a la alopecia, deformación de los cuernos y/o pezuñas, parálisis, convulsiones y anorexia; en humanos, los síntomas de selenosis incluyen halitosis, pérdida del cabello y las uñas, deformación dental, lesiones en la piel y un descenso en los niveles de hemoglobina.<sup>53</sup> Una ingesta crónica de Se inorgánico, por su parte, puede conducir a hepatotoxicidad y teratogénesis tanto en animales como en humanos.<sup>57</sup>

Estudios epidemiológicos y clínicos llevados a cabo con derivados organoselénicos en humanos, así como ensayos de laboratorio, apoyan el papel protector del selenio frente al desarrollo del cáncer. Los resultados han demostrado que un suplemento de selenio en la dieta inhibe la proliferación de células cancerígenas, induce la apoptosis de las células tumorales, suprime la metástasis en animales y reduce en humanos el riesgo de cáncer de próstata, de pulmón, de mama y colorrectal.<sup>50</sup> Se ha demostrado que tanto la dosis como la forma química en la que se administre el selenio son factores críticos en la respuesta celular.<sup>61</sup> Existen evidencias de que muchas de las numerosas actividades que tiene el selenio en los sistemas biológicos se deben a su

---

<sup>57</sup> Tapiero, H.; Townsend, D.M.; Tew, K.D. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57*, 134-144 y referencias contenidas.

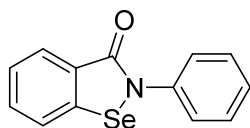
<sup>58</sup> Clark, L.C.; Hixson, L.J.; Combs Jr, G.F.; Reid, M.E.; Turnbull, B.W.; Sampliner, R.E.; *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1993**, *2*, 41-46.

<sup>59</sup> Zeng, H.; Combs Jr.; G.F. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, *19*, 1-7.

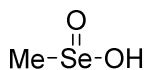
<sup>60</sup> Chen, Y.C.; Orabhu, K.S.; Mastro, A.M. *Nutrients* **2013**, *5*, 1149-1168.

<sup>61</sup> Ip, C.; El-Bayoumy, K.; Upadhyaya, P.; Ganther, H.; Vadhanavikit, S.; Thompson, H. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 187-192.

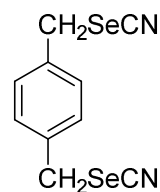
capacidad de actuar como antioxidante.<sup>62-64</sup> Los compuestos organoselénicos han mostrado una mayor actividad anticancerígena en comparación con sus isómeros de azufre. De este modo, compuestos como el ebselén (2-fenil-1,2-bencisoselenazol-3-[2H]-ona),<sup>65</sup> el ácido metilselenínico (MSA)<sup>66,67</sup> o el 1,4-fenilenobis(metilen)selenocianato (*p*-XSC)<sup>68</sup> son considerados potenciales agentes anticancerígenos. El ebselén ha mostrado, además, citoprotección del corazón<sup>69</sup> y el cerebro,<sup>70</sup> y utilidad en el tratamiento de la apoplejía isquémica.<sup>71</sup> Se ha demostrado que el ebselén actúa como mimético de las enzimas glutatión peroxidasa y de la fosfolípido-hidroperóxido-glutatión peroxidasa<sup>72,73</sup> eliminando hidroperóxidos y lipoperóxidos. Recientemente se ha demostrado también que el ebselén actúa como un mimético de sales de litio en el tratamiento del trastorno bipolar.<sup>74</sup>



Ebselén (78)



MSA (79)

*p*-XSC (80)

<sup>62</sup> Grek, C. L.; Tew, K. D.; *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 362-368.

<sup>63</sup> Cilla, A.; De Palma, G.; Lagarda, M. J.; Barberá, R.; Farré, R.; Clemente, G.; Romero, F. *Ann. Nutr. Metab.* **2009**, *54*, 35-42.

<sup>64</sup> El Gharras, H. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44*, 2512-2518.

<sup>65</sup> Jacob, C.; Maret, W.; Vallee, B. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *248*, 569-573.

<sup>66</sup> Yamaguchi, K.; Uzzo, R. G.; Pimkina, J.; Makhov, P.; Golovine, K.; Crispen, P.; Kolenko, V. M. *Oncogenesis* **2005**, *24*, 5868-5877.

<sup>67</sup> Abdulah, R.; Miyazaki, K.; Nakazawa, M.; Koyama, H. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2005**, *19*, 141-150.

<sup>68</sup> El-Bayoumy, K.; Chae, Y. H.; Upadhyaya, P.; Meschter, C.; Cohen, L. A.; Reddy, B. S. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2402-2407.

<sup>69</sup> Maulik, N.; Yoshida, T.; Das, D. K. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *24*, 869-875.

<sup>70</sup> Takasago, T.; Peters, E. E.; Graham, D. I.; Masayasu, H.; Macrae, I. M. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 1251-1256.

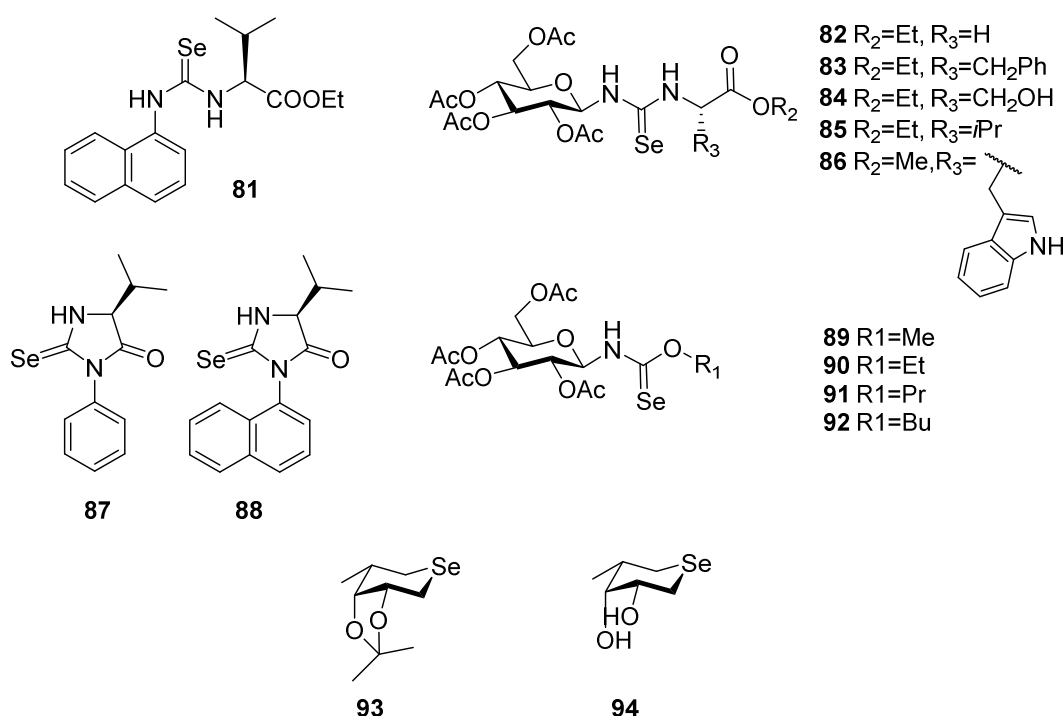
<sup>71</sup> Seo, J. Y.; Lee, C. H.; Cho, J. H.; Choi, J. H.; Yoo, K. Y.; Kim, D. W.; Park, O. K.; Li, H.; Choi, S. Y.; Hwang, I. K.; Won, M. H.; *J. Neurol. Sci.* **2009**, *285*, 88-94.

<sup>72</sup> Müller, A.; Cadenas, E.; Graf, P.; Sies, H. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 3235-3239.

<sup>73</sup> Maiorino, M.; Roveri, A.; Coassin, M.; Ursini, F. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 2267-2271.

<sup>74</sup> Singh, N.; Halliday, A.C.; Thomas, J.M.; Kuznetsova, O.; Baldwin, R.; Woon, E.C.Y.; Aley, P.K.; Antoniadou, I.; Sharp, T.; Vasudevan, S.R.; Churchill, G.C.; *Nature Commun.* **2013**, *4*, 2320-2326.

En nuestro grupo de investigación se ha llevado a cabo la síntesis de varias familias de selenoderivados con marcada actividad biológica, que incluyen selenoazúcares,<sup>75</sup> selenoureas, selenohidantoínas y selenocarbamatos.<sup>76</sup> Así pues, las aril y alquilselenoureas, incluyendo derivados glicosílicos (**82-86**) mostraron una excelente actividad antirradicalaria (EC<sub>50</sub> 19-46 μM, método DPPH), las selenohidantoínas **87**, **88** mostraron una buena actividad inhibitoria frente del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (61-67% de inhibición a concentración 0.5 mM), los selenocarbamatos **89-92** mostraron una buena capacidad de inhibir la peroxidación lipídica (49-71% método del tiocianato férrico), por otro lado la L-isofucoselenofagomina *O*-protegida **93** demostró una eficiente actividad mimética de la glutatión peroxidasa, mientras que su análogo desprotegido **94** fue el primer selenoazúcar en mostrar actividad inhibitoria de la L-fucosidasa.

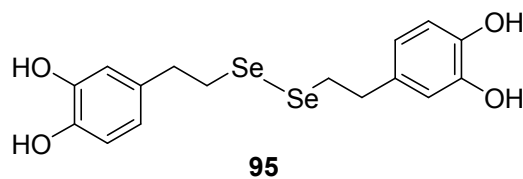


El diselenuro de hidroxitirosilo **95**, también sintetizado en nuestro grupo de investigación,<sup>¡Error! Marcador no definido.</sup> mostró una actividad antitumoral excelente como

<sup>75</sup> Merino-Montiel, P.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J.G. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3591-3595.

<sup>76</sup> Merino-Montiel, P.; Maza, S.; Martos, S.; López, O.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J.G. *Eur. J.*

inductor de la apoptosis en las líneas celulares de melanoma (A-375) y glioblastoma humano (SF-268), obteniéndose unos valores de  $IC_{50}$  de 0.48 y 0.36  $\mu$ M respectivamente.



Por tanto, las numerosas propiedades, por un lado, de los compuestos polifenólicos, y por otro, de los tio y selenoderivados, justifican los compuestos preparados en la presente Tesis Doctoral.

## OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la preparación de derivados polifenólicos funcionalizados, con objeto de obtener productos con actividades mejoradas con respecto a polifenoles naturales, como el hidroxitirosol.

Un primer objetivo será el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas que permitan el acceso a ésteres lipófilos derivados de polifenoles, con objeto de mejorar la biodisponibilidad en sistemas biológicos. Así pues, se plantea la preparación de ésteres mediante reacción quimioselectiva entre el hidroxilo alifático del hidroxitirosol y ésteres alifáticos, mediante catálisis ácida heterogénea.

También será abordada por primera vez la síntesis del 3',4'-dihidroxifenilacetato de hidroxitirosilo, un éster con dos fragmentos de catecol aislado recientemente de un insecto, que ha sido empleado en la medicina tradicional china en el tratamiento de inflamaciones, infecciones y cáncer.

Otro objetivo primordial será la funcionalización de los polifenoles con grupos que contengan azufre o selenio, ya que pueden incorporar interesantes propiedades biológicas. En este contexto, se propone la síntesis del  $\alpha$ -lipoato de hidroxitirosilo, que podría combinar las interesantes propiedades biológicas del hidroxitirosol, y del ácido  $\alpha$ -lipoico natural.

También se abordará la derivatización de la 2-cloro-3',4'-dihidroxiacetofenona con nucleófilos azufrados, como por ejemplo, el tioacetato potásico como paso clave en la preparación de disulfuros polifenólicos, análogos estructurales al disulfuro de hidroxitirosilo, sintetizado recientemente en nuestro grupo de investigación, y que exhibe interesantes propiedades antiproliferativas.

Se analizará también la apertura regioselectiva de epóxidos derivados del vinilcatecol con nucleófilos de selenio, como una ruta de acceso a  $\beta$ -hidroxi-alquil selenuros.

Se plantea también la preparación de tio- y selenoureas por acoplamiento directo de la norepinefrina con isotio- e isoselenocianatos de tipo alquilo y arilo, con objeto de llevar a cabo un análisis de estructura-actividad que considere la influencia de la

naturaleza del heteroátomo (azufre, selenio), así como el tipo del *N*-sustituyente en las propiedades biológicas.

Se prepararán asimismo amidas polifenólicas mediante acoplamiento peptídico del DOPAC (ácido 3',4'-dihidroxifenilacético) con diversos aminoésteres derivados de L-aminoácidos; se estudiará el mejor agente acoplante para llevar a cabo dicho proceso.

También se propone la preparación de sistemas polifenólicos multivalentes, con varios anillos de catecol, obtenidos mediante la metodología *click chemistry*, mediante cicloadición 1,3-dipolar entre un azidoderivado polifenólico y un *core* que posea varios grupos alquino. Se analizará el posible efecto de la multivalencia en las propiedades biológicas.

Se estudiará la posibilidad de formación de complejos de inclusión entre algunos productos relevantes obtenidos en esta Tesis y ciclodextrinas como vía de solubilización y fotoprotección, útil en posibles aplicaciones cosméticas o en alimentos.

Es un objetivo fundamental la evaluación de las propiedades biológicas exhibidas por los compuestos sintetizados en la presente Tesis Doctoral. Se considerarán dos tipos de propiedades biológicas; por un lado, su actividad antioxidante, en cuanto a la capacidad antirradicalaria, de captación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o de inhibición de peroxidación lipídica. Es esperable que algunos de los selenoderivados preparados se comporten además como miméticos de la glutatión peroxidasa. Por otro lado, también será evaluada su capacidad antiproliferativa frente a diversas líneas celulares de tumores sólidos humanos.

## **2. SÍNTESIS DE ÉSTERES DERIVADOS DEL HIDROXITIRO SOL**



## 2. SÍNTESIS DE ÉSTERES DERIVADOS DEL HIDROXITIRO SOL

### 2.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Debido a la limitada solubilidad del HT en medios lipídicos, en los últimos años se ha investigado con intensidad el aislamiento y síntesis de compuestos que conserven la actividad antioxidante del HT pero que posean un mayor carácter lipófilo, de modo que puedan atravesar más fácilmente membranas lipídicas y puedan así aprovecharse tanto a nivel clínico como en alimentación y cosmética. De esta manera, dichos compuestos podrían conseguir alargar la caducidad de los alimentos al proteger los componentes lipídicos de los mismos, o bien adicionarse a tratamientos cosméticos para aprovechar sus beneficiosas propiedades.<sup>77</sup>

Se pueden encontrar numerosos análogos lipofílicos naturales del HT tanto en las aceitunas como en el aceite de oliva virgen. La concentración de estos compuestos está determinada por numerosos factores, como la variedad de la aceituna y su grado de madurez, clima, procesamiento y extracción. Entre estos compuestos, destaca, por ejemplo, el acetato de hidroxitirosilo, cuya concentración es similar a la del HT en algunas variedades de aceite como la Arbequina, el doble en la variedad Picual, y entre la tercera y una cuarta parte en las variedades Manzanilla y Hojiblanca.<sup>78</sup>

Tanto el tirosol como el hidroxitirosol, han sido modificados con objeto de mejorar sus propiedades en sistemas oleosos y emulsiones. La introducción en la cadena lateral de un acilo de diferente longitud genera moléculas más lipófilas sin que por ello se altere la actividad antioxidante inherente al fragmento de catecol.<sup>79</sup>

La síntesis de estos ésteres ha sido abordada con diferentes metodologías, como se detalla a continuación:

---

<sup>77</sup> Buisman, G. J. H.; Van Helteren, C. T. W.; Kramer, G. F. H.; Veldsink, J. W.; Derksen, J. T. Cuperus, F. P. *Biotechnol. Lett.* **1998**, *20*, 131–136.

<sup>78</sup> González-Correa, J.A.; Navas, M.D.; Muñoz-Marín, J.; Trujillo, M.; Fernández-Bolaños, J.; De la Cruz, J.P. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7872–7876.

<sup>79</sup> Lucas, R.; Comelles, F.; Alcántara, D.; Maldonado, O.S.; Curcuroze, M.; Parra, J.L.; Morales, J.C. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8021-8026.

Un procedimiento clásico es la **esterificación de Fischer** entre ácidos fenólicos, como el ácido cafeico, y diversos alcoholes; en estas reacciones se emplean ácidos próticos fuertes como catalizadores.<sup>80</sup> A pesar de conseguirse una buena quimioselectividad hacia el hidroxilo alifático, las drásticas condiciones de reacción, junto al gran exceso de alcohol requerido, hacen que este método presente en muchas ocasiones una muy limitada aplicabilidad.

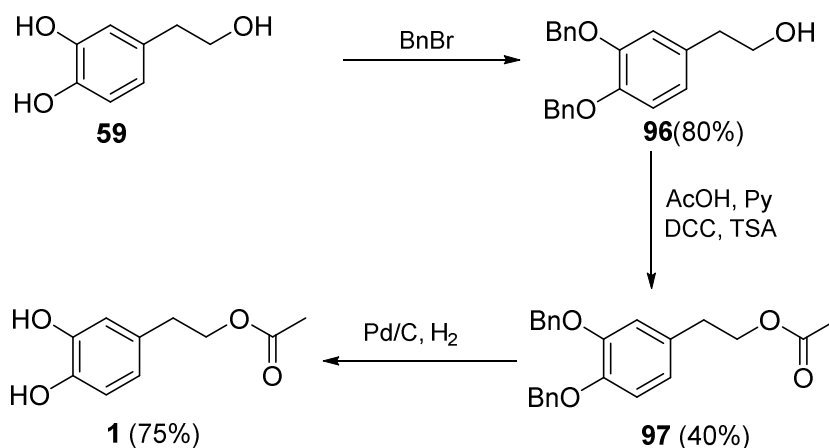
Una alternativa menos agresiva al procedimiento anterior es la **esterificación bajo catálisis básica** entre el hidroxilo alifático de compuestos como el hidroxitirosol y tirosol y derivados de ácidos carboxílicos. No obstante, el principal problema del empleo de estas condiciones es que los hidroxilos fenólicos pueden desprotonarse fácilmente, por lo que existiría una competencia en la esterificación entre las posiciones fenólicas y alifáticas, estando aquellas favorecidas en medio básico. Por tanto, sería necesario el empleo de grupos protectores en los hidroxilos aromáticos. Ejemplos de dichos grupos protectores empleados se exponen en los siguientes esquemas:

Empleo del grupo bencilo como protector, esterificación bajo catálisis básica y posterior desprotección mediante hidrogenación catalítica.<sup>81</sup> A modo de ejemplo, en el esquema 1.1 se muestra la síntesis del acetato de hidroxitirosilo efectuada por Gordon y col. En dicha síntesis se procede en primer lugar a la protección quimioselectiva de los hidroxilos fenólicos usando BnBr en medio ligeramente básico. A continuación se obtiene el éster por reacción del grupo hidroxilo libre con ácido acético usando DCC como agente acoplante, en presencia de piridina y TSA. La desprotección final mediante hidrogenólisis conduce al acetato de hidroxitirosilo con un 24% de rendimiento global.

---

<sup>80</sup> Burke, T.R.; Fesen, M.; Mazumder, A.; Yung, J.; Wang, J.; Carothers, A.M.; Grunberger, D.; Driscoll, J.; Pommier, J.; Kohn, K. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4171–4178.

<sup>81</sup> Gordon, M.H.; Paiva-Martins, F. Almeida, M.; *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, *49*, 2480–2485.

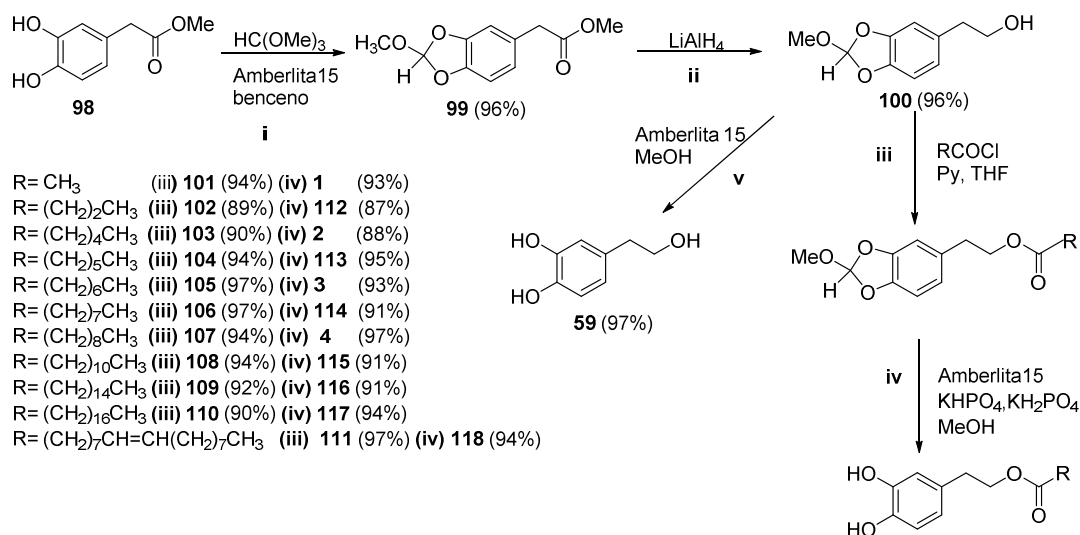


Esquema 2.1

Gambacorta y col. también han obtenido acetato de hidroxitirosilo partiendo de 3,4-dihidroxifenilacetato de metilo, mediante protección del catecol en forma de ortoéster, reducción del grupo éster con  $\text{LiAlH}_4$ , acetilación con cloruro de acetilo y desprotección mediada por resina Amberlita 15. El ortoéster intermedio **101** también se empleó para la síntesis de HT mediante la reducción con  $\text{LiAlH}_4$  y posterior desprotección (Esquema 2.1).<sup>82</sup> La misma ruta se empleó posteriormente para la síntesis de derivados con cadenas alifáticas más largas con un rendimiento de entre el 86-95%, de los cuales se estudió su actividad antioxidante (ensayos ABTS, DCF en células), mostrando resultados similares o ligeramente superiores en el caso de las cadenas de longitud media a los obtenidos para el HT.<sup>83</sup>

<sup>82</sup> Gambacorta, A.; Tofani, D.; Migliorini, A. *Molecules* **2007**, *12*, 1762–1770.

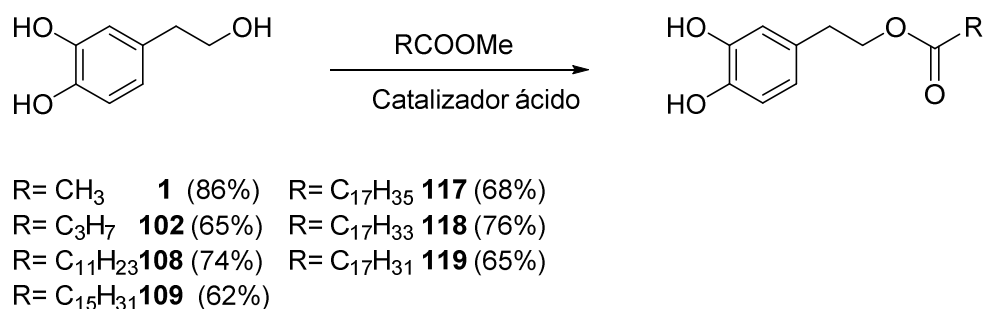
<sup>83</sup> Tofani, D.; Balducci, V.; Gasperi, T.; Incerpi, S.; Gambacorta, A. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5292-5299.



Esquema 2.1

Con el fin de evitar los pasos de protección-desprotección, se han descrito diversas alternativas para preparar ésteres de hidroxitirosilo:

La *transesterificación* empleando ésteres metílicos o etílicos y ácido *p*-toluensulfónico como catalizador ha sido descrita como un método eficaz y quimioselectivo.<sup>84,85</sup> Este método se ha empleado para la síntesis tanto de acetato de hidroxitirosilo **1** y tirosilo como de otros ésteres de cadenas alifáticas de mayor longitud con rendimientos comprendidos entre el 62-86% (Esquema 2.3).<sup>85,86</sup>



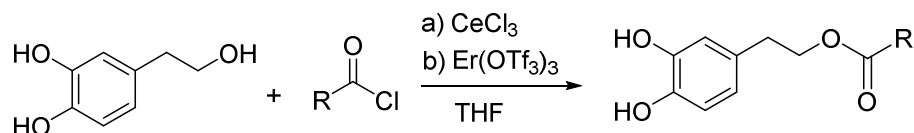
Esquema 2.2

<sup>84</sup> Alcudia, F.; Cert A, Espartero JL, Mateos R, Trujillo M. Pat. Appl. **2004**, WO2004005237.

<sup>85</sup> Trujillo, M. Mateos, R.; Collantes de Teran, L.; Espartero, J.L.; Cert, R.; Jover, M.; Alcudia, F.; Bautista, J.; Cert, A.; Parrado, J. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3779-3785.

<sup>86</sup> Mateos, R.; Trujillo, M.; Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Cert, A.; Espartero, J.L. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10960-10966.

También se ha descrito la *esterificación* quimioselectiva de HT con *haluros de ácido* de distinta longitud de cadena, catalizadas por cloruro de cerio (III)<sup>87</sup> o Er(OTf)<sub>3</sub>.<sup>88</sup> Los rendimientos obtenidos para el caso del CeCl<sub>3</sub> fueron moderados (52-53%) y entre 57-88% para el caso de Er(OTf)<sub>3</sub> (Esquema 2.4).



- a) R = (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub> **106** (53%)  
 (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub> (Z) **118** (52%)
- b) R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> **112** (88%)  
 R = (CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CH<sub>3</sub> **4** (57%)  
 R = (CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub> **116** (64%)  
 R = (CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CH<sub>3</sub> **117** (65%)  
 R = (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub> (E) **118** (83%)  
 R = (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub> (Z) **119** (70%)  
 R = (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub> (E,E) **120** (62%)

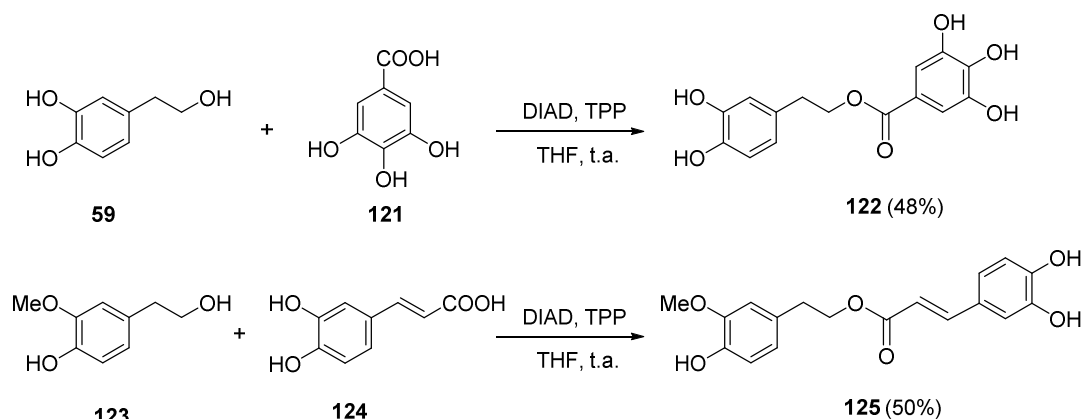
Esquema 2.3

Mediante la *reacción de Mitsunobu* también se ha logrado la esterificación regioselectiva entre ácidos y alcoholes polifenólicos,<sup>89</sup> siendo ejemplos de ello la condensación del hidroxitirosol y el ácido gálico, y del alcohol vanílico con ácido cafeico, en ambos casos con rendimientos moderados (48 y 50% respectivamente) (Esquema 2.5).

<sup>87</sup> Torregiani, E.; Seu, G.; Minassi, A.; Appendino, G; *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2193–2196.

<sup>88</sup> Procopio, A.; Celia, C.; Nardi, M.; Oliverio, M.; Paolino, D.; Sindona, G. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2377-2381.

<sup>89</sup> Appendino, G.; Minassi, A.; Daddario, N.; Bianchi, F.; Tron, G.C.; *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3839–3841.



Esquema 2.4

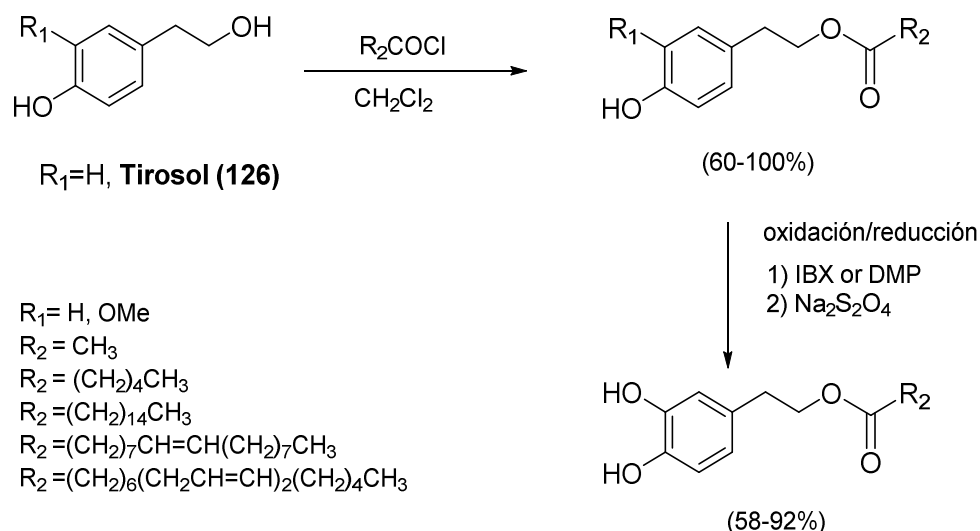
Asimismo, también se ha descrito la síntesis de ésteres partiendo de precursores distintos al hidroxitirosol, como por ejemplo el tirosol o el ácido homovanílico, mediante el uso de cloruro de ácido sin ningún tipo de catalizador adicional. Los autores sugieren una catálisis ácida que proviene de la presencia de trazas de cloruro de hidrógeno procedente de la hidrólisis del cloruro de ácido bajo las condiciones experimentales.<sup>90</sup> Este procedimiento implica la esterificación selectiva de dichos precursores empleando cloruros de acilo de diferente longitud de cadena en diclorometano, para generar los correspondientes ésteres de tirosilo y vanílico con rendimientos comprendidos entre el 70-99%. La posterior oxidación con ácido 2-yodobenzoico (IBX) o con el periodinano de Dess-Martin (DMP) y reducción *in situ* con ditionito sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) conduce a los ésteres de hidroxitirosilo finales, en mayor rendimiento para el caso de los derivados del tirosol (92-97%) que para aquellos homovanílicos (58-88%). Este procedimiento de óxido-reducción está bajo la protección de dos patentes,<sup>91,92</sup> y se ha empleado en la síntesis otros análogos estructurales del HT.<sup>93</sup>

<sup>90</sup> Bernini, R.; Mincione, E.; Barontini, M.; Crisante, F.; *J. Agric. Food. Chem.*, **2008**, *56*, 8897-8904.

<sup>91</sup> Bernini, R.; Mincione, E.; Barontini, M.; Crisante, F. Pat. Appl. **2007**, MI2007A001110.

<sup>92</sup> Bernini, R.; Mincione, E.; Barontini, M.; Crisante, F. Pat. Appl. **2008**, IB2008000598.

<sup>93</sup> Bernini, R.; Crisante, F.; Barontini, M.; Tofani, D.; Balducci, V.; Gambacorta, A. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7408-7416.



Esquema 2.5

También se han empleado enzimas como biocatalizadores en procesos de transesterificación; las principales ventajas de este proceso son la quimioselectividad y el empleo de condiciones más amigables con el medio ambiente en cuanto a disolventes y reactivos. En este contexto destaca el uso de lipasas procedentes de los organismos *A. niger*, *C. cylindracea*, *M. javanicus*, *P. cepacia*, *M. miehei*, *C. viscosum*, *P. fluorescens*, *R. arrhizus*, *R. niveus*, *C. antarctica*, empleando acetato de vinilo como reactivo y *t*-butil metil éter como disolvente.<sup>94</sup>

Solo se han conseguido los ésteres en la cadena lateral de manera quimioselectiva con la lipasa procedente de *C. antarctica*<sup>94, 95</sup> Dicha lipasa se ha empleado en la transesterificación del HT con diferentes ésteres de ácidos grasos, tanto de cadena saturada, como mono y poliinsaturada catalizada por la enzima inmovilizada *Novozym*® 435 a presión reducida y en ausencia de disolvente, procedimiento mediante el cual se obtuvieron rendimientos entre el 59-98% en el caso de ésteres de ácidos grasos saturados, y entre el 32-97% para el caso de los mono y poliinsaturados.<sup>95</sup>

Esta metodología de catálisis enzimática se ha empleado por el grupo de Cert y col. para la obtención de aceites con alto contenido en antioxidantes mediante la reacción

<sup>94</sup> Grasso, S.; Siracusa, L.; Spatafora, C.; Renis, M.; Tringali, C. *Bioorg. Chem.* **2007**, *35*, 137-152.

<sup>95</sup> Torres de Pinedo, A.; Peñalver, P.; Rondón, P.; Morales, J.C. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7654-7660.

del HT, adsorbido sobre un soporte sólido, como tierra de infusorios o talco, con los triglicéridos de dicho aceite, utilizando como catalizador *C.antarctica*. Con este procedimiento se puede obtener *in situ* un aceite con alta concentración de derivados lipófilos de hidroxitirosilo que ejerzan su actividad antioxidante sin necesidad de síntesis y purificación previa.<sup>96</sup>

El grupo de Laszlo y col. también ha empleado matrices lipídicas para la obtención de ésteres con fragmentos catecol. Así pues, utilizaron el aceite derivado de la semilla de la especie *Cuphea* (*Cuphea viscosissima* y *Cuphea lanceolata*) rico en ácido cáprico, al cual adicionaron tirosol e hidroxitirosol y emplearon *C. antarctica* (Novozym 435®) como catalizador enzimático para la transesterificación; lográndose conversiones de hasta el 98% para el caso del tirosol y del 97% para el hidroxitirosol, y obteniéndose mayoritariamente el éster derivado del ácido cáprico en ambos casos. Ambos productos demostraron tener actividad antioxidante (inhibición de la peroxidación lipídica) en la matriz lipídica comparable a la de los productos aislados y puros<sup>97</sup>

Relacionada con este procedimiento de catálisis enzimática está la síntesis de ésteres con fragmentos catecol derivados del ácido sapiénico llevada a cabo por Kaki y col.<sup>98</sup>

En primer lugar se sintetiza el ácido sapiénico en dos pasos; primero se obtiene la sal de fosfonio del ácido 6-bromohexanoico al tratarlo con  $\text{PPh}_3$ , y a continuación se hace reaccionar éste con decanal y hexametildisililamida sódica a  $-78^\circ\text{C}$  para obtener **127**.

La obtención de los ésteres **128-131** se hace mediante tratamiento de la mezcla del ácido sapiénico y los fenoles correspondientes con la lipasa procedente de *Candida antártica*. Finalmente, la obtención de los derivados catecólicos **132a 132b** se hace mediante hidroxilación aromática empleando IBX (Esquema 2.7).

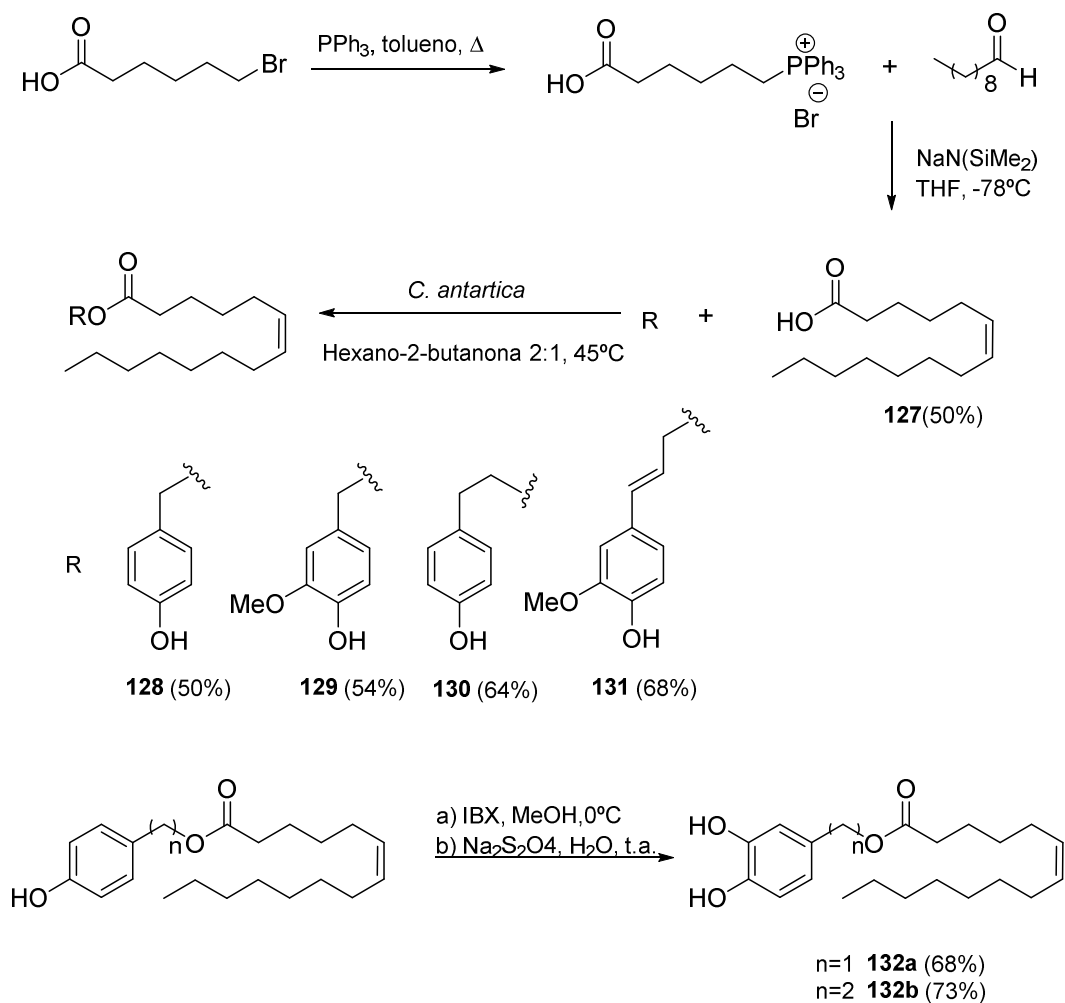
---

<sup>96</sup> Cert, A.; Romero, A.; Mateos, R.; Alcudia, F.; Espartero, J.L.; Trujillo, M. Pat. Appl. **2012**, WO2012042080A120120405.

<sup>97</sup> Laszlo, J.A.; Cermak, S.C.; Evans, K.O.; Compton, D. L.; Evangelista, R.; Berhow, M.A.; Joseph A. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2013**, *115*, 363–371.

<sup>98</sup> Kaki, S.S.; Gopai, S.C.; Rao, B.V.S.K.; Poornachandra, Y.; Kumar, C.G.; Prasad, N.B.N. *Eur. J. Sci. Technol.* **2013**, *115*, 1123-1129.





Esquema 2.6

La actividad biológica de derivados lipófilos de hidroxitirosol se ha evaluado mediante estudios sobre el transporte, absorción y metabolismo en modelos celulares y animales.<sup>99,100</sup> Para ello, se emplearon las líneas celulares HepG2 como modelo del hígado humano y la línea Caco-2/TC7, comúnmente empleada para caracterizar la absorción intestinal de fármacos, nutrientes y otros xenobióticos. Los resultados mostraron una relación directa del carácter lipofílico de cada compuesto y el

<sup>99</sup> Pereira-Caro, G.; Bravo, L.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Mateos, R. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 798–806.

<sup>100</sup> Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Saha, S.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Bravo, L.; Kroon, P.A. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 11501–11509.

nivel de metabolización, de manera que las cadenas más largas eran metabolizadas y absorbidas por el intestino de manera más rápida que las más cortas.

Estudios frente al estrés oxidativo también han sido llevados a cabo sobre líneas celulares HepG2. Los resultados mostraron el potencial de estos compuestos para prevenir el daño celular inducido por hidroperóxido de *tert*-butilo (*t*-BuOOH) y para mantener inalterado el equilibrio redox de la célula, obteniéndose de nuevo mejores resultados para ésteres de cadena alifática larga frente a los de cadena alifática corta,<sup>101</sup> lo cual está de acuerdo con la hipótesis denominada “paradoja polar” (*polar paradox*), según la cual los antioxidantes polares son más efectivos en medios más apolares, como aceites, y los antioxidantes apolares, por su parte, son más activos en medios polares, como emulsiones de aceite en agua o liposomas en agua.<sup>102</sup>

El grupo de Boullagui y col. ha estudiado recientemente la actividad citotóxica y antiproliferativa del acetato y el oleato de hidroxitirosilo, obtenidos mediante catálisis enzimática, frente a células humanas de cáncer cérvico-uterino (HeLa), obteniéndose valores de IC<sub>50</sub> de 0.42 y 0.33 mM para el acetato y el oleato de hidroxitirosilo respectivamente, que resultaron ser más activos que el hidroxitirosol (0.46 mM).<sup>103</sup>

---

<sup>101</sup> Pereira-Caro, G.; Sarriá, B.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Goya, L.; Bravo, L.; Mateos, R. *J. Agric. Food. Chem.* **2011**, *59*, 5964–5976.

<sup>102</sup> Porter, W. L.; Black, E. D.; Drolet, A. M. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 615–624

<sup>103</sup> Bouallagui, Z.; Bouaziz, M.; Lassoued, S.; Engasser, J.M.; Ghoul, M.; Sayadi, S. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011, *163*, 592–599.

## 2.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se propone la síntesis de ésteres derivados del HT con el fin de aumentar su lipofilia, lo cual permitiría aumentar su permeabilidad a través de membranas celulares, así como su potencial empleo en la preservación de alimentos. Se pretende desarrollar un método de síntesis de ésteres del hidroxitirosol que permita acortar la secuencia sintética con respecto a los métodos ya descritos en la bibliografía, así como utilizar condiciones de *Química Verde*.

### 2.2.1 Síntesis de ésteres alifáticos derivados del hidroxitirosol mediante transesterificación catalizada por ácido.

En concreto, se han ensayado diversas condiciones de transesterificación catalizada por ácido entre el hidroxitirosol desprotegido y diversos ésteres, analizándose la quimioselectividad del proceso.

#### *Catálisis ácida empleando montmorillonita K-10*

La montmorillonita K-10, una arcilla de fórmula  $\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  perteneciente al grupo de los filosilicatos, ha sido utilizada como catalizador en síntesis orgánica durante años de manera satisfactoria. Cabe destacar su uso en reacciones de Diels-Alder, condensación de Knoevenagel, adición de Michael, síntesis de éteres, ácidos carboxílicos, acetilación de alcoholes, tioles, fenoles y aminas.<sup>104</sup>

Su carácter ácido, así como su fácil procesado y potencial reutilización, nos estimuló a ensayarla en la preparación de ésteres derivados del hidroxitirosol.

Desafortunadamente, tras ensayarlo en la transesterificación del HT con acetato de etilo, anhídrido acético y cloruro de acilo en diferentes proporciones, condiciones de temperatura y empleando distintos disolventes, no condujo a resultados satisfactorios (Tabla 2.1).

De este modo, en el caso del empleo de AcOEt en la transesterificación del HT

---

<sup>104</sup> Kaur, N.; Kishore, D. *J. Chem. Pharm. Res.* **2012**, *4*, 991-1015.

catalizada por montmorillonita, no se produjo ninguna reacción, mientras que para el resto de reactivos se llegó a la conclusión de que la reacción no mostraba quimioselectividad, obteniéndose mezclas complejas de productos mono, di y peracetilados, por lo que se descartó como método de síntesis eficaz de ésteres alifáticos del hidroxitirosol.

**Tabla 2.1** Condiciones de reacción para la esterificación de hidroxitirosol catalizada por montmorillonita K-10

Condiciones	Resultados
AcOEt, montmorillonita K-10 (20% p/p), reflujo	No hay reacción.
Anhídrido acético (0.7-2 eq.) montmorillonita K10 (10-50 % p/p), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , t.a.	No hay quimioselectividad. Mezcla de productos mono-, di- y peracetilados.
Anhídrido acético (1.5- 3 eq.), montmorillonita K-10 (10-50 % p/p), AcOEt, 50°C	Producto peracetilado (87-99%).
AcOCl (3-6 eq.), montmorillonita K-10 (50% p/p), AcOEt, t.a.	No hay quimioselectividad. Mezcla de productos mono y diacetilados.

***Uso de Amberlita IR-120 (H<sup>+</sup>) como catalizador ácido.***

A diferencia de lo ocurrido en el caso de la montmorillonita, se consiguió la transesterificación quimioselectiva del HT empleando ésteres metílicos y etílicos de ácidos de cadena lineal de distinta longitud y catálisis ácida procedente de la resina Amberlita IR-120 (H<sup>+</sup>). Los productos sintetizados son los que se detallan en el esquema 2.8, (acetato, hexanonato, octanoato y decanoato de hidroxitirosilo), obtenidos en rendimientos de moderados a excelentes.



Esquema 2.7

El empleo de Amberlita IR-120 ( $H^+$ ) como catalizador constituye una alternativa más práctica que otros procesos descritos en la bibliografía, ya que dicha resina puede retirarse fácilmente del medio de reacción mediante filtración, constituyendo así un método verde, económico y eficaz para este tipo de síntesis.

Este método resultó especialmente satisfactorio para la obtención de acetato de hidroxitirosilo, que se aisló con un 74% de rendimiento tras purificación en columna, convirtiéndolo así un procedimiento sencillo y efectivo para la obtención de un éster alifático del HT. Además, otra ventaja de este método es la posibilidad de reutilizar la resina sin ningún tipo de tratamiento ni regeneración mediante lavado con ácido, ya que se ha demostrado que mantiene la eficacia en al menos tres ciclos sucesivos sin alterar por ello el rendimiento en la reacción (Tabla 2.2), lo cual abarataría los costes en caso de que se llevara a cabo la producción industrial de este compuesto. Estos resultados han sido protegidos recientemente bajo patente.<sup>105</sup>

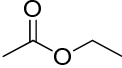
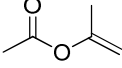
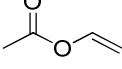
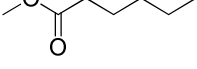
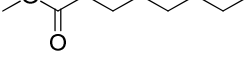
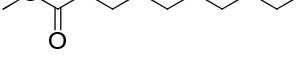
**Tabla 2.2.** Eficacia de la reutilización de la resina Amberlita IR-120 ( $H^+$ )

Ciclo	Rendimiento (%)
1	66
2	66
3	67

Este método, sin embargo, resultó bastante menos eficaz en la transesterificación para el caso de ésteres de ácidos de cadenas larga, para los cuales el rendimiento se situaba en torno al 30% en el mejor de los casos. (Tabla 2.3).

<sup>105</sup> Fernandez-Bolaños, J.; Rodriguez, G.; Lama, A.; Senent, F.; Fernandez-Bolanos, J. M.; Maya, I.; López, O.; Marset, A. **2013**, WO2013007850.

**Tabla 2.3.** Transesterificación del HT con ésteres alifáticos catalizada por Amberlita IR-120.

Éster	Disolvente	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)
	AcOEt	11	74
	THF	24	36
	THF	.*	-
	THF	26	31
	THF	28	16
	THF	48	27

\*no hay reacción

Los ésteres etílicos o metílicos presentan el inconveniente de que el proceso es un equilibrio, por la liberación del alcohol correspondiente; por este motivo, nos propusimos ensayar la obtención de los ésteres de hidroxitirosilo usando otros ésteres, como el acetato de isopropenilo o el acetato de vinilo, que al generar acetona o acetaldehído, respectivamente, evitarían la existencia de un equilibrio. No obstante, bajo estas condiciones, el rendimiento fue tan sólo del 36% en el caso del acetato de isopropenilo, y ausencia de reacción para el caso del acetato de vinilo. Otros agentes acilantes, como los correspondientes cloruros de acilo o anhídrido acético no permitieron obtener los correspondientes ésteres de hidroxitirosilo de manera quimioselectiva.

### 2.2.2. Síntesis de (3',4'-dihidroxifenil)etanoato de hidroxitirosilo.

Se ha llevado a cabo la primera síntesis del éster dimérico derivado del HT, **8**. Este compuesto, que ha sido aislado muy recientemente del escarabajo japonés *Blaps japonensis* (familia Tenebrionidae) por Yan y col.,<sup>106,107</sup> se usa en la medicina tradicional

<sup>106</sup> Yan, M.Y.; Dai, H.Q.; Du, Y.; Schneider, B.; Guo, H. Li, D.P.; Zhang, L.X.; Fu, H.; Dong, X.P.; Cheng, Y.X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4179-4181.

china para el tratamiento de inflamaciones, infecciones y cáncer.<sup>108</sup> Además, ha demostrado tener una actividad eficaz como inhibidor de proteínas de la familia 14-3-3, expresadas en todas las células eucariotas y que tienen un papel importante en la regulación de funciones como la diferenciación, proliferación y transformación celular, además de regular una amplia variedad de oncogenes y genes supresores de tumores.<sup>106</sup> Los compuestos que inhiben estas proteínas son considerados candidatos a ser usados en quimioterapia.<sup>109</sup>

Para la obtención de este compuesto, en primer lugar se llevó a cabo la protección regioselectiva de los hidroxilos fenólicos utilizando  $\alpha, \alpha'$ -dibromo-*o*-xileno. El  $\alpha, \alpha'$ -dibromo-*o*-xileno es un grupo protector que ha sido empleado recientemente en la protección regioselectiva de hidroxilos 1,2-*trans*-diecuatoriales en azúcares, incluyendo ciclodextrinas.<sup>110,111</sup> A continuación, el hidroxilo primario de **133** fue oxidado con peryodinano de Dess-Martin (*Dess Martin Periodinane*, DMP, **134**),<sup>112</sup> para dar lugar a su correspondiente aldehído **5**, y posteriormente hasta el ácido carboxílico **6** con NaClO<sub>2</sub>. Una ruta alternativa más eficaz consistiría en la oxidación directa del alcohol primario **133** mediante el empleo de una mezcla de NaClO/NaClO<sub>2</sub> en presencia de TEMPO.<sup>113</sup> El ácido **6** se transformó en el cloruro de ácido **135** mediante tratamiento con SOCl<sub>2</sub>, este intermedio fue usado directamente para la siguiente etapa sin ninguna purificación cromatográfica. El acoplamiento con el derivado de HT parcialmente protegido **134** con el cloruro de ácido **135** en presencia de Et<sub>3</sub>N en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro, condujo al éster dimérico **8**, con un rendimiento de tan sólo el 5%.

<sup>107</sup> Cheng, Y.; Yan, Y.; Lu, Q.; *Faming Zhuanli Shenqing*, Pat. Appl, **2012**, CN102503826A20120620.

<sup>108</sup> Zhang, L. S.; Xia, C. L.; Yang, Y. S.; Liu, G. M. *Lishizhen Med. Mater. Medica Res.* **2009**, *20*, 3113

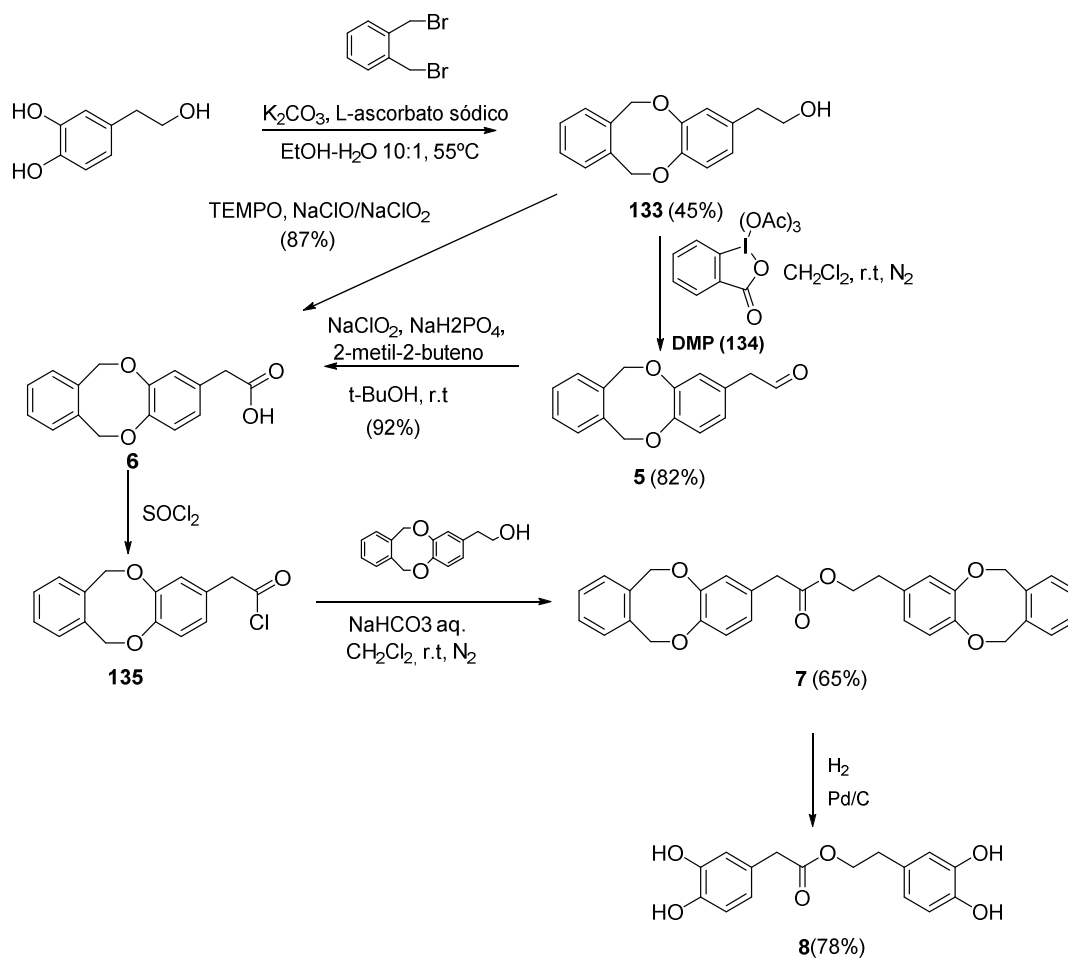
<sup>109</sup> Hermeking, H. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 931-943.

<sup>110</sup> Imamura, A.; Lowary, T. L. *Organic Lett.* **2010**, *12*, 3686-3689.

<sup>111</sup> Balbuena, P.; Lesur, D.; González-Álvarez, M.J.; Mendicuti, F.; Ortiz-Mellet, C.; García-Fernández, J.M. *Chem. Commun.* **2007**, 3270-3272

<sup>112</sup> Dess, D.B.; Martin, J.C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155-4156.

<sup>113</sup> Anelli, P.L.; Montanari, F.; Quici, S. *Org. Synth.* **1990**, *69*, 212-219.



Esquema 2.8.

No obstante, el empleo de un sistema bifásico  $CH_2Cl_2$ -NaHCO<sub>3</sub> (aq.) en presencia de Bu<sub>4</sub>NI como catalizador de transferencia de fase permitió obtener el éster dimérico protegido con un 65% de rendimiento tras purificación cromatográfica. Finalmente, la hidrogenación catalítica de este compuesto condujo al compuesto deseado con excelente rendimiento.



### **3. SÍNTESIS DE TIO Y SELENODERIVADOS CON FRAGMENTOS DE CATECOL**

### 3. SÍNTESIS DE TIO Y SELENODERIVADOS CON FRAGMENTOS DE CATECOL

#### 3.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

##### 3.1.1. Ácido lipoico

El ácido 5-(1,2-ditioilan-3-il)pentanoico, también conocido como ácido tióctico o ácido  $\alpha$ -lipoico es un ácido graso que contiene un disulfuro cíclico. Se encuentra en todas las células, tanto eucariotas como procariotas, en configuración *R* como cofactor en complejos enzimáticos,<sup>114,115</sup> aunque su forma racémica comercial es ampliamente utilizada. Fuentes naturales de ácido *R*-(+)-lipoico en la dieta son las espinacas, brócoli, tomates, maíz y patatas, en los que se encuentra en forma de lipoil lisina; también está presente en las carnes rojas.<sup>116-119</sup>

Como antioxidante presenta propiedades únicas, ya que conserva su actividad tanto en su forma oxidada (ácido lipoico) como en su forma reducida (ácido dihidrolipoico).<sup>115,120</sup> La pareja ácido lipoico/ácido dihidrolipoico (LA/DHLA) constituyen un potente par rédox, con un potencial  $E_0 = -0.320$  V,<sup>121</sup> lo cual le confiere la capacidad de regenerar ciertos antioxidantes, como las vitaminas C y E.<sup>122</sup>

<sup>114,114</sup>Singh, U.; Jialal, I.; *Nutr. Rev.* **2008**, *66*, 646-657.

<sup>115</sup>Navari-Izzo, F.; Quartacci, M.F.; Sgherri, C. *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, *40*, 463-470.

<sup>116</sup>Lachman, J.; Hamouz, K. *Plant Soil Environ.* **2005**, *51*, 477-482.

<sup>117</sup>Vianey-Laud, N.; Kobrehel, K.; Suavaire, Y.; Wong, J.H.; Buchanan, B.B. *J. Agric. Food Chem.* 1994, *42*, 1110-1114.

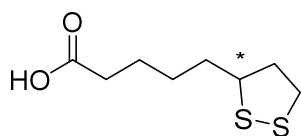
<sup>118</sup>Mattulat, A.; Baltes, W.Z. *Lebensm Unters Forsch.* **1992**, *194*, 326-329.

<sup>119</sup>Satoh, S.; Shindoh, M.; Min, J.Z.; Toyo'oka, T.; Fukushima, T.; Inagaki, S. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, *618*, 210-217.

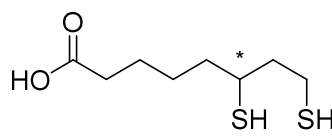
<sup>120</sup>Packer, L.; Witt, E.H.; Tristschler, H.J.; *Handbook of antioxidants*, M.Dekker Inc. New York, **1996**, 545-591.

<sup>121</sup>Searls, R.L.; Sanadi, D.R. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 2485-2491.

<sup>122</sup>Bast, A.; Haenen, G.R. *Biofactors* **2003**, *17*, 207-213.



Ácido lipoico (136)



Ácido dihidrolipoico (137)

Además, y a diferencia de otros antioxidantes como el ácido ascórbico, el DHLA no se destruye al interaccionar con radicales libres, sino que se puede regenerar de nuevo.<sup>123</sup> Tanto el ácido lipoico como el dihidrolipoico han demostrado ser activos frente a radicales hidroxilo y ácido hipocloroso,<sup>124,125</sup> mientras que solo el lipoico interviene frente al oxígeno singlete,<sup>126</sup> y ninguna de las dos especies es activa frente al peróxido de hidrógeno.<sup>125</sup>

Estudios recientes sugieren que los efectos terapéuticos y antienvjecimiento del ácido lipoico se deben a la modulación de la señal de transducción y transcripción genética, lo cual mejora el estado antioxidante de la célula. Paradójicamente, esto ocurre preferentemente mediante mecanismos prooxidantes, y no mediante mecanismos antirradicalarios o reductores.<sup>127,128</sup>

Ambas especies, ácidos lipoico y dihidrolipoico, tienen capacidad para quelatar metales de transición<sup>129</sup> y desactivar intermedios de procesos altamente reactivos, como las ROS.<sup>130</sup> El ácido lipoico, debido a que es soluble tanto en medios lipídicos, como en agua, puede acceder y proteger las células nerviosas,<sup>130</sup> y cruzar con facilidad la barrera hematoencefálica, por lo que se puede utilizar en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el glaucoma,<sup>131</sup> y en la prevención de la enfermedad de

<sup>123</sup>Rochette, L.; Ghibu, S.; Richard, C.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Vergely, C. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 114-125

<sup>124</sup>Packer, L.; Witt, E.H.; Tritschler, H.J. *Free Rad. Biol. Med.* **1995**, *19*, 227-250.

<sup>125</sup>Haenen, G.R.; Bast, A. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *42*, 2244-2246.

<sup>126</sup>Devasagayam, T.P.; Subramanian, M.; Pradan, D.S.; Sies, H. *Chem. Biol. Interact.* **1993**, *86*, 79-92.

<sup>127</sup>Petersen Shay, K.; Moreau, R. F.; Smith, E. J.; Hagen, T. M., *IUBMB Life*, **2008**, *60*, 362-367.

<sup>128</sup>Petersen Shay, K.; Shenvi, S.; Hagen, T. M.; *Lipoic Acid as an inducer of phase II detoxification enzymes trough activation of Nr-f2 dependent gene expression*, Taylor & Francis Publishers, **2008**, 349-371

<sup>129</sup>Ou, P.; Tritschler, H.J.; Wolff, S.P.; *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 123-126.

<sup>130</sup>Ji, D.; Shah, A.; Majid, A.; Yin, Z.Q. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 1060-1067.

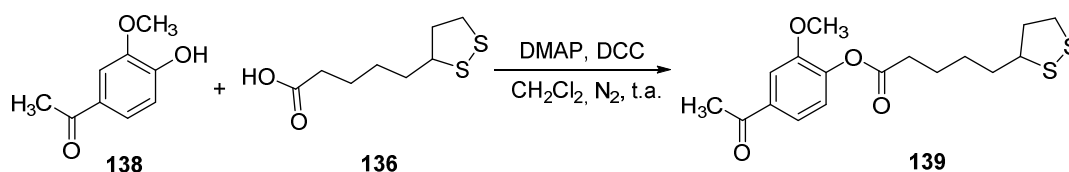
<sup>131</sup>Inman, D.N.; Lambert, W.S.; Calkins, D.J.; Horner, P.J. *PLoS One* **2013**, *8*, 1-17.

Alzheimer.<sup>132</sup> También ha mostrado actividad hepatoprotectora y antidiabética,<sup>133,134</sup> y eficacia en el tratamiento de la cirrosis, la aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares,<sup>135</sup> tratamientos contra el cáncer,<sup>136,137</sup> y en casos de envenenamiento con mercurio, antimonio, y ciertas setas.<sup>115,127</sup>

El ácido lipoico contiene un carbono asimétrico, lo que ofrece la posibilidad de utilizar tanto la forma racémica como cada isómero óptico por separado, pudiendo ofrecer cada una de estas tres combinaciones diferente actividad biológica.

Debido a sus interesantes propiedades, en los últimos años se han sintetizado diversos derivados del ácido lipoico. Ejemplos de estos derivados y sus aplicaciones son los que se muestran a continuación:

En este contexto, el grupo de Saleh y col. ha llevado a cabo la síntesis del éster derivado de la apocianina y el ácido lipoico mediante acoplamiento con DCC empleando como base DMAP (Esquema 2.1). Este compuesto ha mostrado actividad inhibitoria de la NADPH oxidasa y actividad neuroprotectora.<sup>138</sup>



Esquema 3.1

<sup>132</sup>Maczurek, A.; Hager, K.; Kenkies, M.; Sharman M.; Martins, R.; Engel, J.; Carlson D.A.; Münch, G. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1463–1470.

<sup>133</sup>Udapa, A.; Nahar, P.; Shah, S.; Kshirsagar, M.; Ghongane, B. *Ann. Med. Health Sci. Res.* **2013**, *3*, 442.446.

<sup>134</sup>Jacob, S.; Ruus, P.; Hermann, R.; Tritschler, H.J.; Maerker, E.; Renn, W.; Augustin, H.J.; Dietze, G.K.; Rett, K. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, *27*, 309-314.

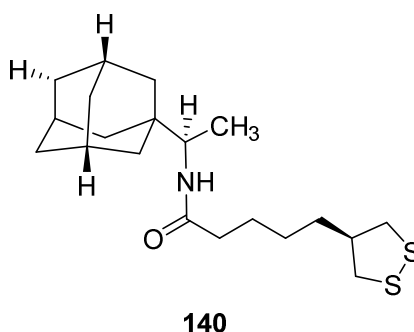
<sup>135</sup>Sabharwal, A.K.; May, Mol, J.M. *Cell. Biochem.* **2008**, *309*, 125-132.

<sup>136</sup>Wenzel, U.; Nickel, A.; Daniel, H. *Apoptosis* **2005**; *10*, 359-368.

<sup>137</sup>Michikoshi, H.; Nakamura, T.; Sakai, K.; Suzuki, Y.; Adachi, E.; Matsugoa, S.; Matsumoto, K. *Cancer Lett.* **2013**, *335*, 472–478.

<sup>138</sup>Saleh, T.; Rajagopal, D.; Khan, B.; Conell, B.J. *Pat. Appl.* **2013**, WO2013071400.

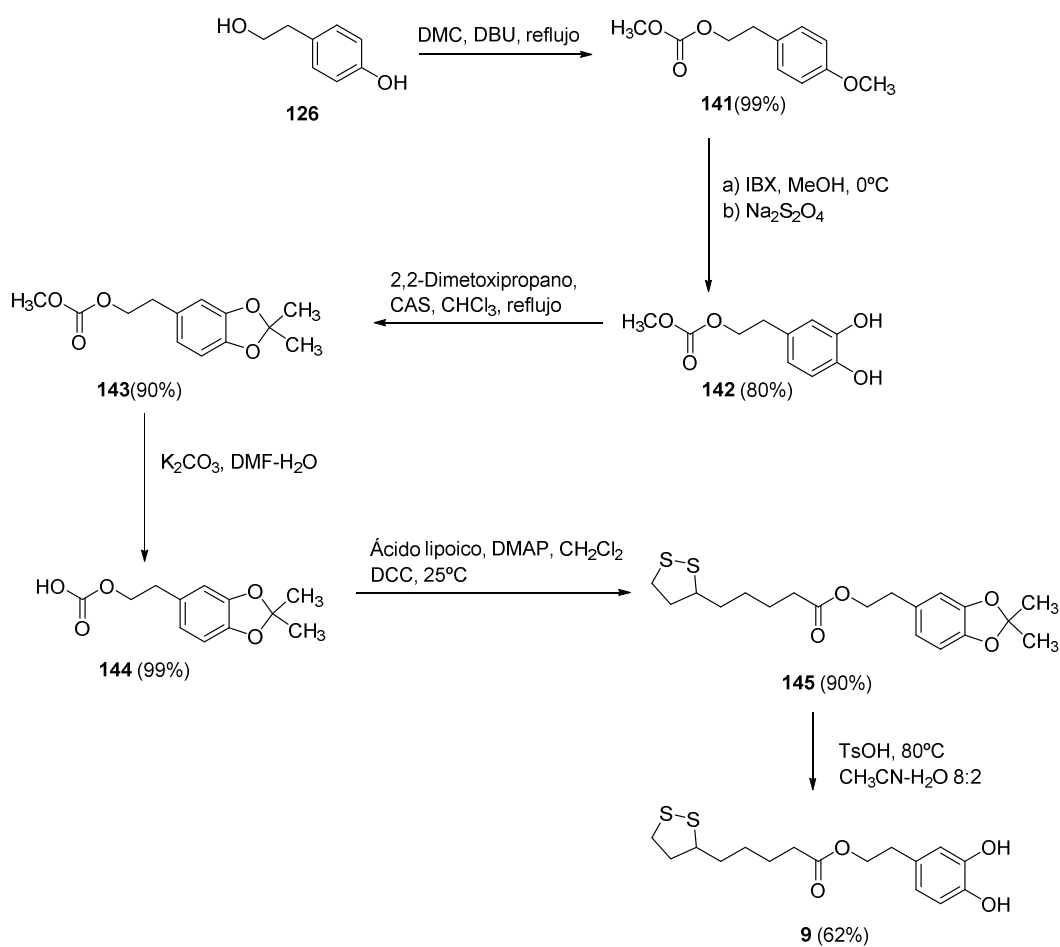
Shibnev y col. ha sintetizado derivados de la 1-(1-adamantil)etilamina, entre ellos, aquel con un fragmento lipoilo **140** que presenta actividad selectiva frente a la gripe A.<sup>139</sup>



El grupo de Bernini y col. ha sintetizado el éster derivado del ácido  $\alpha$ -lipoico y el HT mediante dos rutas alternativas.<sup>140</sup> En la primera de ellas, se trató el tirosol con carbonato de dimetilo (DMC), en presencia de DBU como base. Posteriormente, el compuesto resultante **141** se sometió a una hidroxilación aromática con IBX y reducción *in situ* empleando  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , aislándose el derivado catecólico **142** con un 80% de rendimiento (Esquema 2.2). Para impedir la esterificación de los hidroxilos aromáticos, se protegieron empleando 2,2-dimetoxipropano en presencia de ácido canforsulfónico (CAS) como catalizador. Tras la desprotección del hidroxilo alifático en condiciones básicas, éste se esterificó con ácido  $\alpha$ -lipoico empleando DMAP como base y DCC como agente acoplante, lográndose la obtención de **145** con un 90% de rendimiento. Finalmente, la desprotección de los hidroxilos fenólicos en condiciones ácidas dio lugar al producto **9** con un rendimiento del 62%. (Esquema 3.2).

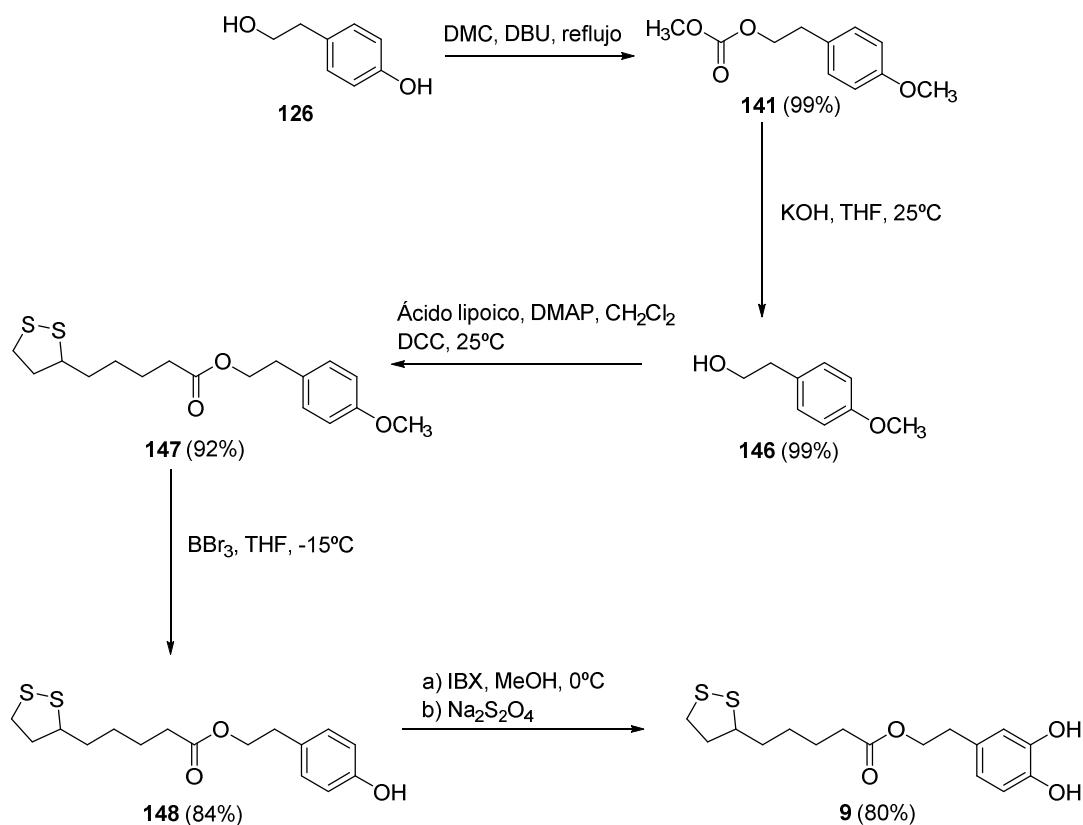
<sup>139</sup>Shibnev, V. A.; Finogenova, M. P.; Garaev, T. M.; Burtseva, E. I.; Shevchenko, E. S, Pat. Appl. **2012**, RU2461544C120120920.

<sup>140</sup>Bernini, R.; Crisante, F.; Merendino, N.; Molinari, R.; Soldatelli, M.C.; Velotti, F. Eur. *J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 439-446.



Esquema 3.2

Una ruta alternativa propuesta por el mismo grupo partió de la protección de ambos grupos hidroxilo del compuesto **126** empleando DMC/DBU. (Esquema 3.3) A continuación, se desprotegió el carbonato en medio básico (KOH) y se procedió a la esterificación del compuesto resultante con ácido  $\alpha$ -lipoico en presencia de DCC/DMAP, obteniéndose el compuesto **147** con un rendimiento del 92%. El tratamiento de **147** con tribromuro de boro dio lugar al éster **148** con un rendimiento del 84%. Finalmente, la hidroxilación aromática con IBX/ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  condujo al éster **9** con un rendimiento del 80%; consiguiéndose de este modo acortar la ruta de reacción de 6 a 5 pasos y mejorándose significativamente el rendimiento global (62% frente al 40% de la ruta anterior).



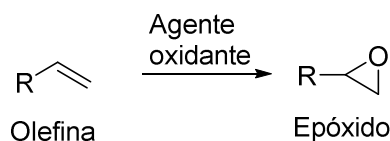
Esquema 3.3

Se ha ensayado la actividad antiproliferativa del compuesto **9** frente al adenocarcinoma colorrectal humano (línea celular HT-29), observándose una inhibición significativa comparada tanto con el HT como con el ácido  $\alpha$ -lipoico ( $83.6\pm 3.9\%$ ,  $53.2\pm 4.1\%$  y  $19.5\pm 4.9\%$  respectivamente, a una concentración de  $300\ \mu\text{M}$ ), demostrándose la sinergia de los grupos catecol y disulfuro para esta actividad.<sup>140</sup>

### 3.1.2. Oxiranos y apertura regioselectiva con diferentes nucleófilos

Los oxiranos o epóxidos son éteres intramoleculares que forman un anillo de tres miembros. Los epóxidos se generan mediante la adición de oxígeno al doble enlace de olefinas (Esquema 3.4), empleando agentes oxidantes como peroxiácidos, peróxido de

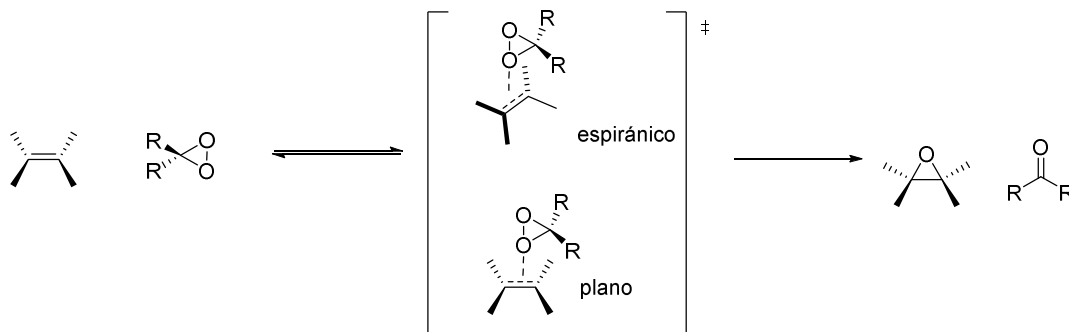
hidrógeno o hidroperóxidos, o bien mediante oxidación directa con oxígeno molecular catalizada por metales o sales metálicas.<sup>141</sup>



Esquema 3.4

El uso de dimetildioxirano (DMDO) en la síntesis de epóxidos es un método que logra altos rendimientos en condiciones suaves y neutras, y que es especialmente útil para la obtención de epóxidos que no se pueden obtener por otras vías. Sin embargo, la preparación de disoluciones de DMDO presenta inconvenientes experimentales como la necesidad condiciones anhidras de reacción y corta vida de almacenamiento.<sup>142</sup>

El empleo de peroximonosulfato potásico ( $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ ) u Oxona®, un agente oxidante muy versátil, favorece la generación *in situ* de dioxiranos a partir de cetonas, y es una alternativa al uso de DMDO en la síntesis de epóxidos a partir de olefinas.<sup>143</sup> El mecanismo de la epoxidación mediante dioxiranos se ha explicado a partir de dos aproximaciones, la primera de ellas implicaría un estado de transición plano y la segunda un estado de transición espiránico (Esquema 3.5), siendo la segunda aproximación la más plausible.<sup>143</sup>



Esquema 3.5

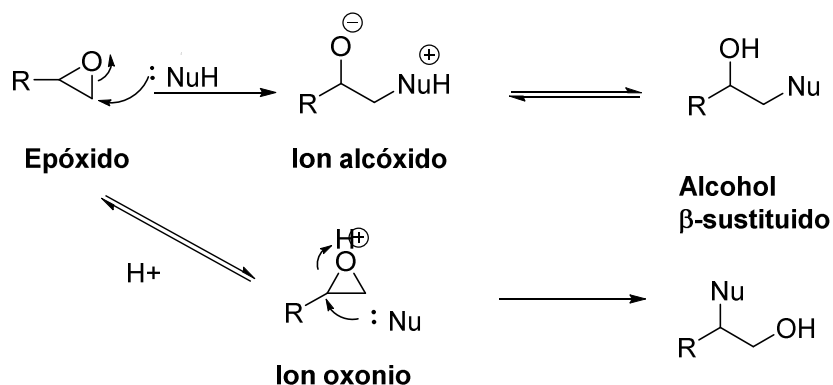
<sup>141</sup> Monnier, J.R. *Appl. Catal., A* **2001**, *221*, 73-91.

<sup>142</sup> Crandall, J.K.; Rambo, E. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7027-7036.

<sup>143</sup> Hussain, H.; Green, I.R.; Ahmed, I. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 3329-3371.



En los epóxidos la tensión del anillo es muy elevada, lo que le confiere una alta reactividad con diferentes nucleófilos tales como aminas, tioles o alcoholes,<sup>144</sup> lo que lo convierte en un intermedio interesante en Química Orgánica. La apertura del epóxido puede realizarse en condiciones ácidas o básicas (Esquema 3.6). En los epóxidos asimétricos, el ataque del nucleófilo se produce preferentemente en el carbono del anillo menos sustituido al estar menos impedido estéricamente en medio básico, mientras que en medio ácido se produce preferentemente en el más sustituido, de modo que se logran conversiones estereoespecíficas. El mecanismo de reacción tiene muchas de las características de una reacción S<sub>N</sub>2.



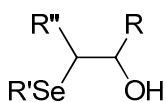
Esquema 3.6

La síntesis de compuestos organoselénicos, debido a las interesantes propiedades biológicas que muchos de ellos tienen, ya comentadas en la Introducción General de esta Tesis Doctoral, plantea la necesidad de idear diversas rutas para su obtención. La apertura de oxiranos con nucleófilos de alquil o aril-selenio es una de las muchas estrategias desarrolladas para la síntesis de diferentes compuestos, como selenoesteroides con actividad proapoptótica,<sup>145</sup> o β-hidroxiselenuros, intermedios útiles en una amplia variedad de reacciones químicas.<sup>146-149</sup>

<sup>144</sup> a) Fringuelli, F.; Pizzo, F.; Vaccaro, L. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1131-1133. b) Ollevier, T.; Lavie-Compin, G. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7891-7893. c) Barluenga, J.; Vázquez-Villa, H.; Ballesteros, A.; González, J. M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2817-2819. d) Iranpoor, N.; Firouzabadi, H.; Shekarize, M. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 724-727. e) Azoulay, S.; Manabe, K.; Kobayashi, S. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4593-4595. f) Krake, S.H.; Bergmeier, S.C. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7337-7360.

<sup>145</sup> Rodrigues, O.E.D.; de Souza, D.; Soares, L.C.; Dornelles, L.; Burrow, R.A.; Appelt, H.R.; Alves, C.F.; Alves, D.; Braga, A.L. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2237-2240.

<sup>146</sup> Tiecco, M.; Testaferri, L.; Marini, F.; Sternativo, S.; Del Verme, F.; Santi, C.; Bagnoli, L.; Temperini, A. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3337-3342 y referencias contenidas.



### β-Hidroxiselenuro

La obtención de este tipo de compuestos se ha descrito mediante varias vías, como la adición a epóxidos de especies fenilseleno silanos,<sup>150</sup> o la adición de difenildiselenuros asistida por (n-Bu)<sub>3</sub>P,<sup>151</sup> indio,<sup>151</sup> ultrasonidos,<sup>152</sup> o Rongalita®,<sup>153</sup> que promueven la rotura del enlace diselenuro originando arilselenolatos nucleófilos.

#### 3.1.3. Síntesis de tio y selenoureas

La química de los compuestos *N*-tiocarbónicos se remonta a 1923, cuando Schoorl sintetizó la D-glucopiranosil tiourea por condensación de D-glucosa con tiourea.<sup>154</sup> Desde entonces se han publicado numerosos artículos acerca de este tipo de compuestos, considerados isómeros de ureas y de otros compuestos.

La síntesis de tioureas *N,N'* disustituidas han suscitado un interés creciente debido al amplio espectro de actividad biológica que pueden llegar mostrar; de este modo, se han sintetizado derivados con propiedades antifúngicas,<sup>155</sup> antibacterianas, insecticidas, antituberculosas,<sup>156</sup> herbicidas y reguladoras del crecimiento en vegetales.<sup>157</sup> En el ámbito clínico, las tioureas *N,N'* disustituidas han demostrado tener actividad antimicrobiana,<sup>158</sup> y actividad antiviral tanto *in vitro* como *in vivo*,<sup>159,160</sup> habiéndose

<sup>147</sup> Aifheli, C. G.; Kaye, P. T. *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 4459-4475.

<sup>148</sup> Schwartz, A.; Madan, P. B.; Mohacsi, E.; O'Brien, J. P.; Todaro, E.; Coffen, D. L. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 851-856.

<sup>149</sup> Bégué, J. P.; Bonnet-Delpon, D.; Kornilov, A. *Synthesis* **1996**, 529-531.

<sup>150</sup> Tiecco, M.; Testaferri, L.; Marini, F.; Sternativo, S.; del Verme, F.; Santi, C.; Bagnoli, C.; Temperini, A. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3337-3342.

<sup>151</sup> Chen, X.; Wu, H.; Su, W.; Xu, R.; Liu, M.; Ding, J. *J. Chem. Res.* **2007**, *6*, 325-327.

<sup>152</sup> Cheng, T.; Zheng, X.; Ke, Q. *J. Chem. Res.* **2011**, *35*, 522-524.

<sup>153</sup> Lv, G.; Li, T.; Hu, R.; Chen, J.; Ding, J.; Wu, H. *J. Chem. Res.* **2010**, *10*, 549-552.

<sup>154</sup> Schoorl, M. N. *Rec. Trav. Chim.* **1903**, *22*, 31-77.

<sup>155</sup> Eweis, M.; Elkholyb, S.S.; Elsabeeb, M.Z. *Int. J. Biol. Macromol.* **2006**, *38* 1-8.

<sup>156</sup> Dharmarajan, S.; Perumal, Y.; Murugesan, D.; Rathinasababathy, T. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 1194-1196.

<sup>157</sup> Zhang, Y.M.; Wei, T.B.; Wang, X.C.; Yang, S.Y. *Indian J. Chem.*, **1998**, *37*, 604-606.

<sup>158</sup> Singh, D.P.; Gangwar, M.; Kumar, D.; Nath, G.; Pratap, S., *J. Chem. Crystallogr.* **2013**, *43*, 610-621.

probado mediante estudios de estructura-actividad que la presencia de un grupo NH-(CS)-NH es esencial para dicho efecto.<sup>161</sup> De especial interés es la actividad antitumoral de ciertas familias de tioureas, con un amplio rango de actividades contra varias leucemias y tumores sólidos debido a su actividad inhibitoria contra los receptores de tirosina quinasa (RTKs),<sup>162</sup> las proteínas tirosina quinasa (PTKs)<sup>163</sup> y las quinasas dependientes de la ciclina (CDKs),<sup>164</sup> que juegan un papel importante en la división y proliferación celular.

Las tioureas también se usan en otros ámbitos como por ejemplo en la industria del caucho como aceleradores, ejemplos de ello son la *N,N'*-dietiltiourea, dibutiltiourea y difeniltiourea.<sup>165</sup> La capacidad del grupo tioureido de formar enlaces de hidrógeno ha propiciado su uso como receptores de aniones<sup>166,167</sup> y en el ámbito de la organocatálisis;<sup>168</sup> actualmente, este tipo de derivados emplean satisfactoriamente como catalizadores en síntesis asimétrica,<sup>169,170</sup> como por ejemplo en reacciones de Suzuki y Heck, debido a la resistencia de los enlaces del grupo tioureido a la temperatura, al aire y a la humedad.<sup>171,172</sup>

Estos derivados también son útiles como agentes quelatantes debido a su habilidad para coordinarse con metales;<sup>173</sup> ejemplos del aprovechamiento de esta capacidad coordinativa son el empleo de tioureas *N,N'* disustituidas en separación cromatográfica y determinaciones fluorimétricas.<sup>174,175</sup>

---

<sup>159</sup> Todouloul, O.G.; Papadaki-Valiraki, A.E.; Filippatos, E.C; Ikeda, S., De Clercq, E. *Eur. J Med. Chem.* **1994**, *29*, 127-131

<sup>160</sup> Kang, I.J.; Wang, L.W.; Hsu, S.J.; Lee, C.C.; Lee, Y.C.; Wu, Y.S.; Yueh, A.; Wang, J.C.; Hsu, T.A.; Chao, Y.S.; Chern, J.H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 6063-6068.

<sup>161</sup> Galabov, A.S.; Galabov, B.S.; Neykova, N.A. *J. Med. Chem.*, **1980**, *23*, 1048-1051.

<sup>162</sup> Ullrich, A.; Schlessinger, J. *Cell.* **1990**, *61*, 203-212.

<sup>163</sup> Hubbard, S. R.; Till, J. H. *Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 373-398.

<sup>164</sup> Sun, J.; Lv, X.H.; Qiu, H.Y.; Wang, Y.T.; Du, Q.R.; Li, D.D.; Yang, Y.H.; Zhu, H.L. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 1-9.

<sup>165</sup> Martinez Gonzalez, M.C.; Goday Bujan, J.J.; Almagro, M.; Fonseca, E. *Actas Dermosifiliogr.* **2009**, *100*, 317-320.

<sup>166</sup> Doyle, A.G.; Jacobsen, E.N. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5713-5743.

<sup>167</sup> Svetlana, B.T. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 1701-1716.

<sup>168</sup> Sibi, M.P.; Itoh, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8064-8065.

<sup>169</sup> Takemoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 593-601.

<sup>170</sup> Yeboah, E. M. O.; Yeboah, S. O.; Singh, G. S. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 1725-1762.

<sup>171</sup> Yang, D.; Chen, Y.C.; Zhu, N.Y. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1577-1580.

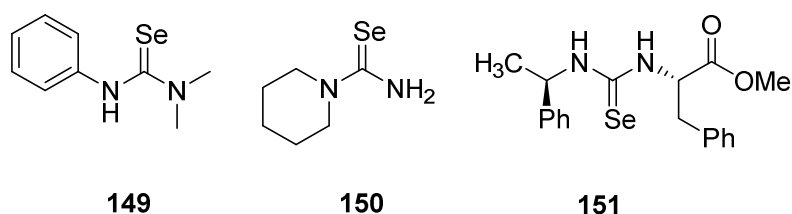
<sup>172</sup> Dai, M.; Liang, B.; Wang, C.H.; Chen, J.H.; Yang, Z. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 221-224.

<sup>173</sup> Binzet, G.; Kavak, G.; Külcü, N.; Özbey, S.; Flörke, U.; Arslan, H. *Journal of Chemistry*, **2013**, 1-9.

<sup>174</sup> Coch, R.K.; Sacht, C.; Grimmacher, T.; Bourne, S.S. *Afr. J. Chem.*, **1995**, *48*, 71-177.

<sup>175</sup> Yesilkaynak, T.; Binzet, G.; Emen, F.M.; Florke, U.; Kulcu, N.; Arslan, H. *Eur. J. Chem.* **2010**, *1*, 1-5.

Por otra parte, las interesantes propiedades de las selenoureas han despertado el interés por el desarrollo de su síntesis en los últimos años. Motivo de ello han sido las propiedades biológicas exhibidas por algunas de ellas; a modo de ejemplo, la selenourea **149** presenta actividad antifúngica frente a la *Rhizotonia solani*<sup>176</sup> mientras que la selenourea **150** muestra actividad inhibitoria frente a la tirosinasa. Como se ha expuesto anteriormente, los compuestos de selenio juegan un papel primordial en la actividad de péptidos y proteínas; en este contexto recientemente Hemantha y Sureshbabu describieron<sup>177</sup> la síntesis de selenoureido peptidomiméticos derivados de aminoácidos, como la selenourea derivada de la L-fenilalanina **151** (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Selenoureas de interés biológico

En la bibliografía se encuentran numerosas técnicas para la obtención de tio y selenoureas (Esquema 3.7). Como ejemplos de ello, en el caso de la obtención de selenoureas sea descrito la reacción entre diaminocarbenos y selenio elemental,<sup>178</sup> y el uso del agente LiAlHSeH con carbodiimidas,<sup>179</sup> con cianoamidas,<sup>180</sup> o con cloruros de selenocarbamoilo.<sup>181</sup> En cuanto a la obtención de tioureas, se ha descrito el empleo del agente LiAlHSH con cianoamidas,<sup>180</sup> y el tratamiento con H<sub>2</sub>S de carbodiimidas.<sup>182</sup> Sin embargo, el método más utilizado es el acoplamiento directo entre isotio(seleno)cianatos y aminas.<sup>183-185</sup>

<sup>176</sup> Zakrzewski, J.; Krawczyk, M. *Phosphorous Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2009**, *184*, 1880-1903.

<sup>177</sup> Hemantha, H. P.; Sureshbabu, V. V. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 644-651.

<sup>178</sup> Zhou, Y.; Denk, M. K. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1295-1299.

<sup>179</sup> Ishihara, H.; Koketsu, M.; Fukuta, Y.; Nada, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8408-8409.

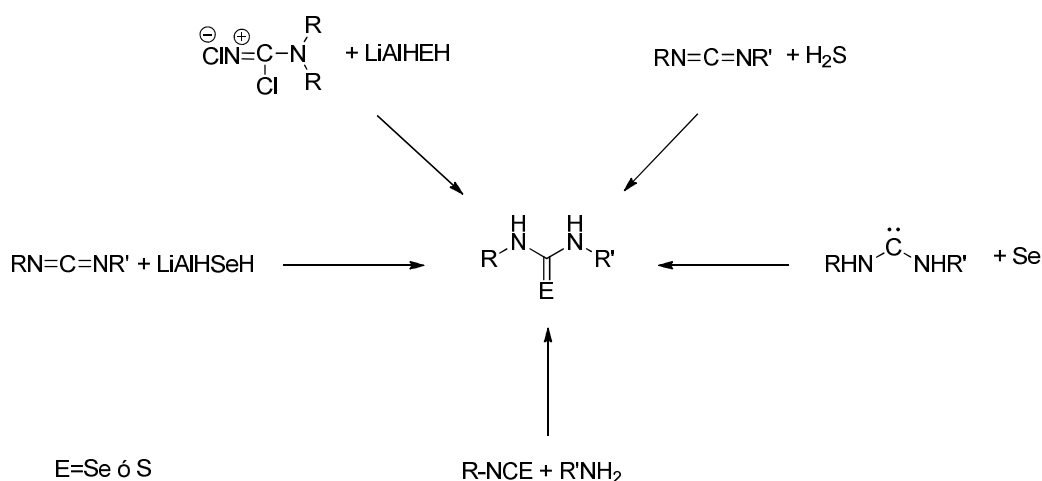
<sup>180</sup> Koketsu, M.; Fukuta, Y.; Ishihara, H. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6333-6335.

<sup>181</sup> Koketsu, M.; Fukuta, Y.; Ishihara, H. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1008-1011.

<sup>182</sup> García, J.M, Ortiz, C. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2000**, *55*, 35-135.

<sup>183</sup> Márquez, J. M.; López, O.; Maya, I.; Fuentes, J.; Fernández-Bolaños, J. G.; *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3912-3915.

<sup>184</sup> López, O.; Maya, I.; Fuentes, J.; Fernández-Bolanos, J. G. *Tetrahedron*, **2004**, 61-72.



Esquema 3.7. Obtención de tio y selenoureas.

El uso de las selenoureas como intermedios sintéticos está ampliamente descrito en la bibliografía como precursores de heterociclos conteniendo selenio;<sup>186</sup> entre ellos destacan la síntesis de selenazoles,<sup>187</sup> de selenazolidinas<sup>188</sup> o de selenohidantoínas.<sup>177</sup>

Las tioureas son también compuestos importantes en la síntesis de heterociclos, ya que pueden transformarse en tiazoles, iminotiazolinas, tiohidantoínas, triazinas, oxazolidinas y selenazoles.<sup>183,189-193</sup> Por otro parte, el grupo tioureido es una función versátil,<sup>182</sup> que puede transformarse a su vez en otros grupos funcionales tales como ureas,<sup>194,195</sup> carbodiimidas<sup>196</sup> o guanidinas.<sup>197,198</sup> Otras tioureas han sido extensamente

<sup>185</sup> López, Ó.; Maza, S.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J. G. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2556-2566.

<sup>186</sup> Ninomiya, M.; Garud, D. R.; Koketsua, M. H. *Heterocycles*, **2010**, *81*, 2027-2055.

<sup>187</sup> Maza, S.; López, Ó.; Martos, S.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J. G. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5239-5246.

<sup>188</sup> Koketsu, M.; Nada, F.; Ishihara, H. *Synthesis* **2002**, 195-198.

<sup>189</sup> Kasmi, S.; Hamelin, J.; Benhaoua, H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8093-8096.

<sup>190</sup> Kidwai, M.; Venkataramanan, R.; Dave, B. *Green Chem.* **2001**, *3*, 289-279.

<sup>191</sup> Ansu, D.; Kapil, A.; Meha, S. *Synth. Commun.* **2004**, *34*, 1141-1155.

<sup>192</sup> Hinelt, U.; Schultheis, D.; Jager, S.; Iindenmaire, M.; Pollex, A.; Beckmann, H.S. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 9883-9888.

<sup>193</sup> Bellina, F.; Cauteruccio, S.; Rossi, R.; *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 4571-4624.

<sup>194</sup> Elbert, T.; Černý, M. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1985**, *50*, 2000-2009.

<sup>195</sup> López, O.; Maza, S.; Maya, I.; Fuentes, J.; Fernández-Bolaños, J.G. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 9058-9069.

<sup>196</sup> Linkleter, B. A.; Bruice, T. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1517-1520.

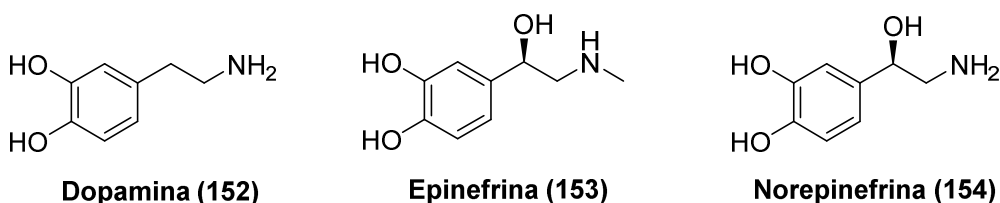
<sup>197</sup> Dempcy, R. O.; Browne, K. A.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6140-6141.

<sup>198</sup> Márquez, J. M.; López, O.; Maya, I.; Fuentes, J.; Fernández-Bolaños, J. G.; *Tetrahedron*

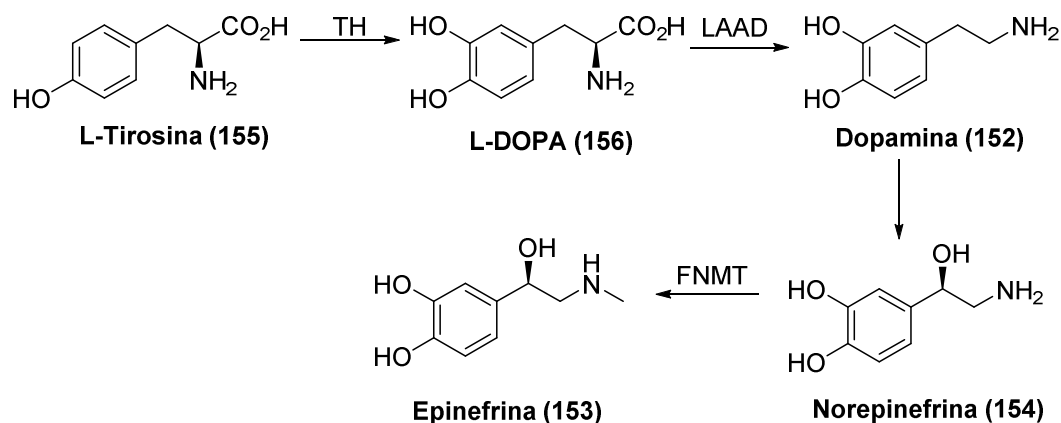
utilizadas en síntesis enantioselectiva en reacciones nitro-Mannich, aza-Henry y adiciones de Michael.<sup>199-201</sup>

### 3.1.4. Catecolaminas

El L-R-dihidroxifenil-2-aminoetanol o norepinefrina es un compuesto perteneciente a la familia de las catecolaminas, que engloba a la adrenalina, epinefrina y norepinefrina, y que estructuralmente se caracterizan por poseer un fragmento catecol y un grupo amino.



La biosíntesis de catecolaminas tiene lugar a partir de la tirosina, que puede sintetizarse en el hígado a partir de la fenilalanina, o provenir de la dieta. El proceso está catalizado por cuatro enzimas: la tirosina-hidroxilasa (TH), la L-aminoácido aromático descarboxilasa (LAAD), la dopamina β-hidroxisilasa (DBH) y la feniletanolamina-N-metiltransferasa (FNMT) (Esquema 2.8), siendo la primera etapa la que limita todo el proceso.<sup>202</sup>



Esquema 3.8

*Lett.* **2008**, *49*, 3912-3915.

<sup>199</sup> Yoon, T.P.; Jacobsen, E.N. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 466-468.

<sup>200</sup> Okino, T.; Nakamura, S.; Furukawa, T.; Takemoto, Y. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 625-629.

<sup>201</sup> Huang, H.B.; Jacobsen, E.N. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7170-7171.

<sup>202</sup> Xu, L.; Chen, X.; Sun, B.; Sterling, C.; Tank, A.W. *Brain Res.* **2007**, *1158*, 1-10.

Aunque similares en estructura, tanto la dopamina, como la epinefrina y norepinefrina desempeñan diferentes roles en el organismo, de modo que la norepinefrina se encarga de la transferencia de impulsos a las terminaciones nerviosas simpáticas, mientras que la epinefrina actúa como vasopresor y estimulador cardíaco, e interviene en el control y del volumen y presión sanguínea.<sup>203</sup> Por su parte, la dopamina actúa como neurotransmisor en los sistemas nerviosos central y periférico.<sup>204</sup>

Las catecolaminas y sus metabolitos desempeñan un papel importante en el sistema nervioso central y periférico, ya que su presencia o ausencia está relacionada con numerosas enfermedades neurológicas, psiquiátricas, endocrinas y cardiovasculares.<sup>205</sup> En 1970, Adolfsson estudió la relación de la concentración de estos compuestos con la enfermedad de Alzheimer, descubriendo que la concentración de dopamina y noradrenalina en tejido cerebral de pacientes con este diagnóstico era significativamente baja.<sup>206</sup> Desde entonces, se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la relación de la concentración en plasma y diferentes tejidos de esta familia de compuestos, estableciéndose una clara relación entre éstos y dicha enfermedad.<sup>207</sup> Esta familia de compuestos también se ha relacionado con otras afecciones como la esquizofrenia, y trastornos como la depresión.<sup>205</sup>

Las catecolaminas, debido a su elevada polaridad, no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que el cerebro y el sistema nervioso central dependen de la síntesis endógena de estos compuestos. Por este motivo, la búsqueda de nuevas estrategias para solventar esta limitación es clave para el tratamiento de muchas enfermedades. Ejemplos de estas estrategias consisten en la derivatización del grupo amino o en sustituciones en el anillo aromático. A modo de ejemplo, Goodman y colaboradores desarrollaron de este modo la familia de compuestos **157** (Figura 3.2) que demostró tener actividad  $\beta$ -adrenérgica,<sup>208</sup> mientras que Ye, por su parte, propuso la síntesis de compuestos de la familia **158** (Figura 3.2), que demostró tener propiedades en

---

<sup>203</sup> Goodman, M.; Verlander, M.S.; Jacobson, K.A.; Melmon, K.L.; Castagnoli, N. **1982** *Patt. Appl.* US337207A.

<sup>204</sup> Smidt, M. P.; Smits, S. M.; Burbach, J. P. H. *Eur. J. Pharmacol.*, **2003**, *480*, 75-88.

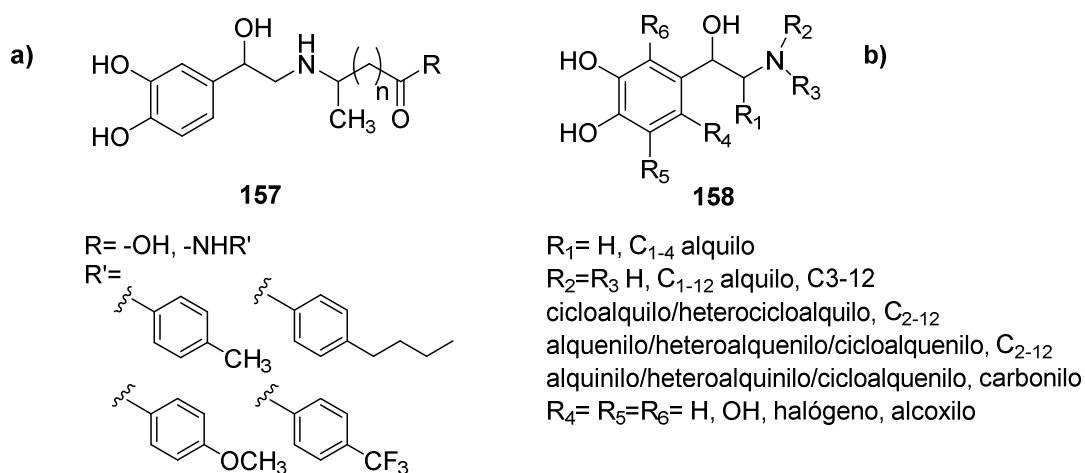
<sup>205</sup> Eisenhofer, G.; Kopin, I.J.; Goldstein, D.S. *Pharmacol. Rev.*, **2004**, *56*, 331-349.

<sup>206</sup> Adolfsson, R., Gottfries, C. G., Roos, B. E., Winblad, B. *Br. J. Psychiatry* **1979**, *135*, 216-223.

<sup>207</sup> Liu, L.; Li, Q.; Li, N.; Ling, J.; Liu, R.; Wang, Y.; Sun, L.; Chen, X.H.; Bi, K.J. *Sep. Sci.* **2011**, *34*, 1198-1204.

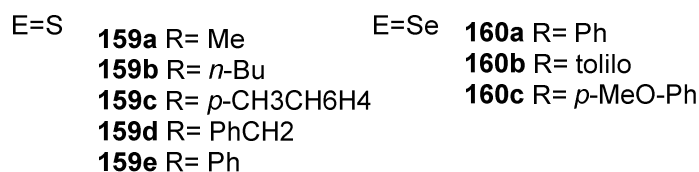
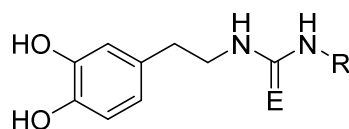
<sup>208</sup> Goodman, M.; Verlander, M.S.; Jacobson, K.A.; Melmon, K.L.; Castagnoli, N. *US Pat. Appl.* **1980**, US4337207A.

el tratamiento de desórdenes metabólicos (obesidad) y neuropsiquiátricos (depresión, ansiedad).<sup>209</sup>



**Figura 3.2**

Nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo la síntesis de las tioureas **159a-e** y de las selenoureas **160a-**, que incluyen en su estructura el fragmento de catecol, mediante reacción de iso(tio)selenocianatos aromáticos y alifáticos con hidrocloreuro de dopamina. Estos compuestos mostraron ser potentes antioxidantes, además, las selenoureas mostraron ser eficaces inductores de la apoptosis en las líneas celulares A-375 (melanoma), SF-268 (glioblastoma) y NCI-H460 (cáncer de pulmón).<sup>44</sup>



<sup>209</sup> Ye, Keqiang. Pat. Appl. **2010**, WO2010107866A2.

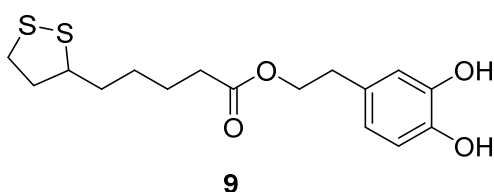


## 3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se describe la síntesis de tio y selenoderivados con fragmentos catecol con diversas funcionalidades y a través de diferentes rutas, tal y como se mostrará en los siguientes apartados.

### 3.2.1. Esterificación del hidroxitirosol con ácido lipoico

En este apartado se describe la síntesis del éster derivado del hidroxitirosol con el ácido  $\alpha$ -lipoico **9**, hemos desarrollado un procedimiento alternativo a los empleados por Bernini y colaboradores en la síntesis de este compuesto.<sup>140</sup> Así pues, mostraremos una ruta sintética más corta, selectiva y que prescinde de la protección previa de los grupos hidroxilo fenólicos.



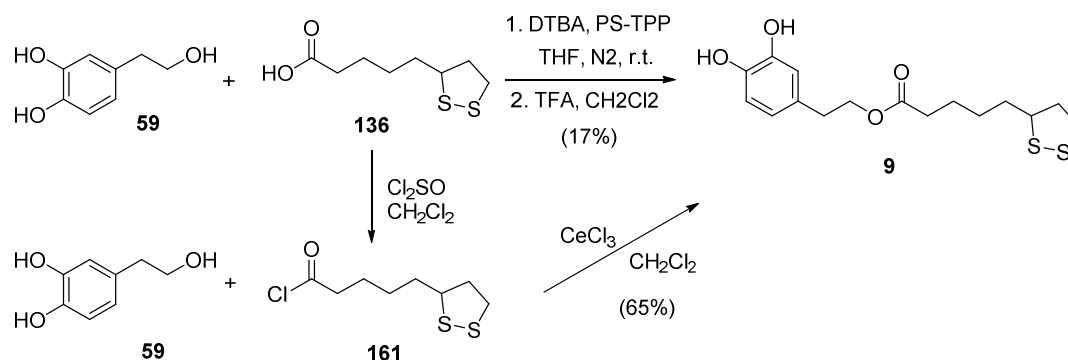
En primer lugar, se ensayó la síntesis del éster derivado del ácido lipoico y el hidroxitirosol mediante la reacción de Mitsunobu. Con esta reacción puede esterificarse de forma selectiva el grupo hidroxilo alifático, sin que sea necesaria la protección de los hidroxilos aromáticos. Esta reacción se llevó a cabo, en primer lugar, utilizando trifenilfosfano (TPP), diisopropilazodicarboxilato (DIAD) en tetrahidrofurano (THF) bajo atmósfera inerte y a temperatura ambiente, que son las condiciones clásicas de esta reacción.<sup>210</sup> No obstante, fue imposible aislar el producto puro; en la bibliografía está ampliamente descrita la frecuente dificultad en la eliminación de los subproductos de la reacción (óxido de trifenilfosfina e hidrazina del DIAD).<sup>211</sup> Por este motivo, se han

<sup>210</sup> Kumara Swamy, K. C.; Bhuvan Kumar, N. N.; Balaraman, E.; Pavan Kumar, K. V. P. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551–2651.

<sup>211</sup> Appendino, G.; Minassi, A.; Daddario, N.; Bianchi, F.; Tron, G. C. *Organic Lett.* **2002**, *4*, 3839–3841.

descrito numerosas modificaciones de la reacción de Mitsunobu, como por ejemplo el empleo de trifenilfosfina soportada sobre una resina polimérica de poliestireno y la sustitución de DIAD por di-*t*-butilazodicarboxilato (DTBA), con objeto de mejorar la separación del éster de los subproductos de la reacción.<sup>212</sup> Bajo estas condiciones, a pesar de llegarse al producto final en un solo paso, no logró superarse un rendimiento del 17% (Esquema 3.9).

Se planteó una ruta alternativa que implica la conversión previa del ácido lipoico en cloruro de lipoilo y posterior reacción del mismo con hidroxitirosol, empleando como catalizador  $\text{CeCl}_3$ . El rendimiento obtenido a partir de esta ruta fue del 65%, constituyendo, por tanto, una aproximación competitiva y eficaz en la obtención del éster **9**.



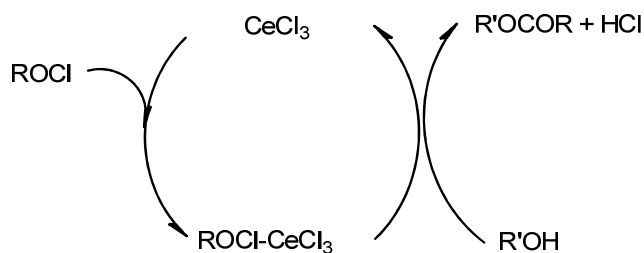
Esquema 3.9

El mecanismo de esta reacción implica la formación de un aducto electrófilo entre el cloruro de acilo y el cloruro de cerio(III).<sup>213,214</sup> Este aducto es captado por el grupo hidroxilo alifático del HT, de carácter nucleófilo, con la consecuente formación del éster deseado y cloruro de hidrógeno, y la regeneración del cloruro de cerio (Esquema 3.10).

<sup>212</sup> Pelletier, J. C.; Kincaid, S.; *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 797-800.

<sup>213</sup> Torregiani, E.; Seu, G.; Minassi, A.; Appendino, G. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2193-2196.

<sup>214</sup> Ishihara, K.; Kubota, M.; Kurihara, H.; Yamamoto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4413-4414.

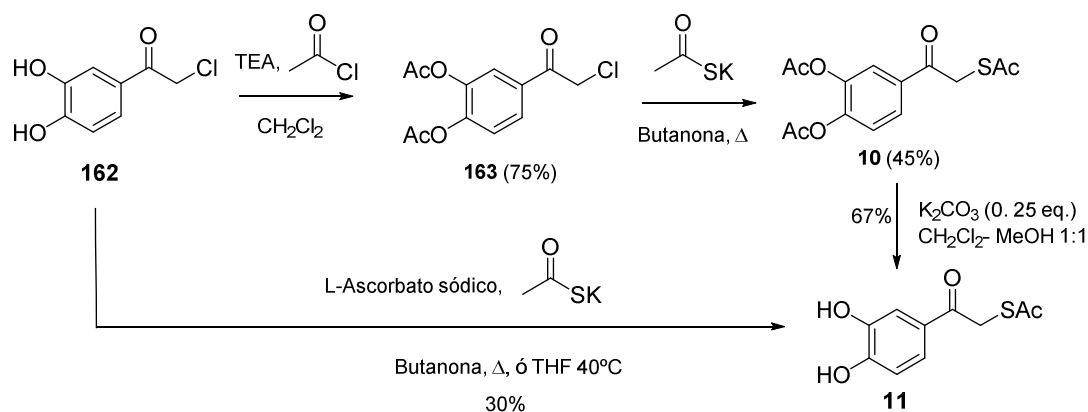


Esquema 3.10

### 3.2.2. Síntesis de tioderivados del cloruro de 3,4-dihidroxiacetofenona

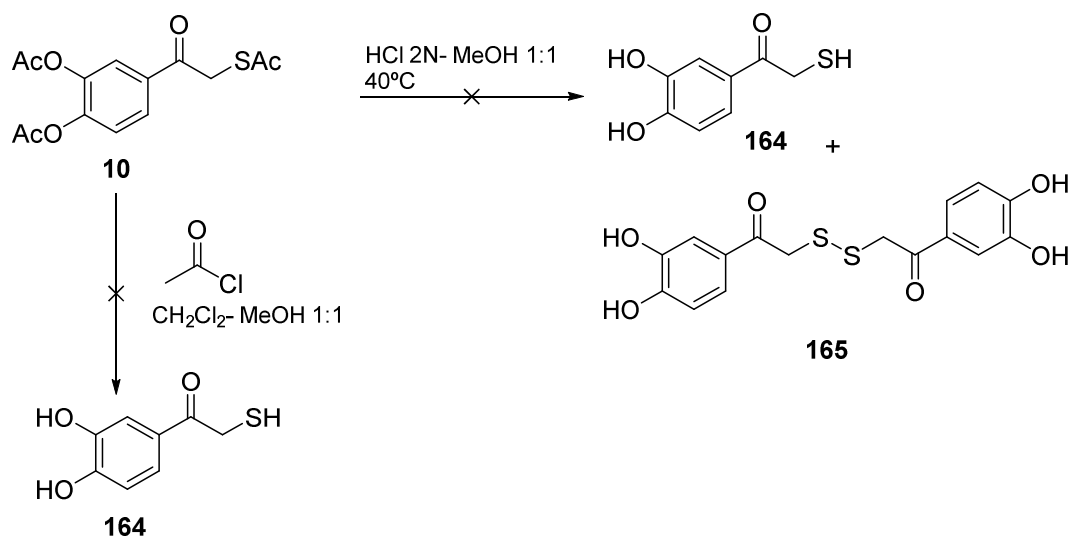
En este apartado proponemos la síntesis de diversos tioderivados partiendo de 2-cloro-3',4'-dihidroxiacetofenona. La importancia de las propiedades biológicas de los compuestos organosulfurados y los polifenoles, descrita en la Introducción General de esta Tesis Doctoral, justifica la búsqueda de nuevas rutas y estructuras que contengan este elemento.

Concretamente, hemos llevado a cabo la preparación del tioacetato de 2-tioacetato-3',4'-dihidroxibenzofenona **11** empleando dos metodologías sintéticas: por un lado, acetilación de los hidroxilos fenólicos de **162** con cloruro de acetilo en medio básico, seguido de desplazamiento nucleofílico del átomo de cloro por tioacetato potásico y desprotección de los hidroxilos aromáticos empleando  $K_2CO_3$  (23% de rendimiento global para las tres etapas). Alternativamente, se ensayó la obtención del mismo compuesto en una sola etapa por desplazamiento directo del átomo de cloro de **163** por tioacetato potásico en el derivado desprotegido; en este caso, el rendimiento fue del 30% para una sola etapa sintética (Esquema 3.11).



Esquema 3.11

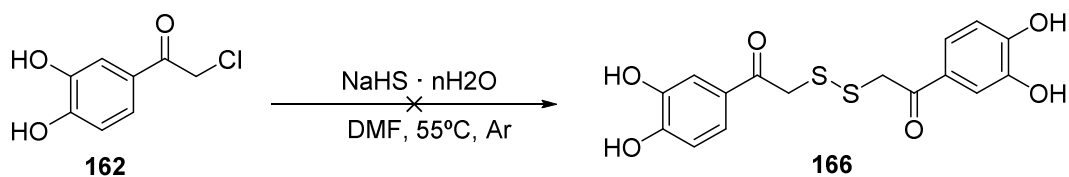
Se intentó aislar el tiol derivado de **11** a partir de dos rutas, la primera de ellas mediante desacetilación promovida por cloruro de acetilo, sin que se logaran los resultados esperados, y mediante hidrólisis ácida con HCl 2N, proceso que tampoco funcionó. Habría sido esperable la formación, tanto del tiol **163**, como del disulfuro **164**, obtenido por oxidación espontánea de aquel (Esquema 3.12).



Esquema 3.12

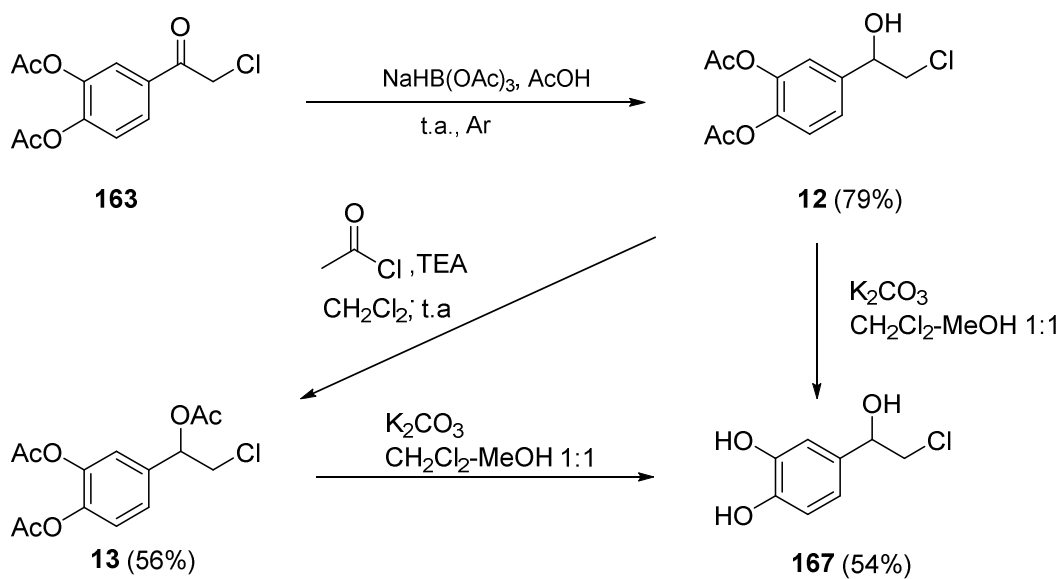
Dado el potencial interés del compuesto con un doble fragmento catecol y puente disulfuro, se intentó una ruta alternativa para su obtención mediante el empleo de NaHS en tanto en butanona como en DMF, tanto a t.a. como aplicando un calentamiento suave

hasta 55 °C. Sin embargo, este procedimiento resultó igualmente infructuoso (Esquema 3.13).



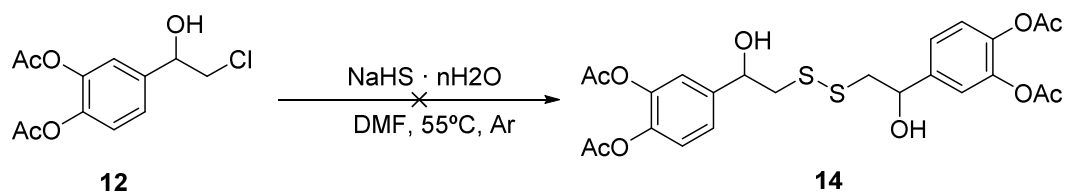
Esquema 3.13

Se planteó una ruta para obtener del disulfuro **14** a partir de **163**, llevándose a cabo la reducción del mismo con NaHB(OAc)<sub>3</sub> en medio ácido, obteniéndose el compuesto **12** con un rendimiento del 79% (Esquema 3.14). La posterior desprotección de los hidroxilos fenólicos en medio básico (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) condujo al cloroderivado con todos sus grupos hidroxilos desprotegidos; algo que también se consiguió mediante un procedimiento de protección-desprotección. (Esquema 3.14)



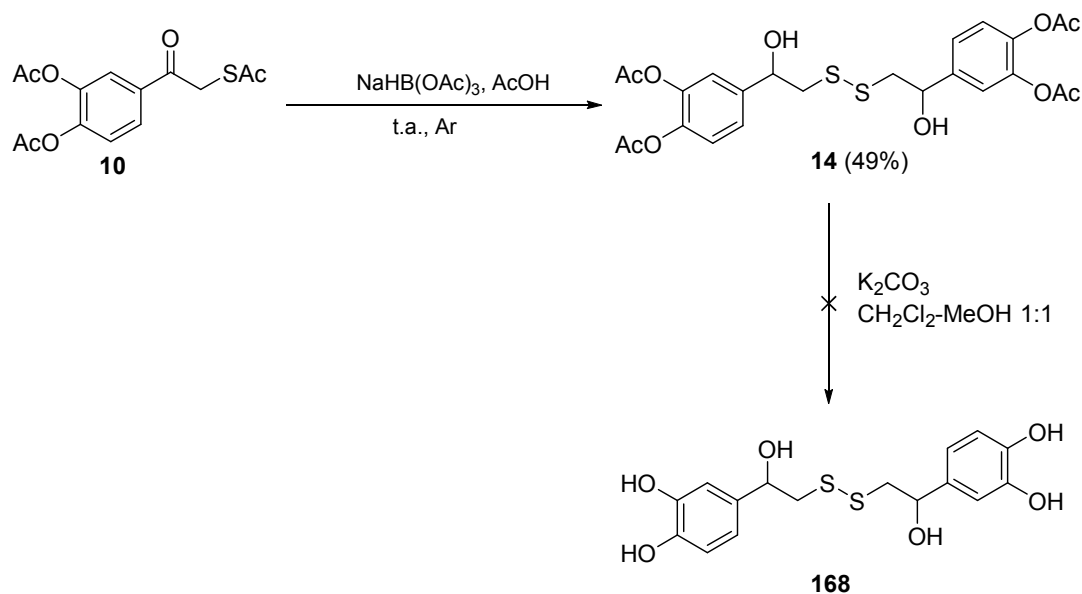
Esquema 3.14

De nuevo, al igual que ocurrió para su análogo **162** con los grupos hidroxilo aromáticos desprotegidos, el tratamiento de **12** con NaHS para la obtención de **14** no consiguió los resultados esperados (Esquema 3.15).



Esquema 3.15

Al trasladar la metodología anteriormente ensayada sobre el cloroderivado **163** sobre el compuesto **10**, la reducción con  $\text{NaHB}(\text{OAc})_3$  en medio ácido condujo a la formación del disulfuro **14** con los hidroxilos en posición benélica reducidos. La posterior desprotección de los hidroxilos fenólicos en condiciones básicas, que resultó eficaz para el caso del cloroderivado **12**, no logró la desprotección en el caso del disulfuro **14** (Esquema 3.16), sino que supuso su descomposición.



Esquema 3.16

La formación del compuesto **14** se corroboró mediante RMN, ya que, por una parte, se observó la pérdida de uno de los acetilos observándose tan sólo una señal a 2.30 ppm correspondiente a los cuatro acetilos aromáticos, mientras que no se observó la aparición del triplete característico del grupo SH en torno a 1.6 ppm. Desafortunadamente, ninguno de los experimentos de espectrometría de

masas llevados a cabo (CI, LSIMS, EI, *electrospray*) dio información concluyente sobre el pico molecular o pseudomolecular.

### 3.2.3. Síntesis del oxirano derivado del vinilcatecol di-*O*-protegido del hidroxitirosol y apertura regioselectiva con selenoderivados

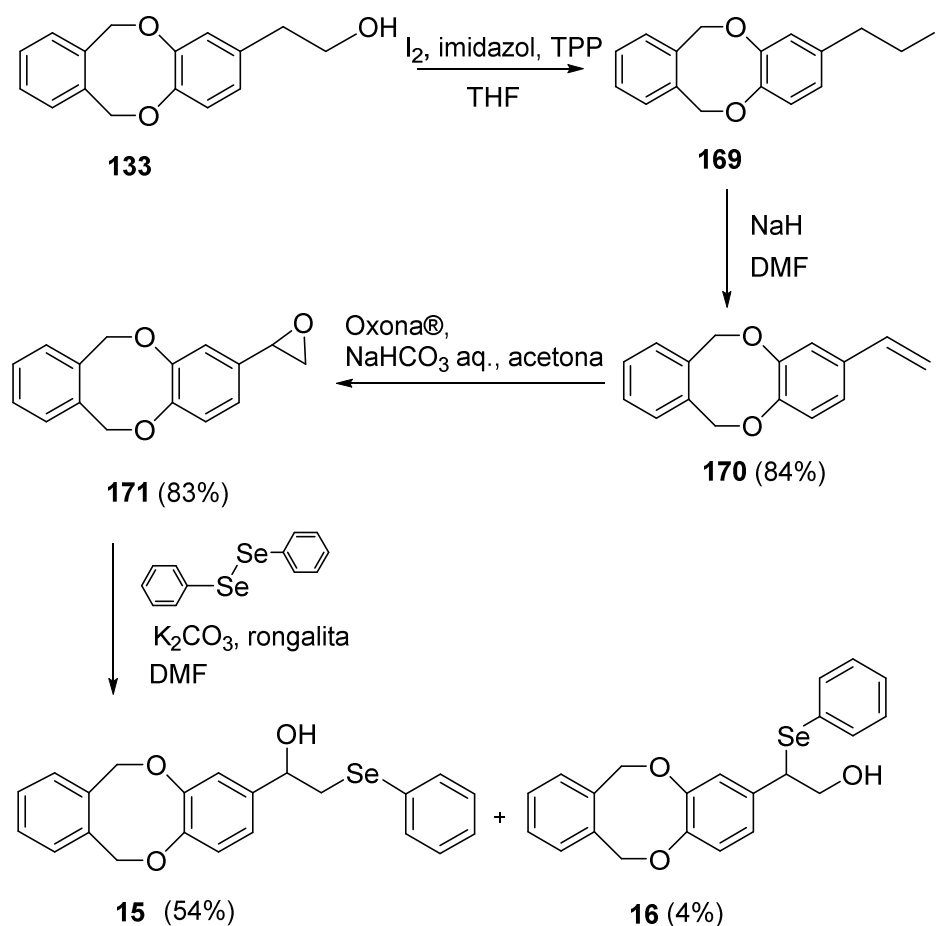
Siguiendo la ruta sintética previamente optimizada en nuestro grupo para tioderivados del hidroxitirosol,<sup>215</sup> se plantea la síntesis de selenoderivados que contengan además un fragmento de tipo catecol, con el fin de probar la posible sinergia en cuanto a actividad antioxidante proporcionada tanto por el catecol como por el átomo de selenio.

Para ello, se lleva a cabo la síntesis del oxirano **171** mediante una modificación del procedimiento descrito por Dondoni y colaboradores;<sup>216</sup> en dicho procedimiento, el hidroxitirosol parcialmente protegido **133** se transformó en el yododerivado **169** mediante tratamiento con I<sub>2</sub>, trifenilfosfano e imidazol. El tratamiento en medio básico (NaH) de este condujo al vinilcatecol protegido **170** que fue epoxidado mediante tratamiento con Oxona®, para dar lugar a **171** con un 42% de rendimiento global para las tres etapas (Esquema 3.17).

---

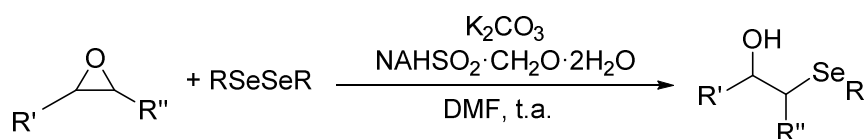
<sup>215</sup>María de los Ángeles López García, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, **2011**.

<sup>216</sup>Cheshev, P.; Marra, A.; Dondoni, A. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 2714-2716.



Esquema 3.17

La apertura regioselectiva del epóxido con diselenuro de difenilo se consiguió mediante el uso de Rongalita®<sup>217</sup> y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en DMF a temperatura ambiente. La Rongalita es un agente que promueve la rotura de enlaces disulfuro y diseleniuro,<sup>218</sup> como se muestra en el esquema 3.18.



Esquema 3.18

Esta reacción condujo a la mezcla de los dos regioisómeros **15** (procedente del ataque del selenonucleófilo en la posición menos sustituida del epóxido) y **16**, que fueron

<sup>217</sup> Guo, W.; Chen, J.; Wu, D.; Ding, J.; Chen, F.; Wu, H. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5240-5243.

<sup>218</sup> Ganesh, V.; Chandrasekaran, S. *Synthesis* **2009**, 267-3278.



purificados mediante cromatografía en columna obteniéndose unos rendimientos del 54 y 4% respectivamente.

Los dos regioisómeros obtenidos se pudieron identificar mediante sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN. En el caso del regioisómero mayoritario, se distingue un doblete que integra para un protón (4.61 ppm) y que corresponde al protón del carbono en posición bencílica. Los protones del metileno aparecen como dos dobles dobletes (3.23 y 3.06 ppm) debido a que el centro estereogénico en la posición bencílica los convierte en diastereotópicos. Por su parte, para el regioisómero minoritario resultante del ataque del selenonucleófilo en la posición más sustituida, el protón del carbono en posición bencílica aparece como un triplete (4.29 ppm) presenta una multiplicidad de triplete, mientras que los protones de metileno aparecen como un multiplete. En este caso, se distingue la señal correspondiente al protón del hidroxilo como un triplete ancho (Figura 3.3).

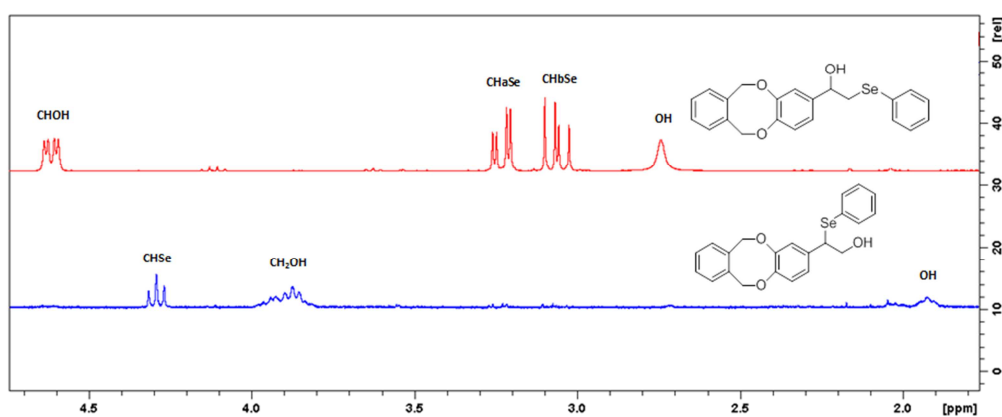
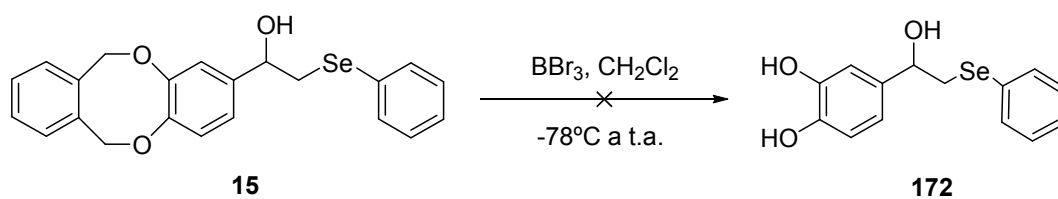


Figura 3.3

Finalmente, se intentó la desprotección de los hidroxilos aromáticos del compuesto **15** empleando  $\text{BBr}_3$ <sup>219</sup> como alternativa a la hidrogenación catalítica, que no es viable para compuestos organoselénicos al envenenarse el catalizador por el selenio. Sin embargo, y contrariamente a lo ocurrido a los análogos de azufre, esta desprotección no fue satisfactoria, produciéndose la descomposición del compuesto (Esquema 3.19).

<sup>219</sup> Barluenga, J.; Aznar, F.; Palomero, M.A. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 537-544.



Esquema 3.19

### 3.2.4. Síntesis de tio y selenoureas derivadas de la norepinefrina

En este apartado se describe la síntesis de nuevas selenoureas derivadas de la norepinefrina que incluyen en su estructura el fragmento catecol, mediante reacción de isoselenocianatos aromáticos y alifáticos. El objetivo es combinar en la misma molécula un fragmento de catecol, y una unidad de tipo tiona o selona, que puede conferir interesantes propiedades biológicas a los compuestos preparados. Se llevará a cabo un estudio sencillo de estructura-actividad para discernir la influencia del átomo de azufre o selenio, así como la naturaleza de los grupos alquilo y arilo en las propiedades antioxidantes y antiproliferativas de los productos finales.

Para proceder a la preparación de los isoselenocianatos se ha llevado a cabo una modificación de la metodología descrita por Barton y colaboradores<sup>220</sup> desarrollada en nuestro grupo de investigación,<sup>221,222</sup> De esta manera, en primer lugar se lleva a cabo la transformación de las alquil/aryl aminas en las correspondientes formamidas mediante tratamiento con formiato de etilo, en presencia de AcOH como catalizador ácido.

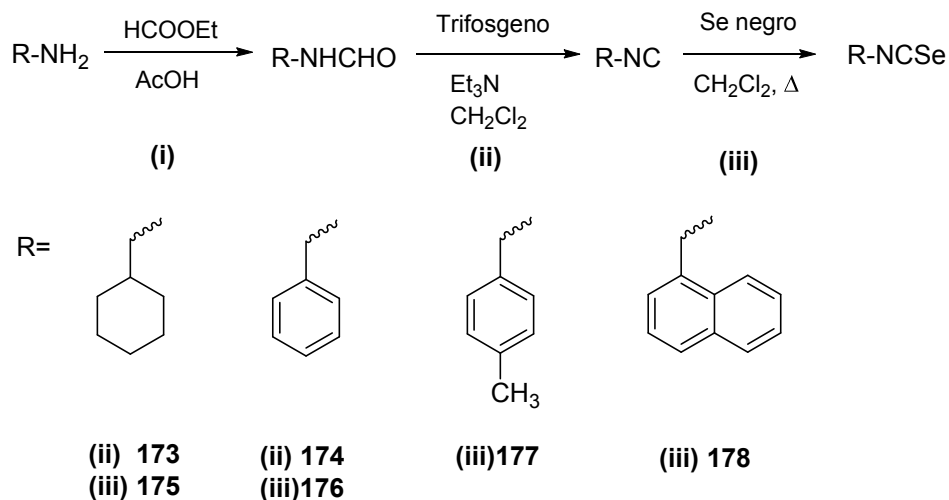
A continuación, las formamidas son transformadas en isoselenocianatos mediante un procedimiento *in situ* en dos etapas; en primer lugar se genera un isonitrilo intermedio por deshidratación de las formamidas promovida por trifosgeno, y dicho isonitrilo se transforma en isoselenocianato mediante reacción con selenio negro elemental (Esquema 3.20), cabe destacar que el trifosgeno es un sustituto eficaz del fosgeno, sin la toxicidad y

<sup>220</sup> Barton, D.H.R.; Parekh, S.I.; Tajbakhsh, M.; Theodorakis, E. A.; Tse, C. L. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 639-654.

<sup>221</sup> Fernández-Bolaños, J. G.; López, O.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fuentes, J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4081-4084.

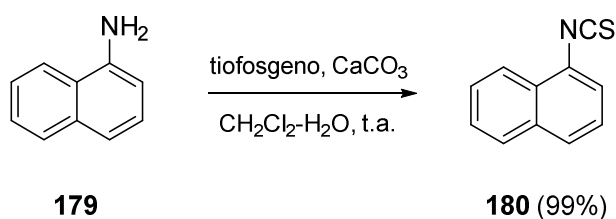
<sup>222</sup> López, O.; Maza, S.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2556-2566.

riesgo inherentes a este. De este modo se sintetizaron las formamidas **173** y **174** y las isoselenoureas **176-178**.



Esquema 3.20

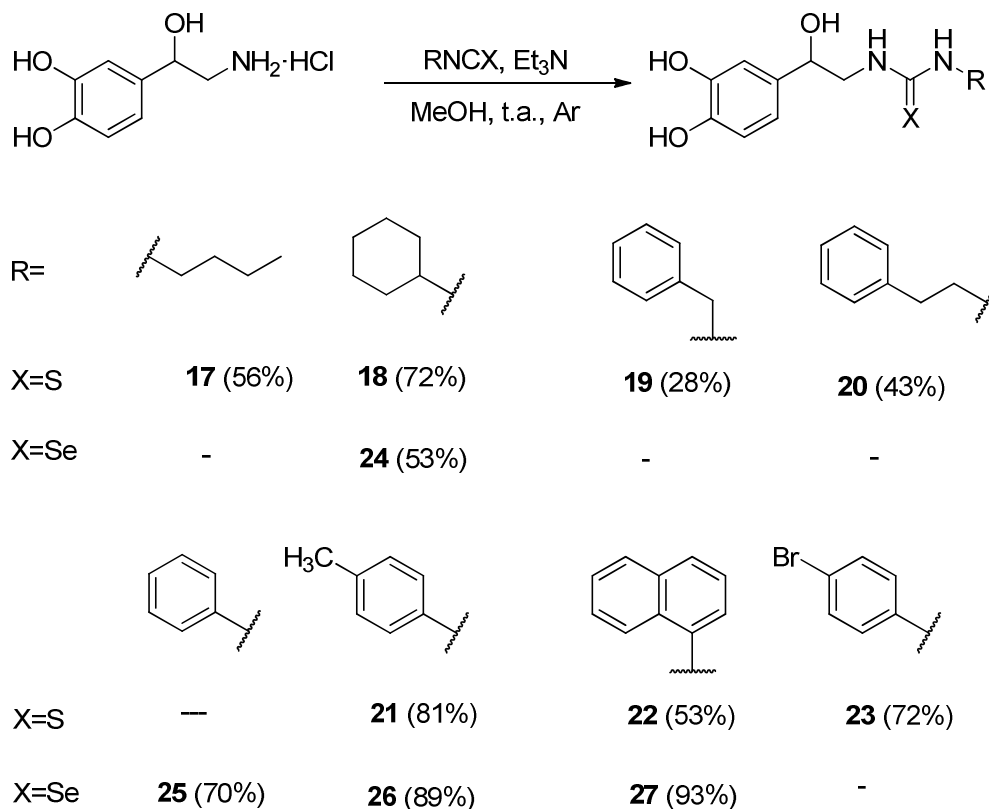
Los isotiocyanatos empleados han sido comerciales, salvo el isotiocianato de  $\alpha$ -naftilo, el cual se ha preparado a través de una modificación del procedimiento descrito por Ávalos González y col. para la preparación de isotiocyanatos derivados de carbohidratos,<sup>223</sup> consistente en el tratamiento de  $\alpha$ -naftilamina con tiofosgeno en un sistema trifásico de  $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{Cl}_2-\text{CaCO}_3$  (Esquema 3.21). El isotiocianato **180** fue obtenido con un 98% de rendimiento.



Esquema 3.21

<sup>223</sup> Avalos González, M.; Fuentes Mota, J.; Gómez Monterrey, I.; Jiménez Requejo, J.L.; Palacios Albarrán, J.C. *Carbohydr. Res.* **1986**, *154*, 49-62.

Finalmente, el acoplamiento de la norepinefrina con los isotio(seleno)cianatos en metanol condujo a las correspondientes tio(selenoureas) con rendimientos de moderados a excelentes (28-93%) (Esquema 3.22) en un procedimiento experimentalmente eficaz y sencillo.



Esquema 3.22

Los datos espectroscópicos confirman las estructuras propuestas. En los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN se puede distinguir en todos los casos un doble doblete a 4.71-4.85 ppm correspondiente al protón del carbono en posición bencílica, que porta el grupo hidroxilo, y por tanto más desapantallado. Además, se puede observar que los protones del metileno unido a nitrógeno aparecen como dos señales diferenciadas debido a que el centro estereogénico en la posición bencílica los convierte en diastereotópicos. Aunque la multiplicidad no puede apreciarse para todos los casos, en la mayor parte puede distinguirse al menos para uno de ellos una señal de doble doblete. En los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN se observa la aparición en todos los casos de señales entre 189.9 y 179.1 ppm

que confirman la presencia de los fragmentos tio y selenoureido en las estructuras propuestas (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Desplazamientos químicos seleccionados para los compuestos (17-27).<sup>a</sup> En CD<sub>3</sub>OD.  
<sup>b</sup>En (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO

Comp.	17 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>	22 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>	24 <sup>b</sup>	25 <sup>a</sup>	26 <sup>a</sup>	27 <sup>a</sup>
<b>C=S</b>	183.	182.5	184.5	183.8	182.0	183.5	182.4				
	5										
<b>C=Se</b>	-	-	-	-	-	-		179.9	179.3	179.1	180.1
<b>CHO</b>	4.72	4.79	4.72	4.71	4.78	4.74	182.4	4.79	4.85	4.85-	4.76
<b>H</b>										4.80	

**4. SÍNTESIS DE DERIVADOS PEPTÍDICOS POLIFENÓLICOS DERIVADOS  
DE L-AMINOÁCIDOS.**

## 4. SÍNTESIS DE DERIVADOS PEPTÍDICOS POLIFENÓLICOS DERIVADOS DE L-AMINOÁCIDOS.

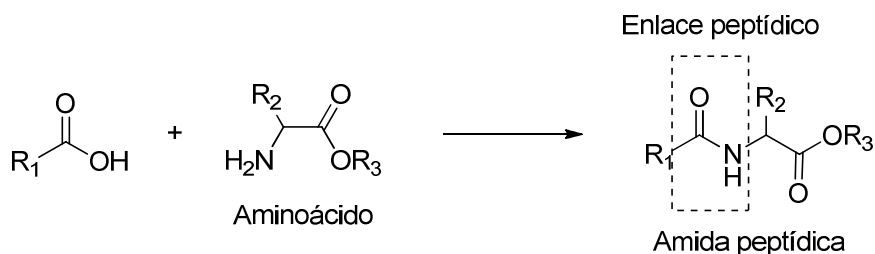
### 4.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

#### 4.1.1. Acoplamiento peptídico

La formación de enlaces peptídicos es una operación de gran importancia en la síntesis de numerosos productos bioactivos. No en vano, la FDA (*Food and Drug Administration*) ha aprobado numerosos fármacos que contienen péptidos en su composición; en la actualidad existen en el mercado más de 60 fármacos de naturaleza peptídica y más de 500 se encuentran en distintas fases previas a su aprobación.<sup>224</sup> Las aplicaciones en el ámbito médico y farmacéutico abarcan el tratamiento del cáncer y desórdenes metabólicos como la diabetes, obesidad y osteoporosis, y otras afecciones como alergias, desórdenes inmunológicos y enfermedades cardiovasculares.<sup>225</sup>

No obstante, el acoplamiento peptídico no es una operación trivial, ya que requiere de procesos de protección-desprotección, así como del uso de activadores para potenciar la reactividad del grupo carboxilo.

En el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra el esquema general de la reacción de un ácido carboxílico con un aminoácido cualquiera, para dar lugar a la amida a través de la consecuente formación del enlace peptídico.



Esquema 4.1

#### 4.1.2. Grupos protectores en la síntesis peptídica.

La síntesis selectiva de derivados peptídicos exige la protección previa de los grupos amino o carboxilo que no estén implicados en la reacción, con objeto de eliminar subproductos que impliquen la participación de dichos grupos en la reacción. Con esta protección se

<sup>224</sup> Mullard, A. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2013**, *12*, 87-90.

<sup>225</sup> Ayoub, M.; Scheidegger, D. *Chim. Oggi.* **2006**, *24*, 26-48.

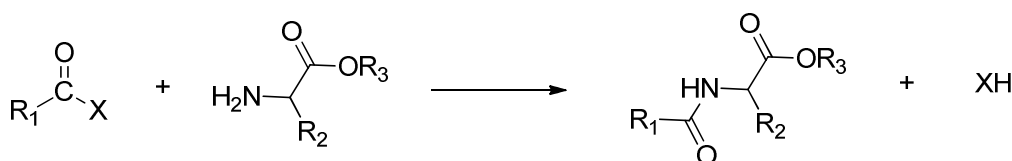
incrementa además la solubilidad de los reactivos en disolventes orgánicos.<sup>226</sup> El carboxilo del aminoácido normalmente se protege mediante esterificación. Una opción muy popular son los ésteres de bencilo, ya que se pueden eliminar fácilmente por hidrogenación. Otros grupos protectores usados han sido los ésteres de fenilo, o los ésteres alquílicos, como los metil ésteres.

#### 4.1.3. Métodos de acoplamiento peptídico.

La gran mayoría de los métodos de acoplamiento pueden aplicarse tanto en disolución como en fase sólida; ésta última aproximación fue desarrollada por Merrifield en los años 60, y resulta especialmente útil en la obtención de oligopéptidos.<sup>227</sup> El acoplamiento peptídico en fase sólida implica el uso de una resina polimérica (resina de Merrifield, Wang, etc.) donde se produce el anclaje del primer aminoácido, lo cual ha permitido su automatización.<sup>228</sup>

Los métodos de acoplamiento peptídico pueden dividirse en dos grandes grupos: los basados en la utilización de reactivos que activan *in situ* al ácido carboxílico y aquellos otros que se basan en la utilización de especies activadas del propio ácido carboxílico que han sido previamente preparadas, aisladas y purificadas.<sup>229</sup>

La simple mezcla de un ácido carboxílico y un aminoéster sólo proporcionaría la correspondiente sal de amonio, por lo que para llevar a cabo la formación del enlace peptídico de forma adecuada es necesario que el grupo carbonilo del ácido sea activado. Básicamente, la activación consiste en el reemplazo del grupo hidroxilo del ácido carboxílico por un grupo que actúe como buen grupo saliente, de modo que pueda ser atacado por el grupo amino del aminoéster.<sup>229</sup> El mecanismo de actuación del ácido activado se muestra en el esquema 4.2, donde X representa cualquier grupo activante del mismo.



Esquema 4.2

#### Acoplamiento peptídico a partir de haluros de acilo

La síntesis peptídica basada en el empleo de cloruros de acilo fue descrita por primera vez por Emil Fischer en 1903. Consiste en la conversión del carboxilo en el cloruro de acilo

<sup>226</sup> Stock, R.P. *Síntesis de péptidos*, 2007, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología.

<sup>227</sup> Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.

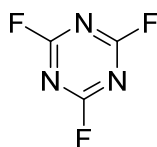
<sup>228</sup> Amblard, M.; Fehrentz, J.A.; Martinez, J.; Subra, G. *Mol Biotechnol.* **2006**, 33, 239-254.

<sup>229</sup> Joullié, M.M.; Lassen, K.M. *Arkivoc* **2010**, 189-250.



correspondiente usando cloruros de fósforo, cloruro de tionilo, o cloruro de oxalilo; seguido de tratamiento con una amina. Este método activa tanto al carboxilo que limita su uso al producir reacciones secundarias, como la ciclación de los cloruros de acilaminoácidos para generar oxazolonas y de péptidos.<sup>229</sup>

Tanto en la síntesis en disolución como en fase sólida se han conseguido fluoruros de acilo de aminoácidos para obtener el enlace peptídico por tratamiento con fluoruro cianúrico.<sup>230</sup>



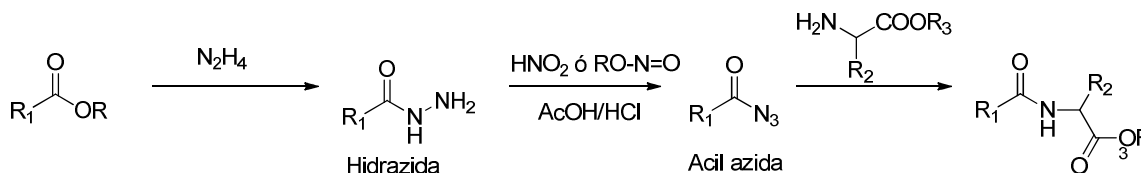
**Fluoruro cianúrico (181)**

Este método es muy indicado para la incorporación de aminoácidos con doble sustitución alquímica en el carbono  $\alpha$ .<sup>231</sup>

#### Acoplamiento peptídico a partir de acil azidas

La principal ventaja en el uso de estos compuestos es la disminución del riesgo de epimerización al ser esta especie bastante menos reactiva que los derivados anteriores.<sup>232</sup> No obstante, esta baja reactividad es también su mayor inconveniente, puesto que normalmente no se observa una conversión total. Además, es sabido que las acil azidas pueden experimentar una transposición de Curtius.

Para llevar a cabo la reacción, primero se prepara la hidrazida tratando el éster carboxílico con hidracina en exceso (Esquema 4.3).<sup>229</sup> La hidrazida se convierte en azida empleando bien ácido nítrico o un nitrito alquílico, y finalmente ésta se hace reaccionar con el aminoéster dando lugar a la formación del enlace peptídico. El acoplamiento final se efectúa a bajas temperaturas, debido a la inestabilidad intrínseca de la acil azida a temperatura ambiente.<sup>229</sup>



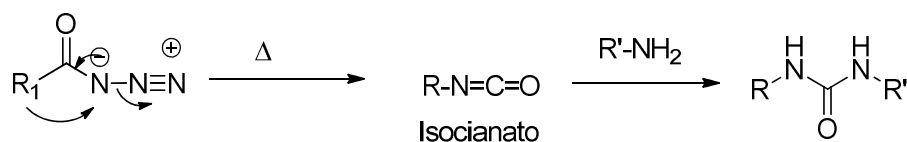
**Esquema 4.3.** Síntesis de péptidos mediante acil azidas.

<sup>230</sup> Bertho, J.N.; Loffet, A.; Pinel, C.; Reuther, F.; Sennyey, G *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1303-1306.

<sup>231</sup> Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Haber, H.; Seydel, J.K.; Krause, E.; Bienert, M.; Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Albericio, F. *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 405-410.

<sup>232</sup> Benoiton, N.L.; Kuroda, D.; Chen, F.M.. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, 20, 81-86.

Una de las reacciones laterales más comunes en este procedimiento es la posibilidad de producirse una trasposición de Curtius de la acil azida, que se transforma en el correspondiente isocianato, que al reaccionar con una amina generaría una urea en lugar del péptido deseado (Esquema 4.4).<sup>233</sup>



Esquema 4.4. Trasposición de Curtius

### Acoplamiento peptídico a partir de anhídridos

Para evitar reacciones secundarias al aplicar este método de activación, generalmente se usan únicamente anhídridos simétricos y *N*-carboxianhídridos.<sup>229</sup>



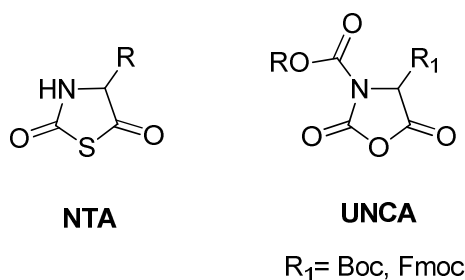
Los anhídridos mixtos carboxílicos, o menos comúnmente carbónicos, pueden conducir a dos productos diferentes en función de cual sea el grupo carbonilo que sufra el ataque nucleofílico.<sup>234</sup> Para disminuir el ataque sobre el grupo carbonilo no deseado se utilizan derivados carboxílicos (o carbónicos) o que posean grupos con gran impedimento estérico, por ejemplo los derivados del ácido piválico o del hidrogenocarbonato de isobutilo.<sup>229</sup>

Los *N*-carboxianhídridos (NCA), o *anhídridos de Leuchs*, se obtienen por reacción del carboxilo a activar con fosgeno. Su mayor ventaja es que el único producto secundario es CO<sub>2</sub>, y su principal inconveniente es su sensibilidad a la humedad y su facilidad para polimerizar. Los tíoanálogos de los NCA (NTA) se emplean preferiblemente para glicina e histidina, pero son propensos a la racemización.<sup>229</sup> Los NCA protegidos con uretanos, como por ejemplo, con grupos Boc o Fmoc (UNCA) restringen aún más el ataque hacia el carbonilo deseado y evitan totalmente las reacciones de polimerización.<sup>235</sup>

<sup>233</sup> Meienhofer, J. *The Peptides, Vol. 1. The Azide Method in Peptide Synthesis*, 1979. Eds. Gross, E.; Meienhofer, J. Academic Press, 197-239.

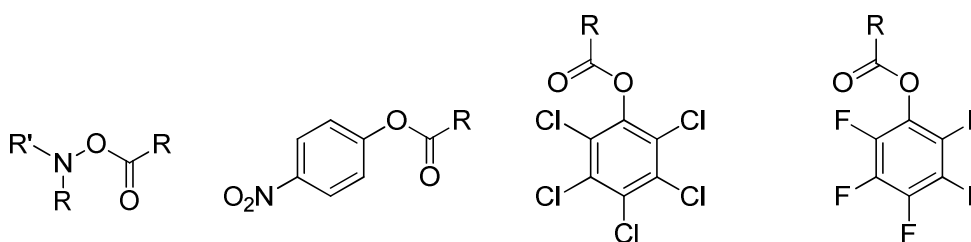
<sup>234</sup> Meienhofer, J. *The Peptides Vol. 1. The Mixed Carbonic Anhydride Method of Peptide Synthesis*, 1979. Eds. Gross, E.; Meienhofer, J. Academic Press, 263-314.

<sup>235</sup> Fuller, W.D.; Cohen, M.P.; Shabankareh, M.; Blair, R.K.; Goodman, M.; Naider, F.R. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 7414-7416.



### Acoplamiento peptídico a partir de ésteres activados

Existen dos grandes grupos de ésteres activos, los derivados de *N*-hidroxilaminas, y aquellos que son derivados del fenol con sustituyentes atractores de electrones, como los *p*-nitro, pentaclorofenil y pentafluorofenil ésteres. (Figura 4.1).<sup>229</sup>



**Figura 4.1.** Ésteres activados

Pueden destacarse los siguientes aspectos en el uso de ésteres activados para obtener enlaces peptídicos:<sup>229,237</sup>

- Proporcionan una sola vía de aminólisis, a diferencia del método de anhídridos, que presentan dos posibilidades.
- El éster activado se puede almacenar.
- El éster activado se puede acoplar a un grupo amino con el grupo carboxilo libre, lo cual reduce el número de etapas sintéticas de protección-desprotección.

Los ésteres alquílicos sencillos, como los ésteres metílicos y etílicos, sufren aminólisis a unas velocidades muy lentas, lo que los hace muy poco prácticos para su utilización en síntesis de péptidos. Sin embargo, los ésteres que incorporan un buen grupo saliente, como es el caso de los ésteres fenólicos sustituidos, reaccionan mucho más rápidamente y son utilizados para la obtención de péptidos, principalmente en síntesis en disolución.<sup>229</sup>

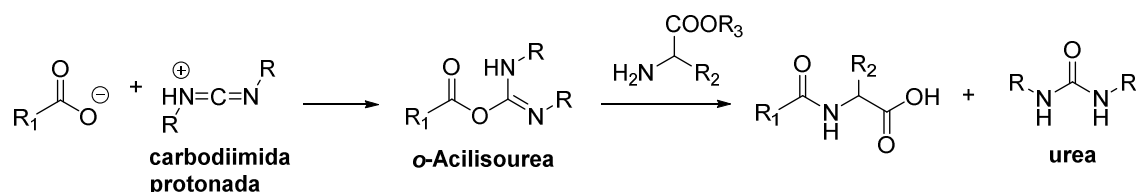
### Activación *in situ* del carboxilo. Uso de agentes de acoplamiento en la síntesis peptídica

Otra aproximación para obtener derivados peptídicos es generar la especie activada del carboxilo *in situ*, sin necesidad de ser aislada. En este contexto, los agentes acoplantes más utilizados son las carbodiimidas, así como sales de amonio, de aminio, de fosfonio y de uronio.

Las **carbodiimidas** son los reactivos de acoplamiento más clásicos tanto en fase sólida

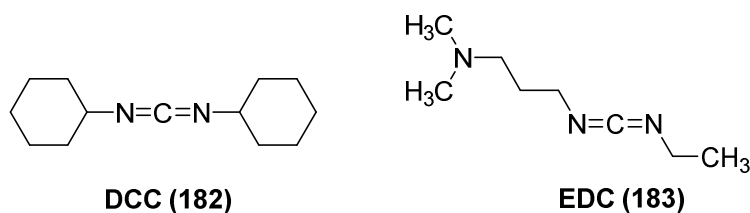
como en disolución.<sup>236</sup> La reacción del anión carboxilato y la forma protonada de la carbodiimida conduce a una *O*-acilisourea, la cual deriva, mediante reacción con el aminoéster, a la formación del enlace peptídico correspondiente, y a una urea disustituida como subproducto. El mecanismo de acoplamiento se muestra en el esquema 4.5.<sup>237</sup>

Esta urea es un compuesto muy estable y por lo tanto muy buen grupo saliente, siendo la fuerza impulsora de la reacción. Si se utiliza un segundo equivalente de ácido carboxílico, la *O*-acilisourea dará lugar al anhídrido simétrico. Del mismo modo, si la reacción se lleva a cabo en presencia de hidroxilaminas (HOBt o HOAt) como aditivo se obtiene el correspondiente éster activo. Cualquiera de estas tres especies reactivas, *O*-acilisourea, anhídrido simétrico o éster activo, son buenos agentes acilantes.



La *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) ha sido ampliamente usada, tanto en síntesis en fase sólida como en disolución, desde que se aplicara por primera vez en 1955 por Sheehan y Hess.<sup>236</sup> En este caso, el subproducto es la *N,N'*-diciclohexilurea (DCU), insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos comunes, y por tanto, fácilmente eliminable mediante filtración.<sup>238</sup>

El hidrocloreuro de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), debido a la solubilidad de su urea en disolventes acuosos ligeramente ácidos, se utiliza principalmente en síntesis en disolución, eliminándose fácilmente este subproducto mediante simples lavados.<sup>229</sup>



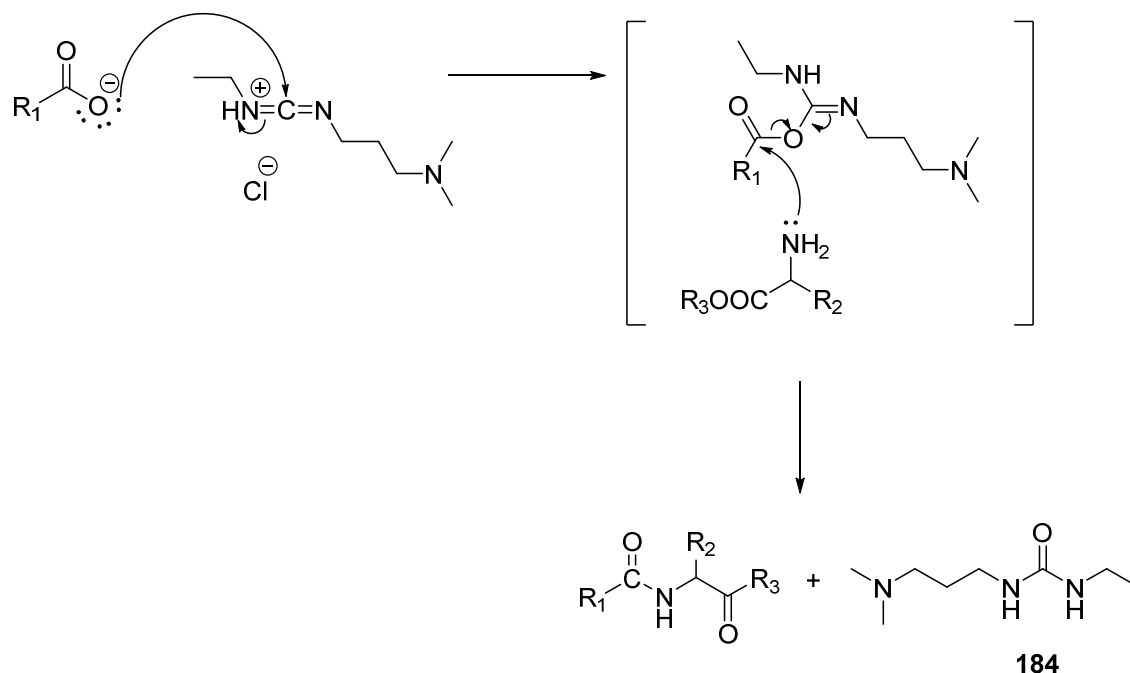
El mecanismo implicado en el uso de carbodiimidias se detalla en el esquema 4.6. Así pues, el anión carboxilato y la forma protonada de la carbodiimida conducen a la *O*-acilisourea, forma activada del ácido carboxílico; la reacción posterior de este último compuesto con el

<sup>236</sup> Sheehan, J.C.; Hess, G.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.

<sup>237</sup> El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.

<sup>238</sup> Kiso, Y.; Yajima, H., Ed. Gutte, B. *Peptides: Synthesis, Structures and Applications. Cap.2 Amide Formation and Deprotection and Disulfide Formation in Peptide Synthesis.* **1995**, Ed Academic Press, 39-93.

aminoéster da lugar a la formación del enlace peptídico, y a la salida de la correspondiente urea disustituída.



**Esquema 4.6.** Síntesis peptídica con carbodiimidas.

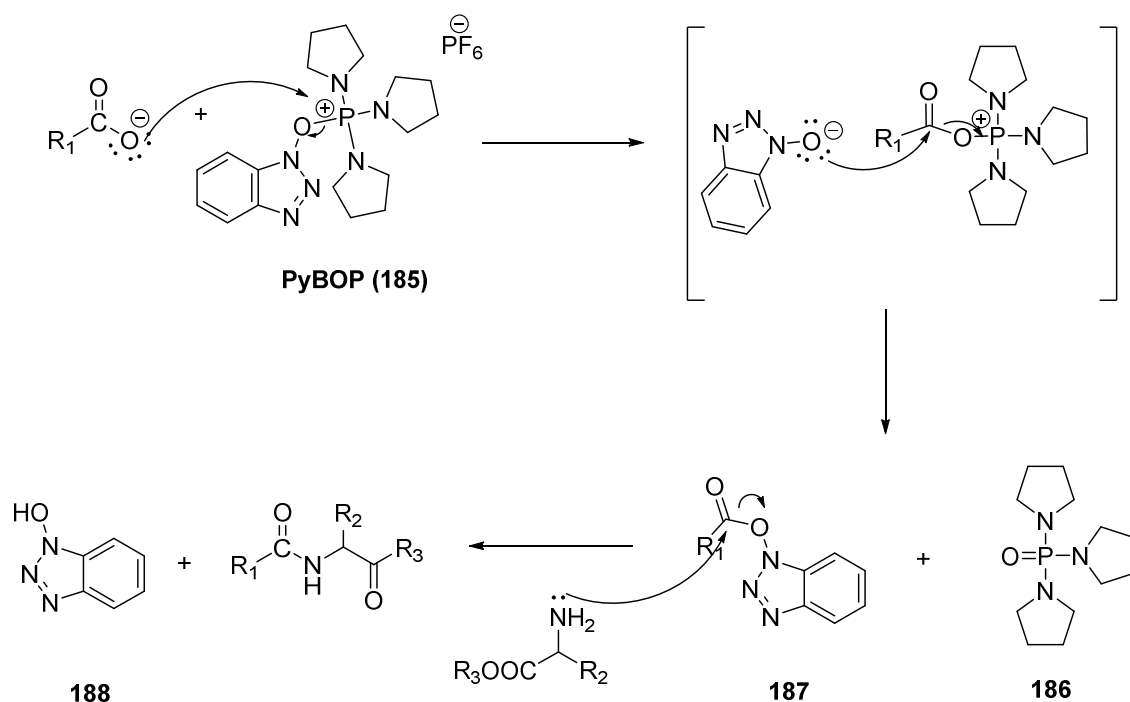
La activación del carboxilo para el acoplamiento peptídico también se puede llevar a cabo mediante el empleo de *sales de fosfonio*. Uno de los reactivos más usados en la activación del grupo carboxilo para el acoplamiento peptídico es el hexafluorofosfato de benzotriazoliloxi-tris-[dimetilamino] fosfonio (BOP), que incorpora un equivalente de benzotriazol. El BOP proporciona altos rendimientos, con pocas reacciones secundarias y sus subproductos se eliminan fácilmente.<sup>239</sup> Sin embargo, se demostró que algunos de los subproductos son tóxicos, como la hexametilfosforotriamida, una especie con carácter carcinogénico, por lo que se recomienda sustituirlo por hexafluorofosfato de benzotriazoliloxi-tris-(pirrolidino) fosfonio (PyBOP), que posee una reactividad similar o superior al BOP.<sup>240</sup> Este es uno de los activadores de carboxilo que se ha empleado en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

El mecanismo de reacción del acoplamiento mediado por el PyBOP se expone en el esquema 4.7. En él, el carboxilato obtenido por desprotonación del ácido carboxílico por la presencia de una amina terciaria en el medio de reacción, ataca como nucleófilo a la sal de fosfonio para dar lugar a la sal derivada del HOBt (hidroxibenzotriazol) y al correspondiente derivado de acilfosfonio. Estos últimos evolucionan hacia el éster, forma activada del ácido

<sup>239</sup> Castro, B.; Dormoy, J.R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *31*, 1219-1222.

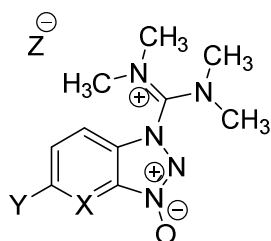
<sup>240</sup> Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *14*, 205-208.

carboxílico, y óxido de tris(pirrolidino)fosfina, subproducto de la reacción.<sup>241</sup> El ataque nucleófilo del aminoéster sobre el grupo carbonilo de **187** proporciona el péptido deseado y una molécula de HOBT.



Esquema 4.7. Síntesis peptídica empleando PyBOP

Otro grupo de agentes acoplantes usados en la síntesis de péptidos son las *sales de uronio*. Estas sales sustituyen el fósforo de las del apartado anterior por un átomo de carbono.<sup>242</sup> Compuestos como los hexafluorofosfatos de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-oxi-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) y *N*-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridin-1-ilmetileno]-*N*-metilmetanaminio (HATU) poseen una reactividad similar al BOP.<sup>237</sup>



- 189** X=CH; Y=H; Z=PF<sub>6</sub>, **HBTU**  
**190** X=N; Y=H; Z=PF<sub>6</sub>, **HATU**  
**191** X=CH; Y=Cl; Z=PF<sub>6</sub>, **HCTU**  
**192** X=CH; Y=H; Z=BF<sub>4</sub>, **TBTU**  
**193** X=N; Y=H; Z=BF<sub>4</sub>, **TATU**  
**194** X=CH; Y=Cl; Z=BF<sub>4</sub>, **TCTU**

Figura 4.2. Sales de uronio empleadas en el acoplamiento peptídico.

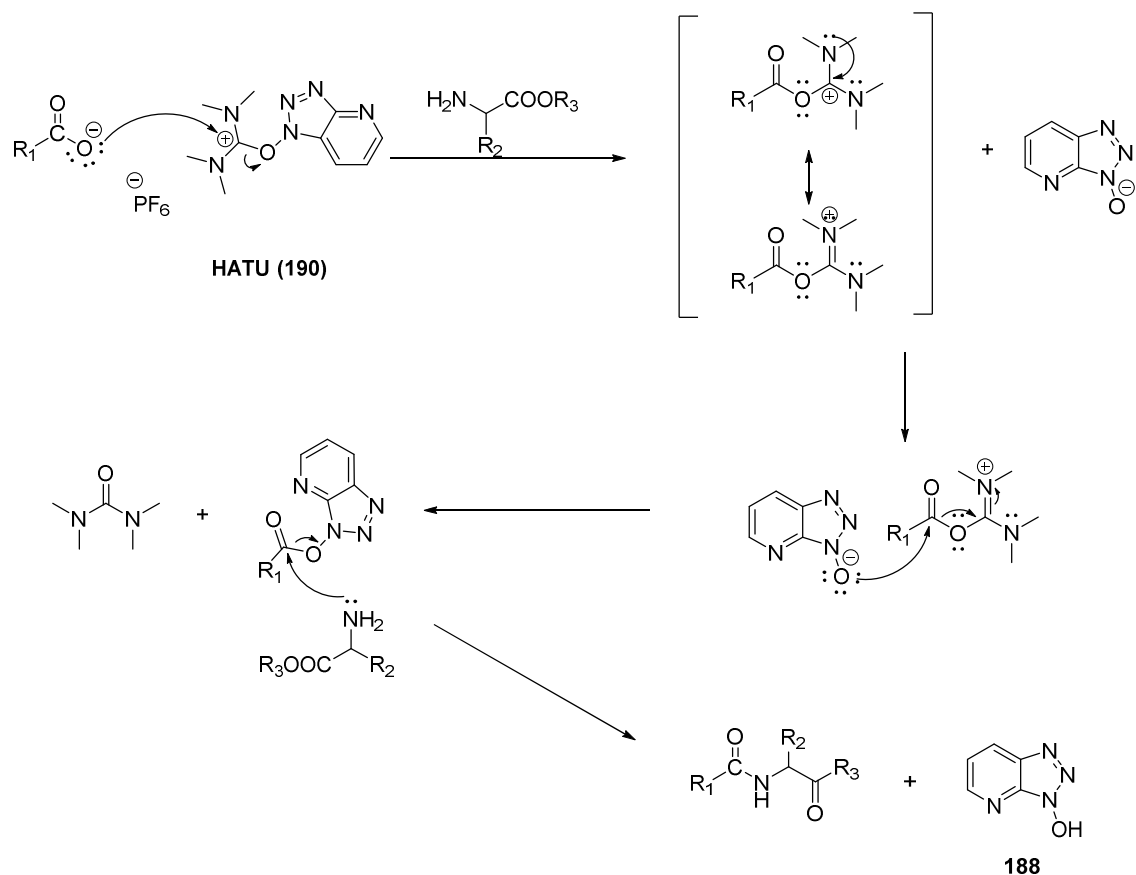
Se ha demostrado que el HATU, que posee en su molécula un equivalente de HOAt,

<sup>241</sup> Hudson, D. J. *Org. Chem.* **1988**, 53, 617-624.

<sup>242</sup> Dourtoglou, V.; Ziegler, J.C.; Gross, B. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 1269-1272.

aumenta la velocidad de la reacción de acoplamiento y reduce la posibilidad de racemización.<sup>243</sup>

En el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.8** se muestra el mecanismo general del acoplamiento mediante HATU con un ácido carboxílico desprotonado debido a la presencia de una amina terciaria.<sup>229</sup> Al igual que en el caso de las carbodiimidas, la reacción inicialmente deriva hasta una *O*-acilisourea, evolucionando hasta la formación del péptido y la urea correspondiente, la cual, como en el uso del acoplante anterior, es la fuerza impulsora de la reacción. La reacción del éster activado con un aminoéster da lugar finalmente a la amida deseada.



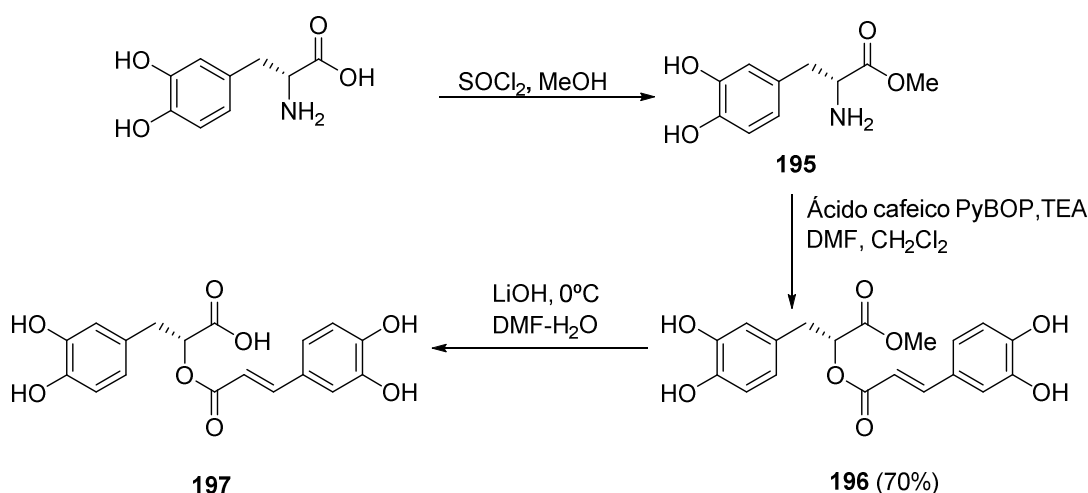
Esquema 4.8. Síntesis peptídica con la sal de uronio HATU.

#### 4.1.4. Amidas polifenólicas

En la bibliografía pueden encontrarse algunos peptidomiméticos constituidos por el acoplamiento de sistemas polifenólicos, como el ácido gálico, y aminoácidos y derivados. En este contexto, Park y colaboradores han descrito la síntesis de amidas derivadas de la D- y L-DOPA mediante acoplamiento peptídico de la forma protegida como éster metílico con diversos

<sup>243</sup> Carpino, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.

ácidos polifenólicos, como por ejemplo, el ácido cafeico<sup>244</sup> (Esquema 4.9).



Esquema 4.9

Estos compuestos fueron estudiados como antagonistas del dominio p56lck SH2, encontrado en las células-T, y de gran relevancia en desórdenes inmunológicos, tales como rechazos en trasplantes de órganos, enfermedades autoinmunes, o enfermedades inflamatorias crónicas, entre otros.<sup>244</sup>

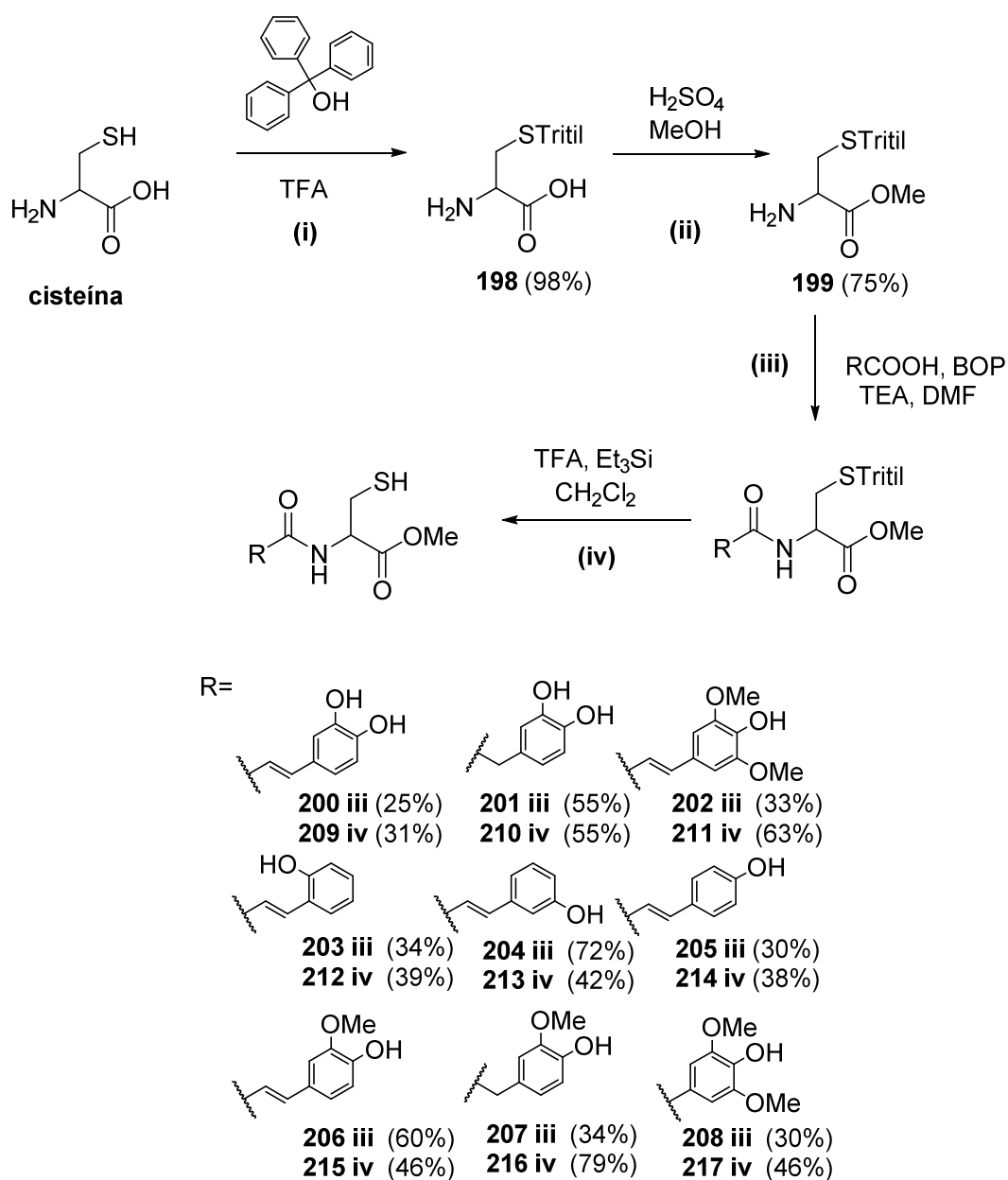
Recientemente Silvia y colaboradores<sup>245</sup> han publicado la síntesis de amidas a partir ácidos fenólicos y aminoácidos o dopamina, con objeto de estudiar su actividad antirradicalaria (Esquemas 4.10 y 4.11).

En este contexto, en el esquema 4.10 se describe la preparación de amidas derivadas de la cisteína mediante una metodología sintética larga que implica etapas de protección-desprotección en el grupo tiol. Así pues, la protección de dicho grupo con tritilo, seguido de esterificación de Fischer del grupo carboxílico libre conduce a **199** con un 73% de rendimiento global para las dos etapas. A continuación tiene lugar el acoplamiento peptídico entre el grupo amino libre y diversos ácidos fenólicos (cafeico, DOPAC, sinápico, *o*-, *m*-, *p*-cumárico, ferúlico, homovainilínico, siríngico), usando BOP como agente acoplante; este proceso transcurre con rendimientos de malos a moderados (25-72%). La desprotección final del grupo tritilo en condiciones ácidas conduce a los metil ésteres derivados de cisteína **209-217**, con un rendimiento comprendido entre el 31 y el 79%.

<sup>244</sup> Park, S. H.; Kang, S.H.; Lim, S.H.; Oh, H.S.; Lee, K.H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 3455-3459.

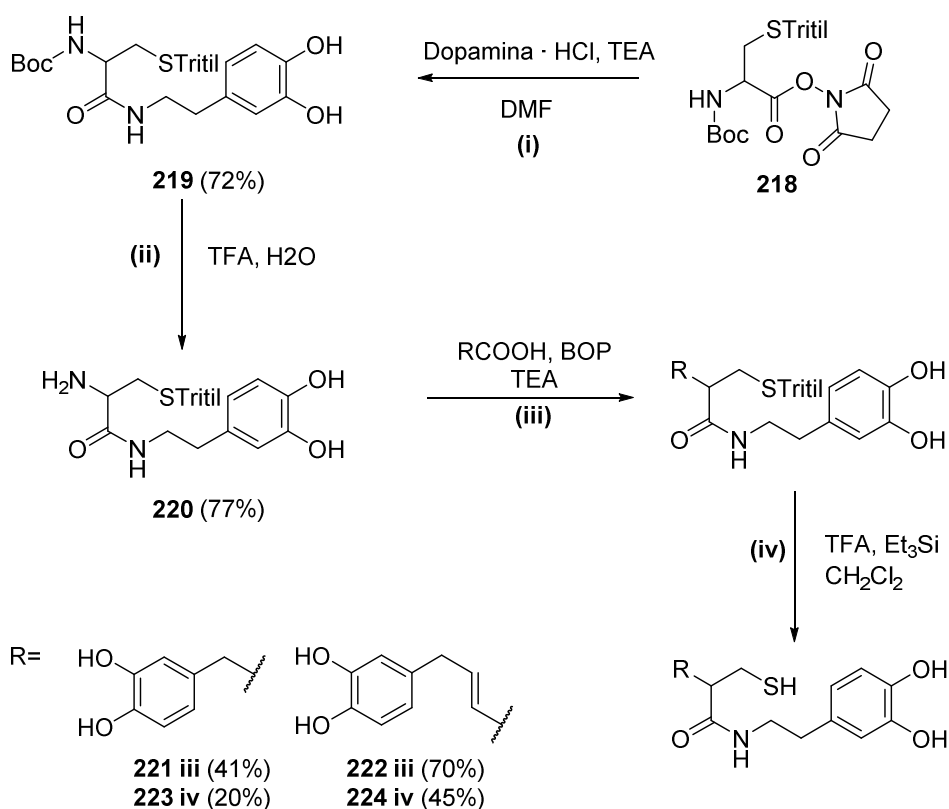
<sup>245</sup> Silvia, V.; Baldisserotto, A.; Scalambra, E.; Malisardi, G.; Durini, E.; Manfredini, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 383-392.





Esquema 4.10

Alternativamente, los mismos autores describen también la preparación de péptidos con dos anillos polifenólicos mediante acoplamiento peptídico a partir de los grupos carboxilo y amino de la cisteína.<sup>245</sup> Para ello se requiere la protección previa del grupo tiol en forma de tritilioéter, la protección del grupo amino con Boc, y la activación del grupo carboxílico con *N*-hidroxisuccinimida. El acoplamiento de dicho compuesto con el hidrocloreto de dopamina conduce a **219** con un 72% de rendimiento; a continuación se lleva a cabo la desprotección del grupo amino, el acoplamiento peptídico de dicho grupo con DOPAC y ácido cafeico empleando BOP; la desprotección final del grupo tiol conduce a los derivados **223** y **224** con rendimientos del 20 y del 45%, respectivamente (Esquema 4.11).

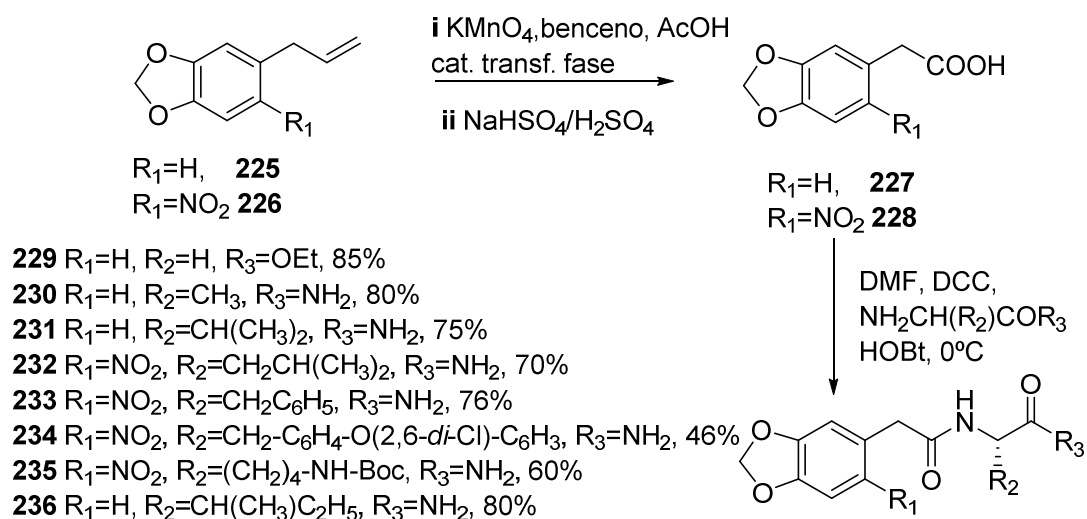


Esquema 4.11

Los productos finales fueron evaluados como agentes antirradicalarios (métodos DPPH y ORAC); el estudio estructura-actividad mostró que la actividad antioxidante era más apreciable en aquellos compuestos con un fragmento de tipo catecol frente a aquellos con un único hidroxilo fenólico, y en aquellos compuestos con un espaciador entre dicho fragmento y el grupo carbonilo.

También ha sido descrita la síntesis de peptidomiméticos a partir del ácido 3,4-metilendioxfenilacético, debido a las interesantes propiedades que ha demostrado poseer el fragmento metilendioxi, al ser hallado en numerosos agentes anticancerígenos naturales.<sup>246</sup> Para ello, en primer lugar se partió tanto de Safrol **225**, como de su análogo estructural con un sustituyente nitro en la posición 6, **226**, los cuales fueron transformados en sus correspondientes ácidos carboxílicos mediante tratamiento con  $\text{KMnO}_4$  y ácido acético, para posteriormente someterlos a acoplamiento peptídico con aminoácil amidas empleando DCC como agente acoplante en presencia de hidroxibenzotriazol como base. Mediante este procedimiento se obtuvieron los peptidomiméticos **229-236** con unos rendimientos comprendidos entre el 46 y el 85% (Esquema 4.12).

<sup>246</sup> De Magalhaes Moreira, D.R.; Lima Leite, A.C.; Pinheiro Ferreira, P.M.; Marçal da Costa, P.; Costa Lotufo, L.V.; Odorico de Moraes, M.; Brondani, D.J.; do Ó Pessoa, C. *J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 351-357 y referencias contenidas.

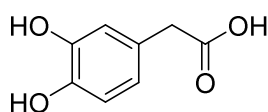


Esquema 4.12

Los derivados sintetizados fueron evaluados frente a líneas celulares tumorales de glioblastoma humano, carcinoma de colon, leucemia y cáncer de mama (MDA/MB-435, HCT-8, HL-60 y SF-295), demostrándose una mayor actividad para aquellos compuestos con un fragmento de glicina, tirosina y lisina.

### 3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se ha llevado a cabo la preparación de nuevos derivados peptidomiméticos derivados del DOPAC, con objeto de obtener análogos con un mayor carácter lipófilo, que pudieran mejorar la biodisponibilidad del antioxidante en sistemas biológicos al facilitarse el transporte a través de las membranas celulares. Dicha síntesis se ha abordado partiendo de los ácidos 3,4-metilendioxfenilacético y 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) ambos comerciales, que fueron acoplados a diferentes hidroclocloruros de aminoésteres etílicos y metílicos derivados de L-aminoácidos naturales (glicina, fenilalanina, valina, serina, triptófano y cistina).



**DOPAC (237)**

El ácido 3,4-dihidroxifenilacético, conocido como DOPAC, es otro de los compuestos polifenólicos presentes en la aceituna; se trata de un producto del metabolismo del neurotransmisor dopamina. Es un compuesto de gran interés, ya que ha demostrado tener importantes propiedades biológicas.

Sus propiedades antioxidantes han sido estudiadas, observándose que su capacidad de captación de radicales libres en el método de DPPH prácticamente duplica a la del HT.<sup>247</sup> También se ha demostrado que en concentraciones de orden micromolar proporciona protección antioxidante en plasma de rata en un medio muy cercano a las condiciones *in vivo*.<sup>248</sup> Se ha comprobado que el DOPAC, incluso en concentraciones subestequiométricas, es capaz de inhibir la fibrilación de la  $\alpha$ -sinucleína, una pequeña proteína presináptica cuya agregación está asociada al inicio de la enfermedad de Parkinson.<sup>249</sup>

Respecto a la formación de enlaces peptídicos, en este trabajo se ha optado por el método de activación *in situ* en disolución, ensayando como agentes acoplantes la sal de fosfonio PyBOP (métodos A1 y A2), el hidroclocloruro de carbodiimida EDC (método B), y la sal de uronio HATU (método C).

En el caso de los métodos A1 y A2, se han llevado a cabo mediante una modificación del método propuesto por Bělohradský y colaboradores para la síntesis de dipéptidos a partir de  $\alpha$ -aminoácidos (método A1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro),<sup>250</sup> y del desarrollado por Park y colaboradores

<sup>247</sup> Stupans, I.; Kirlich, A.; Tuck, K.L.; Hayball, P.J. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 2464-2469.

<sup>248</sup> Raneva, V.; Shimasaki, H.; Ishida, Y.; Ueta, N.; Niki, E. *Lipids* **2001**, *36*, 1111-1116.

<sup>249</sup> Zhou, W.; Gallagher, A.; Hong, D.P.; Long, C.; Fink, A.L.; Uversky, V.N. *J. Mol. Biol.* **2009**, *388*, 597-610.

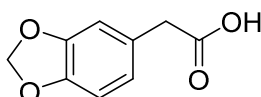
<sup>250</sup> Bělohradský, M.; Císařová, I.; Holý, P.; Pastor, J.; Závada J. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8811-8823.

para la síntesis de derivados del ácido rosmarínico (método A2, DMF),<sup>244</sup> ambos empleando PyBOP como agente acoplante.

En el método B, se empleó como agente acoplante hidrocloreuro de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Se llevó a cabo una modificación del método descrito por Sasaki y colaboradores para la síntesis de péptidos *N*-terminales del ácido 2,3-diaminopropiónico, realizando el acoplamiento con HOBt y el hidrocloreuro de EDC en diclorometano anhidro.<sup>251</sup>

Para el uso de la sal de uronio HATU como agente acoplante (en el método C) se modificó el procedimiento descrito por Paloumbis y colaboradores para la síntesis péptidos basados en  $\delta$ -glic aminoácidos.<sup>252</sup>

La optimización del acoplamiento peptídico se inició con el ácido 3,4-(metilendioxi)fenilacético, que al no tener los hidroxilos fenólicos libres, permitía una mejor manipulación y purificación en la primera etapa de optimización de la reacción.

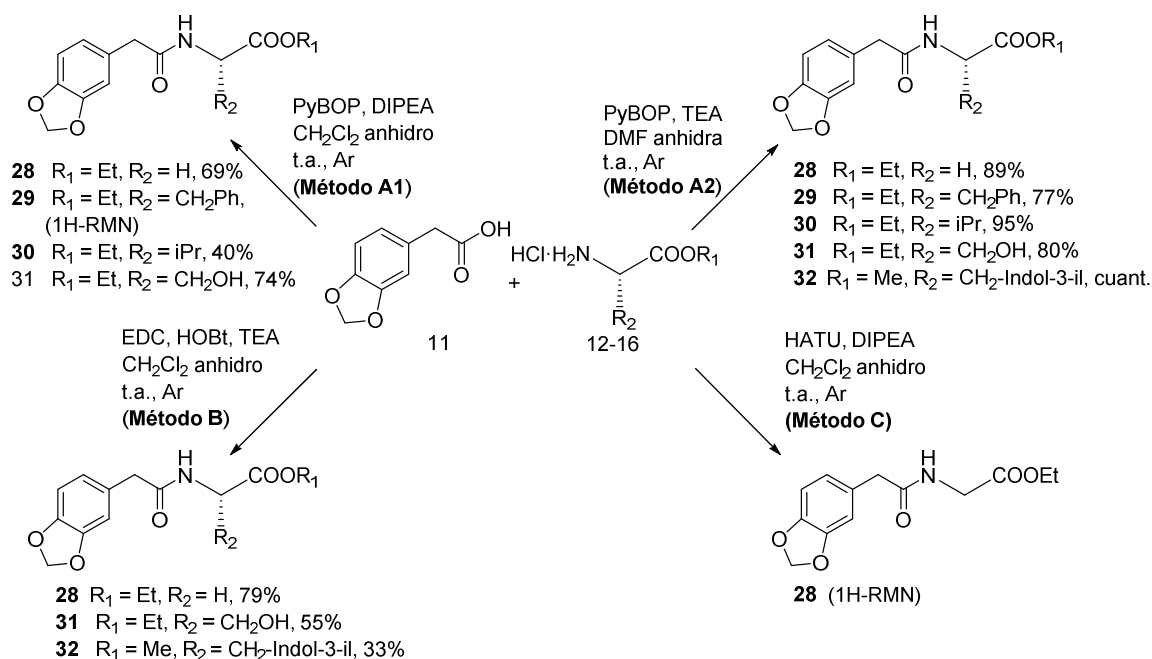


#### Ácido 3,4-metilendioxfenilacético (238)

Para este compuesto se ensayaron las condiciones de los cuatro métodos descritos anteriormente como A1, A2, B y C, todos en presencia de una amina terciaria que interviene en la deprotonación del ácido de partida.

<sup>251</sup> Sasaki, N.A.; Garcia-Alvarez, M.C.; Wang, Q.; Ermolenko, L.; Franck, G.; Nhiri, N.; Martin, M.T.; Audic, N.; Potier, P. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 2310-2320.

<sup>252</sup> Paloumbis, G.; Petrou, C.; Nock, B.; Maina, T.; Pairas, G.; Tsougas, P.; Cordopatis, P. *Synthesis*, **2007**, *6*, 845-852.

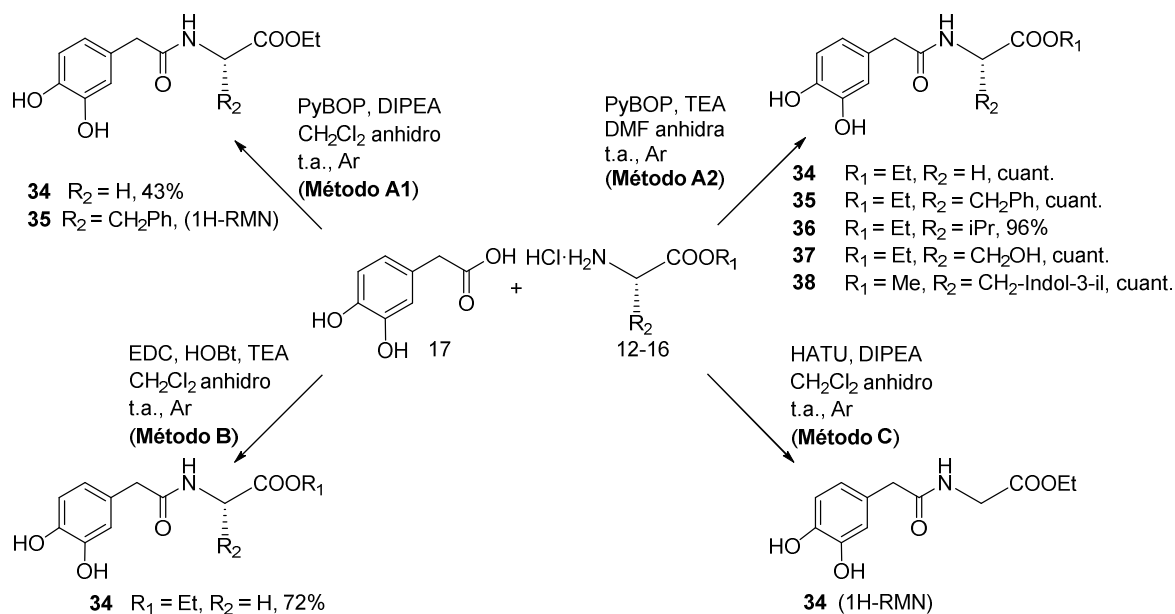


**Esquema 4.13.** Síntesis de derivados peptídicos derivados del ácido 3,4-metilendioxfenilacético

De la observación del esquema 4.13 puede deducirse que para las condiciones de los métodos A1 y B las reacciones ensayadas transcurrieron con rendimientos de moderados a buenos (40-69% para el PyBOP, método A1 y 33-79% en el caso del método B); no fue así para el método C, para el que la reacción transcurre con un alto grado de impurezas, además de necesitar un mayor tiempo de reacción y un acoplamiento incompleto en los casos ensayados, por lo que se descartó.

Es destacable que, manteniendo el PyBOP como agente acoplante, pero empleando TEA como base y DMF como disolvente (Método A2), se produjo un incremento sustancial de los rendimientos de todas las amidas, que bajo estas condiciones resultaron ser de excelentes a cuantitativos (77-100%) tras la purificación cromatográfica.

Una vez optimizada la síntesis anterior, se aplicaron esos mismo cuatro procedimientos a la reacción entre el ácido 3,4-dihidroxifenilacético y los distintos L-aminoésteres (Esquema 4.14).



**Esquema 4.14.** Síntesis de derivados peptídicos derivados del ácido 3,4-dihidroxifenilacético.

La síntesis del derivado de glicina se llevó a cabo según las cuatro aproximaciones sintéticas anteriormente mencionadas. Empleando los métodos A1, A2 y B, los rendimientos obtenidos tras la purificación cromatográfica fueron del 43%, 100% y 72%, respectivamente. El método C (HATU) fue descartado ya que la reacción transcurre con un alto grado de impurezas, al igual que la síntesis de **35** mediante el método A1.

La síntesis de **35** y **36** también transcurrió de forma exitosa empleando las condiciones A2 (rendimientos cuantitativo y del 96%, respectivamente). El método B resultó ineficaz para la preparación de ambos péptidos, ya que tras 48h de reacción aún se observaba una cantidad remanente importante de materia prima.

La eficacia del método A2 también se comprobó en la preparación de los péptidos polifenólicos **37** y **38**, derivados de L-serina y L-triptófano, respectivamente, ya que ambos fueron aislados con rendimientos cuantitativos tras la purificación cromatográfica.

La formación del enlace peptídico se confirmó mediante  $^{13}C$ -RMN; donde el carbono carbonílico de dicho enlace resuena alrededor de 170 ppm (169.9-173.0 ppm para los derivados protegidos **28-32** y 170.6-172.9 ppm para los polifenoles desprotegidos **34-38**).

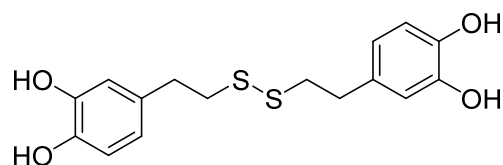
Cuando el espectro se registró en  $^1H$ -RMN sin usar disolventes deuterados próticos, también se observó el protón correspondiente al enlace peptídico. Así pues, para los compuestos **28** y **30**, cuyos espectros fueron registrados en  $CDCl_3$ , la resonancia de dicho protón fue de 6.03 y 5.98 ppm, respectivamente. Por otro lado, para los compuestos **31**, **34** y **37** (espectro en  $(CD_3)_2CO$ ), el desplazamiento químico encontrado para ese protón fue de 7.29, 7.36, 7.10 ppm.

Finalmente, para los derivados **32** y **38**, estudiados en DMSO- $d_6$ , se observó una resonancia del protón del enlace peptídico a 8.41 y 8.29 ppm, respectivamente.

Estos datos claramente sugieren un desapantallamiento creciente en este orden, según el disolvente:  $\text{CDCl}_3 < (\text{CD}_3)_2\text{CO} < \text{DMSO-}d_6$ . Dicho orden puede ser explicado considerando la formación de puentes de hidrógeno entre el protón del enlace peptídico y los disolventes  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  y  $\text{DMSO-}d_6$ ; los puentes de hidrógeno son especialmente intensos en este último disolvente, lo cual explica la resonancia de dicho protón en valores en torno a 8 ppm, aproximadamente dos unidades superior a los observados en  $\text{CDCl}_3$ , donde no pueden formarse dichos puentes de hidrógeno.

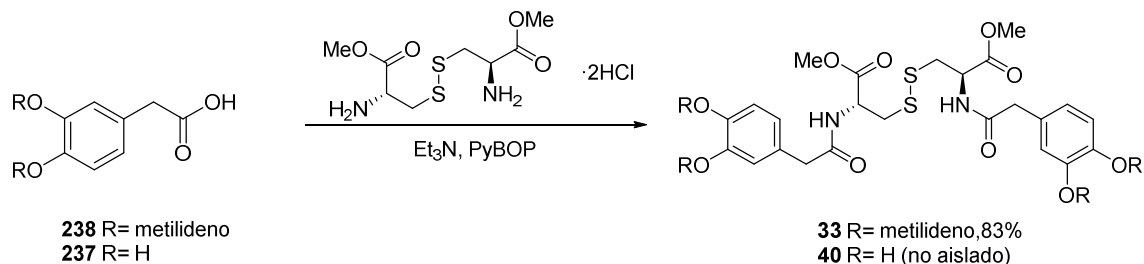
También cabe destacar que en los derivados de fenilalanina, serina y triptófano, dado que el carbono  $\alpha$  es un carbono quiral, los dos protones del grupo metileno contiguo son diastereotópicos y ambos se acoplan entre sí con una constante de acoplamiento geminal del orden de 14 Hz.

Basándonos en la excelente capacidad antiproliferativa frente a líneas celulares tumorales mostrada por una serie de tioderivados del hidroxitirosol, incluyendo el disulfuro de hidroxitirosilo, sintetizados recientemente en nuestro grupo de investigación,<sup>44</sup> decidimos extender la síntesis de péptidos al éster metílico de la L-cistina, donde el puente disulfuro podría conferir interesantes propiedades al compuesto final.



**Disulfuro de hidroxitirosilo (75)**

Para ello, se emplearon las condiciones descritas en el método A2 y se utilizaron como ácidos tanto el ácido 3,4-dihidroxiifenilacético como el ácido 3,4-(metilendioxi)fenilacético (Esquema 4.15), obteniéndose un rendimiento del 83% para el caso del derivado protegido **33**.



**Esquema 4.15.** Síntesis de los derivados peptídicos de la L-cistina.

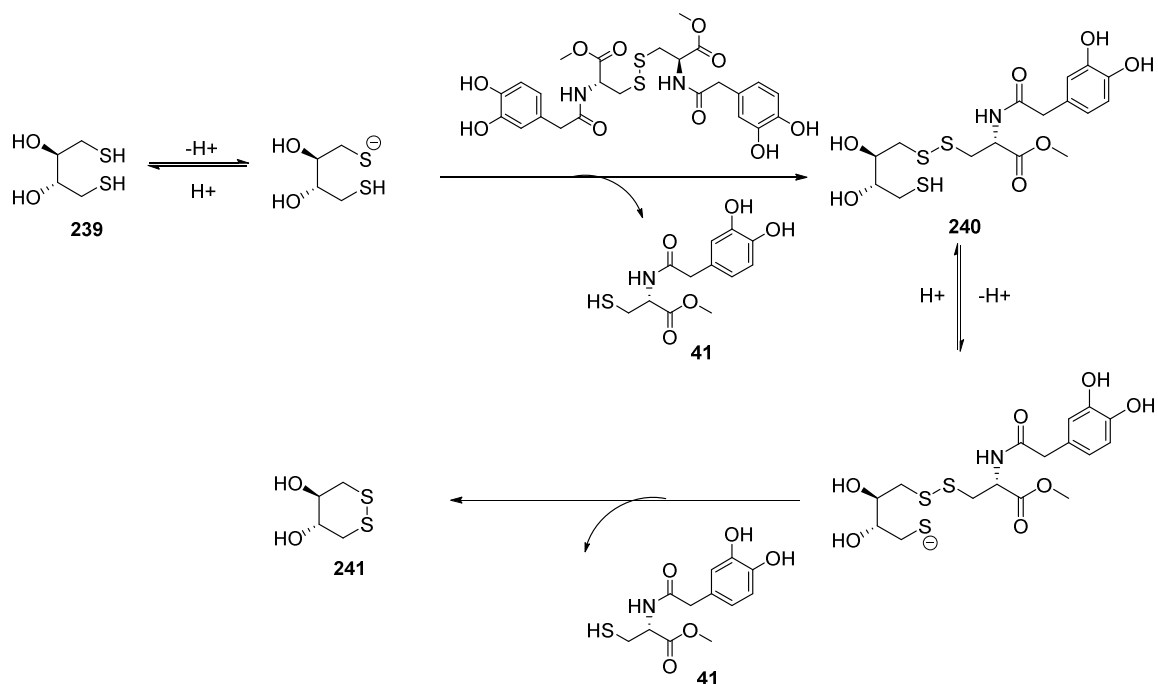


No obstante, los intentos de purificación del correspondiente péptido dimérico **40** procedente del acoplamiento directo del éster metílico de la L-cistina con **237** resultaron infructuosos; este aspecto se resolvió mediante acetilación convencional del crudo de reacción para dar lugar al derivado protegido **39**, y posterior desacetilación de los hidroxilos fenólicos. En la desacetilación se ensayaron diversas condiciones básicas, ( $K_2CO_3$ ,  $NH_4OAc$ ), e incluso la adición de enzimas como la *C. antarctica* y la *P. cepacia*, pero se observó que, en todos los casos, se producía bien descomposición o bien formación de mezclas complejas de productos, siendo el tratamiento con  $CsCO_3$  en una mezcla  $CH_2Cl_2$ -MeOH el que proporcionó el mejor rendimiento (65%) El compuesto **40** constituye el primer ejemplo de un peptidomimético entre un sistema polifenólico y un derivado de L-cistina.

También se transformó el disulfuro **40** en el tiol **41** (44%) mediante proceso de óxido-reducción mediado con ditioneol, el cual se oxidó hasta el correspondiente disulfuro cíclico (Esquema 4.16). Es ampliamente conocida la utilidad de ditioles, como por ejemplo, el ( $\pm$ )-ditioneol (DTT), en la reducción de enlaces disulfuro, incluyendo los presentes en proteínas, para dar lugar a tioles. Estos ditioles se caracterizan por un potencial de reducción significativamente alto, y el proceso transcurre en condiciones bastante suaves.<sup>253</sup> Este proceso transcurre mediante la deprotonación de uno de los grupos tiol del DTT en presencia de una base, seguido de un posterior ataque nucleofílico del tiolato resultante sobre uno de los átomos de azufre del disulfuro, provocando la ruptura del enlace y generando la consecuente pérdida de una molécula del tiol correspondiente. Seguidamente, la deprotonación del tiol restante resulta en un nuevo tiolato que se estabiliza a través de un nuevo ataque nucleofílico a uno de los átomos de azufre del disulfuro producido, dando lugar al disulfuro cíclico **241** y a una nueva molécula del tiol **41**.

---

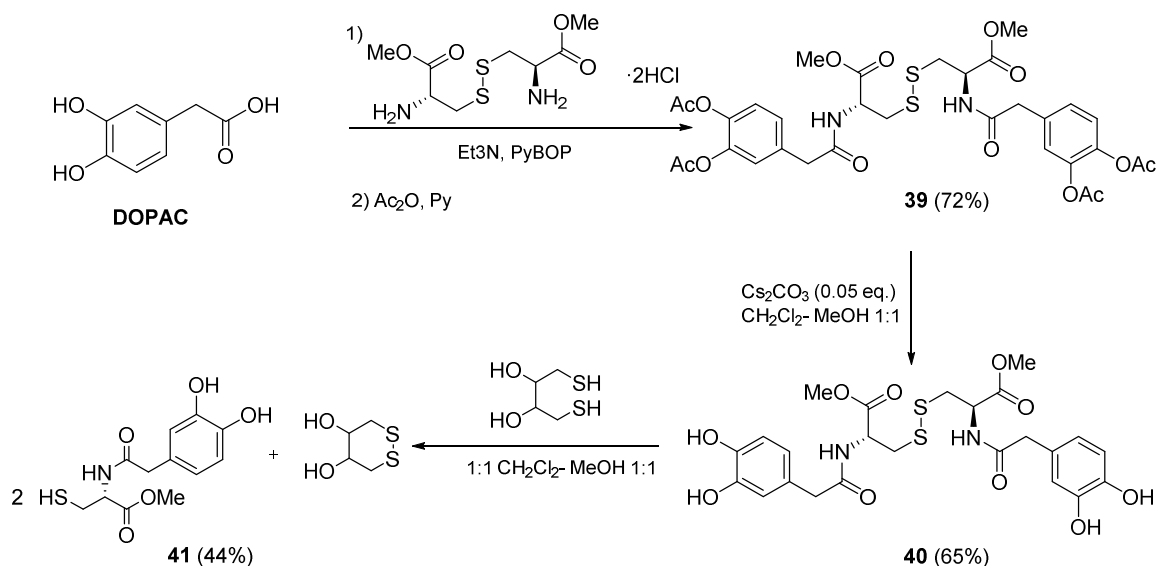
<sup>253</sup> G. V. Lamoureux, G. M. Whitesides. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 633-641.



Esquema 4.16

Este procedimiento constituye una síntesis alternativa a la descrita por Silvia y colaboradores de **41**,<sup>245</sup> también en 4 etapas, y con un rendimiento global (22%). Es destacable que nuestro procedimiento, además de implicar el uso de reactivos de menor toxicidad en el acoplamiento peptídico (PyBOP frente a BOP), transcurre con rendimientos sensiblemente superiores en esa etapa.

En los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  se observa un ligero desapantallamiento de los protones diastereotópicos del grupo  $\text{CH}_2\text{S}$  del disulfuro **40** (3.13, 3.07 ppm) con respecto a los mismos protones del derivado de cisteína **41** (2.93, 2.85). Además, el carbono de dicho grupo metileno muestra un fuerte desapantallamiento en el disulfuro (41.1 frente a 26.5 ppm). Este comportamiento es análogo al observado previamente en nuestro grupo de investigación para el disulfuro de hidroxitirosilo y el correspondiente tiol derivado.<sup>44</sup>



Esquema 4.17. Síntesis de los derivados peptídicos de la L-cistina.

En la tabla 4.1 se resumen todas las condiciones, tiempos de reacción y rendimientos para todos los peptidomiméticos preparados.

Tabla 4.1. Tiempos de reacción y rendimientos obtenidos en la síntesis peptídica

Compuesto	Aminoéster	Método A1		Método A2		Método B		Método C	
		t (h)	Rend. (%)	t (h)	Rend. (%)	t(h)	Rend. (%)	t(h)	Rend. (%)
28	L-Gly	48	69	25	89	60	79	72	*
29	L-Phe	24	*	38	77	-	-	-	-
30	L-Val	44	40	17	95	-	-	-	-
31	L-Ser	30	74	19	80	60	55	-	-
32	L-Trp	30	**	15	cuant	22	33	-	-
34	L-Gly	48	43	22	cuant	60	72	72	*
35	L-Phe	72	*	38	cuant	48	***	-	-
36	L-Val	-	-	16	96	48	***	-	-
37	L-Ser	-	-	38	cuant	-	-	-	-
38	L-Trp	-	-	38	cuant	-	-	-	-
33	L-Cis	-	-	7	83	-	-	-	-
40	L-Cis	-	-	12	**	-	-	-	-

\*Identificado por RMN

\*\*Identificado por c.c.f

\*\*\*acoplamiento peptídico incompleto

-ensayo no realizado

**5. SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL HIDROXITIRO SOL CON  
MÚLTIPLES FRAGMENTOS DE CATECOL VÍA *CLICK CHEMISTRY*.**

## 5. SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL HIDROXITIROSOL CON MÚLTIPLES FRAGMENTOS DE CATECOL VÍA *CLICK CHEMISTRY*.

### 5.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

#### 5.1.1. Antecedentes de derivados con múltiples fragmentos catecol

El término multivalencia es ampliamente usado en moléculas bioactivas que presentan varios fragmentos que pueden interaccionar con receptores biológicos. En numerosas ocasiones, los ligandos multivalentes presentan interacciones sensiblemente superiores a los derivados monovalentes, pueden, lo que permite potenciar su actividad biológica. Esta observación es conocida como *efecto cluster*, y es debido fundamentalmente a dos motivos: por un lado, a un efecto de concentración local (cuando se produce la disociación del receptor biológico, existe una alta concentración local del ligando, por ser multivalente, lo que permite una nueva asociación), y por otro, debido a un efecto entrópico (tras la interacción de un primer ligando con el receptor, las sucesivas asociaciones del resto del sistema multivalente presentan una menor penalización entrópica).<sup>254,255</sup>

En el contexto de los polifenoles, la obtención de arquitecturas multivalentes, con varios anillos polifenólicos, podría tener dos efectos beneficiosos: por un lado, y en base a interacciones multivalentes con biomoléculas, podrían potenciarse alguna de las actividades biológicas de estos compuestos, tales como sus propiedades antiproliferativas. Por otro lado, la existencia de varios anillos polifenólicos podría incrementar su actividad antioxidante frente a especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS).

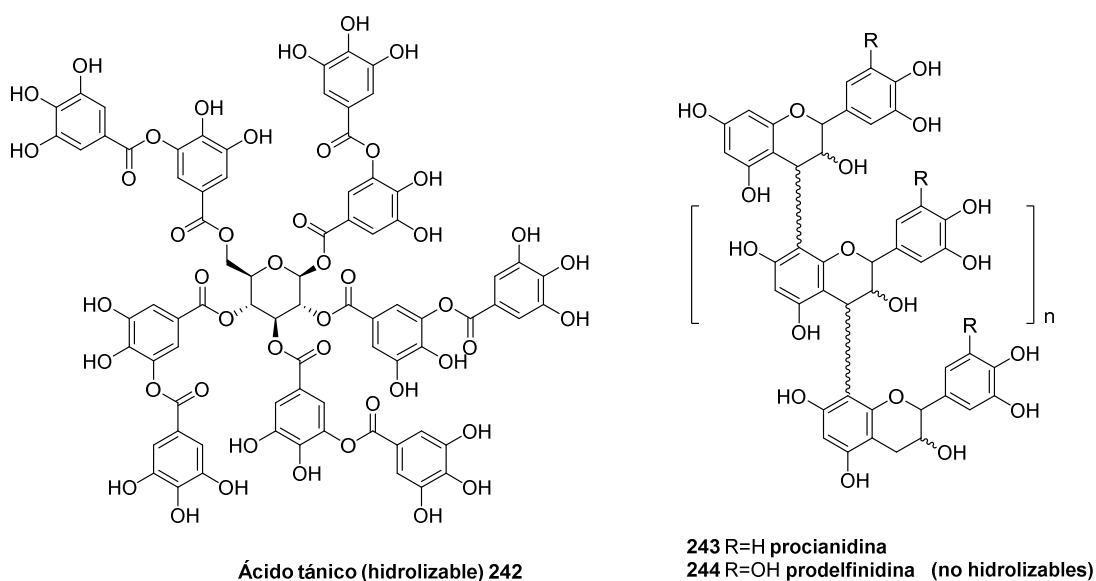
Como ejemplo natural de sistemas polifenólicos multivalentes caben destacar los taninos, compuestos fuertemente hidrófilos de origen vegetal con pesos moleculares comprendidos entre 300 a 5000 daltons; estos compuestos son capaces de formar entrecruzamientos con proteínas y otras biomoléculas. y se caracterizan por contener

---

<sup>254</sup> Badjic, J. D.; Nelson, A. Cantrill, S.J.; Turnbull, W.B.; Stoddart, J.F. *Acc. Chem. Res.*, **2005**, *38*, 723-732.

<sup>255</sup> Martos, V.; Castreno, P.; Valero, J.; de Mendoza, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 698-706

numerosos grupos fenólicos y que por tanto comparten muchas de características y reactividad de los fenoles.<sup>256</sup> Se pueden encontrar altas concentraciones de taninos en las semillas, raíces, hojas, corteza y madera de las plantas. El ejemplo del tanino por excelencia es el ácido tánico. Estructuralmente se distinguen dos familias de taninos: hidrolizables, con un core generalmente de tipo D-glucopiranososa, al que los distintos anillos fenólicos se unen mediante enlaces éster, y los no hidrolizables (condensados o proantocianidinas), estructuras complejas formadas por la polimerización de flavonas, conectadas mediante enlaces C-C, y sin residuos sacarídicos.<sup>256</sup>



Las principales aplicaciones de los taninos comprenden el curtido de pieles,<sup>257</sup> adhesivos,<sup>258</sup> aditivos alimentarios, biorremediación al actuar como agentes quelatantes de metales,<sup>259</sup> inhibición de la corrosión en pigmentos o pinturas, floculantes, despresurizantes, y atrapadores de oxígeno.<sup>260</sup>

La importancia de este tipo de compuestos ha suscitado el interés en los últimos años en su aislamiento y caracterización de fuentes naturales, así como en el desarrollo de

<sup>256</sup> Chung, K.T.; Wong, T.Y.; Wei, C.I.; Huang, Y.W.; Lin, Y. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* **1998**, *38*, 421–464.

<sup>257</sup> Pizzi, A.; Simon, C.; George, B.; Perrin, D.; Triboulot, M. C. *J. Appl. Pol. Sci.* **2004**, *91*, 1030–1040.

<sup>258</sup> Li, K.; Geng, X.; Simonsen, J.; Karchesy, J. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2004**, *24*, 327–333.

<sup>259</sup> Palma, G.; Freer, J.; Baeza, J. *Water Res.* **2003**, *37*, 4974–4980.

<sup>260</sup> Rahim, A.A.; Kassim, J. *Rec. Pat. Mater. Sci.* **2008**, *1*, 223–231.

la síntesis total y semisíntesis de muchos de ellos.<sup>261</sup> Ejima y colaboradores han descrito recientemente la obtención de films mediante la complejación de ácido tánico con Fe(III) en un proceso práctico, económico y escalable, que da lugar a films con citotoxicidad despreciable; es por ello que los autores lo consideran como excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas y medioambientales.<sup>262</sup>

Existen varios ejemplos de incorporación de polifenoles a sistemas multivalentes. En este contexto, Agawa y colaboradores describen la preparación de los dendrímeros polifenólicos de segunda generación **245** mediante síntesis divergente donde las etapas clave son esterificaciones de unidades de ácido gálico. Estos dendrímeros muestran propiedades quimioluminescentes, al generar oxígeno singlete en medio básico y en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; en dicha propiedad es crucial la distancia entre cada dendrón, y por consiguiente el tamaño del *core* (Figura 5.1).<sup>263</sup>

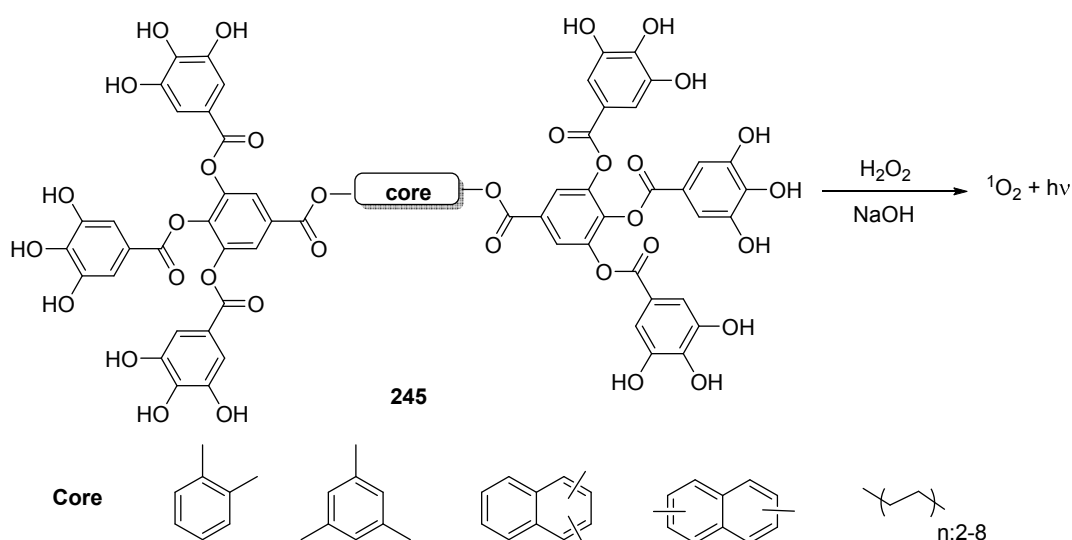


Figura 5.1

Lee y colaboradores describen la preparación de arquitecturas dendríticas tetravalentes de primera generación **246-248** mediante la aminación reductiva del

<sup>261</sup> Poységu, L.; Deffieux, D.; Malik, G.; Natangelo, A.; Quideau, S. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 853-874 y referencias contenidas.

<sup>262</sup> Ejima, H.; Richardson, J.J.; Liang, K.; Best, J.P.; van Koeverden, M.P.; Such, G.K.; Cui, J.; Caruso, F. *Science* **2013**, 154-157.

<sup>263</sup> Agawa, H.; Nakazono, M.; Nanbu, S.; Zaitzu, K. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5171-5174.

aldehído siríngico, vainillina y 5-yodovainillina con una diamina que actúa como *core*, obteniéndose de esta manera cuatro anillos fenólicos en la estructura (Figura 5.2). El análisis de sus propiedades antioxidantes reveló que los tres dendrímeros presentaban una capacidad antirradicalaria (método del DPPH) y de protección de lipoproteínas de baja densidad (LDL) frente a degradación por radicales libres muy superior a antioxidantes clásicos como la quercetina o el Trolox; los compuestos ensayados mostraron además actividad prometedora en cuanto a protección de ADN frente al estrés oxidativo.

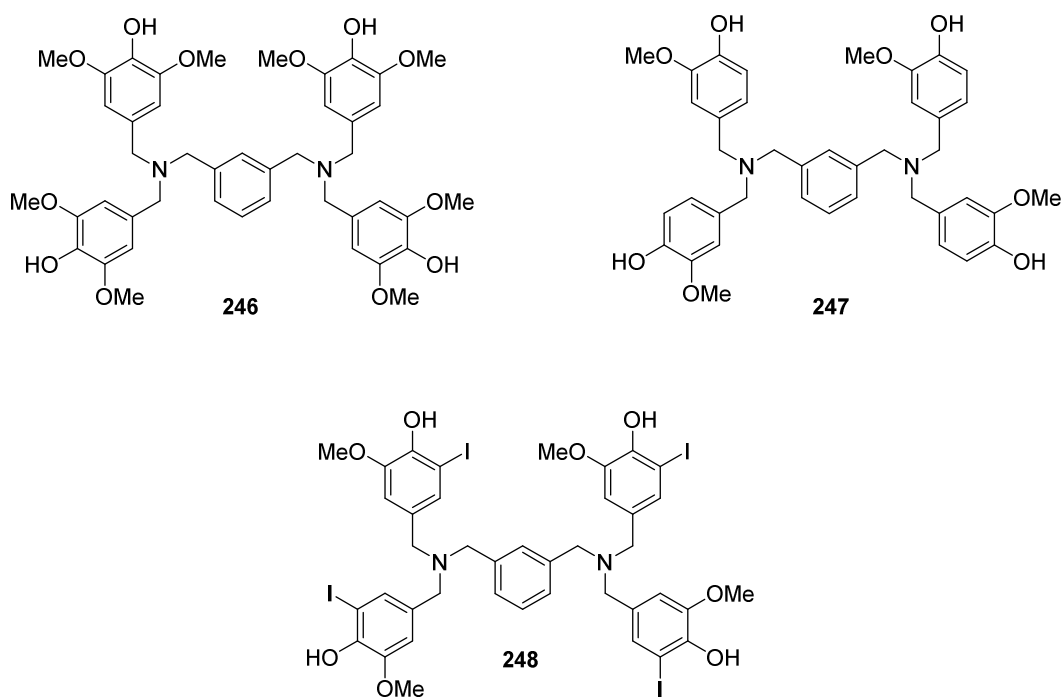


Figura 5.1

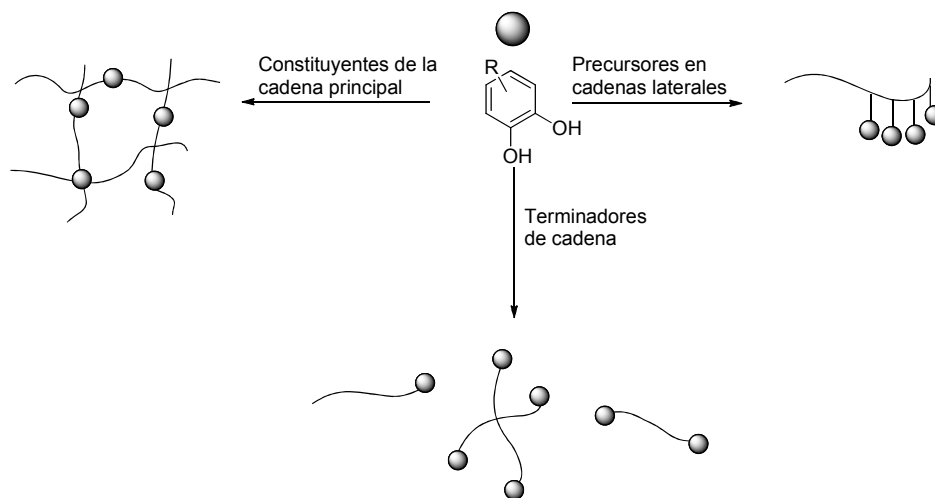
La función catecol puede también ser incorporada a cadenas poliméricas como grupos principales, laterales y terminadores de cadena mediante diversas rutas sintéticas. Las estrategias empleadas incluyen polimerización oxidativa<sup>264</sup> o enzimática<sup>265</sup> de los catecoles, polimerización de monómeros que contengan grupos catecoles mediante

<sup>264</sup> Lee, H.; Dellatore, S.M; Miller, W.M.; Messersmith, P.B. *Science*, **2007**, *318*, 426–430.

<sup>265</sup> Dubey, S.; Singh, D.; Misra, R.A. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 432–437.



polimerización radicalaria<sup>266</sup> o a través de síntesis peptídica;<sup>267</sup> también se ha descrito el uso de catecoles como iniciadores de la polimerización (**Figura 5.3**).<sup>268, 269</sup>



**Figura 5.2**

Las aplicaciones de estos sistemas poliméricos son diversas, y entre ellas se encuentran la catálisis,<sup>270</sup> aplicaciones biomédicas como el transporte de fármacos, la preparación de *scaffolds* para la regeneración de tejido óseo o el desarrollo de biosensores, como superficies antimicrobianas.<sup>271</sup>

<sup>266</sup> Lee, B.P.; Huang, K.; Nunalee, F.N.; Shull, K.R.; Messersmith, P.B. *J. Biomat. Sci., Polym. Ed.* 2004, 15, 449–464.

<sup>267</sup> Dalsin, J.L.; Hu, B.H.; Lee, B.P.; Messersmith, P.B. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 4253–4258.

<sup>268</sup> Fan, X.; Lin, L.; Dalsin, J.L.; Messersmith, P.B. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 15843–15847.

<sup>269</sup> Ye, Q.; Wang, X.; Li, S.; Zhou, F. *Macromolecules*, 2010, 43, 5554–5560.

<sup>270</sup> Álvarez-Paino, A.; Marcelo, G.; Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. *Macromolecules* 2013, 46, 2951–2962.

<sup>271</sup> Faure, E.; Falentin-Daudré, C.; Jérôme, C.; Lyskawa, J.; Fournier, D.; Woisel, P.; Detrembleur, C. *Progress in Polymer Science*, 2013, 38, 236–270.

### 5.1.2. Click Chemistry como estrategia para la obtención de derivados multivalentes con fragmentos catecol

La estrategia que se propone en este capítulo para la construcción de sistemas multivalentes con fragmentos catecol está basada en la cicloadición 1,3-dipolar, uno de los mejores y más empleados ejemplos de la denominada *click chemistry*

El término *click chemistry* fue acuñado por Sharpless y colaboradores en 2001 para definir un conjunto de reacciones que mostraran ciertas características comunes, como ser modulares, estereoespecíficas, generar subproductos inofensivos, tener un alto rendimiento e involucrar procedimientos experimentales sencillos.<sup>272</sup> Además, también deben partir de reactivos accesibles y llevarse a cabo bajo condiciones “verdes” o amigables con el medioambiente (empleando agua o en ausencia de disolventes) y evitar en lo posible purificaciones cromatográficas.

Sólo ciertas reacciones reúnen estas condiciones, como por ejemplo la apertura de anillos tensionados como los epóxidos o aziridinas, adiciones de oxígeno a dobles enlaces carbono-carbono (epoxidaciones), formación de ureas, tioureas, heterociclos aromáticos, hidrazonas o amidas partiendo de grupos carbonilo; o cicloadiciones tipo Diels-Alder o 1,3-dipolar.<sup>272</sup>

Centrándonos en el último de los ejemplos, la adición 1,3-dipolar constituye un método eficaz para la síntesis de triazoles. Este método se conoce desde 1893, cuando Michael publicó la primera síntesis de 1,2,3-triazoles partiendo de dietilacetilendicarboxilato y fenilazida.<sup>273</sup> Fue Huisgen quien, en la segunda mitad del siglo XX estudió este tipo de reacción, que implicaba el tratamiento térmico de alquinos y azidas para dar lugar a los correspondientes triazoles 1,4 y 1,5 sustituidos en proporción 1:1.<sup>274</sup> En 2002, el grupo de Fokin y Sharpless, y el de Meldal y colaboradores, publicaron de manera independiente la eficiencia del Cu(I) como catalizador conduciendo únicamente a los productos 1,4-disustituidos (Esquema 5.1);<sup>275,276</sup> este proceso se conoce

---

<sup>272</sup> Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

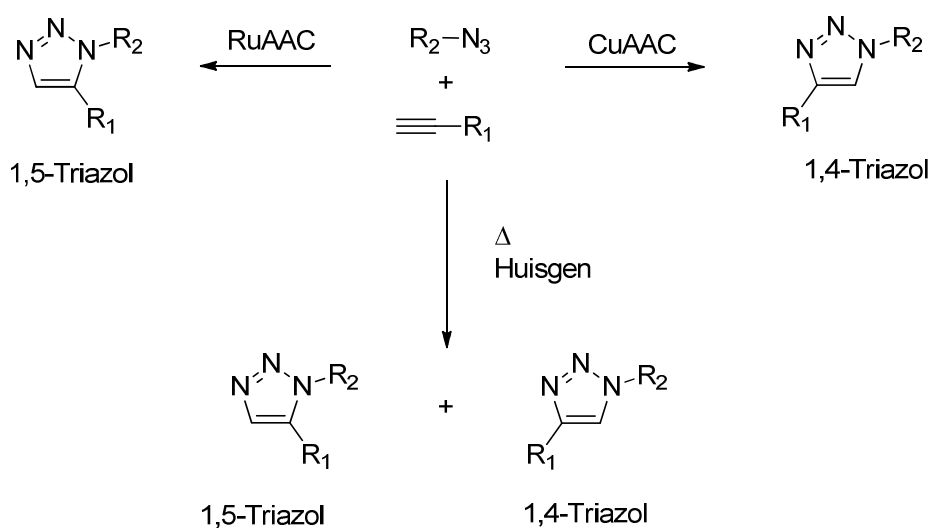
<sup>273</sup> Michael, A.; Luehn, F.; Higbee, H.H. *Am. Chem. J.* **1898**, *20*, 377-395.

<sup>274</sup> Fernández-Bolaños, J.G.; López, O. *Top Heterocycl. Chem.* **2007**, *7*, 31-66.

<sup>275</sup> Rostovtsev, V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596-2599.

con las siglas CuAAC (*Copper(I)-catalyzed Azido-Alkyne Cycloaddition*) En 2005, de nuevo el grupo de Sharpless y colaboradores publicó la selectividad 1,5 de la adición 1,3-dipolar catalizada por Rutenio (RuAAC, *Ruthenium-catalyzed Azido-Alkyne Cycloaddition*). Esta cicloadición, al igual que la catalizada por Cu(I) tolera una amplia variedad de grupos funcionales, pero es más sensible al disolvente y al impedimento estérico.<sup>277</sup>

Se han utilizado otros catalizadores metálicos como Ni<sup>2+</sup>,<sup>278</sup> Pd<sup>2+</sup>,<sup>279</sup> Pt<sup>2+</sup><sup>278</sup> y Au<sup>280</sup> para este tipo de adición, pero no han resultado tan eficaces como los indicados anteriormente.



**Esquema 5.1.** Regioselectividad en la cicloadición azido-alquino 1,3-dipolar.

El protocolo de esta reacción está bastante bien establecido, pudiéndose emplear directamente como catalizador una especie de Cu(I), como haluros de cobre (CuI, CuBr), CuOAc<sup>281</sup> o bien mediante la generación *in situ* de esta especie partiendo de

<sup>276</sup> Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

<sup>277</sup> Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P. Sun, H.H.Y.; Williams, I.D.; Sharpless, K.B.; Fokin, V.V.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998-15999.

<sup>278</sup> Golas, P.L.; Tsarevsky, N.V.; Sumerlin, B.S.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules*, **2006**, *39*, 6451-6457.

<sup>279</sup> Choudhury, C.; Mandal, S.B.; Achari, B. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8531-8534.

<sup>280</sup> Partyka, D.V.; Updegraff, J.B.; Zeller, M.; Hunter, A.D.; Gray, T.G. *Organometallics* **2007**, *26*, 183-186.

<sup>281</sup> Liang, L.; Astruc, D. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2933-2945.

precatalizadores como sales de Cu(II), por ejemplo, CuSO<sub>4</sub>, y un agente reductor como el ascorbato sódico (método más clásico);<sup>272</sup> hidracina<sup>278</sup> o tris-(2-carboxyetil)fosfina (TCEP);<sup>282</sup> o mediante la oxidación de Cu(0).<sup>283,284</sup> También se han empleado como catalizadores complejos de coordinación como CuOTf.C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, [Cu(NCCH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>][PF<sub>6</sub>],<sup>272</sup> Cu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, CuBr(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>,<sup>285</sup> y [Cu(C186tren)]Br (C186tren=tris(2-dioctadecilaminoetil)amina)<sup>286</sup> con resultados satisfactorios. Esta reacción admite el uso de una amplia variedad de disolventes,<sup>276</sup> siendo el agua es el más empleado con la obtención de altos rendimientos, aunque la insolubilidad de ciertos reactivos, que haría necesario el empleo de codisolventes, o la incompatibilidad del uso de agentes reductores como el ascorbato sódico en medios biológicos, que pueden reaccionar con las cadenas de proteínas<sup>287</sup> o dañar el ADN,<sup>288</sup> hacen necesario el empleo de otras estrategias. Las condiciones *solvent free*,<sup>289,290</sup> principalmente mediante irradiación de microondas,<sup>291-293</sup> o la reducción del Cu(II) inducida por luz ultravioleta,<sup>294</sup> han proporcionado estrategias para solventar este inconveniente.

En cuanto al mecanismo, a diferencia de la cicloadición térmica de alquinos y azidas de Huisgen, que transcurre a través de un proceso concertado en una única etapa, la cicloadición 1,3 catalizada por Cu(I) tiene lugar a través de varios pasos, Este mecanismo ha sido objeto de estudio en los últimos años, y se han propuesto dos posibles rutas (Esquema 5.2).<sup>295,296</sup>

<sup>282</sup> Zhan, W.H.; Barnhill, H.N.; Sivakumar, K.; Tian, H.; Wang, Q. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1691-1695.

<sup>283</sup> Orgueira, H. A.; Fokas, D.; Isome, I.; Chane, P.C.; Baldino, C.M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2911-2914.

<sup>284</sup> Molteni, G.; Bianchi, C.L.; Marinoni, G.; Santod, N.; Ponti, A. *New J. Chem.* **2006**, *30*, 1137-1139.

<sup>285</sup> Lal, S.; Diez-Gonzalez, S. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2367-2373.

<sup>286</sup> Candelon, N.; Lastecoueres, D.; Diallo, A.K.; Aranzaes, J.R.; Astruc, D.; Vincent, J.M.. *Chem. Commun.* **2008**, 741-743.

<sup>287</sup> Nagaraj, R. H.; Sell, D.R.; Prabhakaram, M.; Ortwerth, B.J.; Monnier, V.M. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 10257-10261.

<sup>288</sup> Natarajan, P.; Ferraudi, G. *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 3708-3712.

<sup>289</sup> Mukherjee, N.; Ahammed, S.; Bhadra, S.; Ranu, B.C. *Green Chem.* **2013**, *15*, 389-397.

<sup>290</sup> Pathigoolla, A.; Pola, R.P.; Sureshan, K.M. *Appl. Catal., A* **2013**, *453*, 151-158.

<sup>291</sup> Krim, J.; Taourirte, M.; Grünwald, C.; Krstic, I.; Engels, J.W. *Synthesis* **2013**, *45*, 396-405.

<sup>292</sup> Moorhouse, A.D.; Moses, J.E. *Synlett*, **2008**, *14*, 2089-2092.

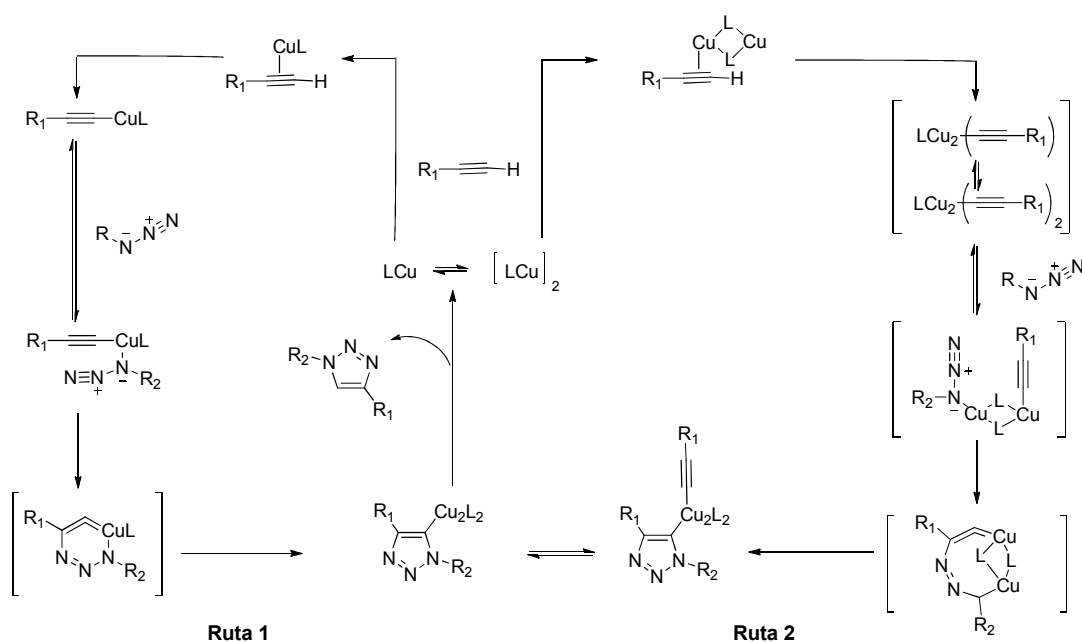
<sup>293</sup> Krim, J.; Taourirte, M.; Engels, J.W. *Molecules* **2012**, *17*, 179-190.

<sup>294</sup> Tasedlen, M.A.; Yagci, Y. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6945-6947.

<sup>295</sup> Himoto, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V.V.; Noodleman, L.; Sharpless, K.B.; Fokin V.V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.

La primera de ellas (Ruta 1) contemplaría un primer paso en el que se forma un acetiluro de Cu(I), como consecuencia de la complejación del alquino con el Cu(I), disminuyendo de esta manera el pKa del alquino terminal. Este acetiluro se coordinaría con la azida, y este aducto se transformaría en el triazol por reordenamiento a través de un estado de transición de seis miembros. Por último, el intercambio de cobre por H<sup>+</sup> daría lugar al triazol, y se regeneraría el catalizador.<sup>295</sup>

La segunda ruta (Ruta 2) contemplaría la participación de un segundo átomo de Cu(I), que dotaría de una estabilización adicional tanto al intermedio como al estado de transición.<sup>296</sup>



**Esquema 5.2.** Mecanismos de reacción propuestos para la adición 1,3 de alquino y azida.

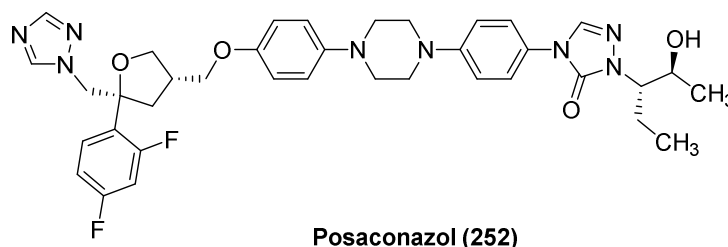
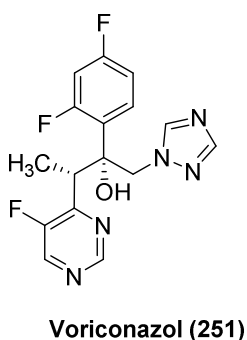
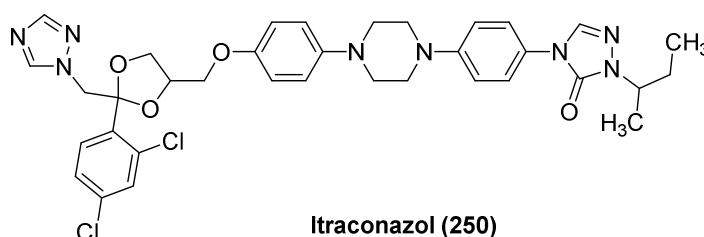
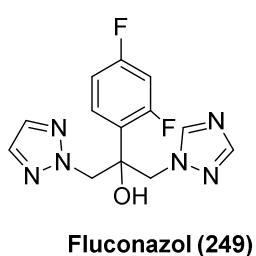
El grupo triazol se caracteriza por una gran robustez, por ser compatible con una amplia variedad de grupos funcionales y por ser prácticamente inerte desde el punto de vista químico a condiciones de reacción diversas, tales como oxidaciones, reducciones o hidrogenaciones, lo cual ha hecho posible su aplicación en ciencias biomédicas, síntesis orgánica y ciencia de los materiales.<sup>297-299</sup>

<sup>296</sup> Ahlquist, M.; Fokin, V.V. *Organometallics* **2007**, *26*, 4389-4439.

<sup>297</sup> Kumar, S.S.; Kavitha, H.P. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2013**, *10*, 40-65.

Numerosos derivados con un fragmento de triazol en su estructura exhiben propiedades farmacológicas tales como actividad antimicrobiana, antituberculosa, anticancerígena, anticonvulsinante, antiinflamatoria, analgésica, antiviral y antifúngica.<sup>297</sup> Por ello, han sido incorporados en una amplia variedad de fármacos entre los que se incluyen antihistamínicos, estimulantes del sistema nervioso central, ansiolíticos y sedantes.<sup>297</sup>

Ejemplos de este tipo de compuestos con actividad fungicida en el ámbito clínico son el Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, y el Posaconazol. Los triazoles también se emplean en el control de enfermedades fúngicas en frutas, vegetales, legumbres y cosechas de grano.<sup>300</sup>



A nivel industrial, otros usos de este tipo de moléculas abarcan la actividad anticorrosiva de metales, colorantes, fotoestabilizadores en materiales fotográficos o blanqueadores fluorescentes.<sup>301, 302</sup>

<sup>298</sup> Wu, P.; Fokin, V.V. *Aldrich. Chim. Acta* **2007**, *40*, 7-17.

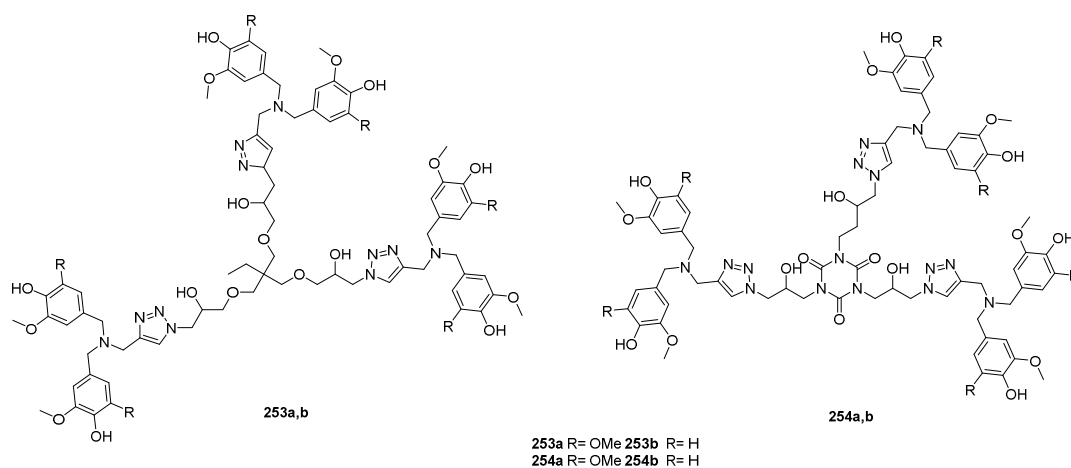
<sup>299</sup> Gil, M.V.; Arévalo, M.J.; López, O. *Synthesis* **2007**, *11*, 1589-1620.

<sup>300</sup> Manclus, J.J.; Moreno, M.J.; Plana, E.; Montoya, A. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8793-8800.

<sup>301</sup> Ramesh, S.; Rajeswari, S. *Electrochim. Acta*, **2004**, *49*, 811-820.

<sup>302</sup> Belei, D.; Bicu, E.; Birsa, L. *Acta Chem. Ias.*, **2009**, *17*, 197-207.

En el ámbito de los polifenoles, Lee y colaboradores han descrito recientemente la preparación de dendrímeros polifenólicos a partir de aldehído siríngico y vainillina en un proceso con dos etapas clave: por un lado, la doble aminación reductiva entre ambos aldehídos y la propargilamina, y por otro, la reacción de tipo *click chemistry* entre el fragmento de alquino y un core con tres grupos azido. Los autores sustituyeron el Cu(I), que podría formar complejos con los sistemas polifenólicos, siendo esto incompatible con el uso de estos derivados en sistemas biológicos, por gránulos de Cu y microondas. Los dendrímeros así sintetizados (Figura 5.4) mostraron ser potentes agentes anti-radicalarios (método del DPPH), con valores de IC<sub>50</sub> comprendidos entre 2.2-3.0 μM, y por tanto con una potencia bastante superior con respecto a antioxidantes conocidos como la quercetina o el ácido ascórbico (IC<sub>50</sub> de 9.0 y 16.6 μM, respectivamente).<sup>303</sup>



**Figura 5.3**

<sup>303</sup> Lee, C.Y.; Held, R.; Sharma, A.; Baral, R.; Nanah, C.; Dumas, D.; Jenkins, S.; Upadhaya, S.; Du, W. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 11221-11228.

## 4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

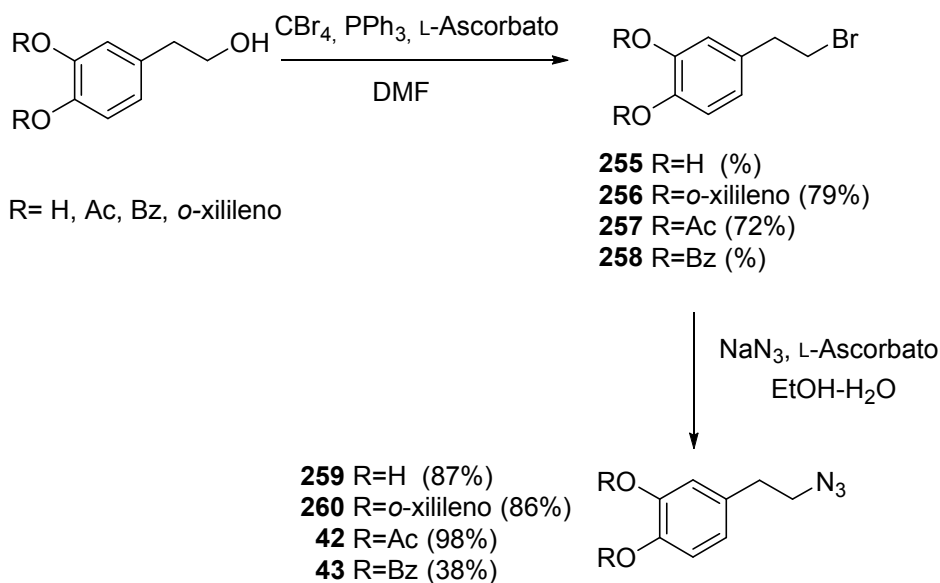
En el presente capítulo se propone la síntesis de sistemas polifenólicos multivalentes derivados del hidroxitirosol mediante el acoplamiento entre un azido-derivado del hidroxitirosol y diversos cores que porten distinto número de alquinos terminales. El acoplamiento se ha realizado mediante la reacción de cicloadición alquino-azida catalizada por Cu(I) (CuAAC).

Para ello, se emplearon los azido-derivados del HT **260**, **42** y **43**, los cuales se prepararon a partir del HT, o del HT protegido en los hidroxilos fenólicos en forma de éster (acetato, benzoato), o de éter bencílico(*o*-xilileno). Dicha preparación se efectuó en dos etapas, siguiendo el método de Gómez Carretero:<sup>304</sup> en primer lugar, reacción de Apple para transformar el hidroxilo alifático en bromuro, mediante tratamiento con CBr<sub>4</sub> y trifenilfosfano; esta reacción se llevó a cabo en presencia de ascorbato sódico en el caso del HT, con objeto de disminuir posibles reacciones de degradación oxidativa. En una segunda etapa, se llevó a cabo el desplazamiento del bromo con azida sódica, esta etapa transcurrió con rendimientos de moderados a excelentes (38-98%). (Esquema 4.3).

---

<sup>304</sup> Gómez, A. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, **2012**.



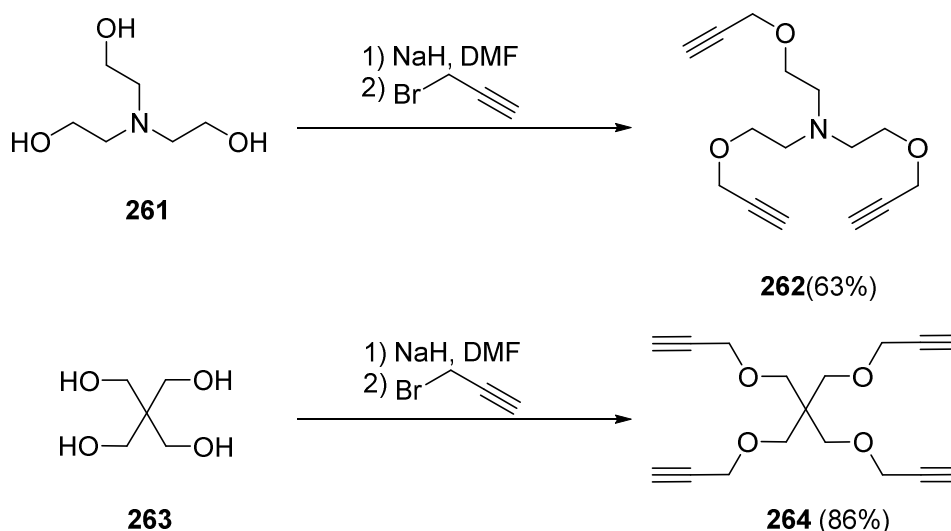


**Esquema 5.3.** Síntesis de las azidas.

Como núcleos alquínlicos, se escogieron el hepta-1,6-diino comercial, tris(2-propiniloxietil)amina y tetrakis(2-propiniloximetil)metano, con objeto de obtener derivados di-, tri- y tetrasustituidos. Los dos últimos núcleos se sintetizaron mediante través de una modificación de los métodos originales descritos por Peiyuan<sup>305</sup> y Zhun,<sup>306</sup> consistente en el tatamiento de una disolución en DMF de la trisetanolamina o el pentaeritritol, respectivamente, con NaH, seguido de adición de bromuro de propargilo, los compuestos **262** y **264** fueron aislados con un 64 y un 86% de rendimiento respectivamente, tras purificación cromatográfica (Esquema 5.4).

<sup>305</sup> Peiyuan, J.; Jinrong, L.; Changqi, Z.; Yong, J. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 1673-1677.

<sup>306</sup> Zhu, J.; Zhu, X.; Kang, E.T.; Neoh, K.G. *Polymer*, **2007**, *48*, 6992-6999.

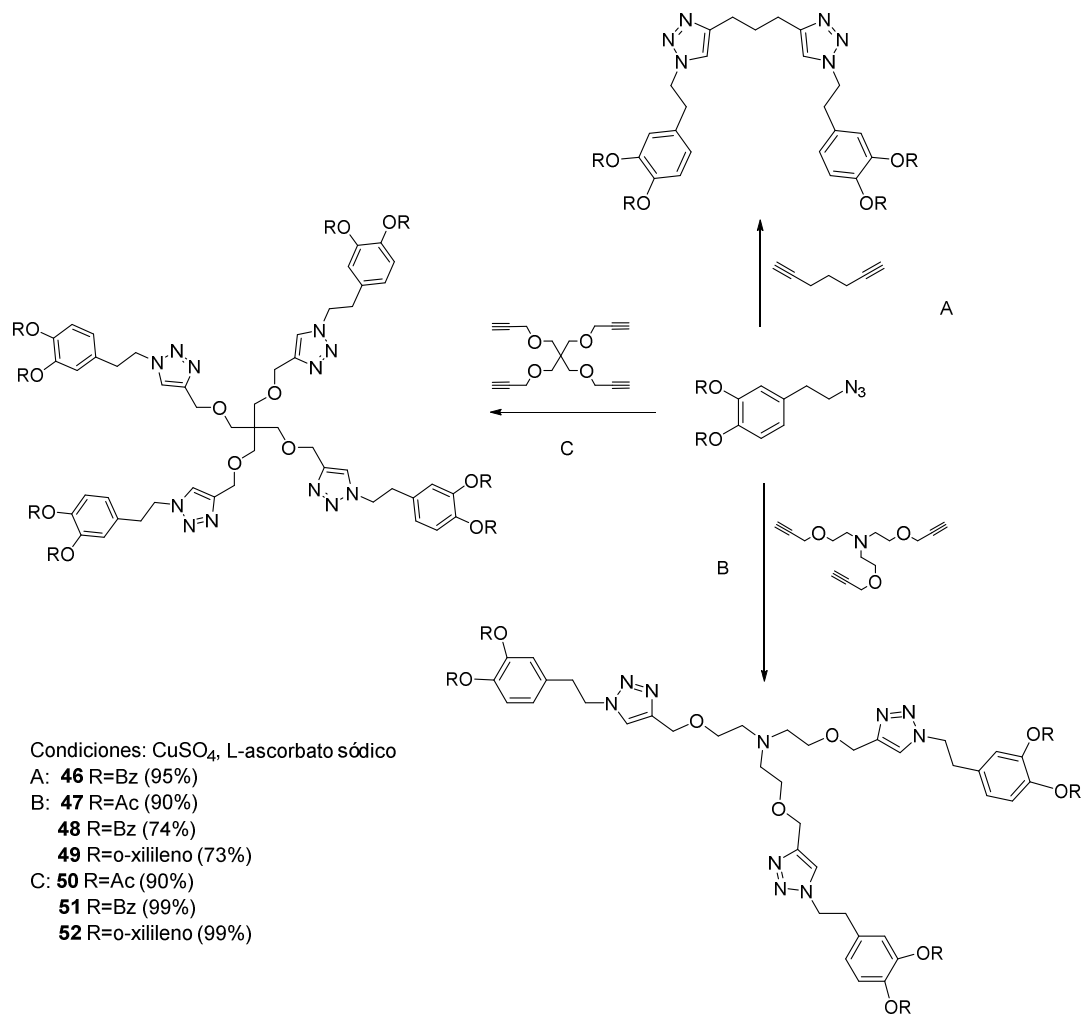


Esquema 5.4. Síntesis de los derivados tri y tetra-alkinílicos.

Todas las cicloadiciones 1,3-dipolares alquino-azida ensayadas en la presente Tesis Doctoral se llevaron a cabo empleando las mismas condiciones experimentales: uso de una mezcla acetona-agua 2:1 como disolvente y combinación de  $\text{CuSO}_4$  y L-ascorbato sódico como fuente de Cu(I). Las reacciones de este tipo para todos los sustratos polifenólicos fueron relativamente lentas, necesitándose un tiempo de reacción de 48 h a t.a. para la completa desaparición de los productos de partida. (Esquema 5.5).

El acoplamiento directo del azido-derivado del HT desprotegido con diversos alquinos planteó importantes problemas en cuanto al aislamiento y purificación final del compuesto; se observó la aparición de productos de elevada polaridad, posiblemente debido a la complejación de los catecoles con el ion Cu(II), que no pudieron ser aislados mediante purificación cromatográfica.<sup>307</sup> Por este motivo, se optó por proteger previamente los grupos hidroxilo en forma de éster (acetato, benzoato) o de éter bencílico (*o*-xilileno). Cuando se emplearon estos azido derivados, protegidos en los hidroxilos fenólicos, los correspondientes acoplamientos azido-alquino para dar lugar a los triazolinderivados transcurrieron con buenos rendimientos (74-99%) (Esquema 5.5).

<sup>307</sup> Ghosh, K.S.; Maiti, T. K.; Mandal, A.; Dasgupta, S. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 4703-4708.



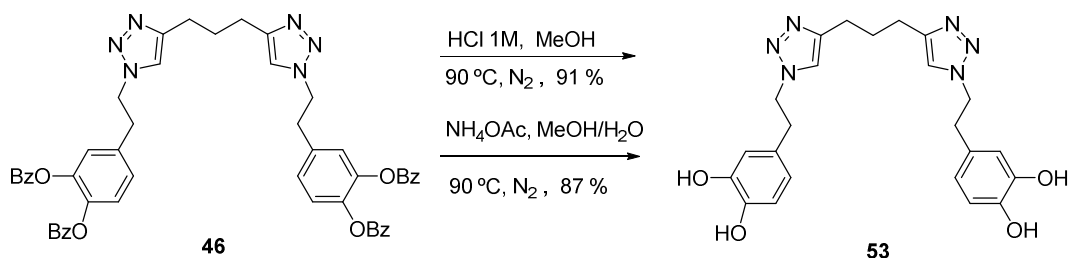
Esquema 5.5. Cicloadiciones 1,3-dipolares.

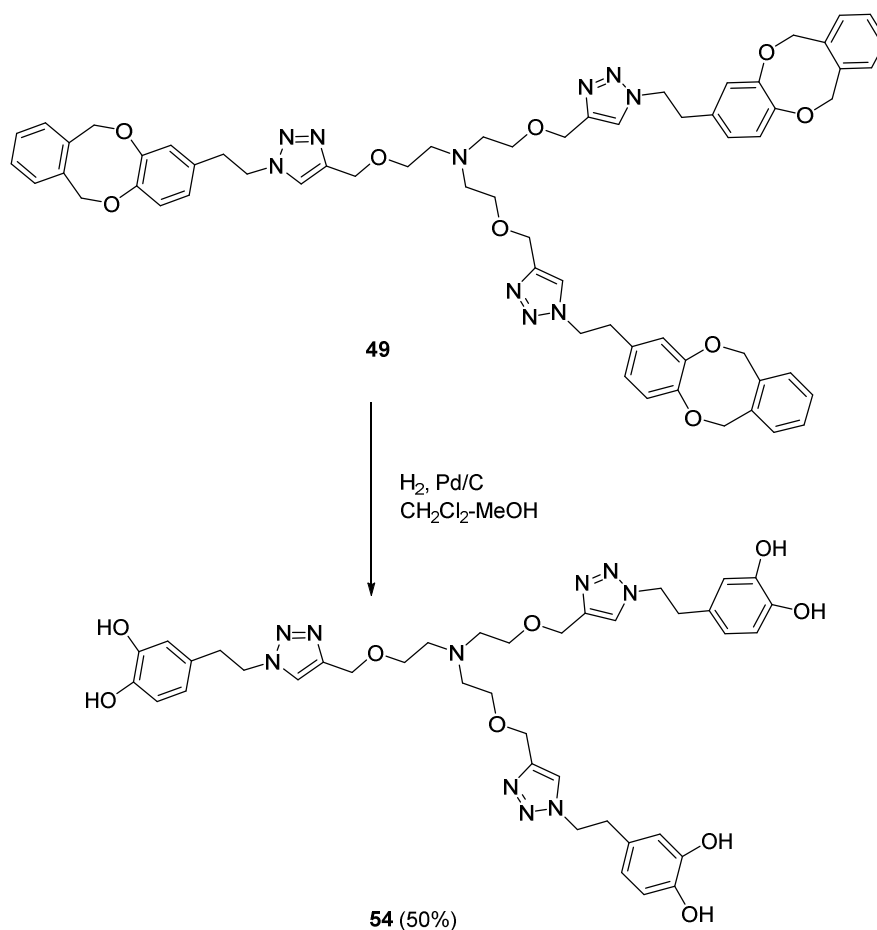
La formación de los derivados multivalentes se corroboró a partir de los datos de  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$ . De este modo, para todos los casos pudo verse con facilidad el protón de triazol (H-5), que aparece como un único singulete a 7.37-7.91 ppm, lo que confirma la simetría y total conversión lograda, junto con la desaparición de las señales típicas de alquino. En el espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$ , a su vez, pueden distinguirse las señales del carbono cuaternario del triazol (C-4), a 130.9-145.5 ppm, y de C-5 a 123.9-124.7 ppm. Estos datos se muestran en la tabla 5.1.

**Tabla 5.1.** Selección de datos de RMN para los derivados triazólicos protegidos.<sup>a</sup> En CD<sub>3</sub>OD. <sup>b</sup>En (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO.

Compuesto	46	47	48	49	50	51	52
C-5	124.7	124.2	124.2	124.0	124.2	124.0	123.9
C-4	130.9	137.4	142.3	145.4	142.2	142.4	145.5
H-5	7.37*	7.87	7.91	7.71	7.87	7.92	7.70

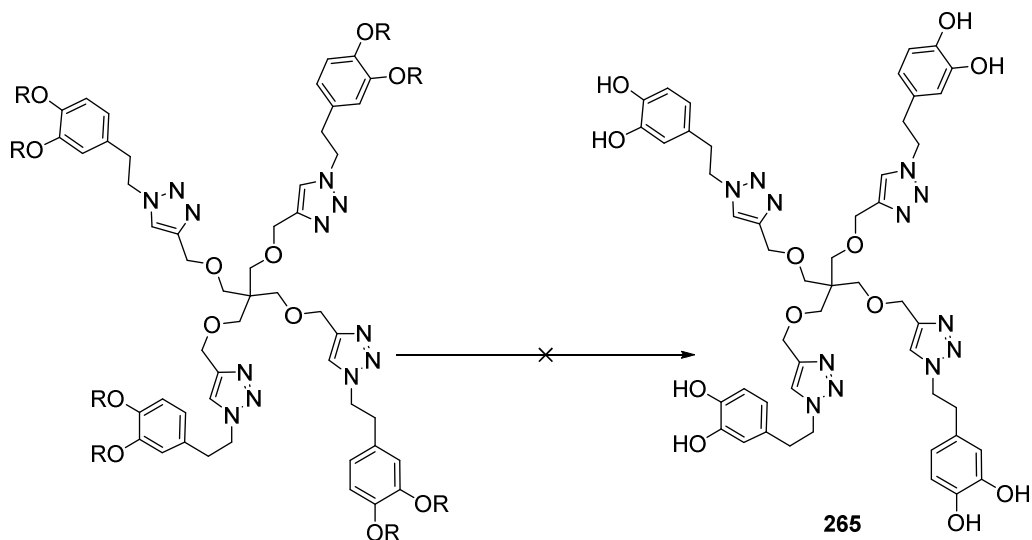
La desprotección de los hidroxilos fenólicos presentó mayores dificultades de lo esperado en todos los casos. Así, el derivado divalente con grupos benzoílo pudo ser desprotegido tanto en condiciones ácidas (HCl) como en condiciones ligeramente básicas (acetato amónico) pero ambas a elevada temperatura (90°C). (Esquema 5.6). Los rendimientos excelentes en ambos casos (91 y 87% respectivamente); no obstante, para el derivado trivalente, los intentos de desprotección de los grupos acetato y benzoato usando las mismas condiciones que las mostrada en el esquema 5.6 fueron infructuosos. Así pues, la única estrategia que permitió su desprotección fue la hidrogenación catalítica sobre los grupos xilileno (Esquema 5.7).

**Esquema 5.6.** Desprotección del derivado divalente **53**.



**Esquema 5.7.** Desprotección del derivado trivalente **54**.

Para el derivado tetravalente, se ensayó la desprotección de los grupos hidroxilo fenólicos bajo diversas condiciones. Así pues, para el derivado benzoilado se intentó tanto la hidrólisis ácida (en metanol bajo calentamiento con HCl y Amberlita IR120 ( $\text{H}^+$ )), como la hidrólisis básica ( $\text{Et}_3\text{N}$  en MeOH a reflujo). Todos estos intentos resultaron infructuosos, ya que se obtuvieron mezclas de productos parcialmente desprotegidos, que no pudieron ser separados de manera eficaz. Asimismo, se intentó la desprotección de los grupos acetato mediante hidrólisis básica empleando  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  metanólicos, estos procedimientos tampoco resultaron exitosos (Esquema 5.8).

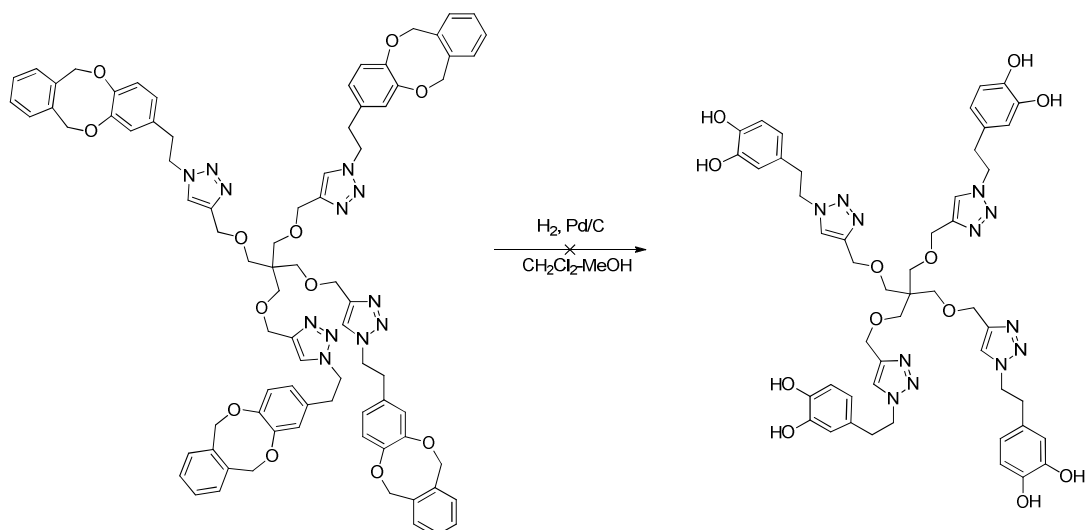


Condiciones ensayadas:

- |      |  |      |               |
|------|--|------|---------------|
| R=Bz | a) HCl, MeOH-THF 1:1                       | R=Ac | f) $K_2CO_3$  |
|      | b) $Et_3N$ -MeOH- $H_2O$ , 1:5:1, $\Delta$ |      | g) $Cs_2CO_3$ |
|      | c) $NH_4OAc$ , 80°C                        |      |               |
|      | d) Amberlita, IR120, 40°C                  |      |               |
|      | e) Dowex 1-x8                              |      |               |

**Esquema 5.8.** Intentos de desprotección de los derivados tetraivalentes **50** y **51** en condiciones ácidas y básicas.

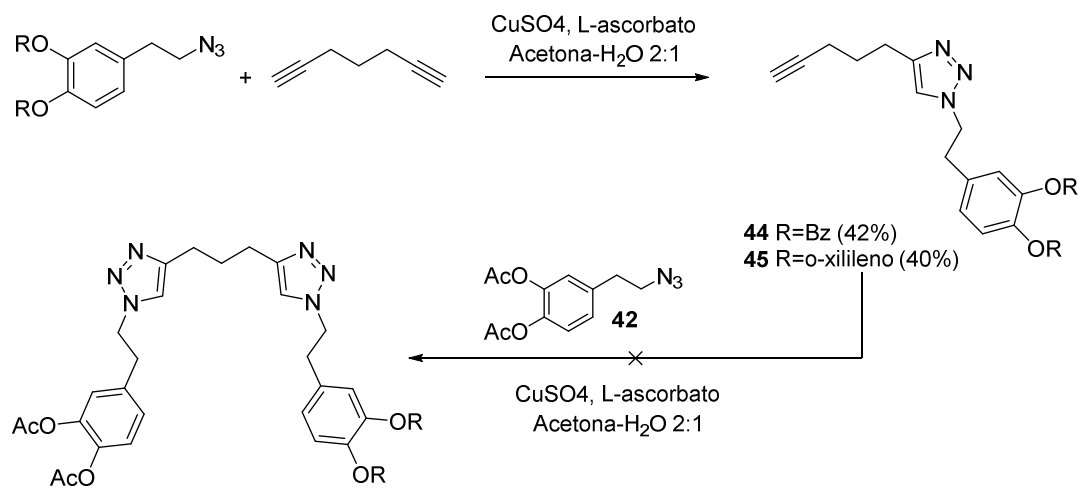
Tampoco la desprotección del grupo xilileno condujo al producto final deseado, tras ensayarse la hidrogenación catalítica empleando Pd/C o  $Ph(OH)_2/C$  como catalizadores, y condiciones de presión de 1 a 34 atmósferas (Esquema 5.9).



**Esquema 5.9.** Intento de desprotección del derivado tetravalente **52** mediante hidrogenación catalítica.

Este resultado se pudo comprobar por  $^1\text{H-RMN}$ , ya que, aunque por un lado se observó la pérdida de la señal de los singuletes correspondientes a los grupos  $\text{CH}_2\text{O}$  del xilileno (5.39, 5.38 ppm), lo cual podría indicar una desprotección satisfactoria, se observan varias señales en la zona del triazol (H-5) y espectros complejos, sugiriendo una degradación del compuesto polifenólico.

De manera análoga, se planteó la síntesis de un dímero que poseyera dos fragmentos diferentes, el interés de esta síntesis radica en la obtención de compuestos no simétricos con dos anillos de triazol y distintos sustituyentes en los extremos, con las diferentes implicaciones que ello pudiera tener. Para ello, en primer lugar se efectuó la cicloadición 1,3-dipolar con una relación 1:2 de azida, lo cual se hizo tanto con la azida **43**, como con la azida **260**, obteniéndose los productos **44** y **45** con rendimientos del 42 y 40% respectivamente. Posteriormente, ambos compuestos se sometieron de nuevo a las condiciones de la cicloadición con la azida **42**, sin embargo, esta segunda vez no se obtuvo el producto deseado en ninguno de los dos casos (Esquema 5.10).



Esquema 5.10



**6. DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE  $\beta$ -CICLODEXTRINA CON DERIVADOS LIPÓFILOS DEL HIDROXITIROSO**

## 6. DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE $\beta$ -CICLODEXTRINA CON DERIVADOS LIPÓFILOS DEL HIDROXITIROSO

### 6.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos de  $\alpha$ -D-glucopiranososa que se obtienen por transglucosilación intramolecular catalizada por ciclodextrina glicosiltransferasa (EC 2.4.1.19) a partir del almidón.<sup>308</sup>

Fueron aisladas por A. Villiers en 1891 fruto de la digestión del almidón mediada por ciclodextrina glicosiltransferasa (CD-GTSA) de la bacteria *Bacillus Macerans*.<sup>309</sup> Desde entonces, su estudio ha avanzado espectacularmente, hasta convertirse en un aditivo de uso común en la industria farmacéutica, alimentaria, química y textil.

En cuanto a su perfil toxicológico, han mostrado ausencia de toxicidad debido a su baja absorción en sangre.<sup>310</sup> Este hecho ha propiciado que las ciclodextrinas hayan sido consideradas como “aditivos seguros” en diversos países, pero con distintas calificaciones; de este modo, en Japón están reconocidas como productos naturales, en Australia y Nueva Zelanda se clasifican como *Novel Foods* o alimentos funcionales desde 2004 y 2003 respectivamente y en EE.UU se han incluido en la lista GRAS (Generally Recognized as Safe, lista de la *Food and Drug Administration*, FDA) por lo que pueden comercializarse como aditivos.<sup>311</sup>

Las ciclodextrinas se caracterizan por su estructura de anillo toroidal, constituido por unidades de glucopiranososa unidas mediante enlace glicosídico en la posición  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). La existencia de grupos hidroxilos secundarios en C-2 y C-3 y grupos hidroxilos

---

<sup>308</sup> Martín del Valle, E. M. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033-1046.

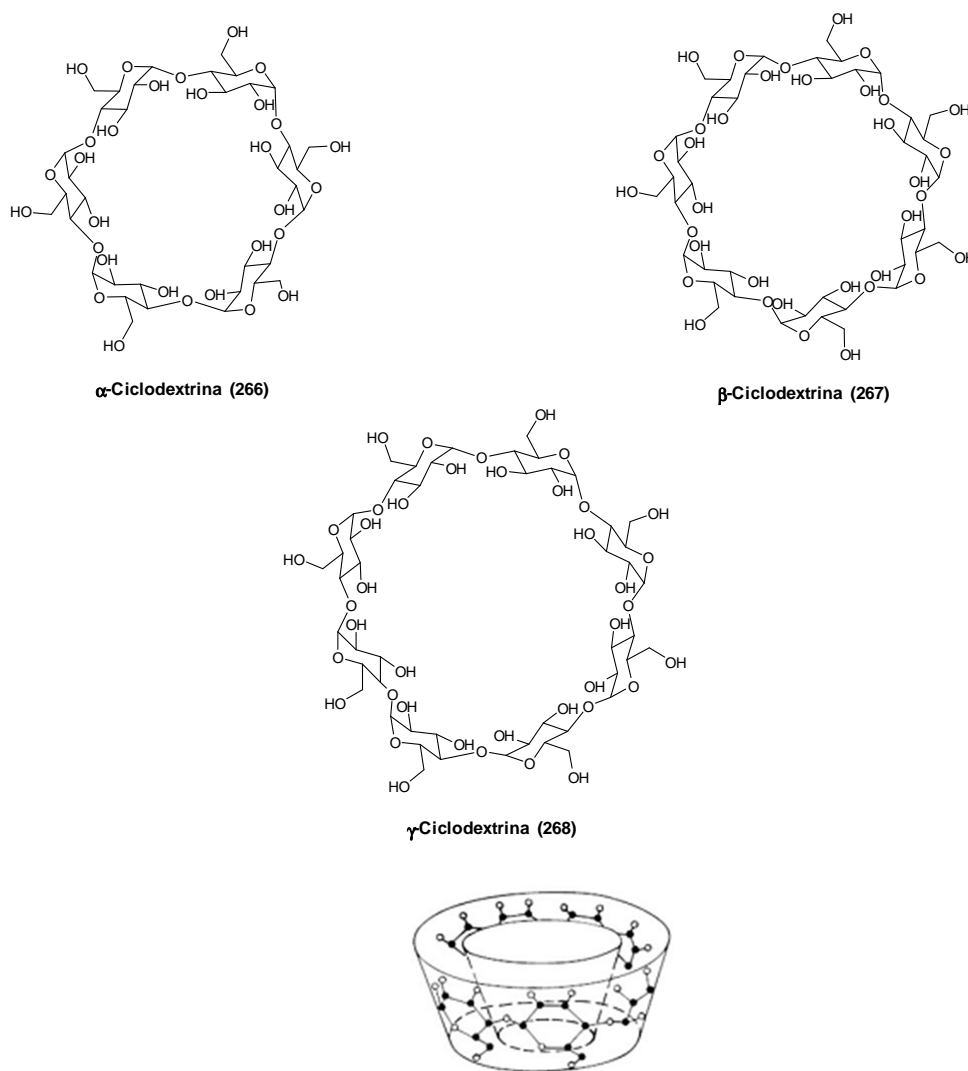
<sup>309</sup> Villiers, A. *Comp. Rend.* **1891**, *112*, 536.

<sup>310</sup> Loftsson, T.; Brewster, M.E. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101*, 3019-3032.

<sup>311</sup> Cravotto, G.; Binello, A.; Baranelli, E.; Carraro, P.; Trotta, F. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2006**, *2*, 343-350.

primarios en los C-6 les hace poseer una superficie externa hidrofílica y una cavidad interna hidrofóbica.

Las tres principales ciclodextrinas son las denominadas  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina, constituidas por 6, 7 y 8 unidades de glucopiranososa respectivamente (Figura 6.1).



**Figura 6.1**

En la tabla 6.1 se muestran algunas propiedades físicas las tres ciclodextrinas más relevantes.<sup>308,312,313</sup>

<sup>312</sup> Li, J.; Loh, X.J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1000-1017.

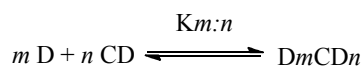
<sup>313</sup> Loftsson, T.; Duchêne, D. *Int. J. Pharm.* **2007**, *329*, 1-11.

**Tabla 6.1.** Propiedades físicas de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD

Propiedad física	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Unidades de glucopiranososa	6	7	8
Altura del toroide (Å)	7.9	7.9	7.9
Ø cavidad interna (Å)	4.5-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Ø cavidad externa (Å)	14.6	15.4	17.5
Solubilidad H <sub>2</sub> O (25° C, g/100 mL)	14.5	1.85	2.32
Volumen cavidad (Å <sup>3</sup> )	174	262	427

Debido a esta particular estructura, en disolución acuosa y en presencia de sustratos hidrófobos, las ciclodextrinas forman lo que se denomina complejos de inclusión, en los que las moléculas de agua de la cavidad central son desplazadas por moléculas hidrófobas o bien por moléculas que sean menos polares que el agua, debido a la formación de interacciones intermoleculares de naturaleza hidrofóbica anfitrión-huésped de tipo van der Waals.<sup>314</sup> Independientemente de las interacciones huésped-CD, la geometría del huésped, su polaridad y la temperatura son factores determinantes en la estabilidad del complejo formado.<sup>315</sup>

Todos los procesos de complejación son de tipo reversible:<sup>316</sup>



Donde  $m$  moléculas del compuesto huésped  $D$  se asocian con  $n$  moléculas de  $CD$  para formar un complejo de estequiometría  $m:n$ .  $K_{m:n}$  es la constante de equilibrio del proceso, o constante de asociación, que también se puede expresar del modo siguiente:

$$K_{m:n} = \frac{[D_m CD_n]}{[D]^m [CD]^n}$$

En la que los corchetes denotan concentraciones molares de cada especie.

<sup>314</sup> Andrade-Dias, C.; Goodfellow, B.J.; Cunha-Silva, L.; Teixeira-Dias, J.J.C. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *57*, 151-156.

<sup>315</sup> Martina, K.; Cravotto, G. *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*, CRC Press, **2012**, 593-603.

<sup>316</sup> Kurkov, S.V.; Loftsson, T. *Int. J. P.* **2013**, *453*, 167-180.

La formación de este tipo de complejos modifica las propiedades físico-químicas de la molécula huésped.<sup>308</sup>

- Aumentando su solubilidad en agua
- Estabilizando moléculas sensibles a la luz, al calor o a la oxidación

Por estas razones, las ciclodextrinas se usan como aditivos en alimentación, fármacos, cosméticos, protección medioambiental, embalajes y en la industria textil.<sup>308</sup>

En la *industria alimentaria*, tras demostrarse el carácter inocuo en la administración de ciclodextrinas por vía oral, se ha aprobado su uso como aditivos con los siguientes fines:<sup>317</sup>

- Proteger componentes lipofílicos de alimentos sensibles al oxígeno y la luz.
- Solubilizar colorantes alimentarios y vitaminas.
- Estabilizar fragancias, sabores, vitaminas y aceites esenciales frente a reacciones indeseables.
- Suprimir olores y sabores desagradables.
- Conseguir la liberación controlada de ciertos componentes alimentarios.
- Evitar la contaminación microbiológica.

Ello es posible debido a la estabilidad de las CD frente a temperaturas moderadas, y a procesos de congelación, descongelación e irradiación de microondas.<sup>315</sup>

En la *industria farmacéutica*, las ciclodextrinas se emplean para solubilizar fármacos en agua de modo que se facilite su administración oral. Los fármacos deben tener cierta solubilidad en agua para alcanzar la membrana celular, pero también cierta lipofilia para cruzarla; una particularidad de las ciclodextrinas es su capacidad para aumentar la biodisponibilidad a través de membranas, al actuar como transportadores al mantener fármacos hidrofóbicos en disolución y suministrarlos a la membrana biológica.. Además,

---

<sup>317</sup> Astray, G.; González-Barreiro, C.; Mejuto, J.C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. *Food Hydrocolloid* **2009**, *23*, 1631-1640.

la complejación con CD aporta resistencia a la hidrólisis, oxidación, calor, luz y descomposición por iones metálicos.<sup>308</sup>

En *cosmética*, el empleo de CD aporta como beneficios la estabilización, control del olor, aumento de la solubilidad en agua y de la estabilidad térmica en aceites y mejora del procesado al convertir un ingrediente líquido en sólido tras su complejación. La interacción de la molécula huésped con la CD genera un incremento en la barrera energética que evita la volatilización de las mismas, generándose así fragancias duraderas. Se han descrito formulaciones en las cuales que incluyen el empleo de CD en dentífricos, cremas faciales, suavizantes, pañuelos desechables y desodorante<sup>318</sup>

En el área de la *química analítica*, las ciclodextrinas se emplean en la separación de isómeros y enantiómeros por HPLC o GC mediante la inmovilización de las mismas en la fase estacionaria y en la purificación de productos al retirar compuestos indeseados de mezclas de reacción. En técnicas electroquímicas, pueden usarse para enmascarar compuestos contaminantes, permitiendo así determinaciones más precisas.<sup>319,320</sup>

El empleo de CD como *catalizadores* se debe a su capacidad de mimetizar enzimas, lo que se consigue al introducir diferentes grupos funcionales en la cara primaria o secundaria de la molécula, de modo que se produce el fenómeno de reconocimiento molecular y aceleración de ciertas reacciones.<sup>321</sup>

En el área de *protección medioambiental*, las ciclodextrinas se han usado en remediación de suelos al complejar contaminantes orgánicos.<sup>321</sup> La descontaminación de efluentes procedentes de la industria y de aguas contaminadas es también posible ya que las ciclodextrinas forman complejos de inclusión con una amplia variedad de productos

---

<sup>318</sup> Buschmann, H.J.; Schollmeyer, E. *J. Cosmet. Sci.* **2002**, *53*, 575-592.

<sup>319</sup> Shahgaldian, P.; Pieleles, U. *Sensors* **2006**, *6*, 593-615.

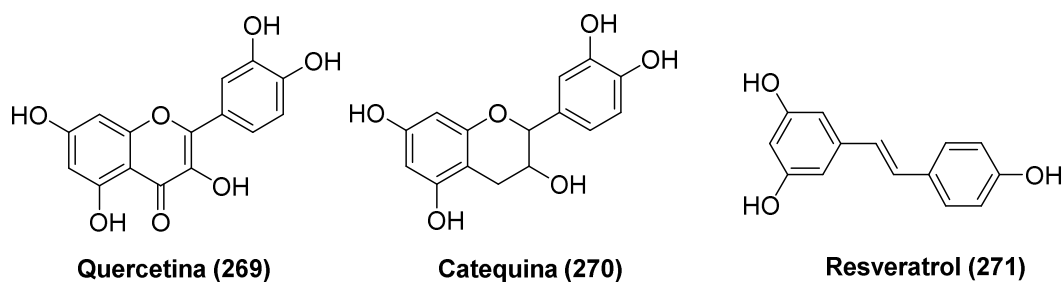
<sup>320</sup> Tang, W.; Choon, S. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 3246-3256

<sup>321</sup> Breslow, R.; Dong, S.D. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1997-2011.

agroquímicos incluyendo herbicidas, insecticidas, fungicidas y repelentes. Por otra parte, la  $\beta$ -CD ayuda a la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados.<sup>322308</sup>

Todas estas importantes aplicaciones han provocado que en los últimos años se hayan estudiado los complejos de inclusión de multitud de moléculas orgánicas de diversa naturaleza.

En relación con los compuestos fenólicos, uno de sus principales problemas es su naturaleza foto y termosensible, lo que limita su uso en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, especialmente bajo ciertas condiciones de almacenamiento o procesado.<sup>323</sup> Los antecedentes bibliográficos sugieren que las ciclodextrinas ejercen un efecto protector sobre algunos compuestos de naturaleza flavonoide y en general polifenólica frente a su degradación oxidativa sin alterar por ello su potencial actividad antioxidante. Por ejemplo, se ha comprobado que la complejación de los flavonoles quercetina y catequina con  $\beta$ -CD al inducirse su oxidación con ácido nitroso.<sup>324</sup> En el caso del resveratrol, la complejación con  $\beta$ -CD, y especialmente con hidroxipropil- $\beta$ -CD, inhibe su degradación enzimática.<sup>325</sup>



La complejación con  $\beta$ -CD del extracto de hoja del olivo, cuyos principales constituyentes son secoiridoides como la oleuropeína, el ligustrósido, la desmetiloleuropeína y el oleósido, flavonoides como la apigenina, kaempferol y luteolina

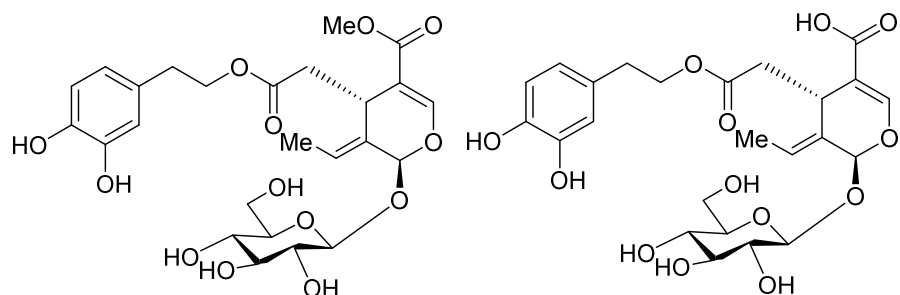
<sup>322</sup> Landy, D.; Mallard, I.; Ponchel, A.; Monflier, E.; Fourmentin, S. *Environ. Chem. Lett.*, **2012**, *40*, 225-237.

<sup>323</sup> Benítez, P.; Castro, R.; Natera, R.; García Barroso, C.; *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *222*, 302-309

<sup>324</sup> Khalafi, L.; Raffie, M.; Sedaghat, S. *Spectrochim. Acta Part A*, **2001**, *81*, 661-665.

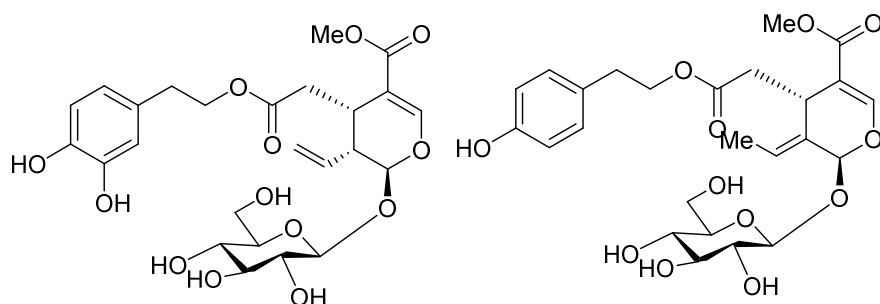
<sup>325</sup> Lucas-Abellán, C.; Fortea, I.; López-Nicolás, J.M.; Núñez-Delicado, E. *Food Chem.* **2007**, *104*, 39-44.

y compuestos fenólicos como el ácido cafeico, ha resultado ser eficiente frente a su descomposición térmica.<sup>326</sup>



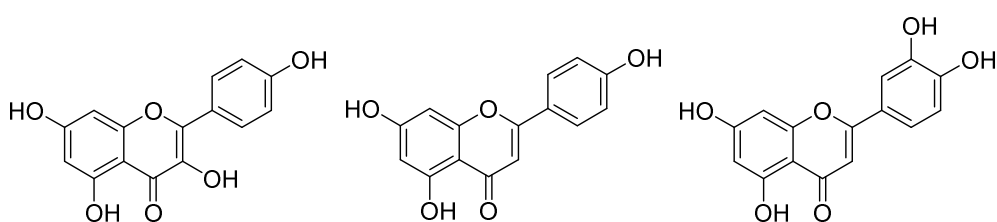
Oleuropeína (60)

Desmetiloleuropeína (272)



Oleurósido (273)

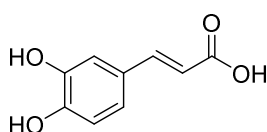
Ligustrósido (274)



Kaempferol (275)

Apigenina (55)

Luteolina (56)



Ácido cafeico (124)

Resultados recientes en nuestro grupo de investigación, demuestran una importante fotoprotección del HT en presencia de la  $\beta$ -CD al irradiarse con radiación

<sup>326</sup> Mourtzinis, I.; Salta, F.; Yannakopoulou, K.; Chiou, A.; Karathanos, V.T. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8088-8094.



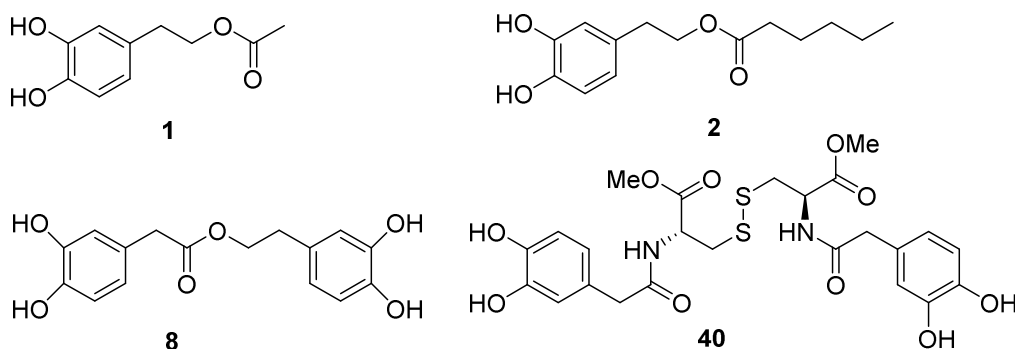
UV.<sup>327</sup> Además, la ciclodextrina se comportó como un antioxidante secundario al mejorar moderadamente la actividad antirradicalaria del HT. De esta manera, cabría esperar resultados similares para los derivados polifenólicos sintetizados en la presente Tesis Doctoral.

---

<sup>327</sup> López-García, M.Á.; López, Ó.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J.G.; *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 8006-8011.

## 6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se ha estudiado la formación de complejos de inclusión entre la  $\beta$ -CD y los compuestos polifenólicos **1**, **2**, **8** y **40** tomados como modelo mediante técnicas de  $^1\text{H}$ -RMN. Estos complejos de inclusión podrían mejorar la solubilidad de los compuestos polifenólicos en medios acuosos, así como ralentizar procesos de degradación oxidativa.



Se ha tomado como molécula anfitrión la  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), ya que su diámetro interno permite la complejación eficiente de compuestos aromáticos de tamaño mediano y de derivados heterocíclicos. Existen además estudios que demuestran que la  $\beta$ -CD para uso clínico es menos irritante que la  $\alpha$ -CD tras su inyección intramuscular, compleja al colesterol, con la consecuente importancia de esto en la prevención de enfermedades coronarias, y se digiere en el tracto intestinal tras su administración oral (1-2%), motivos por los cuales actualmente es la ciclodextrina más empleada en fármacos y la más extensamente estudiada en humanos.<sup>308</sup>

### 6.2.1. Determinación de la estequiometría de los complejos de inclusión

La estequiometría de todos estos complejos se ha deducido empleando el método de variación continua, también denominado representación de Job, donde se estudia la variación de desplazamiento químico para las disoluciones de huésped/ $\beta$ -CD en  $\text{D}_2\text{O}$ -DMSO (10%) de una señal del huésped al modificar su proporción respecto a la CD, pero

manteniendo constante la suma de las concentraciones de ambos,<sup>328</sup> en los casos presentados, la suma de ambas concentraciones se mantuvo siempre en 12.0 mM. La fracción molar de la molécula huésped,  $r_{\text{huésped}}$ , se define como se muestra en la ecuación 6.1.

$$r_{\text{éster}} = \frac{[\text{huésped}]_0}{[\text{huésped}]_0 + [\beta\text{-CD}]_0}$$

**Ecuación 6.1.** Fracción molar de molécula huésped.

Este rango se varió de 0.1 a 0.9 en intervalos de 0.1. En las tablas 6.2 y 6.3 se muestra la variación de desplazamiento químico de las señales estudiadas. Para el caso de los compuestos **1** y **2** se estudió la diferencia de desplazamiento químico de la señal correspondiente al protón aromático H-5'; para el compuesto **8** sobre la señal de CH<sub>2</sub>Ar y para el compuesto **40** de la señal asignada a CH<sub>2</sub>S.

La variación de los desplazamientos químicos, tanto en la molécula huésped como en el hospedador, al modificar sus concentraciones relativas, demuestra la formación de un complejo de inclusión.

En todos los casos, se observó un apantallamiento creciente en las señales estudiadas al aumentar la concentración de la molécula huésped. Además, en todos los casos se observó un único conjunto de señales, tanto para la molécula huésped como para la CD, lo cual confirma un rápido intercambio entre las formas libres y asociadas.<sup>329</sup>

---

<sup>328</sup> Cruz, J. R.; Becker, B. A.; Morris, K. F.; Larive, C. K.; *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 838-845.

<sup>329</sup> Funakasi, N.; Ishikawa, S.; Neya, S. *J. Phys. Chem. B*, **2003**, *107*, 10094-10099.

**Tabla 6.2.** Diferencias en los desplazamientos químicos de H-5' (compuestos **1** y **2**) y CH<sub>2a</sub>S para **40**.

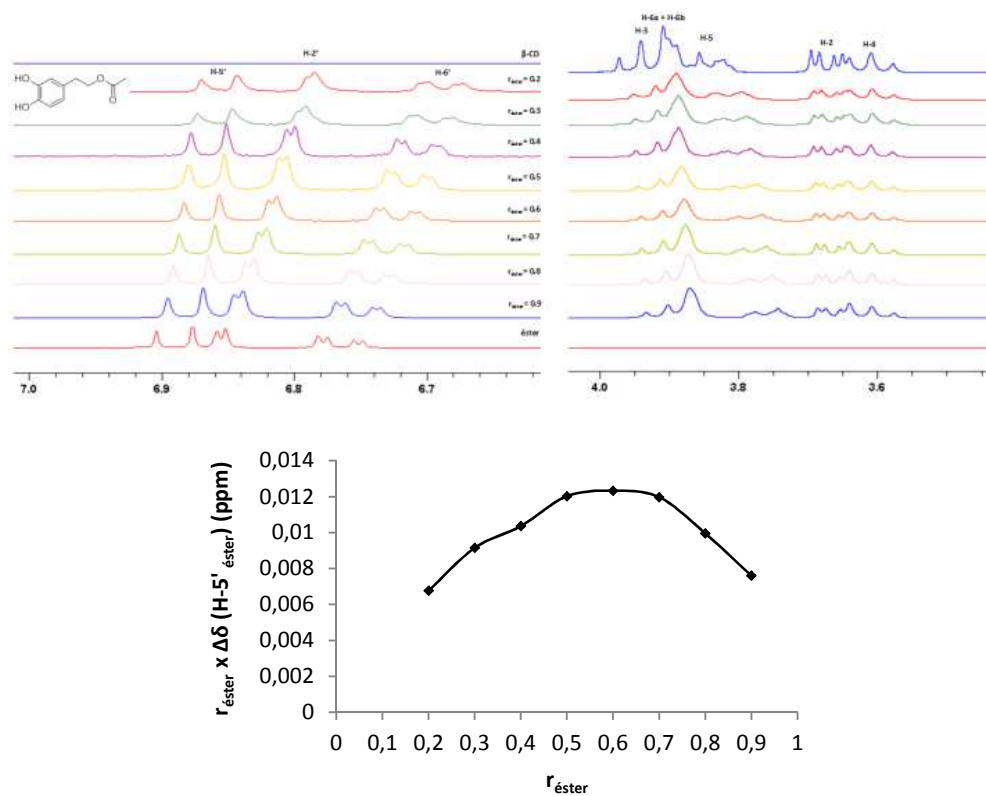
[Compuesto] (mM)	[ $\beta$ - CD] (mM)	$r_{\text{compuesto}}$	$\delta_{\text{H5'libre}} - \delta_{\text{H5'comp.}}$ Compuesto 1	$\delta_{\text{H5'libre}} - \delta_{\text{H5'comp}}$ Compuesto 2	$\delta_{\text{CH2aSlibre}} - \delta_{\text{CH2aScomp}}$ Compuesto 40
10.8	1.2	0.9	$-8.45 \cdot 10^{-3}$	$7.65 \cdot 10^{-3}$	$6.39 \cdot 10^{-3}$
9.6	2.4	0.8	$-1.23 \cdot 10^{-2}$	$1.16 \cdot 10^{-3}$	$1.10 \cdot 10^{-2}$
8.4	3.6	0.7	$-1.71 \cdot 10^{-2}$	$2.42 \cdot 10^{-3}$	$1.44 \cdot 10^{-2}$
7.2	4.8	0.6	$-2.06 \cdot 10^{-2}$	$2.64 \cdot 10^{-3}$	$1.68 \cdot 10^{-2}$
6.0	6.0	0.5	$-2.41 \cdot 10^{-2}$	$5.10 \cdot 10^{-3}$	$1.87 \cdot 10^{-2}$
4.8	7.2	0.4	$-2.59 \cdot 10^{-2}$	$2.84 \cdot 10^{-3}$	$1.79 \cdot 10^{-2}$
3.8	8.4	0.3	$-3.05 \cdot 10^{-2}$	$2.12 \cdot 10^{-3}$	$1.56 \cdot 10^{-2}$
2.4	9.6	0.2	$-3.38 \cdot 10^{-2}$	$9.80 \cdot 10^{-4}$	$1.17 \cdot 10^{-2}$
1.2	10.8	0.1	-	$5.10 \cdot 10^{-4}$	$6.63 \cdot 10^{-3}$

**Tabla 6.3.-** Diferencias en el desplazamiento químico de CH<sub>2</sub>Ar del compuesto **8**

[Compuesto] (mM)	[ $\beta$ -CD] (mM)	$r_{\text{éster}}$	$\delta_{\text{CH2Ar libre}} - \delta_{\text{CH2Ar comp}}$
10.5	1.5	0.875	0.0046
9.0	3.0	0.75	0.0086
7.5	4.5	0.625	0.0132
6.0	6.0	0.5	0.018
4.5	7.5	0.375	0.024
3.0	9.0	0.25	0.0304
1.5	10.5	0.125	0.0297

La estequiometría del complejo se obtiene a partir del máximo de la llamada representación de Job ( $r_{\text{huésped}} \times \Delta\delta(\text{H}_{\text{huésped}})$  vs.  $r_{\text{huésped}}$ ). En todos los casos se observa en la gráfica un máximo a  $r = 0.5$ , que correspondería a una estequiometría 1:1 del complejo

huésped/ $\beta$ -CD. La alta simetría de las gráficas corrobora además dicha estequiometría, ya que si existiera la posibilidad de formación de varios complejos, resultarían curvas asimétricas.<sup>330</sup>



**Figura 6.2.** Desplazamientos químicos y gráfica de Job para el compuesto **1**.

<sup>330</sup> Rodrigues, E.; Vaz, S.; Gil, V.M.S.; Caldeira, M.M.; Moreira da Silva, A.M.G. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *44*, 395-397

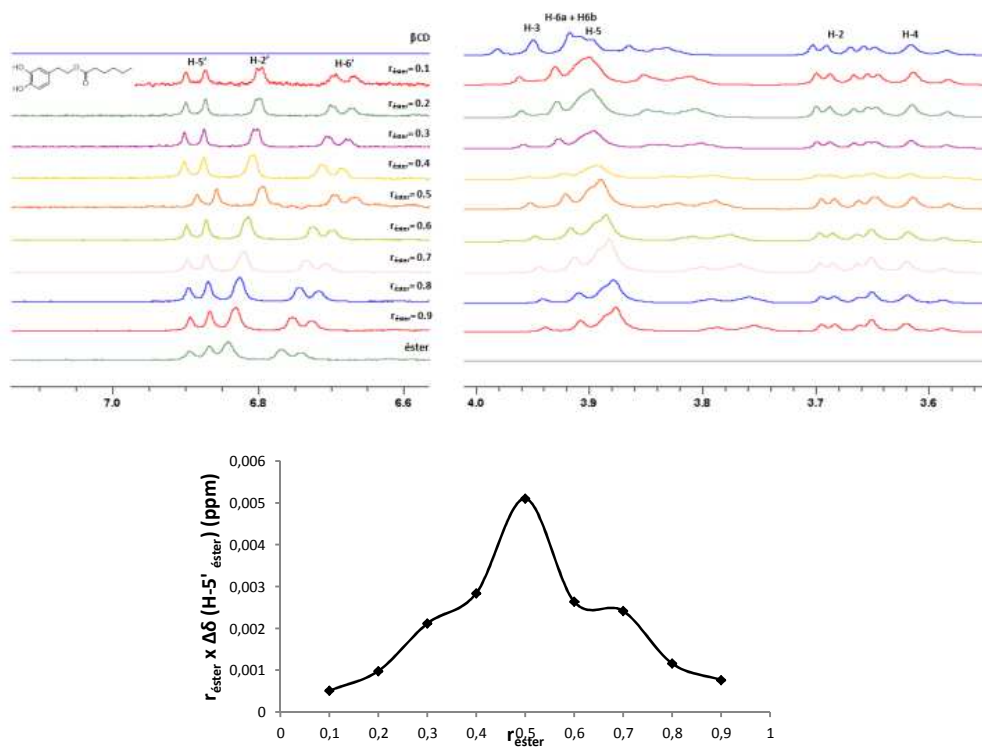


Figura 6.3. Desplazamientos químicos y gráfica de Job para el compuesto 2.

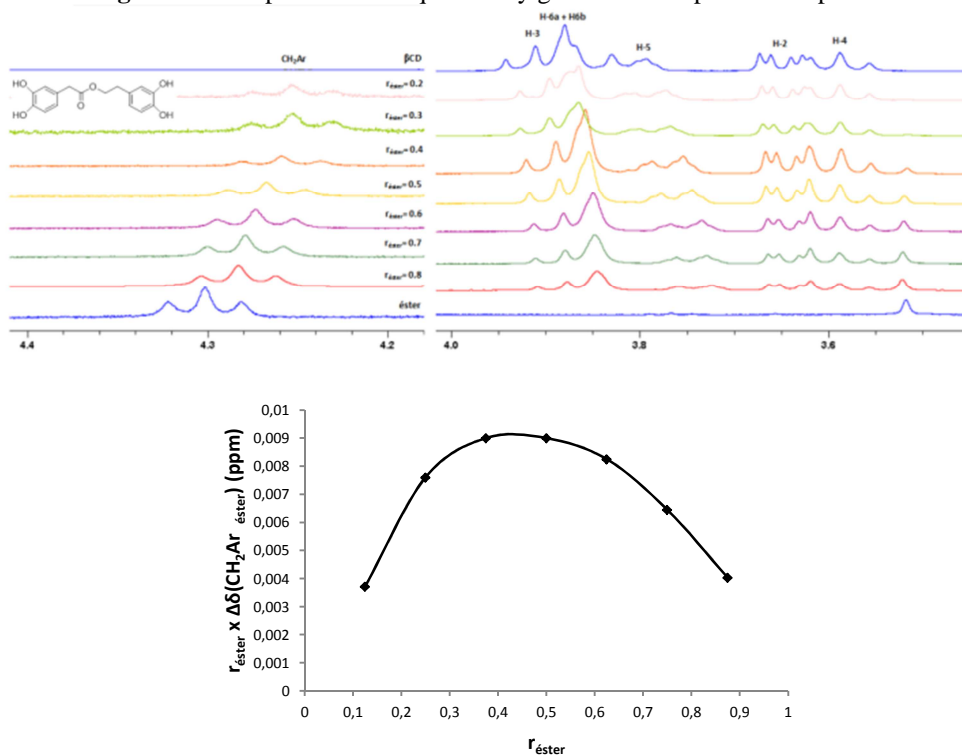


Figura 6.4. Desplazamientos químicos y gráfica de Job para el compuesto 8.

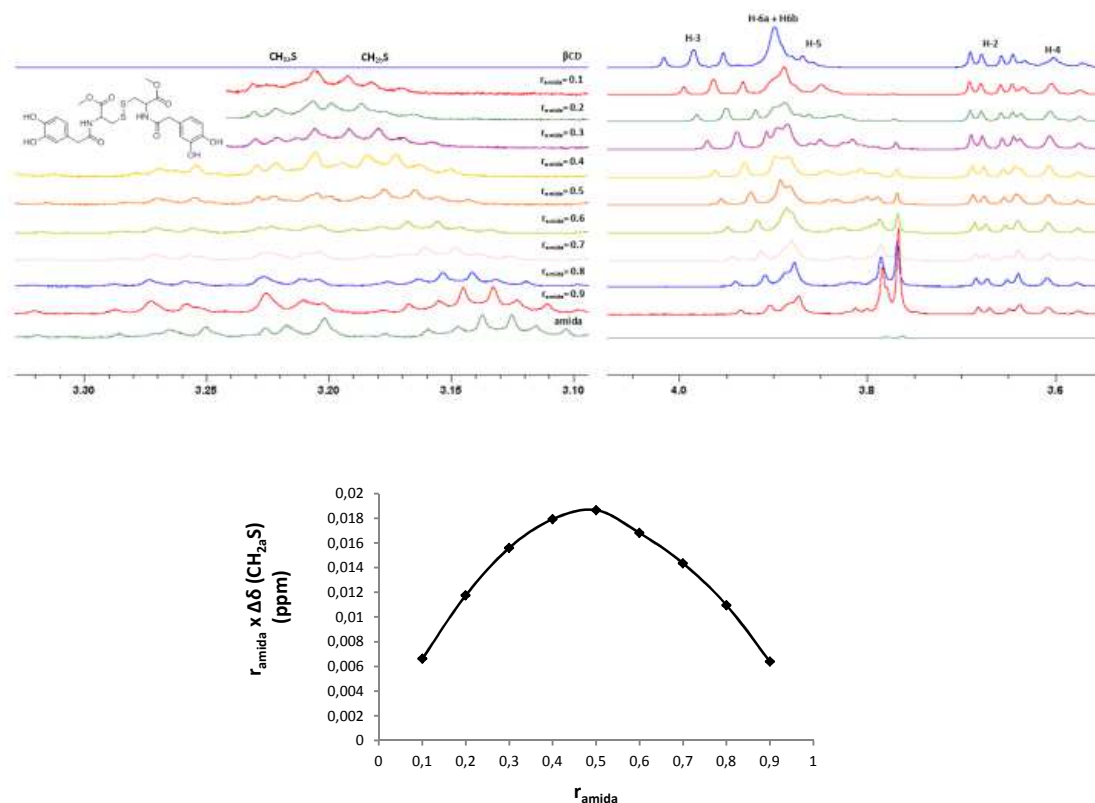


Figura 6.5. Desplazamientos químicos y gráfica de Job para el compuesto 40.

### 6.2.2. Determinación de las constantes de asociación de los complejos de inclusión.

Para el cálculo de la constante de asociación ( $K_a$ ) del complejo de inclusión formado por los ésteres y  $\beta$ -CD se ha empleado la representación de Scott, una modificación de la conocida aproximación de Benesi-Hildebrand<sup>331</sup> (Ecuación 6.2). En esta representación se mantiene constante la concentración del compuesto a estudiar y se modifica la de  $\beta$ -CD.

$$\frac{[\beta - CD]}{\Delta\delta_{\text{obs}}} = \frac{[\beta - CD]}{\Delta\delta_c} + \frac{1}{K_a\Delta\delta_c}$$

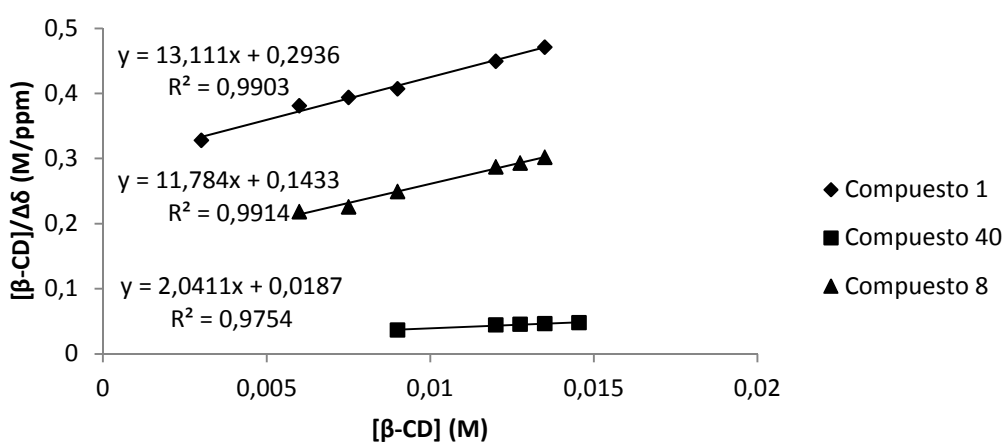
**Ecuación 6.2.** Ecuación de Scott.

<sup>331</sup>Ali, S. M., Upadhyay, S. K.; *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 676-679.

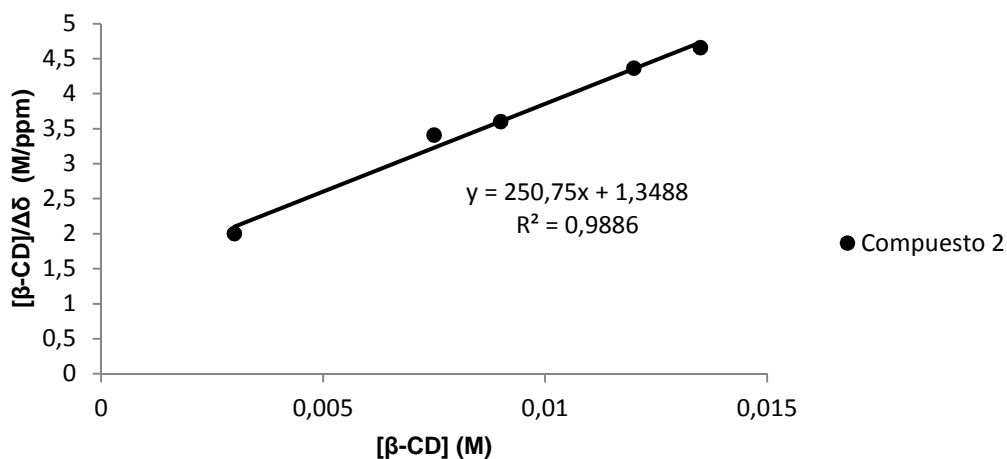
Donde  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  es la diferencia de desplazamiento químico observada,  $\Delta\delta_c$  representa la diferencia en el desplazamiento químico en condiciones de saturación (cuando todo el huésped se ha complejoado),  $[\beta\text{-CD}]$  es la concentración molar de  $\beta$ -CD, y  $K_a$  es la constante de asociación.

La diferencia en el desplazamiento químico se estudió para cada compuesto en las mismas señales empleadas anteriormente para ecuación de Job.

Como puede observarse, en todos los casos la representación de Scott conduce a una línea recta (Gráficas 6.1 y 6.2), lo que es de nuevo indicativo de que la estequiometría del complejo de inclusión es 1:1.



Gráfica 6.1. Gráfica de Scott para los compuestos 1, 8 y 40.



Gráfica 6.2. Gráfica de Scott para el compuesto 2.



La pendiente de la gráfica,  $1/\Delta\delta_c$ , permitió la determinación de  $\Delta\delta_c$ , mientras que la intercepción con el eje axial,  $1/K_a\Delta\delta_c$ , proporcionó el valor de la constante de asociación  $K_a$ . Además, considerando el valor de  $\Delta\delta_c$  para cada complejo, y que los experimentos se han realizado en un espectrómetro de 300 MHz, se ha estimado la frecuencia de intercambio,<sup>328</sup> es decir, el número de veces por segundo que se produce el fenómeno de inclusión y liberación de la molécula huésped en la ciclodextrina, que resulta de multiplicar la frecuencia de resonancia por la diferencia en el desplazamiento químico en condiciones de saturación,  $\Delta\delta_c$  (Tabla 6.4).

**Tabla 6. 4.** Constantes de asociación y frecuencia de intercambio en el equilibrio de los complejos.

Compuesto	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	Frecuencia de intercambio (veces/s)
<b>1</b>	45	23
<b>2</b>	186	1
<b>8</b>	82	25
<b>40</b>	70	29

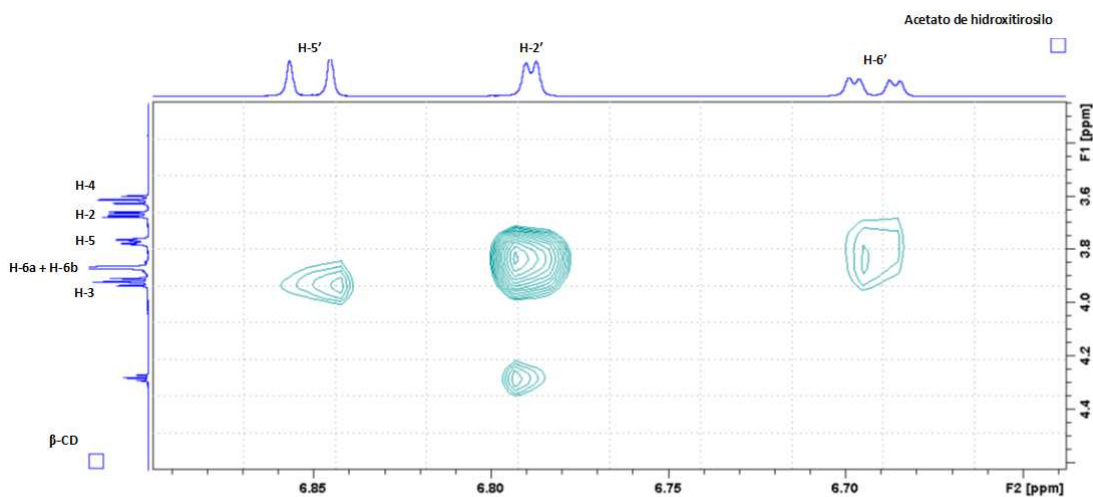
Si se comparan los resultados de  $K_a$  obtenidos con los del HT en nuestro grupo de investigación, ( $97 M^{-1}$ ),<sup>327</sup> el valor de la constante de asociación del hexanoato de 2-(3',4'-dihidroxifenil)etilo es la mayor; esto podría explicarse debido a que la introducción de una cadena alifática aumenta la lipofilia de la molécula, y en consecuencia, la afinidad para introducirse en la cavidad de la ciclodextrina. Por último, el valor de la constante de asociación de **8** y el de **40** son ligeramente inferiores al obtenido para el HT, probablemente debido al mayor tamaño de ambas moléculas.

### 6.2.3. Determinación de la estructura de los complejos de inclusión

La geometría del complejo de inclusión se caracteriza habitualmente mediante experimentos 2D-RMN como ROESY; en particular, el ROESY aporta información de la dinámica y las distancias intermoleculares promediadas de los protones implicados en la complejación, aportando así evidencias sobre la orientación en la que preferentemente entra la molécula huésped en la cavidad de la CD.<sup>331</sup>

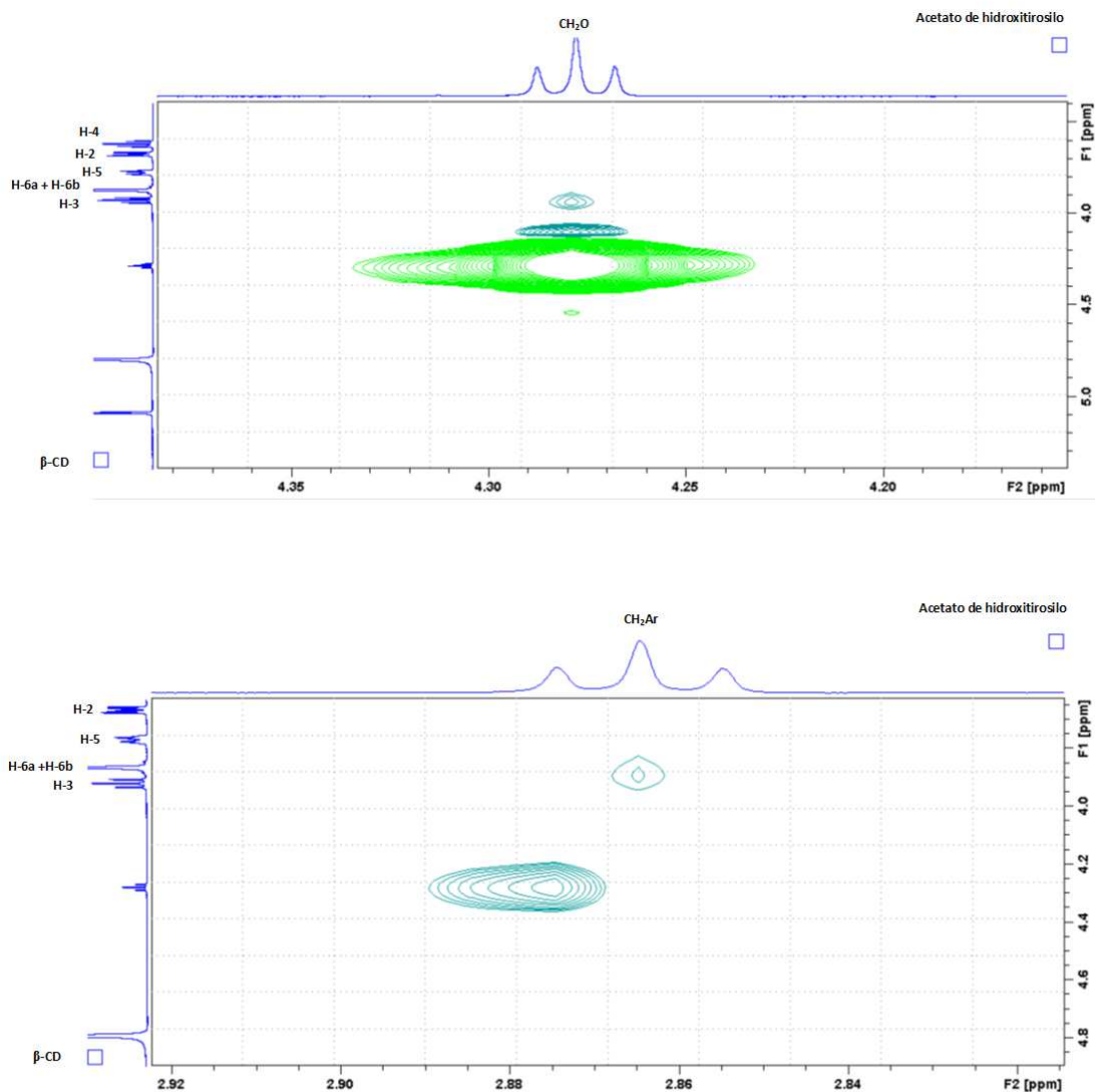
Así pues, se ha estudiado la estructura de los complejos de inclusión analizados anteriormente mediante este tipo de técnicas espectroscópicas.

En la figura 6.5 se muestra el espectro 2D ROESY de una mezcla de acetato de hidroxitirosilo/  $\beta$ -CD de fracción molar 1:1 en  $D_2O$ -DMSO- $d_6$  10%. Se aprecia la existencia de correlación de los protones aromáticos H-2' (fuerte) y H-6' (débil) con el protón H-6 de la  $\beta$ -CD, y del protón H-5' (débil) con el H-3 de la CD.



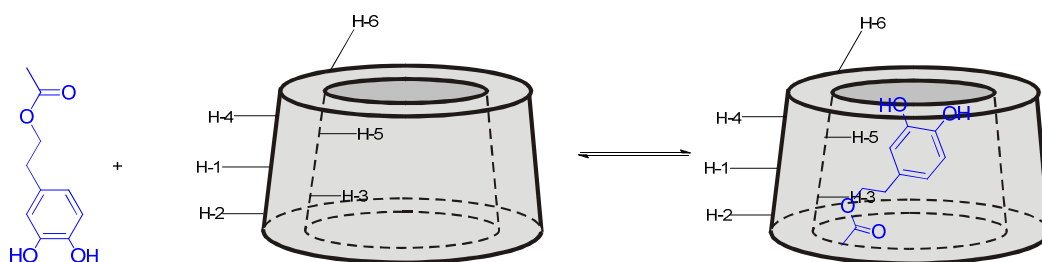
**Figura 6.5.** Ampliación del espectro Roesy para el complejo de inclusión de **1** con  $\beta$ -CD.

En cuanto a las señales alifáticas, se aprecian correlaciones de  $CH_2O$  (débil) y  $CH_2Ar$  (débil) con el protón H-3 de la CD (Figura 6.6).



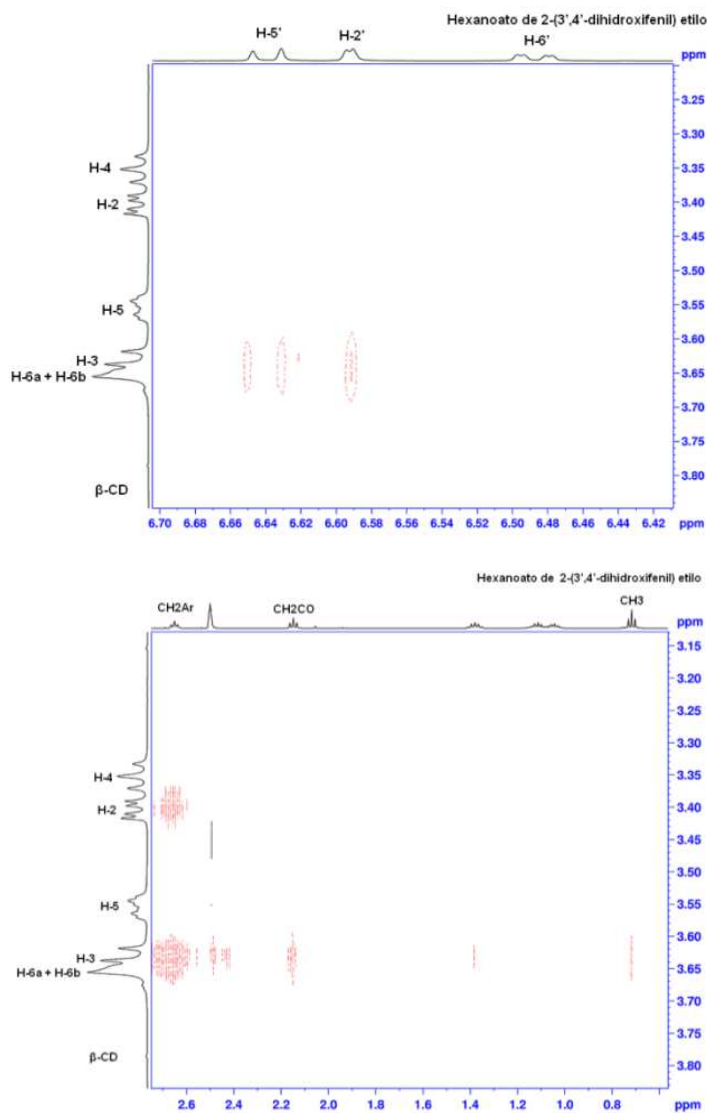
**Figura 6.6.** Ampliaciones del Espectro Röszy para el complejo de inclusión de **1** con  $\beta$ -CD.

Estas correlaciones confirman la encapsulación de la molécula dentro de la cavidad de la ciclodextrina. Los contactos NOE observados indican una fuerte penetración del fragmento aromático dejando la cadena alifática lateral cerca del anillo primario de la ciclodextrina, lo que queda confirmado con la correlación del fragmento OCH<sub>3</sub> con el protón H-1 de la ciclodextrina. De este modo, la nanoencapsulación podría tener lugar a través de la cara secundaria de la ciclodextrina.



**Figura 6.7.** Geometría postulada para el complejo de inclusión 1:1 de acetato de 2-(3',4'-dihidroxifenil) etilo- $\beta$ -CD

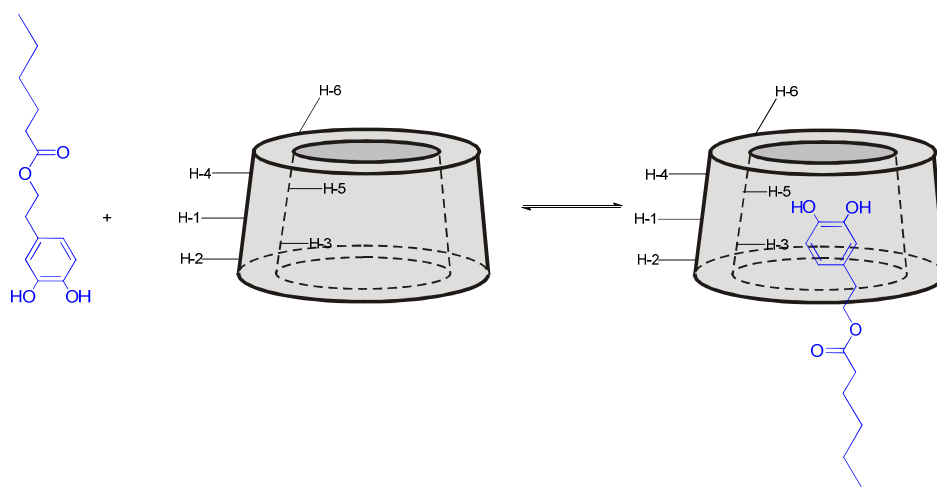
El espectro 2D ROESY de una mezcla de hexanoato de 2-(3',4'-dihidroxifenil) etilo/  $\beta$ -CD de fracción molar 1.0:1.5 en  $D_2O$ - $DMSO-d_6$  1:1 se muestra en la figura 6.8. Se observa una correlación débil de los protones H-2' y H-5' aromáticos del éster y de los protones alifáticos  $-CH_2Ar$ ,  $-CH_2CO$  y  $-CH_3$  con el protón H-3 de la  $\beta$ -CD, y del  $-CH_2Ar$  alifático del éster con el H-2 de la  $\beta$ -CD, por lo que se postula que la inclusión del éster se produce por el anillo secundario de la ciclodextrina.



**Figura 6.8.** Ampliaciones del espectro ROESY para el complejo de inclusión de **2** con  $\beta$ -CD.

Esto contrasta con los datos obtenidos para el hidroxitirosol, para el que postuló la inclusión a través del anillo primario de la  $\beta$ -CD, y con la orientación invertida. La razón para que se produzca la orientación mostrada en la figura 6.9 puede deberse a la congestión estérica producida por la cadena alifática del éster; también puede tener influencia en la orientación invertida propuesta para el complejo HT/ $\beta$ -CD la posibilidad de formación de un enlace de hidrógeno entre los OH-6 de la CD y el hidroxilo de la cadena lateral.

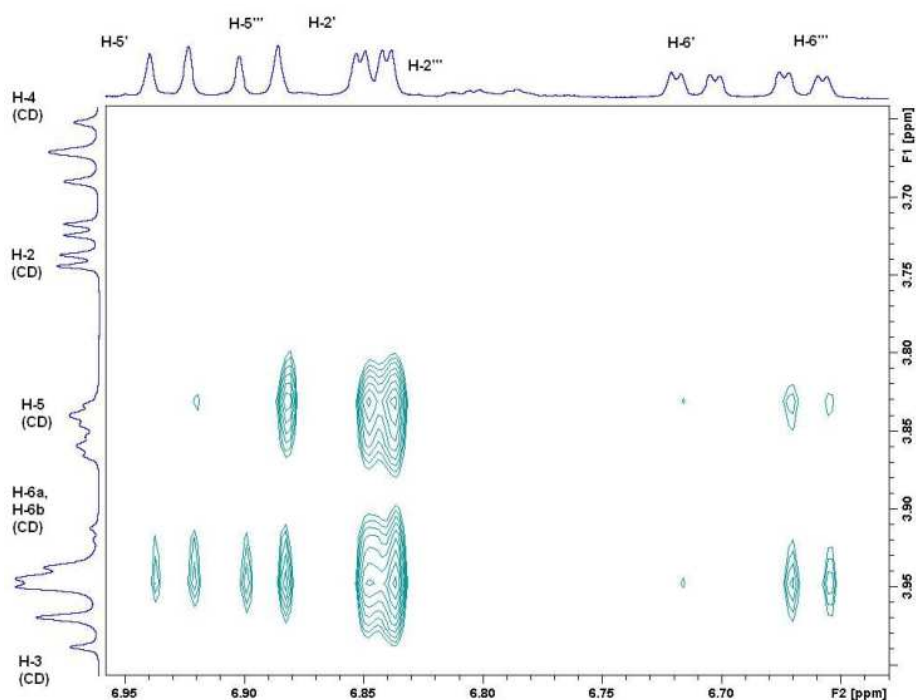
Es significativo que tanto el metilo terminal de la cadena grasa como el metileno en  $\alpha$  al carbonilo muestren señal de correlación con el protón H-3 de la CD en el espectro ROESY. Esto podría indicar cierto grado de plegamiento de la cadena grasa.



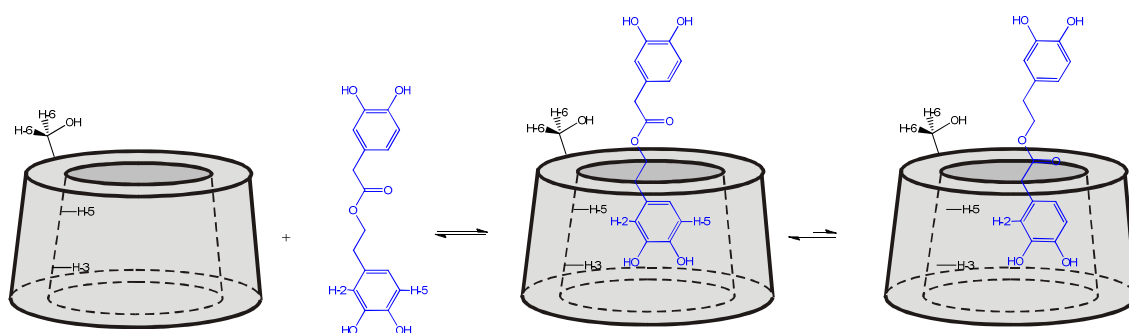
**Figura 6.9.** Geometría postulada para el complejo de inclusión 1:1 de 2- $\beta$ -CD.

Para el caso del compuesto **8**, se observa una correlación intensa entre los protones H-2 de ambos anillos aromáticos y los protones H-5 y H-6 de la ciclodextrina (próximo al anillo de menor diámetro). Asimismo, también se observa una correlación débil entre los protones H-5 de ambos anillos aromáticos (más intenso para el anillo de tipo hidroxitirosilo) y el protón H-5 de la ciclodextrina. Estos datos, unidos a la ausencia de correlación con los protones H-2 y H-4 de la ciclodextrina, situados en la superficie externa, confirman la nanoencapsulación del éster en el interior de la cavidad.

Por otro lado, la ausencia de correlación con el protón H-3 de la ciclodextrina, próximo al anillo inferior, sugiere que el éster se introduce en la ciclodextrina a través de su anillo más pequeño, quizás favorecido por la formación de enlaces de hidrógeno entre los hidroxilos situados en C-6 y el grupo carbonilo del éster. Aunque se observa correlación con el protón H-5 de la ciclodextrina y los protones aromáticos de ambos anillos, se estima que la formación del complejo de inclusión tiene lugar preferentemente con el fragmento de hidroxitirosilo (Figura 6.10).



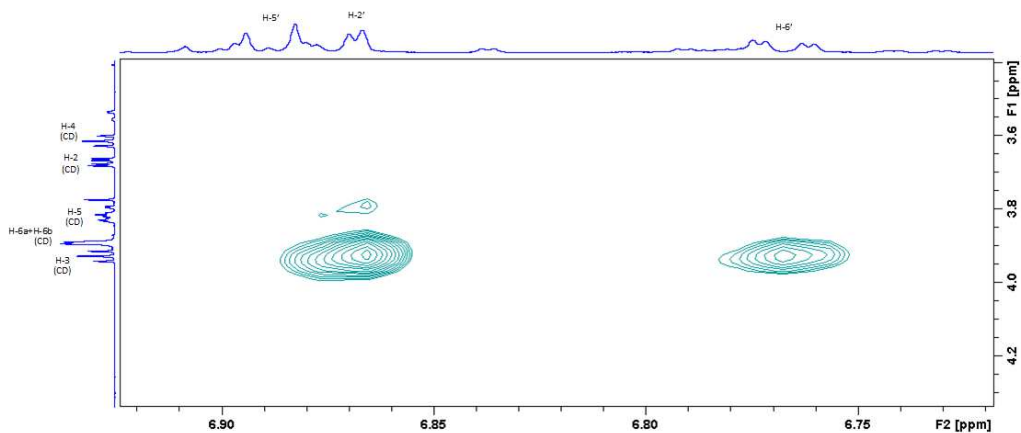
**Figura 6.10.** Ampliación del espectro ROESY para el complejo de inclusión de **8** con  $\beta$ -CD.



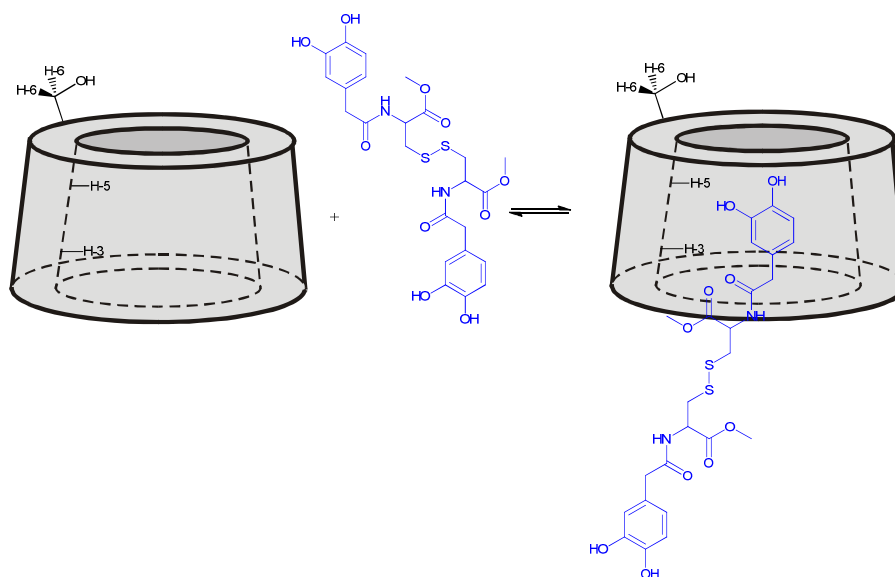
**Figura 6.11.** Geometría postulada para el complejo de inclusión 1:1 de **8**- $\beta$ -CD.

Finalmente, se estudió también la formación del complejo de inclusión de **40** con  $\beta$ -CD partiendo de ambos de fracción molar 1:1 en  $D_2O$ - $DMSO-d_6$  10% (Figura 6.12). Sólo se observa correlación de los protones H-6' y H-2' del anillo aromático con los protones H-3 y H-5 de la ciclodextrina, lo cual sugiere que solamente este fragmento de la molécula es el que penetra en la cavidad, quedando el resto en el exterior. La

complejación podría producirse a través de la cara secundaria de la molécula, al no observarse ningún tipo de interacción con el H-6 de la ciclodextrina.



**Figura 6.11.** Ampliación del espectro ROESY para el complejo de inclusión de **40** con  $\beta$ -CD



**Figura 6.12.** Geometría postulada para el complejo de inclusión 1:1 de **40**- $\beta$ -CD



## **7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

## 7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### 7.1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

#### 7.1.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo puede definirse como el grado de daño oxidativo que se genera en un organismo<sup>332</sup> como consecuencia del desequilibrio entre factores prooxidativos y antioxidativos *in vivo*<sup>333</sup> a favor de los primeros; numerosos estudios lo han relacionado con procesos de envejecimiento,<sup>334</sup> enfermedades como la aterosclerosis<sup>335</sup> la inflamación crónica,<sup>336</sup> la diabetes,<sup>337</sup> enfermedades oculares,<sup>338</sup> cáncer<sup>339</sup> e incluso con enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer.<sup>340</sup>

Son factores prooxidativos los radicales libres, las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS, *Reactive Nitrogen Species*).

Los *radicales libres* se generan de manera natural en las células aeróbicas, predominantemente en las mitocondrias,<sup>341</sup> y están asociados a efectos positivos (por ejemplo en el sistema inmune)<sup>342</sup> cuando se encuentran en bajas concentraciones; no obstante, a concentraciones elevadas presentan efectos negativos, ya que contribuyen a destruir biomoléculas tales como lípidos, proteínas o ADN, mediante procesos

<sup>332</sup> Constantini, D.; Verhulst, S. *Funct. Ecol.*, **2009**, 23, 506-509

<sup>333</sup> Sies, H. *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1986**, 25, 1058-1071.

<sup>334</sup> Kregel, K.C.; Zhang, H.J. *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, 292, R18-36.

<sup>335</sup> Fearon, I.M.; Faux, S.P. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2009**, 47, 372-381.

<sup>336</sup> Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, 49, 1603-1616.

<sup>337</sup> Ceriello, A.; Motz, E. *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* **2004**, 24, 816-823.

<sup>338</sup> Dherani, M.; Murthy, G.V.; Gupta, S.K.; Young, I.S.; Mariani, G.; Camparini, M.; Price, G.M.; John, N.; Chakravarthy, U.; Fletcher, A.E. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2008**, 49, 3328-3335.

<sup>339</sup> Grek, C.L.; Tew, K.D. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, 10, 362-368.

<sup>340</sup> Butterfield, D.A., Perluigi, M.; Sultana, R.; *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, 545, 39-50.

<sup>341</sup> Turrens, J.F. *J. Physiol.* **2003**, 552, 35-344.

<sup>342</sup> Dröge, W. *Physiol. Rev.* **2002**, 82, 47-95.

oxidativos; produciendo además compuestos volátiles no deseados y productos tóxicos.<sup>343,344</sup>

Las *especies reactivas de oxígeno* (ROS) hace referencia a un amplio grupo de compuestos entre los que se incluyen especies radicalarias y no radicalarias derivadas del oxígeno molecular; entre las especies radicalarias se encuentran el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ). Por otro lado, las especies no radicalarias están constituidas por el anión peróxido ( $O_2^{2-}$ ), el ión hidroxilo ( $OH$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ozono ( $O_3$ ) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) (Figura 7.1).<sup>343</sup> Muchas de estas especies se generan de manera endógena en el proceso de respiración, como intermedios en la reducción del oxígeno molecular hasta  $H_2O$ .

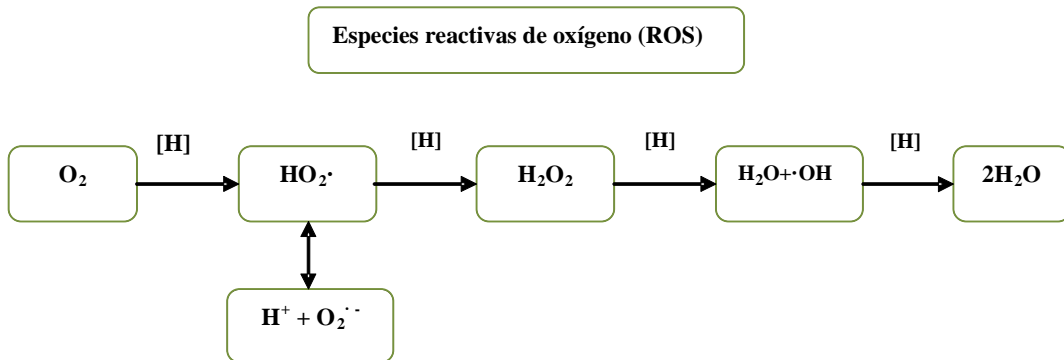


Figura 7.1

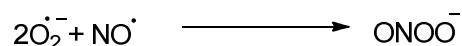
Las *especies reactivas de oxígeno* (RNS) están constituidas por el ión peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) y el óxido nítrico ( $NO$ ). El  $NO$ , al igual que  $H_2O_2$ , se produce de manera continua en las mitocondrias. A concentraciones normales, su función celular es la regulación de procesos de isquemia/reperfusión; interviniendo además en procesos de envejecimiento y degeneración neuronal.<sup>345</sup> El peroxinitrito, por su parte se genera en las células como consecuencia de procesos inflamatorios, en los que el radical de óxido nítrico reacciona con el anión superóxido (Esquema 7.1). La presencia de peroxinitrito causa daños en el ADN, oxidación lipídica y está implicado además en procesos de

<sup>343</sup> Tiwari, S.K.; Rohilla, A.; Rohilla, S.; Kushnoor, A. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* **2012**, *4*, 19-23.

<sup>344</sup> Choe, E.; Min, D.B. *J. Food. Sci.* **2005**, *70*, R142-R159.

<sup>345</sup> Boveris, A.; Cadenas, E. *IUBMB Life*, **2000**, *50*, 245-250.

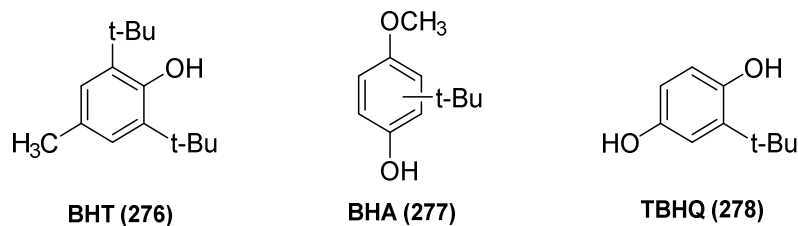
envejecimiento y en afecciones cardiovasculares al provocar una disminución en la disponibilidad de óxido nítrico.<sup>346</sup>



**Esquema 7.1.** Generación de peroxinitrito.

### 7.1.2. Antioxidantes

Se define antioxidante como “cualquier sustancia que, presente en pequeñas concentraciones comparadas con el sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato”.<sup>347</sup> En el organismo humano se generan antioxidantes de manera natural, que son responsables de la prevención de los efectos perjudiciales de los radicales libres y otros productos tóxicos de su metabolismo, manteniendo la concentración de estas especies en valores suficientemente bajos para combatir a las especies de tipo ROS y RNS, poniendo en peligro el correcto funcionamiento del organismo.<sup>348</sup> Es por ello que se hace necesaria su incorporación externa, bien de forma natural a través de la dieta, o bien a través de otras vías; actualmente, tanto alimentos como fármacos contienen en su composición antioxidantes sintéticos como son el hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA) o la *tert*-butil hidroquinona (TBHQ).<sup>349</sup>



Las fuentes naturales de antioxidantes en la dieta son fundamentalmente las frutas y verduras, semillas, cereales, bayas, vino, té, cacao, aceite de oliva y plantas aromáticas.

<sup>346</sup> Battin, E.E.; Brumaghim, *J. Cell Biochem. Biophys.* **2009**, *55*, 1-23 y referencias contenidas.

<sup>347</sup> Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, **1999**, 106-107.

<sup>348</sup> Dauqan, E.M.A.; Abdullah A.; Sani, H.M. *Adv. J. Food Sci. Technol.*, **2011**, *3*, 308-316.

<sup>349</sup> Brewer, M.S. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety*, **2011**, *10*, 221-247.

Estos alimentos tienen actividad antioxidante debido a su alto contenido en ascorbato, tocoferoles, carotenoides y compuestos fenólicos.<sup>350</sup>

Existen diferentes tipos de antioxidantes, como los atrapadores de radicales libres, *quenchers* del oxígeno singlete, desactivadores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otros ROS, agentes quelatantes de iones metálicos, *quenchers* de productos secundarios de oxidación e inhibidores de enzimas prooxidantes, entre otros.<sup>351</sup>

Los antioxidantes pueden clasificarse en función de su mecanismo de acción; así pues, se distinguen **antioxidantes primarios** o *chain-breaking antioxidants*, y los denominados **antioxidantes secundarios** o preventivos.<sup>351,352</sup>

- Los antioxidantes primarios actúan compitiendo en las reacciones de iniciación y propagación con los radicales libres, ROS o RNS. Al reaccionar con ellos, se produce un cambio irreversible en su estructura, que por lo general transforma al antioxidante en un radical estable, y por tanto menos reactivo que los radicales iniciales.
- Los antioxidantes secundarios retardan o previenen la oxidación al interactuar con un iniciador o acelerador; por ejemplo, sería el caso de agentes quelatantes de iones metálicos.

En la última década, el interés por el descubrimiento, aislamiento y síntesis de nuevos antioxidantes ha ido creciendo de manera exponencial. Este interés viene motivado por su versatilidad de acción en numerosos procesos redox y sus múltiples aplicaciones, que abarcan desde su empleo en fármacos y tratamientos clínicos, hasta su uso en alimentos. En concreto, en el ámbito de los alimentos, los antioxidantes pueden usarse bien como estabilizantes o bien por sus interesantes propiedades como parte de la composición de alimentos funcionales, suplementos dietéticos, alimentación animal y cosméticos, entre otros.<sup>353</sup>

---

<sup>350</sup> Fernández-Bolaños, J. G.; López, O.; Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 442-463.

<sup>351</sup> Shahidi, F.; Zhong, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4067-4079

<sup>352</sup> Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K. M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 957-998.

<sup>353</sup> Augustyniak, A.; Bartosz, G.; Ipać, A.C.; Duburs, G.; Horáková, L.; Luczaj, W.; Majekova, M.; Odyseos, A.D.; Rackova, L.; Skrzydlewska, E.; Stefek, M.; Stosová, M.; Tirzitis, G.;

### 7.1.3. Ensayos de antioxidación

Existen numerosos ensayos para cuantificar la actividad o capacidad antioxidante; dichos ensayos se pueden clasificar en función del tipo de reacción en que se basan.<sup>352</sup>

- *Ensayos basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT, Hydrogen Atom Transfer)*. Con ellos se mide la capacidad del antioxidante para atrapar radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno.
- *Ensayos basados en la transferencia de un electrón (ET, Electron Transfer)*. En este tipo de ensayos la actividad antioxidante se simula con una prueba de potencial redox.

A continuación se expone el fundamento de los ensayos de capacidad antioxidante llevados a cabo en los compuestos sintetizados en la presente Tesis Doctoral.

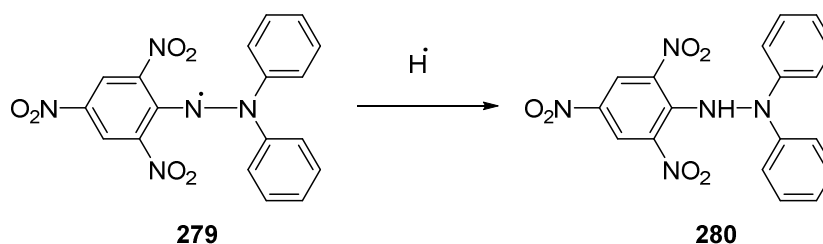
#### Ensayo DPPH de la capacidad antirradicalaria

Esta técnica permite estudiar la actividad antioxidante de un compuesto mediante la captación de radicales libres. Convencionalmente, se asume que un donador de hidrógeno es un reductor y por tanto un antioxidante. La especie 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) es un radical libre estable y comercial que se usa comúnmente como modelo en la interacción con especies antioxidantes captadoras de radicales libres. En su mecanismo de actuación, el DPPH acepta hidrógeno o bien un electrón de un antioxidante, convirtiéndose en la especie reducida (Esquema 7.2).<sup>354</sup>

---

Venskutonis, P.R.; Viskupicova, J.; Vraka, P.S.; Zarkovic, N. *Free Rad. Res.* **2010**, *44*, 1216-1262.

<sup>354</sup> Moon, J.K.; Shibamoto, T. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, *57*, 1655-1666.



Esquema 7.2. Reducción del radical DPPH

La absorbancia del DPPH en su forma radical a 515-517 nm disminuye por la formación de la especie reducida,<sup>355</sup> provocando una disminución de la intensa coloración violeta característica de este compuesto, ya que la forma reducida del DPPH tiene una coloración amarilla. Esta disminución en la absorbancia se mide mediante espectrofotometría de UV, y se correlaciona con la capacidad antioxidante del compuesto estudiado.

La actividad antirradicalaria medida con este método se define como la concentración relativa de antioxidante requerida para reducir el 50% de DPPH ( $EC_{50}$ , *Effective Concentration*). Este valor se obtiene de la representación del DPPH remanente frente a la concentración del antioxidante ensayado. Así pues, cuanto menor sea el valor de  $EC_{50}$ , mayor será el poder antioxidante de la especie sometida a estudio.<sup>356</sup>

### Actividad atrapadora de peróxido de hidrógeno

El  $H_2O_2$  es una especie reactiva de oxígeno (ROS). En los sistemas vivos, el  $H_2O_2$  está implicado en la regulación de procesos como la transducción de señales, defensa frente al estrés oxidativo, desarrollo y proliferación celular y apoptosis. En estos sistemas, el  $H_2O_2$  se genera de manera continua preferentemente en las mitocondrias, y permanece a unos niveles de concentración constantes.<sup>345</sup> Cuando esta concentración aumenta, su presencia se vuelve perjudicial, ocasionando estrés oxidativo y los consiguientes daños celulares ya mencionados previamente.

<sup>355</sup> Jover, M.; Alcudia, F.; Bautista, J.; Parrado, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3779-3785.

<sup>356</sup> Cefarelli, G.; D'Abrosca, B.; Fiorentino, A.; Izzo, A.; Matellone, C.; Pacifico, S.; Piscopo, V. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 803-809.

Para llevar a cabo la cuantificación de la actividad atrapadora de  $H_2O_2$  de un antioxidante, se ha empleado la metodología de Bahorun y colaboradores,<sup>357</sup> consistente en la reacción de oxidación del rojo de fenol en presencia de  $H_2O_2$  y una peroxidasa, que da lugar a un compuesto que exhibe una absorción intensa a 610 nm. La reducción de la absorbancia debida a la presencia de un antioxidante se correlaciona directamente con la capacidad como atrapador de  $H_2O_2$  de ese compuesto.

### Ensayo de la inhibición de la peroxidación lipídica

El proceso de degradación de los lípidos mediante peroxidación transcurre en dos etapas: oxidación primaria (generación de hidroperóxidos y peróxidos) y oxidación secundaria (generación de alcoholes, aldehídos, cetonas,...) (Figura 7.2).

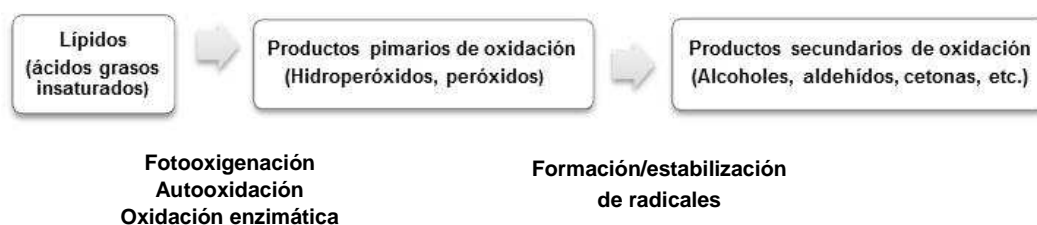


Figura 7.2

La *oxidación primaria* puede producirse a través de tres procesos diferentes:

- **Fotooxigenación:** En este proceso, las posiciones alílicas reaccionan con oxígeno molecular en estado singlete ( $^1O_2$ , el oxígeno singlete es un estado excitado del oxígeno molecular (triplete), que se genera a partir de éste química, fotoquímicamente, por intervención de ciertas enzimas o como producto de la descomposición de hidroperóxidos).<sup>351</sup>

La fotooxigenación tiene lugar mediante una reacción concertada a través de un estado de transición cíclico de seis miembros cuyo producto es un hidroperóxido. El doble enlace se desplaza un átomo de carbono respecto de su posición original, y adquiere configuración *trans* (Esquema 7.3).

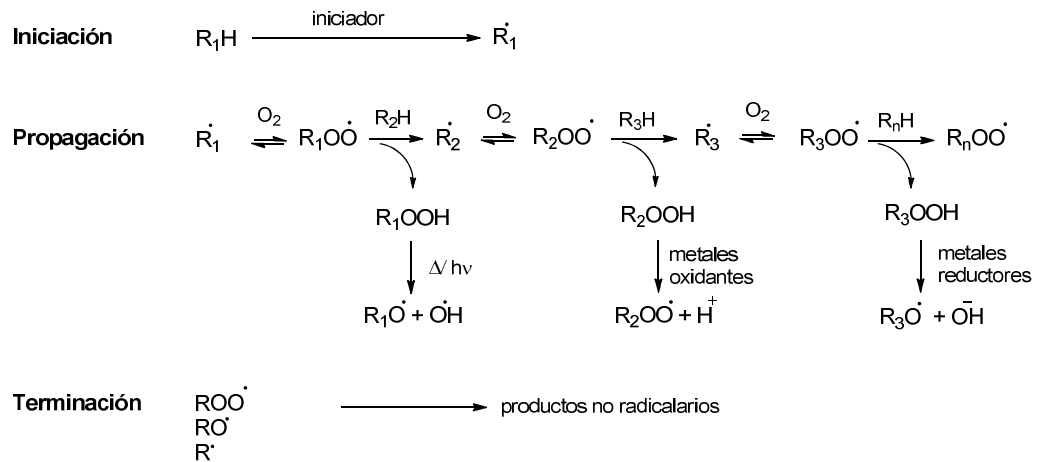
<sup>357</sup> Bahorun, T.; Gressier, B.; Trotin, F.; Brunet, C.; Dine, T.; Luyckx, M.; Vasseur, J.; Cazin, J.C.; Pinkas, M. *Arzneim. Forsch.* **1996**, *46*, 1086-1089.





Esquema 7.3

- **Autooxidación:** Transcurre mediante un mecanismo de reacción en cadena radicalario<sup>358,359</sup> en el que, por tanto, pueden distinguirse las etapas de iniciación, propagación y terminación, como se describen en el esquema 7.4.<sup>345</sup>



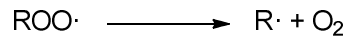
Esquema 7.4

En la iniciación, el paso clave es la formación de un radical lipídico,  $R\cdot$ , lo cual ocurre mediante la ruptura homolítica del enlace R-H bien de forma termo o fotoquímica, o bien por abstracción de un átomo de hidrógeno por un radical libre que actúa de iniciador. El paso de propagación comienza con la adición de oxígeno molecular, sustancia que tiene gran tendencia a capturar radicales libres, a la especie  $R\cdot$  para dar lugar a un radical peróxido ( $ROO\cdot$ ), que a su vez, capta otro átomo de hidrógeno, generando un hidroperóxido ( $ROOH$ ) y otro radical  $R\cdot$ . Durante la propagación, además se observan otros procesos que incluyen fragmentación, reagrupamiento e incluso ciclaciones (Esquema 7.5).<sup>359</sup>

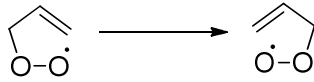
<sup>358</sup> Frankel, E.N. *Prog. Lipid Res.* **1980**, *19*, 1-22.

<sup>359</sup> Porter, N.A.; Caldwell, S.E.; Mills, K. A.; *Lipids*, **1995**, *30*, 277-290.

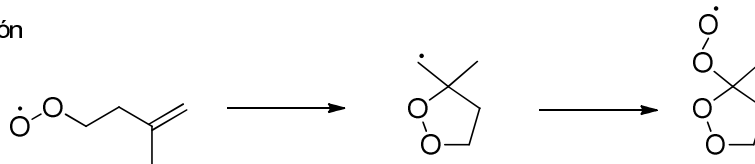
Fragmentación



Reagrupamiento



Ciclación



Esquema 7.5

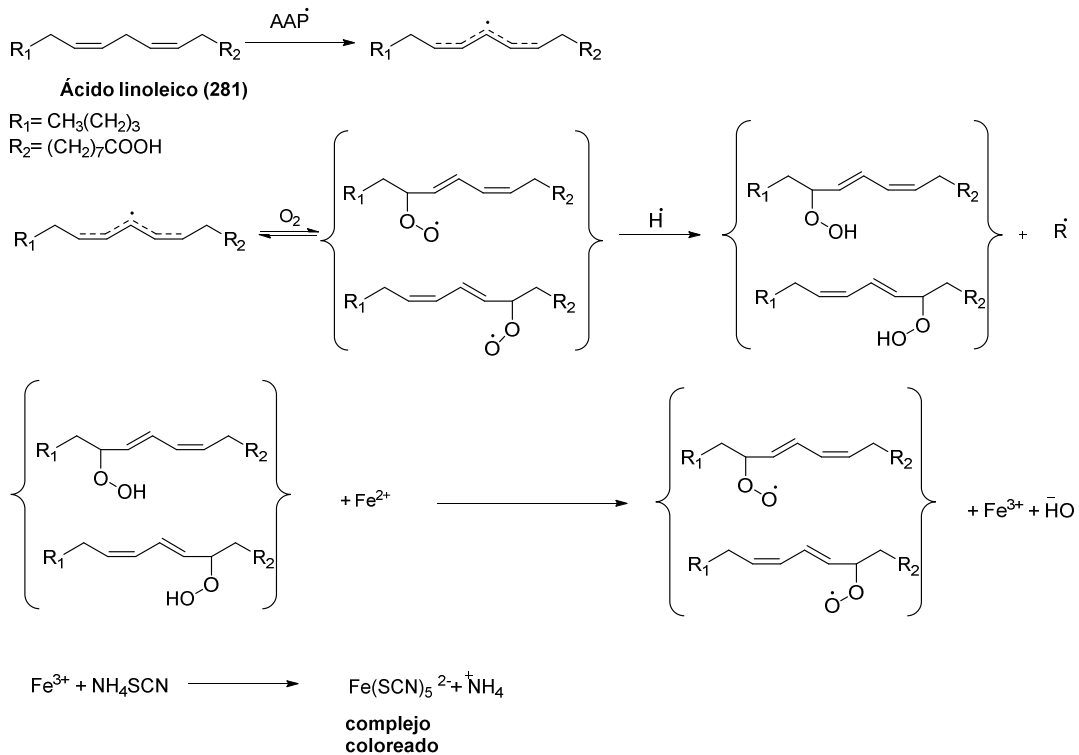
En la etapa de terminación, los radicales desaparecen a través de acoplamiento radical-radical o bien formando productos estables no radicalarios, incluyendo una gran variedad de polímeros.

- *Oxidación enzimática* a través de lipoxigenasas. Enzimas como la ciclooxigenasa (COX), lipooxigenasa (LOX) y el citocromo P450 (CYP) oxidan los ácidos grasos insaturados en el transcurso de importantes procesos fisiológicos, como la homeostasis celular.<sup>360</sup> La principal característica de estos procesos es la especificidad en la oxidación, cada enzima oxida un sustrato concreto para dar lugar a productos regio-, estereo- y enantioespecíficos. Además, se trata de procesos regulados y programados por el organismo, a diferencia de la fotooxigenación o la autooxidación.

En el proceso de *oxidación secundaria*, los peróxidos e hidroperóxidos generados anteriormente se descomponen al romperse el enlace O-O, de carácter lábil, generando radicales libres que pueden evolucionar de modo diverso para dar lugar a alcoholes, aldehídos, cetonas, hidrocarburos, ácidos orgánicos volátiles y epóxidos; en el caso de grasas con un alto grado de insaturación se detecta la formación de malonaldehído.<sup>345</sup>

<sup>360</sup> Niki, E. *FEBS Letters*, **2012**, 586, 3767-3770.

En el ensayo de la inhibición de la peroxidación lipídica se estudia la potencial inhibición de un compuesto de la etapa de autooxidación lipídica. Es un ensayo tipo HAT. Para ello, se estudia la inhibición de la peroxidación del ácido linoleico como modelo de lípido insaturado, inducida por dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) siguiendo la modificación de Olzweska y colaboradores<sup>361</sup> de la metodología original de Azuma y colaboradores.<sup>362</sup> En este procedimiento, el calentamiento origina la rotura homolítica del azocompuesto, AAPH, cuyos radicales inician una reacción en cadena sobre el linoleico generando alquilperóxidos. Estos peróxidos reaccionan con  $\text{Fe}^{2+}$  generando  $\text{Fe}^{3+}$ , que, mediante intercambio con tiocianato amónico producen  $\text{Fe}(\text{SCN})_5^{2-}$ , un complejo de color rojo con un máximo de absorción a 540 nm (Esquema 7.6).



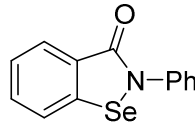
**Esquema 7.6.** Procesos implicados en el ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica.

<sup>361</sup> Olszewska, M.A.; Presler, A.; Michel, P. *Molecules*, **2012**, *17*, 3093-3113.

<sup>362</sup> Azuma, K.; Nakayama, M.; Kishioka, M.; Ippoushi, K.; Yamaguchi, Y.; Kohata, K.; Yamahuchi, Y.; Ito, H.; Higashio, H. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47*, 3963-3966.

### Actividad mimética de la glutatión peroxidasa

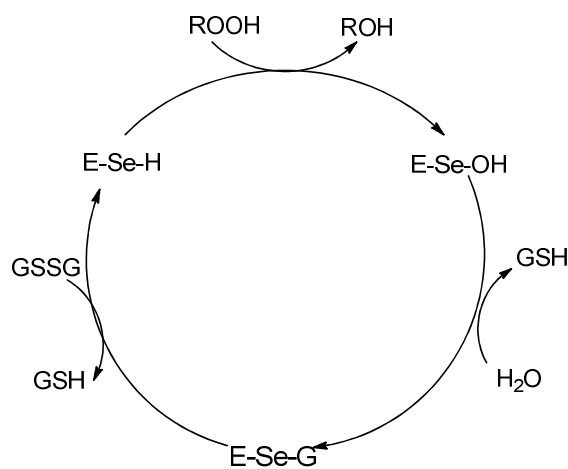
Existen algunos compuestos organoselénicos que actúan como miméticos de la glutatión peroxidasa *in vitro*.<sup>75,76</sup> En concreto, el ebselén es capaz de inhibir el daño del ADN mediado por dopamina/ $\text{Cu}_2^+$ / $\text{H}_2\text{O}_2$ , secuestrando radicales y reduciendo el  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>363</sup>



**Ebselén (282)**

En este contexto, en nuestro grupo de investigación hemos desarrollado una serie de compuestos organoselénicos como nuevas familias de miméticos de GPx, tales como selenoazúcares,<sup>75</sup> selenoureas o selenocarbamatos.<sup>76</sup>

Las glutatión peroxididasas (GPxs) son un grupo de enzimas que contienen selenio en su centro activo. De entre las funciones que presentan, destaca su actuación frente a especies reactivas de oxígeno (ROS), como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a través de un ciclo catalítico redox en el cual intervienen grupos tioles como cofactores y selenio (Figura 7.3).<sup>364,365</sup>



**Figura 7.3.** Mecanismo catalítico de las GPx

<sup>363</sup> Battin, E. E.; Brumaghin, J. L. *Cell Biochem. Biophys.*, **2009**, *55*, 1-23.

<sup>364</sup> Arthur, J.R. *Cell. Molec. Life Sci.* **2007**, *57*, 1825-1835

<sup>365</sup> Mugesh, G.; Singh, H.B. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 347-357

En este ciclo, la glutatión peroxidasa reduce el peróxido de hidrógeno gracias a un centro activo que contiene selenocisteína, y por tanto, un grupo selenol (E-Se-H). El átomo de selenio de dicho centro interviene en un proceso redox en el cual el selenolato se oxida a ácido selénico al reducir tanto a peróxido de hidrógeno como a peróxidos orgánicos. Este selenolato reacciona con el glutatión (GSH) para formar un aducto seleno-sulfuro (E-Se-G). Una segunda unidad de glutatión se encarga de regenerar la forma activa de la enzima atacando al aducto para formar glutatión oxidado, con un grupo disulfuro (GSSG) (Figura 7.3).

#### 6.1.4. Ensayos biológicos

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte y morbilidad en Europa tras las enfermedades cardiovasculares, ocasionando el 20% de las muertes en esta región. Cada año se detectan tres millones de nuevos casos en Europa, y se registran 1.7 millones de fallecimientos.<sup>366</sup>

A nivel mundial, el 70% de las muertes ocasionadas por cáncer tiene lugar en países en vías de desarrollo, en los cuales no existen recursos para la prevención, diagnóstico y tratamiento. Según esta organización, el cáncer es, en muchos casos, evitable si se lleva una vida y una dieta saludables, y si se produce una detección temprana. La relevancia de esta enfermedad ha suscitado el interés en el desarrollo de nuevos tratamientos, que en su mayor parte deben ser específicos para el tipo de cáncer del que se trate. No en vano, la simple búsqueda de “cáncer” en la base de datos SciFinder, arroja un incremento de más de un 40% de publicaciones en este contexto durante la última década.

El cáncer cervicouterino es el segundo tipo de cáncer más extendido en mujeres tras el cáncer de mama, ya que anualmente se detectan 493.243 nuevos casos y se producen 274.00 muertes. La incidencia de este cáncer es mayor en países en vías de

---

<sup>366</sup> <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer>. Última consulta: 09/12/13

desarrollo (un 80% de los casos).<sup>367</sup> La mayor causa de este tipo de cáncer es la infección por el virus del papiloma humano (VPH), especialmente por las cepas VPH16 y VPH18, que provocan carcinogénesis en células uterinas sanas. La carcinogénesis generada por el VPH provoca un fallo inmunitario sobre las células afectadas, ya que son capaces de evadir la detección inmune mediante múltiples estrategias.<sup>368</sup>

Los antecedentes bibliográficos acerca de derivados del hidroxitirosol como agentes antiproliferativos, nos han animado a evaluar la actividad antitumoral y anticancerígena de los compuestos sintetizados en la presente Tesis Doctoral frente a líneas celulares del cáncer cérvicouterino, mediante los procedimientos que se detallan a continuación.

### **Ensayo del Cristal Violeta para la determinación de la proliferación celular**

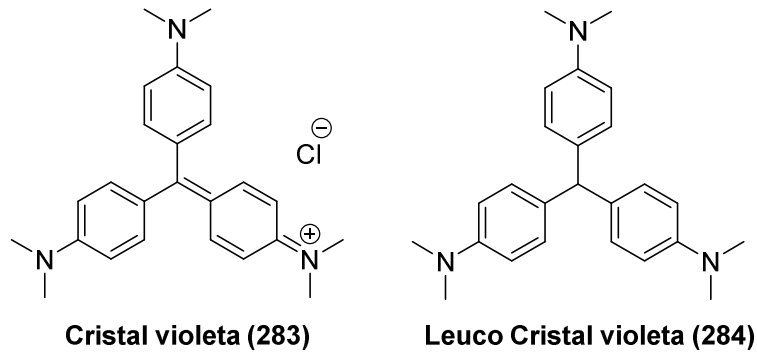
El cloruro de pararosanilina, conocido como violeta básico 3, cristal violeta o violeta de metilo, es un colorante derivado del trifenilmetano, cuya aplicación biológica más extendida es la tinción de cultivos de bacterias Gram positivas, aunque también se ha empleado en la determinación de la citotoxicidad generada por moléculas, fármacos, toxinas o patógenos, determinación de la viabilidad celular o determinación de la proliferación celular bajo diversas condiciones.<sup>369</sup> Una vez introducido en la célula, se transforma en (4-[(4-dimetilaminofenil)fenilmetil]-*N,N*-dimetilanilina o leuco cristal violeta.

---

<sup>367</sup> Zagouri, F.; Sergentanis, T.N.; Chrysykos, D.; Filipits, M.; Bartsch, R.; *Gynecol. Onc.* **2012**, *126*, 291-303.

<sup>368</sup> Hou, F.; Ma, D.; Cui, B. *Clinica Chimica Acta* **2013**, *415*, 337-340.

<sup>369</sup> Vega-Avila, E.; Pugsley, M.K. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **2011**, *54*, 10-14 y referencias contenidas.



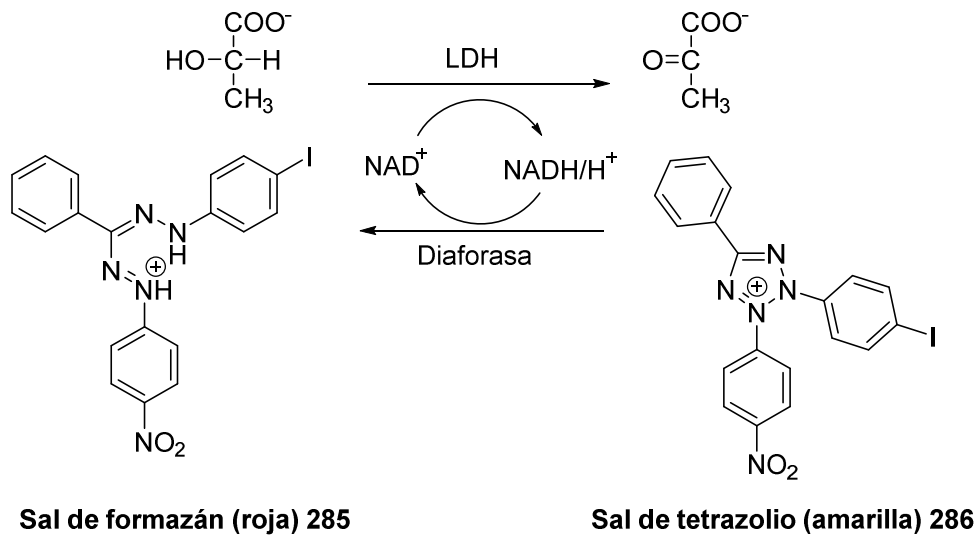
Respecto de esta última aplicación en la determinación de la proliferación celular, el cristal violeta proporciona información cuantitativa sobre la densidad relativa de células adheridas a los pocillos de ensayo. Debe tenerse en cuenta que este colorante se asocia al ADN y que su coloración depende del pH de la disolución. Una vez en disolución la concentración de colorante es proporcional al número de células del cultivo, y se puede medir fácilmente mediante técnicas espectrofotométricas.<sup>369</sup>

#### **Ensayo de la lactato deshidrogenasa (*LSH assay*)**

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática presente en todas las células, que se caracteriza por liberarse rápidamente en el sobrenadante de los cultivos o en la sangre cuando la membrana plasmática de las células es dañada. Por este motivo, el ensayo LDH es empleado como un test cuantitativo para evaluar la citotoxicidad de moléculas y fármacos.<sup>370</sup>

La detección y cuantificación en este método se basa en un cromóforo, por lo que se hace mediante espectrofotometría de manera rápida y reproducible. El ensayo consta de dos pasos: en el primero las isoenzimas LDH catalizan la oxidación del lactato a piruvato mediada por  $\text{NAD}^+$ . En el segundo paso, la enzima diaforasa emplea el  $\text{NADH}/\text{H}^+$  generado en el paso anterior para catalizar la reducción de una sal de tetrazolio a una sal de formazán hidrosoluble y con un máximo de absorción a 490 nm (Esquema 7.7).<sup>370</sup>

<sup>370</sup> Wang, G.; Zhang, J.; Dewilde, A.H.; Pal, A.K.; Bello, D.; Therrien, J.M.; Braunhut, S.J.; Marx, K.A. *Toxicology*, **2009**, 299, 99-111.



Esquema 7.7

De este modo, la concentración de formazán presente en un medio de cultivo celular se puede correlacionar directamente con el incremento de LDH, y es proporcional a la lisis celular en un periodo de tiempo específico. Los resultados de este ensayo se expresan en unidades de LDH por célula.

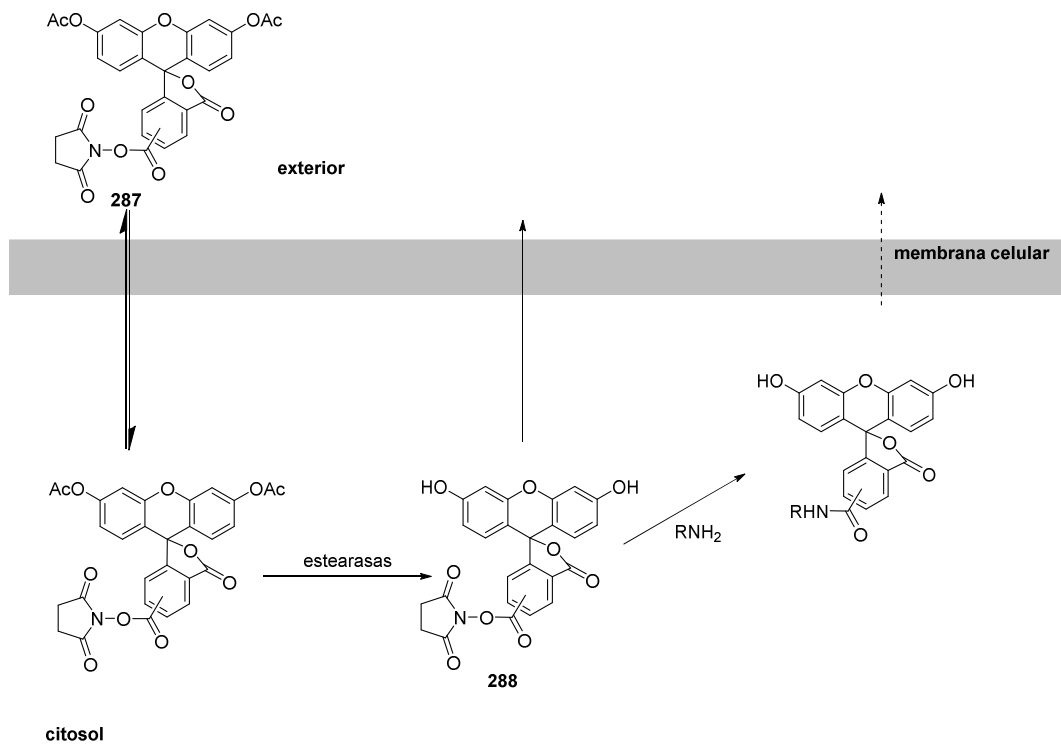
### Ensayo CSFE (*Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester*) de la proliferación de linfocitos

El método CFSE (*Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*) es uno de los métodos más generalizados para medir la división celular. Se basa en la introducción de una especie fluorescente, la carboxifluoresceína, en la célula.

La metodología de este ensayo consiste en introducir succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE) en el interior de la célula, proceso sencillo debido a su facilidad para atravesar la membrana celular. Una vez en el interior de la célula, las esterasas intervienen para transformar esta especie en carboxifluoresceína, cuya permeabilidad de membrana es mucho menor y por tanto su liberación de la célula al exterior es más lenta, tiempo durante el cual se enlaza covalentemente a moléculas intracelulares a través del grupo succinimidilo, que reacciona con grupos amino generando amidas muy estables (Figura 7.4). La reducida permeabilidad de estas especies



permite monitorizar la frecuencia de hasta ocho divisiones celulares, mediante la medida de citometría a través del descenso de la fluorescencia.<sup>371, 372</sup>



**Figura 7.4**

Una ventaja de este método es que puede utilizarse para determinar la división celular tanto en métodos *in vitro* como *in vivo*, y con ello determinarse el grado de proliferación de distintos tipos de células, como por ejemplo es el caso de los linfocitos, incluso se ha descrito su uso para cuantificar la proliferación bacteriana.<sup>373</sup>

<sup>371</sup> Quah B.J.C., Parish C.R. *JoVE*, **2010**, *44*, 1-3.

<sup>372</sup> Parish, C.R. *Immunol. Cell Biol.* **1999**, *77*, 499–508

<sup>373</sup> Ueckert, J.E.; Nebe von Caron, G., Bos, A.P., ter Steeg, P.F. *Let. Appl. Microbiol.*, **1997**, *25*, 295–299.

## 7.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.2.1. Medidas de la actividad antioxidante

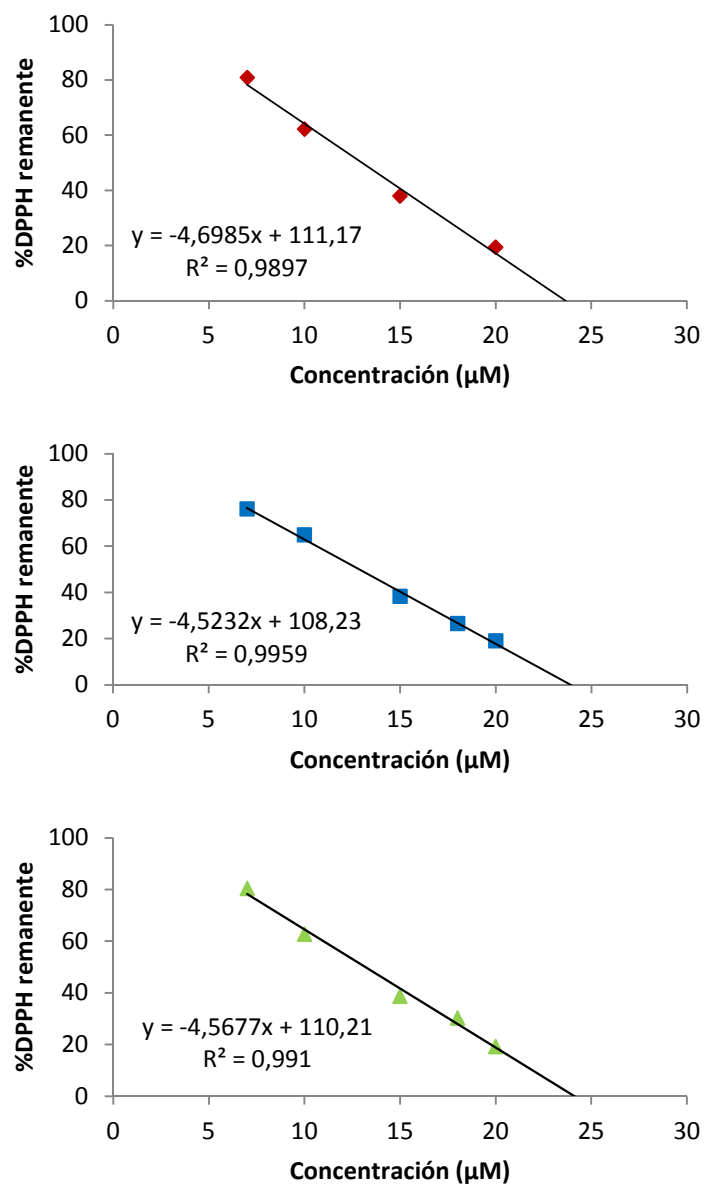
El objetivo del presente capítulo consiste la evaluación de las propiedades antioxidantes de los compuestos sintetizados en el presente trabajo, con objeto de poder establecer relaciones de estructura-actividad que discernir aquellos elementos estructurales responsables de una mayor actividad biológica, tanto desde el punto de vista antioxidante, como antiproliferativa. Los productos sometidos a dicho estudio han sido los ésteres derivados del HT **8** y **9**, el tioderivado **11**, las tio y selenoureas derivadas de la norepinefrina **17-27** y los peptidomiméticos **34-38**, **40** y **41**. Los resultados obtenidos se compararon con el hidroxitirosol, ácido  $\alpha$ -lipoico, DOPAC y norepinefrina, a modo de productos análogos estructuralmente, y de reconocida actividad biológica.

#### 7.2.1.1. Medida de la actividad atrapadora de radicales libres (DPPH)

Para la determinación de la captación de radicales libres se utilizó el método del DPPH, siguiendo la metodología de Prior y colaboradores.<sup>374</sup> La concentración efectiva  $EC_{50}$  representa la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la absorbancia del DPPH un 50% con respecto a su valor original. Este valor, expresado en unidades de concentración  $\mu M$ , se obtuvo para todos los casos ensayados por interpolación de la representación gráfica del porcentaje de DPPH remanente frente la concentración del compuesto ensayado (medidas por triplicado). A modo de ejemplo, en la gráfica 7.1 se incluyen los resultados obtenidos para el compuesto **9**. Dichos resultados fueron obtenidos a partir de las medidas de las absorbancias de muestras con y sin antioxidante, y se expresan según lo indicado en el Apartado 9.1.1.

---

<sup>374</sup> Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290-4302.



**Gráfica 7.1.** Captación de radicales DPPH del compuesto **9**.

### *Ésteres derivados del HT*

Los valores de la actividad atrapadora de radicales libres DPPH para los ésteres derivados del HT **8** y **9** se muestran en la tabla 7.1.

**Tabla 7.1.** Actividad antirradicalaria DPPH.

Compuesto	EC <sub>50</sub> DPPH (μM)
<b>8</b>	3.8±0.4
<b>9</b>	13.0±0.3
<b>HT</b>	11.3±1.3
<b>Ácido α-lipoico</b>	-

Como puede observarse para los datos mostrados en la Tabla 7.1., el éster dimérico **8**, con dos fragmentos de catecol muestra una actividad 3 veces superior a la del HT (3.8 frente a 13.0 μM); esto podría sugerir que la incorporación de sucesivos fragmentos de catecol a la estructura podría tener un efecto beneficioso en la actividad antirradicalaria.

Para el caso del compuesto **9**, sin embargo, la actividad antirradicalaria es del mismo orden, aunque ligeramente inferior a la obtenida para el HT. Si se compara ésta con los resultados obtenidos para el ácido α-lipoico, se observa que éste no presentó capacidad de secuestrar radicales libres DPPH a las concentraciones ensayadas (de 3 a 33 μM), lo cual parece indicar que la incorporación de un fragmento de tipo disulfuro cíclico produce una disminución de la capacidad antirradicalaria del compuesto.

#### ***Tio y selenoderivados con fragmentos de catecol***

Los resultados obtenidos para la actividad atrapadora de radicales libres DPPH para el tioacetato **11** y las tio y selenoureas **17-27** se muestran en la tabla 7.2, los resultados además han sido comparados con el hidrocloreuro de norepinefrina de los que derivan de los compuestos. **17-27**.

**Tabla 7.2.** Actividad antirradicalaria DPPH.

Compuesto	EC <sub>50</sub> DPPH (μM)
<b>11</b>	7.3±0.1
<b>17</b>	4.0±0.5
<b>18</b>	7.4±0.7
<b>19</b>	10.7±1.1
<b>20</b>	8.0±0.4
<b>21</b>	4.0±0.2
<b>22</b>	5.0±0.1
<b>23</b>	4.0±0.6
<b>24</b>	7.4±0.2
<b>25</b>	6.1±0.2
<b>26</b>	5.3±0.1
<b>27</b>	7.7±0.7
<b>Norepinefrina</b>	5.0±0.03

En primer lugar, cabe destacar todos los compuestos evaluados en este apartado presentaron una mejor actividad antirradicalaria que el HT natural, que llega a ser de 2.8 veces en el caso de las tioureas **17**, **21** y **23**. Estos resultados ponen de manifiesto el efecto beneficioso en la actividad antirradicalaria de la introducción de grupos tioureido y selenoureido.

En cuanto a las tio y selenoureas, de todos los compuestos ensayados, se observa para la mayor parte de ellos existe una actividad antirradicalaria similar a la mostrada por la norepinefrina, de 5.0±0.03 μM, y aproximadamente del doble de la mostrada para el HT, de 11.3±1.3 μM, salvo para los compuestos **17**, **21-23** y **26** que mostraron una actividad ligeramente mejor que la de la norepinefrina. En base a los resultados mostrados en la Tabla 7.2, pueden obtenerse una serie de conclusiones. Por un lado, de manera general, las tioureas derivadas de norepinefrina se comportan como atrapadores de radicales libres ligeramente más potentes que los correspondientes selenoisómeros.

Considerando sustituyentes de tipo alquílicos, la presencia de pequeños fragmentos lineales (ej. *n*-butilo en **17**) proporciona mejor actividad que en los correspondientes cicloalquilos (ej. ciclohexilo en **18**).

Los mejores resultados obtenidos se encuentran para fragmentos alquílicos (**17**) lineales, y aromáticos con sustituyentes de tipo *p*-metil (**21**) y *p*-bromo (**23**). No obstante, la combinación de fragmentos de tipo alquilo y arilo (ej. bencilo, en **19** o fenetilo, en **20**) reduce sensiblemente la capacidad antirradicalaria.

### *Derivados peptídicos polifenólicos derivados de L-aminoácidos*

Los valores de actividad atrapadora de radicales libres DPPH obtenidos para los peptidomiméticos **34-38**, **40** y **41** se muestran en la tabla 7.3.

**Tabla 7.3.** Actividad antirradicalaria DPPH.

Compuesto	EC <sub>50</sub> DPPH (μM)
<b>34</b>	12.3±1.8
<b>35</b>	10.5±0.7
<b>36</b>	12.8±3.3
<b>37</b>	10.8±1.6
<b>38</b>	18.4±0.5
<b>40</b>	4.5±0.2
<b>41</b>	11.6±0.4
HT	11.3±1.3
DOPAC	4.9±0.3

Puede observarse que los compuestos **34-38** y **41** mostraron una actividad antirradicalaria muy similar a la del HT, con valores comprendidos entre 10.5-18.4 μM. El DOPAC, con un EC<sub>50</sub> de tan solo 4.9±0.3 μM, exhibe una actividad antirradicalaria 2.3 veces superior a la del HT, y por tanto, a la de los compuestos **34-38** y **41**. Resulta especialmente destacable el compuesto **40**, derivado de la L-cistina, y por tanto, con dos fragmentos de tipo catecol y un puente disulfuro en su estructura. Este compuesto se

comportó como un potente agente antirradicalario, con un  $EC_{50}$  de  $4.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ , prácticamente idéntico al encontrado para el DOPAC.

También es llamativa la diferencia de actividad entre el compuesto **40**, y el derivado del ácido lipoico **9** ( $EC_{50} = 13.0 \pm 0.3$ ), siendo el primero 3.0 veces más activo. Ambos poseen un fragmento de tipo disulfuro, por lo que la diferencia de actividad presumiblemente se debe a la presencia en **40** de dos anillos de tipo catecol. Este resultado es análogo al observado para el éster dimérico **8**, exhibiendo ambos polifenoles divalentes una capacidad antirradicalaria análoga (Tablas 7.1 y 7.3).

Puede deducirse, por tanto, que la introducción de fragmentos de tipo amida en el hidroxitirosol permite, por un lado, mantener una actividad antirradicalaria similar o mejor a la del HT, a la par que introducir ciertos fragmentos hidrófobos que pudieran permitir una mejor biodisponibilidad del compuesto en el caso de ser administrado como potencial fármaco o aditivo alimentario de tipo antioxidante.

#### *Derivados multivalentes vía click chemistry*

Los valores de la actividad atrapadora de radicales libres DPPH para los derivados di y trivalentes del HT **53** y **54** se muestran en la tabla 7.4.

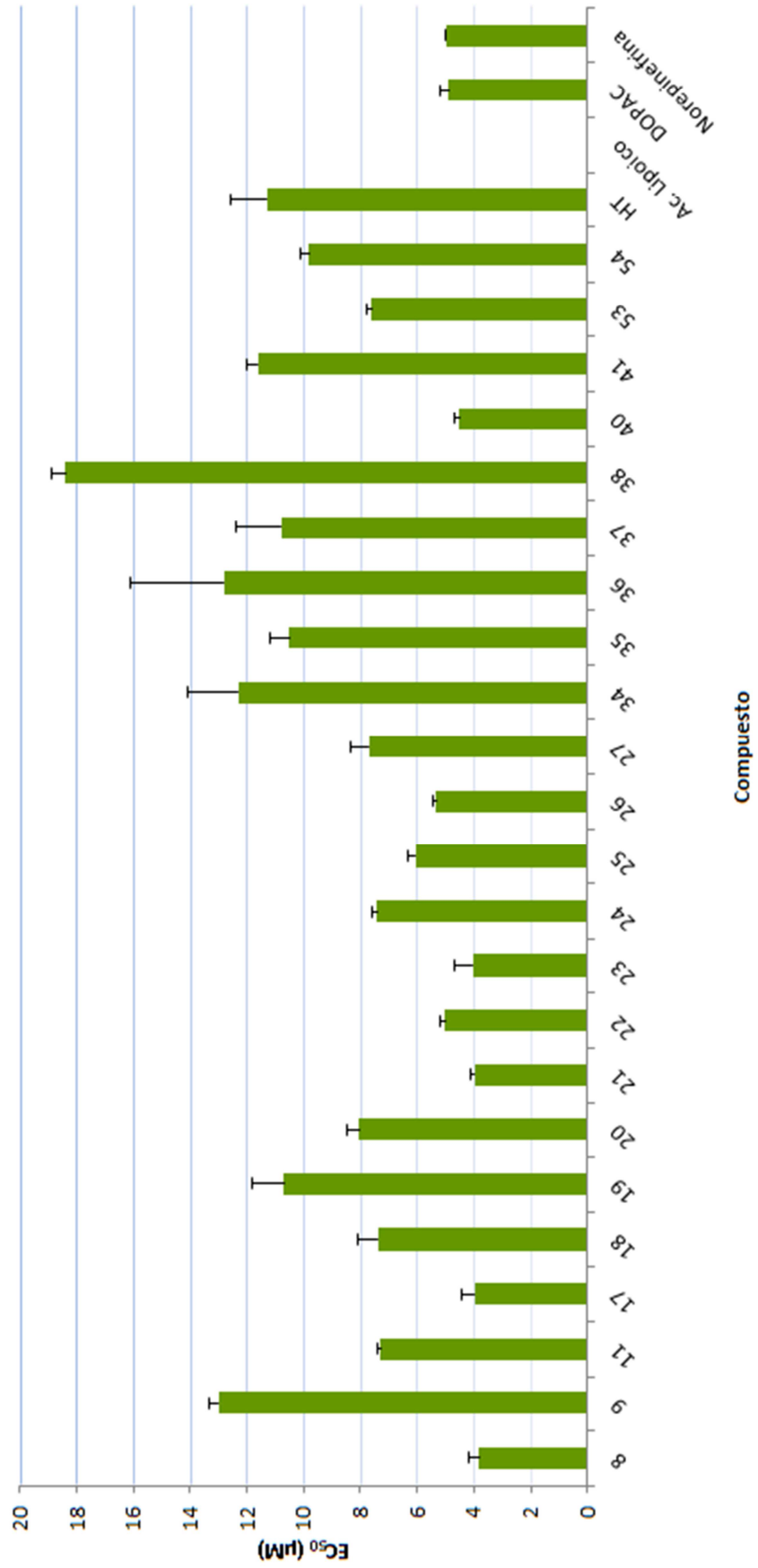
**Tabla 7.4.** Actividad antirradicalaria DPPH.

Compuesto	$EC_{50}$ DPPH ( $\mu\text{M}$ )
<b>53</b>	$7.6 \pm 0.2$
<b>54</b>	$9.8 \pm 0.3$
<b>HT</b>	$11.3 \pm 1.3$

Como puede observarse, la actividad antirradicalaria no se incrementa en este caso con el número de fragmentos catecol de la molécula, puesto el valor de  $EC_{50}$  resultó ser ligeramente superior en el caso del compuesto con tres fragmentos (compuesto **54**), y mejor para el compuesto con tan solo dos fragmentos catecol **53**, obteniéndose para este un valor de  $EC_{50}$  de  $7.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$ . Sin embargo, para ambos casos se demostró que la actividad atrapadora de radicales DPPH mejoraba a la obtenida para el HT.

Los resultados obtenidos en el ensayo de actividad antirradicalaria DPPH para todos los compuestos analizados aparecen recogidos en la gráfica 7.2.





Gráfica 7.2. Actividad atrapadora de radicales libres DPPH.

### 7.2.1.2. Medida de la actividad atrapadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Para la determinación de la actividad atrapadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se ha empleado la metodología de Bahorun y colaboradores.<sup>357</sup> El porcentaje de inhibición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (medidas por triplicado) para la concentración ensayada (0.47 μM), se obtuvo a partir de las absorbancias en presencia y en ausencia de antioxidante mediante la expresión indicada en el **Apartado** 9.1.1.

#### *Ésteres derivados del HT*

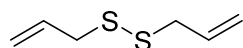
Los valores obtenidos para los compuestos **8** y **9**, comparados con el HT y el ácido lipoico, se muestran en la tabla 7.5.

**Tabla 7.5.** Actividad atrapadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

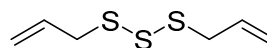
Compuesto	%Inhibición H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>8</b>	78.9 ± 0.9
<b>9</b>	27.0 ± 3.0
<b>HT</b>	68.8 ± 5.0
<b>Ácido α-lipoico</b>	2.5 ± 1.0

De los resultados obtenidos, se observa que el compuesto **8** presenta una excelente actividad inhibitoria del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superior a la del HT, por lo que se puede concluir que, de nuevo, la presencia de un segundo fragmento de catecol aporta una mejora de la actividad. El éster **9**, sin embargo, muestra una escasa actividad inhibitoria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación al compuesto **8**, aunque superior al ácido α-lipoico, que es prácticamente nula. La reducida actividad antioxidante mostrada por el compuesto **9**, podría deberse, por tanto, a la presencia del grupo disulfuro. Estos datos estarían de acuerdo con algunos estudios llevados a cabo en moléculas con grupos disulfuro en su estructura, como el dialil disulfuro (DADS) o dialil trisulfuro (DATS), para los que se detectó una actividad eficaz como atrapadores de aniones superóxido, pero que no

presentaron sin embargo actividad atrapadora de peróxido de hidrógeno o de aniones hidroxilo.<sup>375</sup>



DADS (289)



DATS (290)

### Tio y selenoderivados con fragmentos de catecol

Los resultados obtenidos para este ensayo de antioxidación para el tioacetato **11** y para las tio y selenoureas **17-27** se muestran en la tabla 7.6.

**Tabla 7.6.** Actividad atrapadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Compuesto	% Inhibición H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>11</b>	77.4±0.7
<b>17</b>	79.8±0.9
<b>18</b>	*
<b>19</b>	78.3±0.1
<b>20</b>	78.6±4.9
<b>21</b>	80.2±0.3
<b>22</b>	71.0±21.3
<b>23</b>	79.5±1.2
<b>24</b>	80.0±1.6
<b>25</b>	80.1±2.5
<b>26</b>	79.9±0.7
<b>27</b>	78.7±4.1
<b>Norepinefrina</b>	78.2±0.4

\*no realizada

El compuesto **11**, con un grupo tioacetato en su estructura, se comporta como un excelente inhibidor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mejorando así ligeramente el valor obtenido para el HT.

<sup>375</sup> Kim; J.M.; Chang, H.J.; Kim, W.K.; Chang, N.; Chun, H.S. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6547–6553.

En relación con las tio y selenoureas **17-27**, se observa, en primer lugar, que el valor del porcentaje de inhibición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la norepinefrina es significativamente alto, lo que supone que es un potente inhibidor; no obstante, se observa que la conversión de ésta en una tio o selenourea no afecta a esta actividad.

#### *Derivados peptídicos polifenólicos derivados de L-aminoácidos*

Los valores de actividad atrapadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidos para los compuestos **34-38, 40** y **41** se muestran en la tabla 7.7.

**Tabla 7.7.** Actividad atrpadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Compuesto	% Inhibición H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>34</b>	74.6±2.3
<b>35</b>	65.1±4.1
<b>36</b>	62.9±2.8
<b>37</b>	60.7±7.8
<b>38</b>	34.5±1.0
<b>39</b>	13.3±4.2
<b>40</b>	77.7±10.3
<b>41</b>	54.0±5.3
<b>HT</b>	68.8±5.0
<b>DOPAC</b>	71.3±1.5

El ácido DOPAC muestra un poder de inhibición muy similar al del HT, obteniendo en el ensayo realizado un valor del 71.3±1.5 %.

En el caso de los productos con el fragmento catecol libre sintetizados, estos mostraron distintos valores de inhibición: los compuestos **35, 36** y **37** mostraron un valor muy similar al del HT (65.1±4.1 %, 62.9±2.8 % y 60.7±7.8 % respectivamente). Los compuestos **34** y **40** mostraron un resultados incluso superiores a los del HT y DOPAC (74.6±2.3% y 77.7±10.3% respectivamente). De nuevo, al igual que para la captación de radicales libres, el compuesto **38** proporcionó un resultado bastante inferior al HT, 34.3±1.0%, aunque el menor de los resultados corresponde al compuesto **39**,

probablemente este valor sea debido a la presencia de un grupo disulfuro en su estructura, al igual que ocurría para el compuesto **9**.

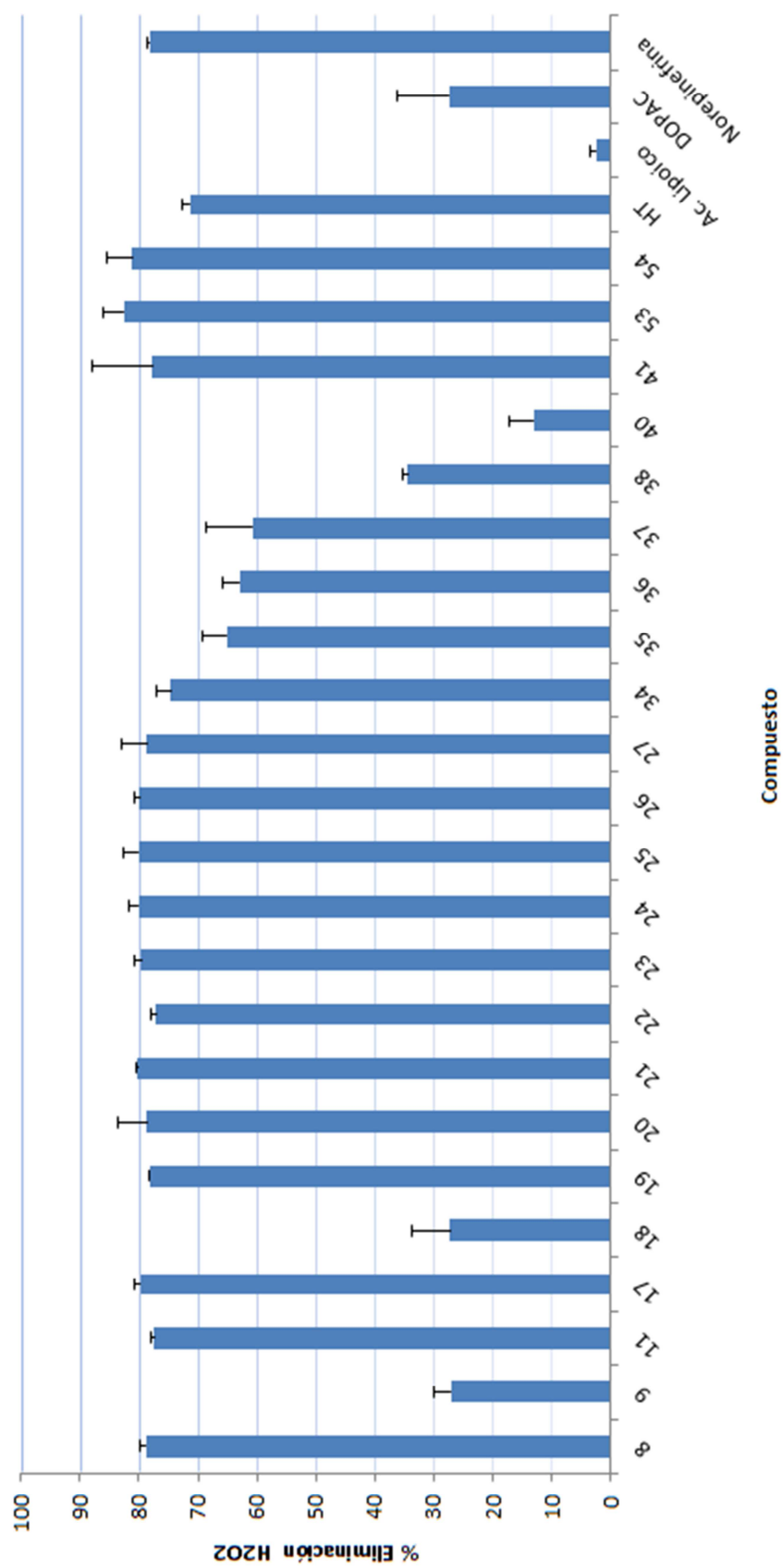
*Derivados con múltiples fragmentos catecol vía “click chemistry”*

Los valores obtenidos para la actividad inhibitoria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se muestran en la tabla 7.8.

**Tabla 7.8.** Actividad atrpadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Compuesto	% Inhibición H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>53</b>	82.6 ± 3.5
<b>54</b>	81.2 ± 4.1
<b>HT</b>	71.3 ± 1.5

Los valores obtenidos para ambos compuestos **53** y **54** mejoran la inhibición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del HT, al superar el 80% de inhibición. Sin embargo puede observarse que, al igual que ocurría para la actividad antirradicalaria, la presencia de un tercer anillo de catecol no permite una mejora de la actividad (compuesto **54**). Los datos obtenidos para todos los compuestos evaluados se muestran resumidos en la gráfica 7.3.



Gráfica 7.3. Actividad atrapadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 7.2.1.3. Medida de la inhibición de la peroxidación lipídica

El ensayo de inhibición de la oxidación primaria se llevó a cabo mediante una modificación del método de Azuma y colaboradores.<sup>362</sup> Los porcentajes de inhibición de la peroxidación lipídica (medidas por triplicado), se obtuvieron a partir de las absorbancias en presencia y en ausencia de antioxidante mediante la expresión indicada en el Apartado 9.1.1.

#### *Ésteres derivados del HT*

A continuación se resumen los datos de la actividad antioxidante obtenidos para los compuestos **8** y **9** se muestran en la tabla 7.9.

**Tabla 7.9.** Inhibición de la peroxidación lipídica

Compuesto	%Inhibición peroxidación lipídica
<b>8</b>	60.3 ± 6.2
<b>9</b>	52.5 ± 9.0
<b>HT</b>	27.4 ± 8.6
<b>Ácido <math>\alpha</math>-lipoico</b>	4.6 ± 1.9

Los valores de inhibición de la peroxidación para ambos compuestos son claramente superiores tanto a los exhibidos por el HT, modesto inhibidor, como por el ácido  $\alpha$ -lipoico, cuya actividad es prácticamente nula. Cabe destacar que para el compuesto **9**, la sinergia entre el fragmento de lipoilo y un grupo catecol es efectiva para este tipo de actividad antioxidante.

#### *Tio y selenoderivados con fragmentos de catecol*

Los valores obtenidos para los compuestos **11**, **17-27** se muestran a continuación en la tabla 7.10.

**Tabla 7.10.** Inhibición de la peroxidación lipídica.

Compuesto	%Inhibición peroxidación lipídica
<b>11</b>	23.4 ± 8.6
<b>17</b>	47.1 ± 10.0
<b>18</b>	44.3 ± 7.1
<b>19</b>	28.3 ± 0.3
<b>20</b>	45.7 ± 8.4
<b>21</b>	62.6 ± 5.1
<b>22</b>	28.0 ± 6.5
<b>23</b>	67.4 ± 5.9
<b>24</b>	66.7 ± 9.8
<b>25</b>	71.3 ± 2.4
<b>26</b>	63.4 ± 2.5
<b>27</b>	36.2 ± 8.7
<b>Norepinefrina</b>	26.5 ± 6.7

El tioacetato **11**, con un porcentaje del  $23.4 \pm 8.6$ , no se comporta como un inhibidor eficiente de la peroxidación lipídica; aun así, esta actividad no se aleja de la mostrada por el HT, que tampoco es un potente inhibidor.

En cuanto a las tio y selenoureas **17-27**, se observó una mejora significativa de la actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica respecto de la norepinefrina ( $26.5 \pm 6.7\%$ ), alcanzándose valores entre el 28 y el 71%. Para la tioureas **17-23** se pudo observar que los valores más bajos de inhibición correspondían a aquellas con un fragmento alifático; mientras que para aquellas con un sustituyente aromático de tipo fenilo se producía un aumento, concretamente para las tioureas **21** y **23** se alcanzó una actividad significativamente alta, sin embargo, se pudo comprobar que la presencia del grupo naftilo para la tiourea **22** conducía a una disminución drástica de esta actividad antioxidante, con valores similares al mostrado por la norepinefrina ( $28.0 \pm 6.5$  y  $36.2 \pm 8.7$  respectivamente), lo cual también ocurría para la selenourea **27**. Las selenoureas **24-26**, con fragmentos de tipo alifático y fenilo, presentaron altos porcentajes de inhibición, destacando especialmente la **25**, con un  $71.3 \pm 2.4$  %. Estos resultados



parecen indicar además que la presencia de un átomo de selenio parece tener un papel fundamental en el proceso de inhibición de la peroxidación lipídica.

### *Derivados peptídicos polifenólicos derivados de L-aminoácidos*

Los valores de inhibición de la peroxidación lipídica obtenidos para los compuestos **34-38**, **40** y **41** se muestran en la tabla 7.11.

**Tabla 7.11.** Inhibición de la peroxidación lipídica.

Compuesto	%Inhibición peroxidación lipídica
<b>34</b>	47.7 ± 4.9
<b>35</b>	54.8 ± 0.4
<b>36</b>	34.1 ± 4.9
<b>37</b>	45.2 ± 4.6
<b>38</b>	43.1 ± 11.7
<b>40</b>	36.5 ± 4.6
<b>41</b>	53.9 ± 5.3
<b>HT</b>	27.4 ± 8.6
<b>DOPAC</b>	45.7 ± 8.7

El ácido DOPAC, muestra un poder de inhibición de la peroxidación lipídica sensiblemente superior al del HT, en concreto del  $45.73 \pm 8.7\%$ . a la concentración ensayada.

En el caso de los peptidomiméticos, todos ellos mostraron valores de inhibición de la peroxidación lipídica superiores al HT: los compuestos **35** y **41** fueron los que mostraron los valores más altos ( $54.8 \pm 0.4\%$  y  $53.9 \pm 5.3\%$  respectivamente), un valor que prácticamente dobla al del HT, siendo también superior a la del DOPAC. Sin embargo el compuesto **40**, que mostró anteriormente los mejores valores tanto para actividad atrapadora de radicales DPPH, mostró un valor de inhibición de la peroxidación lipídica bajo en comparación con el resto de compuestos, del  $36.48 \pm 4.6\%$ .

**Derivados con múltiples fragmentos catecol vía “click chemistry”**

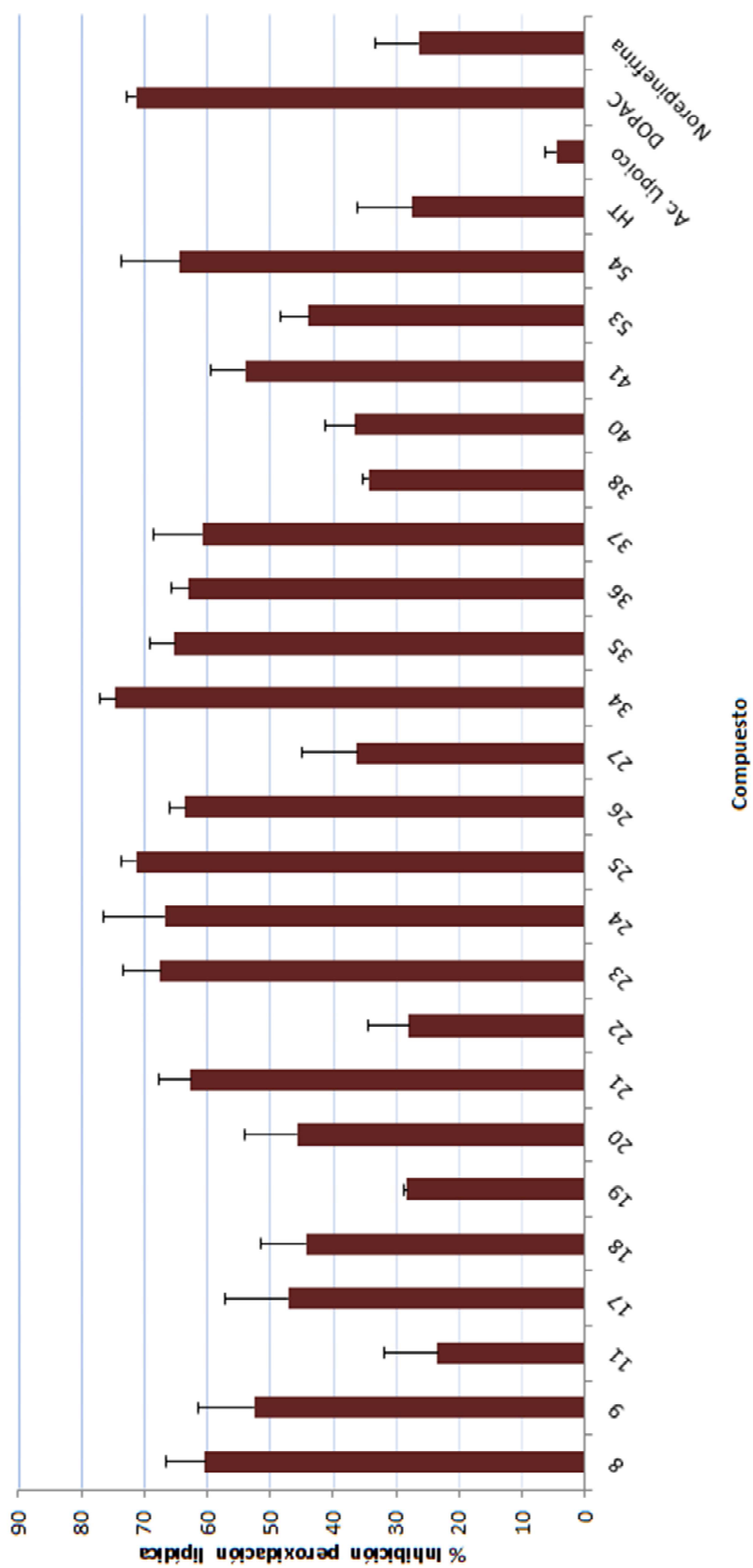
Los valores de inhibición de la peroxidación lipídica obtenidos para los compuestos **53** y **54** se muestran en la tabla 7.12.

**Tabla 7.12.** Inhibición de la peroxidación lipídica.

<b>Compuesto</b>	<b>%Inhibición peroxidación lipídica</b>
<b>53</b>	43.9 ± 4.3
<b>54</b>	64.3 ± 9.3
<b>HT</b>	27.4 ± 8.6

En este ensayo si se observa una correlación entre el número total de anillos polifenólicos y la actividad, ya que, como puede observarse, crece significativamente desde el HT hasta el sistema trivalente **54**.

La inhibición de la peroxidación lipídica mostrada por todos los compuestos ensayados se resume en la gráfica 7.4.



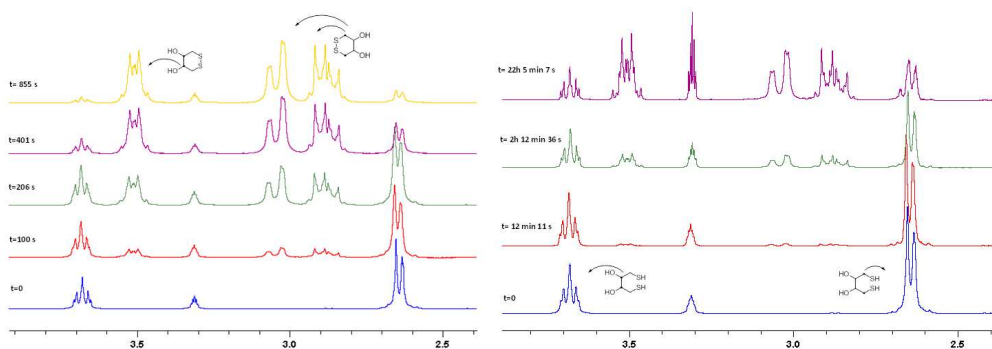
Gráfica 7.4 Inhibición de la peroxidación lipídica.

### 7.2.1.4. Medida de la actividad mimética de la glutatión peroxidasa

Esta actividad ha sido evaluada tanto para las tioureas como para las selenoureas sintetizadas mediante espectroscopía  $^1\text{H}$ -RMN. Para ello se ha utilizado una cantidad catalítica (1% molar) de los compuestos a evaluar en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y ditioneitol (DTT) como fuente de tiol. Puesto que la reacción de oxidación del DTT también se da, aunque más lentamente, en ausencia de catalizador, se realiza también un ensayo de control en el que no se adiciona selenourea y en el que se sigue la evolución de  $\text{DTT}^{\text{red}}$  a  $\text{DTT}^{\text{ox}}$  debida únicamente a la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

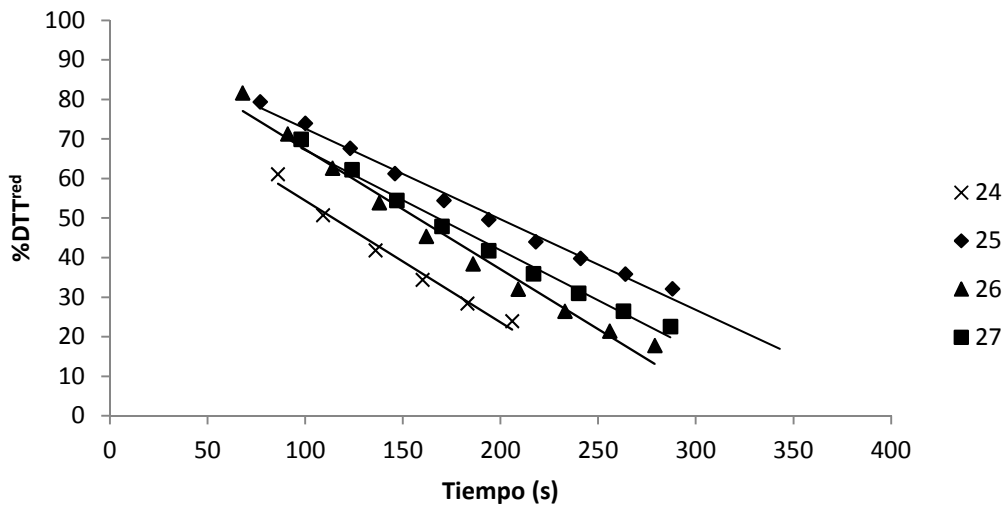
El proceso se monitoriza a través de la desaparición de la señales correspondientes a la especie  $\text{DTT}^{\text{red}}$  ( $\delta=2.63, 3.67$  ppm en  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y el aumento de las señales correspondientes a  $\text{DTT}^{\text{ox}}$  ( $\delta=2.87, 3.03, 3.49$  ppm).

La actividad mimética de la glutatión peroxidasa se ha estimado a través del valor de  $t_{1/2}$ , es decir, el tiempo necesario para transformar el 50% de DTT ( $\text{DTT}^{\text{red}}$ ) en su correspondiente disulfuro cíclico ( $\text{DTT}^{\text{ox}}$ ) al reaccionar con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En la figura 6.5 se muestra como ejemplo la evolución de la reacción de oxidación del DTT catalizada por la selenourea **25**, pudiéndose observar que el porcentaje de  $\text{DTT}^{\text{red}}$  decrece rápidamente con el tiempo.

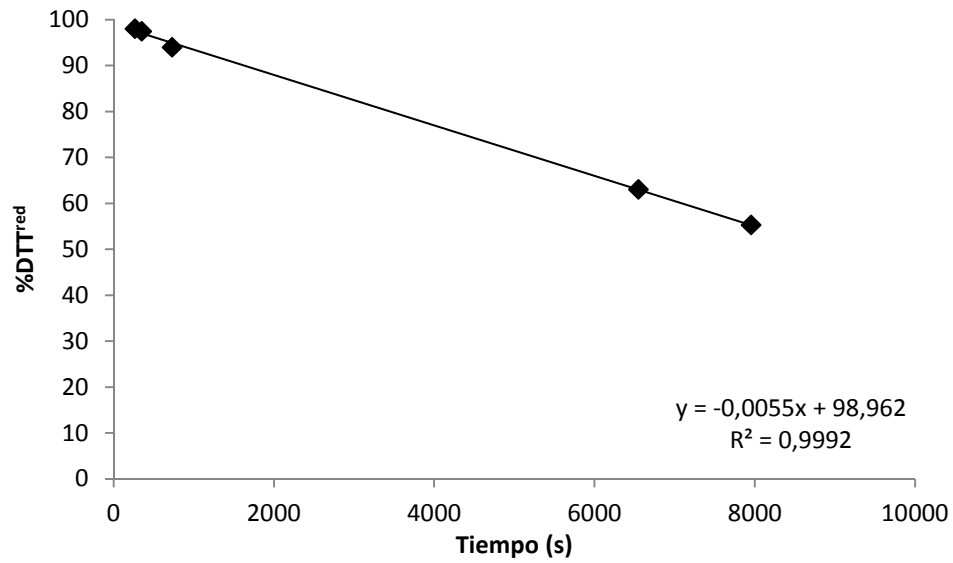


**Figura 7.5.** Seguimiento por  $^1\text{H}$ -RMN del ciclo catalítico de la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  para la selenourea **25**(a) y la muestra control (b)

Los valores de  $t_{1/2}$  para cada compuesto se obtuvieron por interpolación en la gráfica del porcentaje del  $\text{DTT}^{\text{red}}$  frente al tiempo (s). De estas gráficas se pudo observar, en primer lugar, que las selenoureas **24-27** mostraron un comportamiento similar, pudiéndose ajustar los datos experimentales a una regresión lineal para todas ellas (Gráfica 7.5). Los resultados obtenidos fueron excelentes, alcanzándose en algún caso  $t_{1/2}$  inferiores a dos minutos (114-194 s), y muestran el enorme potencial de estos compuestos como miméticos de la GPx, ya que el control (ensayo en ausencia de catalizador) presentó un  $t_{1/2}$  superior a las 2 h (Gráfica 7.6).



**Gráfica 7.5** Representación del porcentaje de  $\text{DTT}^{\text{red}}$  remanente frente a t(s) para las selenoureas **24-27**.



**Gráfica 7.6.** Representación del porcentaje de DTT<sup>red</sup> remanente frente a t(s) para la muestra control.

Sin embargo, el ajuste a una regresión lineal de los datos no fue posible para el caso de las tioureas, para las que se observó una cinética de reacción claramente diferente y ajustable a una curva logarítmica, como puede observarse en las gráficas incluidas en la figura 7.6.

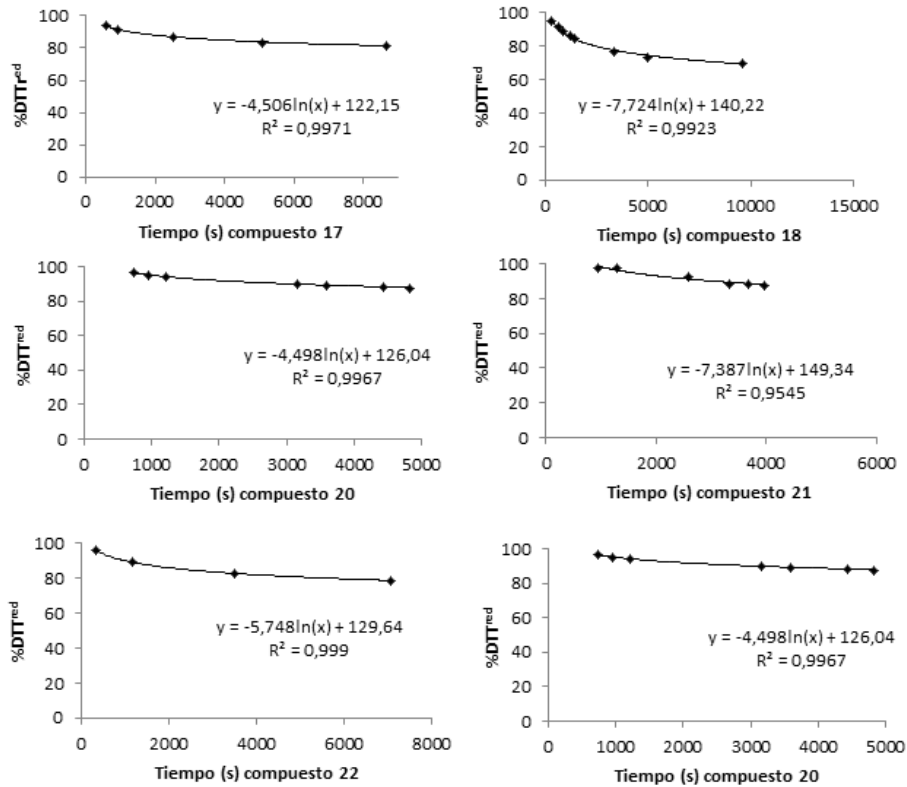


Figura 7.6

De la interpolación en las curvas se obtuvo el valor del  $t_{1/2}$  para las tioureas, las cuales no mostraron resultados tan satisfactorios como los selenosósteros, sino que mostraron tiempos de vida media incluso superiores al control a dicha concentración, lo cual corrobora la especificidad de esta actividad para compuestos organoselénicos. En la tabla 6.13 se muestran los valores de  $t_{1/2}$  para todos los compuestos ensayados.

Tabla 7.13. Tiempos de vida media,  $t_{1/2}$ (s), en los ensayos de actividad mimética de GPx

Compuesto	$t_{1/2}$ (s)
17	>control
18	>control
20	>control
21	>control

---

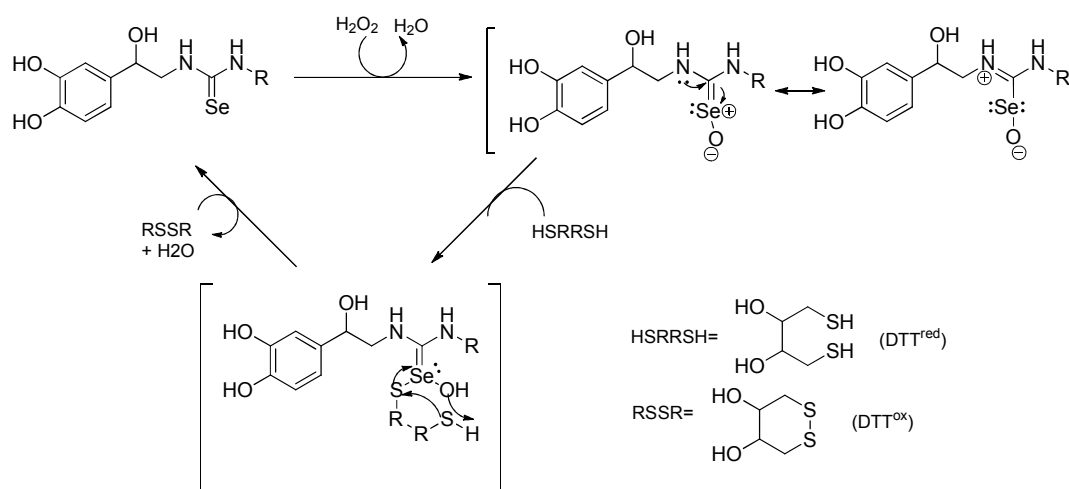
22	>control
23	>control
24	114
25	194
26	157
27	168
<b>Control</b>	8902

---

Estos resultados demuestran que las selenoureas sintetizadas se comportan como excelentes miméticos de la glutatión peroxidasa, y por tanto son eficaces para la eliminación de ROS de tipo peróxido, mientras que las tioureas no muestran este tipo de actividad.

El ciclo catalítico propuesto para las selenoureas actuando como miméticos de la glutatión peroxidasa es el que se muestra en el esquema 6.8. El compuesto organoselénico es oxidado en primer lugar por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  para generar su correspondiente selenóxido. A continuación, este intermedio reacciona con un grupo tiol del ditioneitol ( $\text{DTT}^{\text{red}}$ ), para dar un aducto selenil-sulfuro. Por último, y mediante la reacción con el segundo grupo tiol, se obtiene el disulfuro cíclico  $\text{DTT}^{\text{ox}}$ , regenerándose el compuesto organoselénico, que puede de nuevo comenzar el ciclo catalítico. El hecho de que concentraciones de las selenoureas de tan sólo el 1% molar permitan la desaparición completa del DDT, demuestra la existencia de un ciclo catalítico. El intento de cuantificar el proceso a concentraciones superiores resultó infructuoso, ya que la velocidad de reacción fue superior al tiempo de registro del espectro, obteniéndose el producto final  $\text{DTT}^{\text{ox}}$  antes de poder obtener espectros a varios tiempos de reacción.





**Esquema 7.8.** Mecanismo de actuación de la selenoureas como miméticos de la GPx.

Se ha descrito que la presencia de heteroátomos próximos al selenio, especialmente grupos amino, provoca un incremento de la actividad mimética de la GPx de algunos compuestos organoselénicos por varios motivos: (1) existe un efecto sinérgico del selenio y del nitrógeno básico en la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (2) el selenio como centro activo cataliza la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante la interacción del con el nitrógeno, de carácter básico. Además, la amina interviene en la deprotonación del grupo sulfhidrilo, de modo que promueve una alta concentración de anión tiolato, favoreciendo el progreso del ciclo.<sup>365</sup>

### 7.2.2. Medidas de la actividad anticancerígena y antitumoral

Los peptidomiméticos **34-37**, **40** y **41** fueron evaluados como agentes antiproliferativos en el grupo del Dr. Luis Sánchez Sánchez (Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México). Por otro lado, las tio- y selenoureas **17-27** están siendo ensayadas en el grupo del Dr. Schwartz, en el CIBBIM-Nanomedicina, Instituto de Investigación del Hospital Vall d'Hebron (Barcelona).

### 7.2.2.1. Medida de la actividad antiproliferativa *in vitro* sobre líneas celulares de cáncer de cuello uterino

Con el objetivo de determinar la actividad antiproliferativa *in vitro* de los productos catecólicos desprotegidos sobre cáncer cervicouterino, los compuestos **34-37**, **40**, **41** se ensayaron sobre tres líneas celulares cancerígenas: HeLa y CasKi, que incorporan genes del virus del papiloma humano (VPH), y ViBo, no asociada al VPH. El ensayo sobre el derivado del triptófano desprotegido **38** no pudo ser llevado a cabo debido a la baja solubilidad que presentó el compuesto en las condiciones del ensayo.

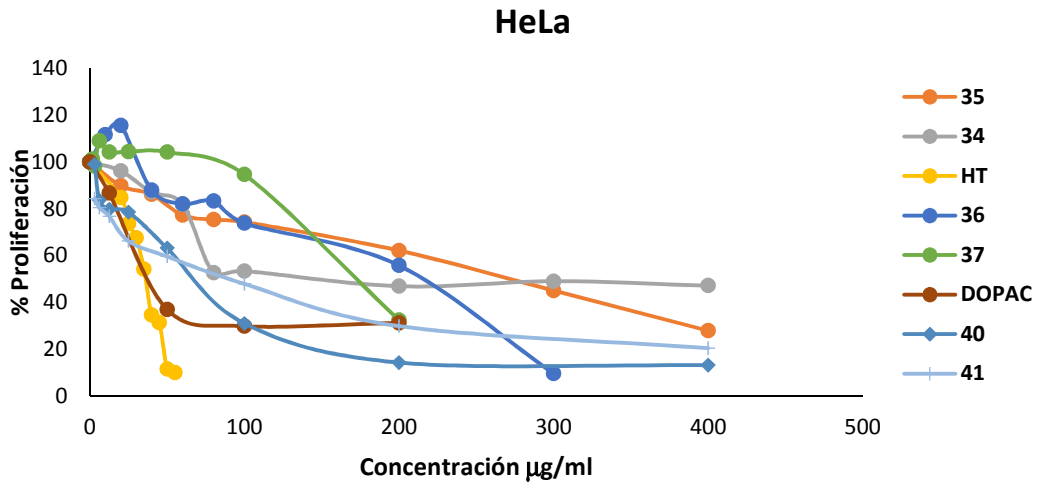
El estudio se focalizó en tres aspectos:

- **Capacidad antiproliferativa sobre las células tumorales.** Se determinaron valores de IC<sub>50</sub> respecto de las líneas celulares estudiadas. Se llevó a cabo mediante el método de tinción de cristal violeta, descrito en el Apartado 9.1.2.
- **Citotoxicidad tanto en células cancerígenas como no cancerígenas,** con objeto de dilucidar el mecanismo de muerte celular provocada por los péptidos. Se llevó a cabo mediante el ensayo de la lactato deshidrogenasa (LDH), descrito en el Apartado 9.1.2.
- **Capacidad antiproliferativa sobre linfocitos humanos,** con objeto de analizar la selectividad en el modo de acción entre células cancerígenas y células sanas, aspecto esencial cuando una sustancia puede ser empleada en un tratamiento de quimioterapia. Se llevó a cabo mediante el ensayo CFSE, descrito en el Apartado 9.1.2.

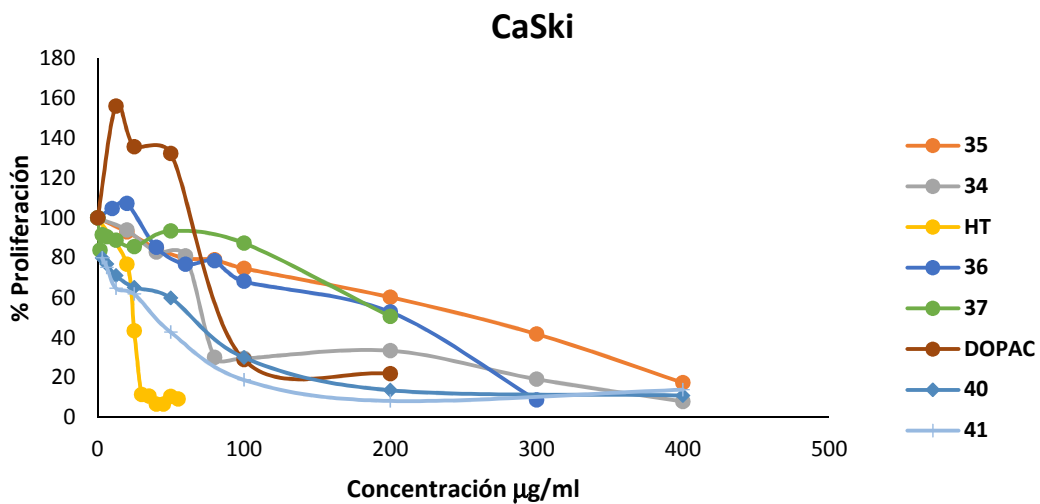
#### ***Determinación de la capacidad antiproliferativa sobre las células tumorales***

En primer lugar, para cada uno de los compuestos y cada una de las tres líneas celulares empleadas, se obtuvieron las curvas de dosis-respuesta, donde se determinó el porcentaje de proliferación para las tres líneas celulares ensayadas, HeLa, CasKi y ViBo, en presencia de concentraciones crecientes de cada uno de los compuestos: HT, DOPAC,

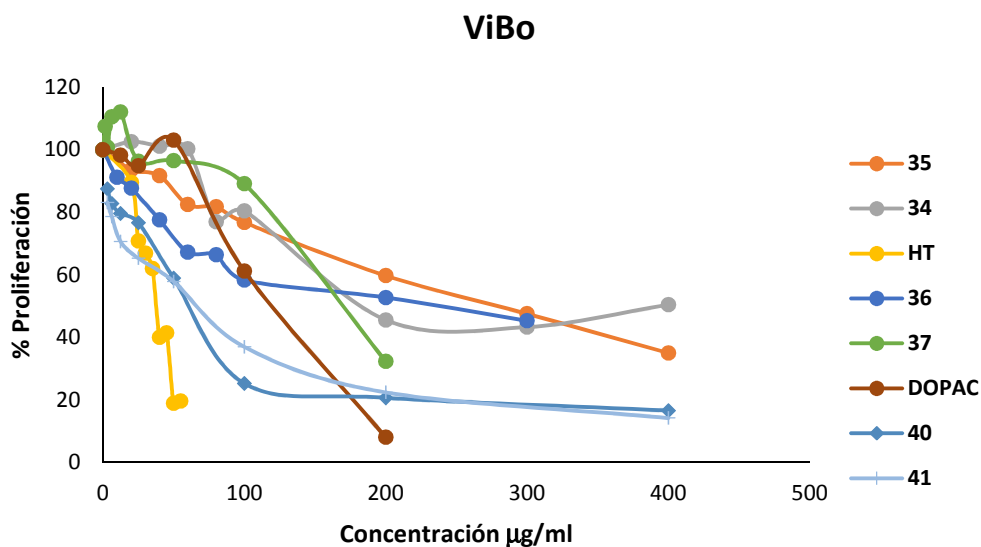
y los catecoles **34-37**, **40** y **41**. (Gráficas 7.7-7.9). Cabe destacar que este tipo de estudio de actividad antiproliferativa no se había realizado con anterioridad para el HT ni el DOPAC considerando estas líneas celulares.



Gráfica 7.7. Curva dosis-respuesta para los compuestos ensayados frente a la línea celular HeLa.



Gráfica 7.8 Curva dosis-respuesta para los compuestos ensayados frente a la línea celular CasKi.



**Gráfica 7.9** Curva dosis-respuesta para los compuestos ensayados frente a la línea celular ViBo.

A partir de las gráficas anteriores se ha calculado el valor de  $IC_{50}$ , es decir, la concentración de compuesto requerida para reducir la proliferación de las líneas celulares cancerígenas al 50%. Estos datos se reflejan en la tabla 6.14, donde los valores de  $IC_{50}$  se encuentran expresados en valores de concentración  $\mu M$ . El valor de  $IC_{50}$  es inversamente proporcional a la capacidad antiproliferativa de la sustancia.

**Tabla 7.14.** Valores de  $IC_{50}$  para las distintas líneas celulares estudiadas ( $\mu M$ )

Compuesto	HeLa	CaSki	ViBo
HT	239	227.8	237.5
DOPAC	286.6	534.1	765.0
34	419.5	299.3	720.3
35	772.5	706.5	827.9
36	790.0	662.2	739.3
37	603.7	734.3	590.0
40	121.8	108.2	109.5
41	373.4	156.7	236.7

Al analizar los resultados de tabla, se comprobó que todos los productos, incluyendo los controles HT y DOPAC, mostraban una actividad antiproliferativa moderada *in vitro* para las tres líneas celulares estudiadas ( $IC_{50}$ 's comprendidos entre 227.8-765.0  $\mu M$ ). Para el resto de compuestos, se observó que la inclusión en el carbono

$\alpha$  de cualquier sustituyente, tanto hidrófobo (fenilalanina, valina), como polar (serina) conducía a una disminución de la actividad sobre las líneas celulares relacionadas con el VPH. De manera significativa, el peptidomimético derivado de cistina **40** mostró el mejor perfil antiproliferativo ( $IC_{50}$  108.2-121.8  $\mu$ M), superior incluso a los compuestos naturales HT y DOPAC. De esta manera, se corrobora cómo la introducción de fragmentos de tipo disulfuro a los polifenoles permite mejorar la capacidad anticancerígena de estos derivados con respecto a los compuestos nativos. Un resultado similar fue obtenido recientemente en nuestro grupo de investigación para el disulfuro de hidroxitirosilo frente a líneas celulares de tipo HL60 (línea celular promielítica de la leucemia humana) y HL60R (multiresistente a fármacos).<sup>44</sup>

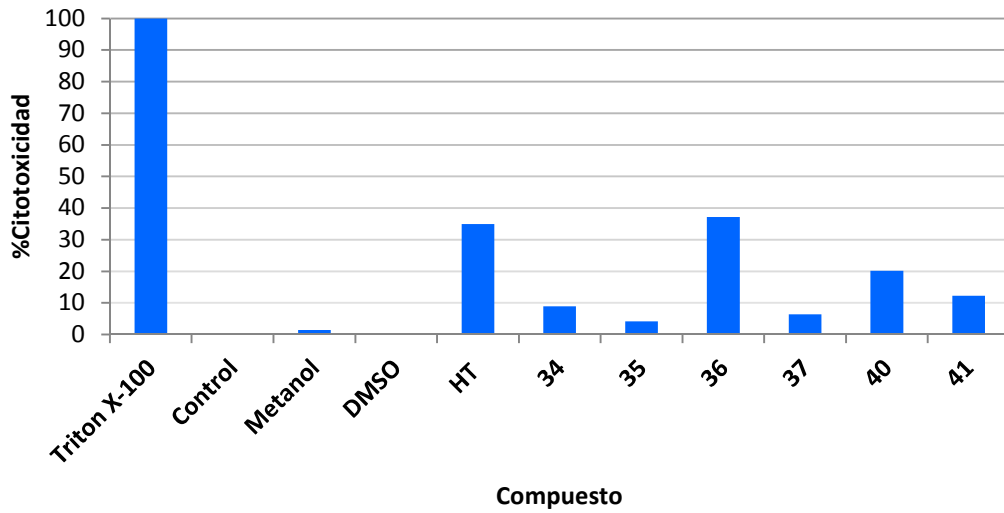
### ***Determinación de la actividad citotóxica en células de cáncer cervicouterino y linfocitos humanos***

Mediante este ensayo se obtiene información que sugiere si la muerte celular se produce por apoptosis (muerte celular programada, proceso ordenado y deseado en un fármaco anticancerígeno) o por necrosis (muerte celular por daños severos por un agente externo, proceso no deseado). Para ello, las tres líneas celulares fueron tratadas mediante el procedimiento descrito en el apartado 9.1.2 con los compuestos a las concentraciones de  $IC_{50}$  (Tabla 6.14), o disolvente puro (DMSO o MeOH, según el caso), como control.

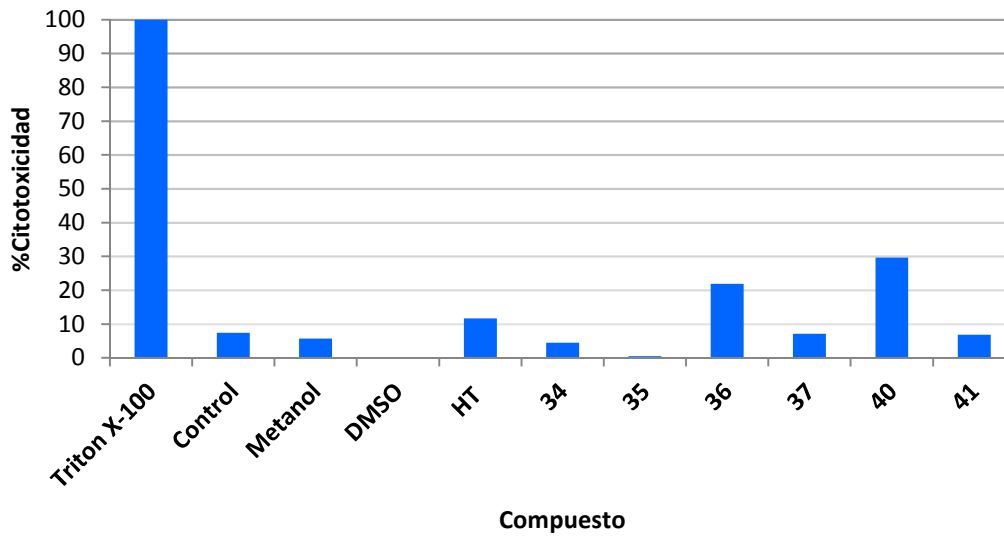
Se empleó Triton X-100, un tensioactivo no iónico de tipo polietoxilado para inducir la lisis celular; en este contexto, la cantidad de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el sobrenadante se toma como medida de la pérdida de integridad de la membrana celular.

En el caso de la citotoxicidad sobre las tres líneas celulares cancerígenas (HeLa, CaSki y ViBo, (3) se observó una influencia prácticamente nula de los disolventes empleados (MeOH, DMSO) sobre la citotoxicidad medida. Los compuestos **34**, **35** y **37** exhibieron una muy baja citotoxicidad, incluyendo linfocitos, es decir, células sanas. Estos resultados podrían sugerir que la disminución de la población celular en las gráficas de dosis-respuesta no se debe a un proceso de necrosis. Cabe destacar que, tanto el HT

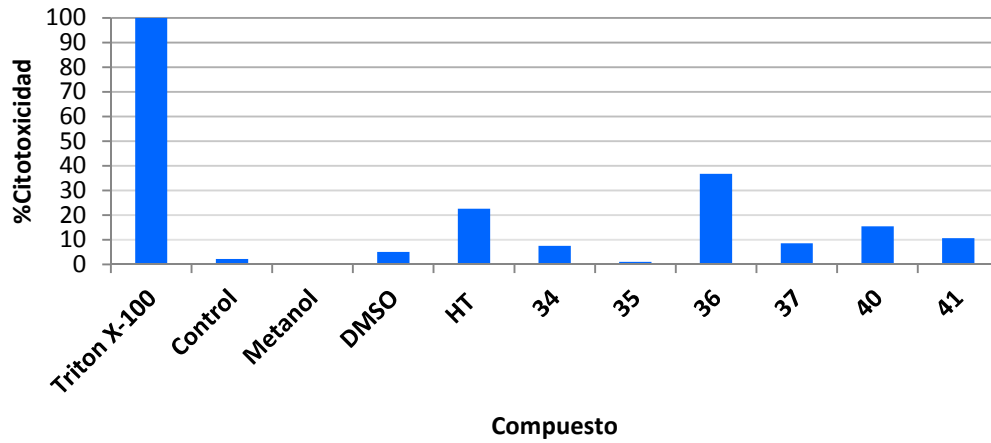
como el compuesto **36** muestran, especialmente en las tres líneas celulares una toxicidad muy superior, posiblemente indicando un mecanismo distinto de muerte celular, y posiblemente una mayor contribución de la necrosis.



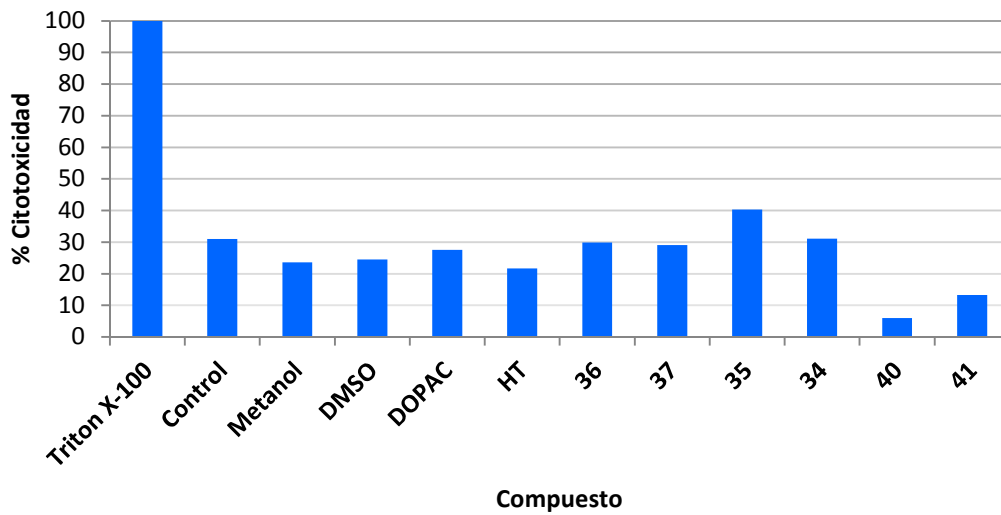
**Gráfica 7.10.** Actividad citotóxica sobre línea celular HeLa.



**Gráfica 7.11** Actividad citotóxica sobre línea celular CaSki



Gráfica 7.12. Actividad citotóxica sobre línea celular ViBo



Gráfica 7.13. Actividad citotóxica sobre linfocitos humanos.

### *Evaluación de la actividad antiproliferativa sobre células no tumorales*

Un problema importante asociado con los compuestos usados en tratamientos de quimioterapia es la poca selectividad hacia las células malignas, lo que conduce a numerosos y severos efectos secundarios en el paciente. Por ello, el estudio de la

actividad antiproliferativa de los compuestos ensayados en el presente proyecto fue completado con un estudio de capacidad antiproliferativa sobre células no tumorales (linfocitos humanos periféricos, parte del sistema inmunitario). Dado que durante un tratamiento con quimioterapia el sistema inmunitario se ve afectado, resulta un estudio de gran interés.

De esta manera, se estudió la proliferación de una población de linfocitos marcada con un fragmento fluorescente (derivado de fluoresceína) y estimulado con PHA (hemaglutinina, una lectina abundante en legumbres, y que provoca una intensa actividad mitogénica en los linfocitos) tratado con los compuestos en cuestión (a la concentración de su  $IC_{50}$ ) o el disolvente correspondiente, para analizar su influencia; el cultivo celular fue analizado tras 72 h mediante citometría de flujo (Figura 7.7). Atendiendo a los datos de la figura, se puede concluir que los compuestos que muestran mejor selectividad (menor capacidad antiproliferativa frente a linfocitos) son los compuestos **40** y **41**, que prácticamente no afectan a los linfocitos, comparados con el resto de derivados, HT y DOPAC, lo que confirma su alta selectividad frente a las células cancerígenas. De esta manera, los derivados de cistina y cisteína podrían considerarse como compuestos cabeza de serie en la búsqueda de derivados anticancerígenos polifenólicos, donde, si bien la actividad es aún moderada (aunque muy superior a polifenoles naturales), su selectividad hacia células sanas resulta excepcional.



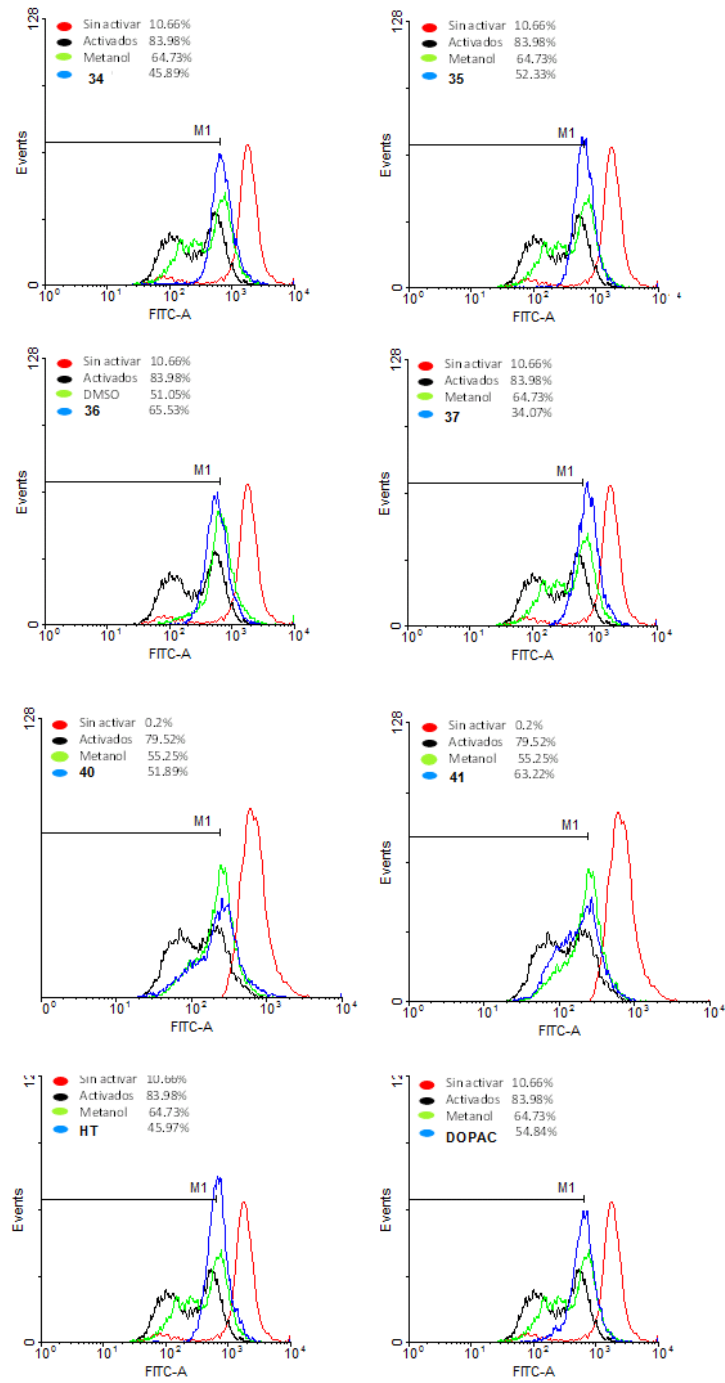


Figura 7.7. Ensayo de proliferación de linfocitos.

## **8. CONCLUSIONES**

## 8. CONCLUSIONES

### PRIMERA

Pueden prepararse ésteres alifáticos derivados del hidroxitirol mediante reacción quimioselectiva del hidroxilo alifático y ésteres grasos, empleando Amberlita IR-120(H<sup>+</sup>) como catalizador heterogéneo y reutilizable. El procedimiento es especialmente eficaz para el acetato de hidroxitirosilo, que fue preparado con un 74% de rendimiento.

### SEGUNDA

El 3',4'-dihidroxifenilacetato de hidroxitirosilo **8**, un éster dimérico aislado recientemente de un coleóptero, puede prepararse mediante una metodología de cinco etapas a partir del hidroxitirosol: protección de los hidroxilos fenólicos, oxidación hasta ácido carboxílico, conversión en cloruro de ácido, acoplamiento con HT protegido en los hidroxilos fenólicos y desprotección.

### TERCERA

La conversión del ácido  $\alpha$ -lipoico en el correspondiente cloruro de ácido, seguido de acoplamiento con hidroxitirosol catalizado por CeCl<sub>3</sub> permite el acceso al  $\alpha$ -lipoato de hidroxitirosilo **9** con un 65% de rendimiento global. Este proceso permite reducir significativamente el número de etapas sintéticas con respecto a los métodos descritos en la bibliografía, a la vez que incrementar el rendimiento global (6 etapas, 39%, 5 etapas, 60%).

### CUARTA

El acoplamiento del hidrocloreuro de norepinefrina con iso(tio)selenocianatos alifáticos y aromáticos permite el acceso a las correspondientes tio- y selenoureas

polifenólicas sin necesidad de protección previa, con tiempos de reacción cortos y en general, rendimientos de buenos a excelentes.

## QUINTA

El uso de PyBOP como agente acoplante entre el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y diversos aminoésteres derivados de L-aminoácidos permite obtener amidas polifenólicas con distinto grado de lipofilia, y excelentes rendimientos. El método ha resultado eficaz para la preparación de derivados de glicina, fenilalanina, valina, serina, triptófano y cistina. El derivado de cisteína, con un grupo tiol en su estructura, puede obtenerse a partir del de cistina mediante un proceso de reducción mediado por ditionitrosol (DTT).

## SEXTA

La reacción de cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu(I) azido-alquino (reacción de *click chemistry*) entre un azidoderivado del hidroxitirosol y un *core* con dos o tres grupos alquino en su estructura puede emplearse para la preparación de derivados polifenólicos di- y trivalentes.

## SÉPTIMA

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y ROESY demuestran la formación de complejos de inclusión entre el acetato y hexanoato de hidroxitirosilo **1** y **2**, el éster dimérico **8** y el peptidomimético derivado de cistina **40** y  $\beta$ -ciclodextrina, con constantes de asociación de 45, 186, 82 y  $70 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente.

## OCTAVA

Los estudios de antioxidación (capacidad antirradicalaria, captación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , inhibición de la peroxidación lipídica) revelan que el éster dimérico **8**, las tio- y

selenoureas **17-27**, el péptido **40**, y los triazolil derivados **53** y **54** presentan actividades sustancialmente mejoradas con respecto al HT. Además, las selenoureas **24-27** resultaron ser excelentes miméticos de la glutatión peroxidasa, actuando como catalizadores en la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con tiempos de vida media del orden de 2 minutos, a una concentración del 1% molar.

## NOVENA

La evaluación de la capacidad antitumoral del HT, DOPAC, y de los peptidomiméticos **34-38**, **40** y **41** frente a tres líneas de cáncer cervicouterino (HeLa, ViBo y CasKi) relevó que dichos compuestos poseían una actividad antiproliferativa moderada. El HT, no ensayado previamente frente a este tipo de cáncer, mostró valores de IC<sub>50</sub> comprendidos entre 227.8-239 µM. El péptido derivado de cistina **40** exhibió valores de IC<sub>50</sub> reducidos en aproximadamente un 50% (108.2-121.8 µM), y por tanto, una mejor actividad que los dos compuestos naturales ensayados. Asimismo, dicho péptido no mostró actividad antiproliferativa frente a células sanas de tipo linfocitos del sistema inmunitario, mostrando por tanto una gran selectividad frente a células cancerosas. Dicha selectividad resultó bastante pobre para el HT.

## **9. PARTE EXPERIMENTAL**

## 9. MÉTODOS GENERALES

Los **puntos de fusión** se han medido en un aparato analógico Electrothermal y en uno digital Electrothermal 9200 y no están corregidos.

La **cromatografía analítica de capa fina** (c.c.f.) con fines cualitativos se ha realizado utilizando cromatoplasmas de gel de sílice sobre aluminio (*Merck 60 F<sub>254</sub>*) de 0.25 mm de espesor. Como eluyentes se han empleado los que se indican en cada caso. La detección de los compuestos en las placas se ha realizado por exposición de éstas a luz UV ( $\lambda = 254$  nm) y mediante revelado por inmersión en disoluciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en EtOH al 10 %, vainillina (1.5 g) en EtOH con un 1% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o relevador de Mostain (5 g de molibdato amónico tetrahidrato y 0.1 g de nitrato cérico-amónico en 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ac. al 10%) y posterior calentamiento.

Para la **cromatografía en columna** con fines preparativos, se ha empleado como fase estacionaria gel de sílice (*Merck 60*; tamaños de partícula 0.040-0.063 y 0.063-0.200 mm), eluyendo por gravedad o sometiendo a una ligera presión. Los eluyentes empleados se indican en cada caso.

La **rotación óptica** se ha medido en un espectropolarímetro *Jasco V-630*, empleando la línea de emisión del sodio ( $\lambda = 589$  nm) y celdas de 1 cm o 1 dm de camino óptico. El disolvente y concentración empleados se indican en cada caso.

Los **espectros de absorción de IR** se han registrado en un espectrómetro *Jasco FT/IR-4100*, aplicando la muestra directamente sobre la lente.

Las **medidas de pH** se realizaron con un pH-metro de la marca Crison modelo *Microcrison pH 2001*. La calibración del aparato se ha llevado a cabo con tampones comerciales de pH=4 y pH=7.

Las **medidas UV** se han llevado a cabo en un espectrofotómetro Hitachi U-2900, utilizando cubetas de poliestireno de dimensiones 10x10x45 mm, y 10x4x45 mm. Se han empleado la longitud de onda y el blanco indicados en cada caso; antes de efectuar las medidas, el aparato se ha termostatizado a  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ .

Los **espectros de RMN** se han registrado en espectrómetros *Bruker AMX-300*, *Avance-300* (300.1 MHz para  $^1\text{H}$  y 75.5 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), *AMX-500* y *Avance-500* (500.13 MHz para  $^1\text{H}$  y 125.77 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Para algunas muestras, se empleó una criosonda *TCI 500 H-C/N-D*.

Se han empleado como disolventes  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}-d_6$  y  $\text{D}_2\text{O}$ . Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en ppm y los valores de las constantes de acoplamiento ( $J$ ), en Hz. Los espectros se han calibrado usando las señales del disolvente como referencias internas.

La asignación de las señales de  $^1\text{H}$  se ha realizado mediante experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (*Correlated Spectroscopy*).

La asignación de las señales de  $^{13}\text{C}$  se ha realizado mediante experimentos de  $^{13}\text{C}$ -RMN y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*).

Los espectros NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) se han obtenido utilizando un tiempo de mezcla de 300 ms.

Los espectros ROESY (*Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy*) se han obtenido utilizando un tiempo de mezcla de 300 ms.

Los **espectros de masas** se han realizado en el espectrómetro *Micromass AutoSpecQ* y *GC-MS Agilent Technologies 6850 Serie II/5973 Inert Instrument* del Servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Sevilla.

Las experiencias realizadas han sido:

***Ionización por impacto electrónico*** (EI, *Electron Impact*) a 70 eV, corriente de ionización de 300  $\mu\text{A}$ , voltaje acelerador de 8 kV, resolución de 1000 o 10000 (definición del 5 % de valle) y velocidad de barrido de 2 o 3 s/dec respectivamente.

***Ionización por FAB-LSIMS*** (*Fast Atom Bombardment-Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*). Se empleó cañón de  $\text{Cs}^+$  (35 kV y 2  $\mu\text{A}$ ) con sonda de muestra y fuente de FAB. Voltaje acelerador de 8 kV,  $2 \cdot 10^{-4}$  mbar. Voltaje acelerador de 4 kV. Resolución 10000 (definición del 5% de valle) y velocidad de barrido de 5 s/dec. Las



matrices usadas fueron tioglicerol con NaI como aditivo y alcohol *m*-nitrobenfílico. Como referencias internas se emplearon PEG-400, 600, 900 y 1000.

**Ionización química** (CI, *Chemical Ionization*) a 150 eV, usando como gas reactivo metano e isobutano a una presión de 0.8 bar, corriente de 500  $\mu$ A, voltaje acelerador de 8 kV, resolución 10000 (definición del 5 % de valle) y velocidad de barrido de 5 s/dec.

En los datos incluidos de los espectros de masas de baja resolución, se indican los valores de la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los picos más representativos, junto con su intensidad relativa referida al pico más intenso. En los espectros de masas de alta resolución se compara el valor de  $m/z$  encontrado hasta la cuarta cifra decimal para el ion pseudomolecular o molecular, con el calculado a partir de los isótopos más abundantes.

### **Estudio de la formación de complejos de inclusión por técnicas de RMN**

La  $\beta$ -ciclodextrina se secó a 90°C a vacío durante 8 h. Debido a la sensibilidad de todos los compuestos ensayados.

Los valores de desplazamiento químico,  $\delta$  (ppm), han sido calculados usando como patrón interno la señal de HDO a 4.790 ppm. Los experimentos ROESY han sido llevados a cabo usando un tiempo de mezcla de 400 ms. En todos los casos, la diferencia de desplazamiento químico inducida por la complejación,  $\Delta\delta$ , se define como la diferencia de desplazamiento químico del huésped libre y en presencia de la ciclodextrina ( $\delta_{\text{free}} - \delta_{\text{complex}}$ ). Para la gráfica de Job, se han tomado diferentes fracciones de disoluciones de concentración 12 mM de los compuestos ensayados y  $\beta$ -CD en D<sub>2</sub>O-DMSO-*d*<sub>6</sub> 10:1, las cuales han sido mezclados manteniendo un volumen constante, con el fin de mantener la suma de las concentraciones constante (12 mM). Para la gráfica de Scott, diferentes volúmenes de una disolución del compuesto ensayado (9 mM) en D<sub>2</sub>O-DMSO-*d*<sub>6</sub> 10:1 y otra de  $\beta$ -CD (15 mM) en D<sub>2</sub>O-DMSO-*d*<sub>6</sub> 1:1 han sido mezclados manteniendo volúmenes constantes (1mL) de modo que la concentración de los compuestos se mantuviera constante e igual a 9 mM. Las mezclas de los compuestos ensayados y  $\beta$ -CD se mantuvieron a 25°C durante 48 h y protegidas de la luz para asegurar la formación de los complejos de inclusión.

### 9.1.1. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

#### Ensayo de la actividad atrapadora de radicales libres (DPPH)

Se ha llevado a cabo siguiendo la metodología de Prior y colaboradores.<sup>1</sup> Se preparan disoluciones de DPPH 60  $\mu\text{M}$  en MeOH grado HPLC (1.17 mL), a las cuales se añade 30  $\mu\text{L}$  de la disolución metanólica de la sustancia antioxidante a 7 concentraciones distintas, o bien 30  $\mu\text{L}$  de metanol en el caso de la muestra control. Las muestras se incuban en la oscuridad a t.a. durante 30 min, y posteriormente se mide la disminución de la absorbancia a 515 nm frente a un blanco (MeOH). Todas las medidas se realizan por triplicado. El valor de DPPH remanente ha sido calculado del modo que se indica a continuación:

$$\% \text{DPPH remanente} = \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

Donde  $A_{\text{muestra}}$  y  $A_{\text{control}}$  corresponden a las absorbancias a 515 nm del radical libre en las disoluciones de la muestra y la disolución control respectivamente.

Se representa gráficamente el DPPH remanente frente a la concentración de antioxidante en la cubeta, y a partir de la gráfica se interpola el valor de  $EC_{50}$  (*Effective Concentration*), esto es, la concentración del antioxidante que permite destruir el 50% de la concentración inicial de DPPH. Los resultados para cada muestra se han expresado como concentración mM de DPPH remanente.

#### Ensayo de la actividad atrapadora de peróxido de hidrógeno

Se ha llevado a cabo siguiendo la metodología de Bahorun y colaboradores.<sup>2</sup> A una disolución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.003% (100  $\mu\text{L}$ ), NaCl 0.1 M (100  $\mu\text{L}$ ), y buffer de fosfato 0.1 M (pH 7.4, 700  $\mu\text{L}$ ) se añade una disolución 10 mM del compuesto a ensayar en MeOH,

<sup>1</sup> Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290-4302.

<sup>2</sup> Bahorun, T.; Gressier, B.; Trotin, F.; Brunet, C.; Dine, T.; Luyckx, M.; Vasseur, J.; Cazin, J.C.; Pinkas, M. *Arzneim. Forsch.* **1996**, *46*, 1086-1089.

o bien sólo MeOH en el caso de la muestra control. La disolución resultante se incuba en la oscuridad a 37 °C durante 20 min. A continuación, se añade una disolución en buffer de fosfato (pH 7.4, 1.0 mL) que contiene rojo de fenol (0.2 mg/mL) y peroxidasa de rábano (0.1 mg/ mL). La disolución resultante se vuelve a incubar durante 15 min. adicionales a 37°C. Posteriormente, se añade NaOH 1 M (100 µL) y la mezcla se deja a temperatura ambiente durante 10 min. y a continuación se mide la absorbancia a 610 nm frente a un blanco 18.7:3:1 de buffer de fosfato: H<sub>2</sub>O: metanol. Todas las medidas se hacen por triplicado. Los resultados se expresan como porcentajes de reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> según la expresión:

$$\%H_2O_2 \text{ reducido} = \frac{A_{H_2O_2} - A_{muestra}}{A_{H_2O_2}} \times 100$$

Donde A<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> se refiere a la disolución control con MeOH en lugar de la disolución del compuesto, y A<sub>muestra</sub> se refiere a la absorbancia de las disoluciones que contienen el compuesto a estudiar.

#### **Ensayo de la actividad frente a la peroxidación lipídica (Método del tiocianato férrico)**

Se ha llevado a cabo siguiendo una modificación de la metodología descrita por Azuma y colaboradores.<sup>3</sup> A una mezcla en un vial del compuesto a estudiar (10 mM en MeOH, 37 µL) y ácido linoleico (1.3% (p/V) en MeOH, 175 µL) en H<sub>2</sub>O (88 µL) y búffer de fosfato 0.2 M (pH 7.0, 175 µL) se añade una disolución de AAPH 55.3 mM en buffer (25 µL). La disolución control se prepara utilizando MeOH (37 µL) en lugar de la muestra.

La mezcla resultante se incuba a 50±1 °C durante 24 h en la oscuridad. Posteriormente, se toman 30 µL de esta mezcla y se añade H<sub>2</sub>O (2.18 mL), MeOH (0.73 mL), una disolución acuosa de NH<sub>4</sub>SCN (30 µL) y una disolución de FeCl<sub>2</sub> 20 mM en HCl 3.5% (30 µL). Tras incubar 3 min a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 546 nm frente a un blanco (24.8% de MeOH, 0.4% de buffer, 73.8% de agua y 1% de HCl 3.5%).

<sup>3</sup>Azuma, K.; Nakayama, M.; Koshioka, M.; Ippoushi, K.; Yamaguchi, Y.; Kohata, K.; Yamauchi, Y.; Ito, H.; Higashio, H. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3963-3966.

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la peroxidación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

Donde  $A_{\text{control}}$  se refiere a la disolución que contiene MeOH en lugar de la disolución de la muestra, y  $A_{\text{muestra}}$  se refiere a la absorbancia de las disoluciones de los compuestos estudiados.

### **Ensayo de la actividad mimética de la glutatión peroxidasa.**

Este ensayo se ha llevado a cabo sobre las tio y selenoureas sintetizadas mediante espectroscopia de RMN y siguiendo la metodología de Iwaoka y colaboradores,<sup>4</sup> basada en la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de ditioneitol ( $\text{DTT}^{\text{red}}$ ). Para cada experimento, se disolvió  $\text{DTT}^{\text{red}}$  (25 mg, 0.161 mmol) y la tio o selenourea a ensayar (8.0  $\mu\text{mol}$ , 5% en moles) en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (0.6 mL). La reacción fue iniciada por la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (16  $\mu\text{L}$ , 0.161 mmol) y se monitorizó la desaparición de los protones CH de la especie  $\text{DTT}^{\text{red}}$  (3.68 ppm), y la aparición de los protones CH del disulfuro cíclico ( $\text{DTT}^{\text{ox}}$ , 3.51 ppm) a diferentes intervalos de tiempo. La proporción entre  $\text{DTT}^{\text{red}}$  y  $\text{DTT}^{\text{ox}}$  fue calculada mediante la integración de dichas señales. La representación del porcentaje de  $\text{DTT}^{\text{red}}$  en la mezcla frente al tiempo de reacción permite calcular el tiempo de semivida,  $t_{1/2}$ , es decir, el tiempo requerido para la desaparición del 50% del  $\text{DTT}^{\text{red}}$  original. Se llevó también a cabo un experimento control sin tio ni selenourea con objeto de comparar la velocidad de la reacción en ausencia de antioxidante.

### **Tratamiento estadístico de las medidas**

Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado para cada muestra. Los valores fueron expresados como intervalo de confianza, calculado para  $n=3$  y  $P=0.95$ , empleando la distribución  $t$  de Student.

---

<sup>4</sup> Iwakowa, M.; Kumakura, F.; *Phosphorous, Sulphur Silicon Relat, Elem.* **2008**, *183*, 1009-1017.

### 9.1.2. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA.

Los ensayos antiproliferativos sobre las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo fueron llevados a cabo por el grupo del Dr. Luis Sánchez Sánchez, en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Autónoma de México.

#### **Cultivos celulares**

Las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo fueron adquiridas en *American Type Culture Collection* (ATCC Rockville, MD) y cultivadas en un medio de RPMI-1640 (GIBCO, USA), el cual contenía un 5% de suero de ternero recién nacido (*Newborn Calf Serum*, NCS, GIBCO, USA) con rojo de fenol suplementado con bencilpenicilina. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% y a 37°C. Todos los ensayos celulares fueron llevados a cabo empleando células en la fase de crecimiento exponencial.

#### **Ensayos de proliferación celular.**

Los ensayos fueron llevados a cabo mediante cultivos de 7500 células/pocillo en placas ELISA de 96 pocillos (Tecan, USA), a los cuales se añadieron 100 µL de medio de cultivo RPMI-1600 suplementado con 5% de suero de ternero recién nacido (NCS). Los cultivos se dejaron proliferar durante 24 h en el medio, habiéndose añadido un 1% de MeOH a los cultivos de control. La actividad antiproliferativa (IC<sub>50</sub>) fue determinada tras 24 h mediante el procedimiento de tinción de cristal violeta, y la absorbancia medida a 590 nm.

#### **Determinación de la citotoxicidad.**

La actividad citotóxica fue determinada empleando el kit *LDH Cytotoxicity Assay Kit* (BioVision, USA), y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En este ensayo, el LDH oxida el lactato hasta piruvato cuando reacciona con la sal de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio (INT), que se transforma en formazán. El incremento en la cantidad de formazán producido en el sobrenadante del cultivo se correlaciona

directamente con el aumento de la lisis celular. El formazán es hidrosoluble y puede ser detectado espectrofotométricamente a 500 nm. Los datos experimentales se han expresan considerando la desviación estándar de tres medidas independientes con tres repeticiones.

### **Ensayo CSFE (*Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester*) de la proliferación de linfocitos**

Para llevar a cabo este ensayo, se emplearon muestras de sangre heparinizada obtenida de voluntarios humanos sanos. De éstos, se aislaron células periféricas mononucleares (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) empleando *Hypaque* (Sigma-Aldrich) como estándar. Las PBMCs fueron lavadas dos veces empleando RPMI 1640 (GIBCO USA) al que se le añadió un 10% de suero bobino fetal (FBS, GIBCO, USA), penicilina (100 U/mL), y estreptomycin (100 U/mL). La población de linfocitos fue enriquecida (ELP) mediante la eliminación de las células adherentes, para ello, se le añadió un medio RPMI-1640 con un 20% de suero bobino fetal y se incubó a 37°C en una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5% durante 1 h, y las células no adheridas fueron cosechadas. Las células cosechadas fueron suspendidas de nuevo en un medio de cultivo RPMI-1460, a una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> células/MI. A dicha suspensión, se le añadió CSFE (Sigma-Aldrich, USA) hasta una concentración final 2 mM, y fue incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. El etiquetado se realizó mediante la adición del FBS en un volumen suficiente como para interactuar con el CFSE libre. Las células etiquetadas se lavaron 3 veces con buffer de fosfato salino estéril (PBS) conteniendo un 10% de FBS. Posteriormente se contaron y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI-1640 a una concentración de 1 x10<sup>6</sup> células/mL. Tanto las células no estimuladas, estimuladas con PHA o tratadas, se colocaron en una placa de cultivo a una concentración 2 x 10<sup>5</sup> células/pocillo, preparándose cinco réplicas para cada una de ellas. A dichas células se les añadió medio de cultivo RPMI-1460 con un 20% de FBS y se incubaron a 37°C durante 72 h. Los cultivos fueron cosechados, lavados dos veces con PBS, fijados con un 1% de formaldehído y a continuación analizados empleando citometría de flujo, adquiriéndose 10.000 medidas para cada muestra. Los datos fueron analizados empleando software WinMDI.

**Tratamiento estadístico de las medidas.**

La desviación estándar fue calculada empleando Excel (Microsoft Office, Versión 2013). El análisis estadístico diferencial fue llevado a cabo mediante análisis de varianza (ANOVA), empleando el programa *SPSS 10.0 for Windows*. Se consideró un valor de  $p < 0.05$  (Tukey t-test).

**9.2.PRODUCTOS COMERCIALES**

1,6-Heptadiino (Sigma-Aldrich)  
2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich)  
 $\alpha$ ,  $\alpha'$ -Dibromo-*o*-xileno (Acros Organics)  
 $\alpha$ - Naftilamina (Fluka)  
 $\beta$ - Ciclodextrina (Fluka)  
( $\pm$ ) Ácido  $\alpha$ -lipoico (Sigma-Aldrich)  
Acetato de etilo (SDS)  
Acetato de hidroxitirosilo (Seprox Biotech)  
Acetato de isopropenilo (Sigma-Aldrich)  
Acetato de vinilo (Sigma-Aldrich)  
Acetona (Fluka)  
Acetonitrilo (Acros Organics)  
Ácido acético (Sigma-Aldrich)  
Ácido ascórbico anhidro (Sigma-Aldrich)  
Ácido cafeico (Sigma-Aldrich)  
Ácido clorhídrico 37% (Panreac)  
Ácido fosfórico (Sigma-Aldrich)  
Ácido linoleico (Sigma-Aldrich)  
Ácido sulfúrico 95-98% (Panreac)  
Ácido trifluoroacético (Panreac)  
Anhídrido acético (Sigma-Aldrich)  
L-Ascorbato sódico (Acros Organics)  
Azida sódica (Sigma-Aldrich)  
Bencil isotiocianato (Aldrich)  
Bicarbonato sódico (Sigma-Aldrich)  
Borohidruro sódico (Merk)  
Bromuro de propargilo 80% en tolueno (Acros Organics)  
n-Butanol (Sigma-Aldrich)  
Butanona (Panreac)  
Butil isotiocianato (Sigma-Aldrich)



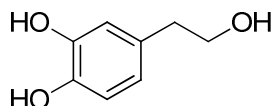
Carbonato de bis(triclorometilo) o trifosgeno (Fluka)  
Carbonato cálcico (Sigma-Aldrich)  
Carbonato de cesio (Sigma-Aldrich)  
Carbonato potásico (Sigma-Aldrich)  
Ciclohexilamina (Sigma-Aldrich)  
Cloruro de amonio (Fluka)  
Cloruro de benzoílo (Fluka)  
Cloruro de hierro (II) tetrahidrato (Sigma-Aldrich)  
Cloruro de hierro (III) (Sigma-Aldrich)  
Cloruro de *p*-tolueno-4-sulfonilo (Sigma-Aldrich)  
Cloruro sódico (Panreac)  
Decanoato de metilo (Sigma-Aldrich)  
Diclorometano (SDS)  
Dihidrógenofosfato de sodio (Panreac)  
Dimetilformamida (Panreac)  
Dioxano (Sigma-Aldrich)  
Dopamina hidrocloreuro (Acros Organics)  
Etanol (Panreac)  
Éter dietílico (SDS)  
Fenil isotiocianato (Sigma-Aldrich)  
Ferrocianuro potásico (Merk)  
Formanilida (Acros)  
Hexano (SDS)  
Hexanoato de metilo (Sigma-Aldrich)  
Hidrogenofosfato de disodio (Panreac)  
Hidrosulfito sódico (Sigma-Aldrich)  
Hidróxido de paladio sobre carbón activo (Sigma-Aldrich)  
Hidróxido de potasio (Riedel-de Haën)  
Hidróxido de sodio (SDS)  
Hidruro sódico (99%) (Sigma-Aldrich)  
Metanol (Sigma-Aldrich)  
Metil isotiocianato (Sigma-Aldrich)  
Nitrato sódico (Sigma-Aldrich)

Octanoato de metilo (Sigma-Aldrich)  
Paladio sobre carbón activo (Sigma-Aldrich)  
Peróxido de hidrógeno x% (Aldrich)  
Piridina (Panreac)  
Potasio dihidrógeno fosfato (Sigma-Aldrich)  
*p*-Tolil isotiocianato (Sigma-Aldrich)  
Resina Amberlita IR-120 (H<sup>+</sup>) (Fluka)  
Selenio negro (Merk)  
Sulfato magnésico anhidro (Panreac)  
Tamiz molecular 4 angstrom (Fluka)  
TEMPO (Sigma-Aldrich)  
Tetrabromuro de carbono (Sigma-Aldrich)  
Tetrahidrofurano (Acros Organics)  
Tierra silícea purificada y calcinada o Celita (Panreac)  
Tiocianato potásico (Sigma-Aldrich)  
Tolueno (Sigma-Aldrich)  
Toluidina (Scharlau)  
Tribromuro de boro (Acros Organics)  
Trietilamina (Sigma-Aldrich)  
Trietanolamina (Fluka)  
Trifenilfosfina (Panreac)  
Yodo (Fluka)

### **9.3. MATERIAS PRIMAS**

### 9.3. MATERIAS PRIMAS

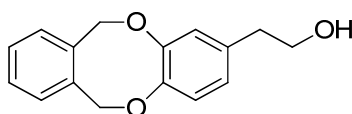
#### 9.3.1. Hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol) (59)



A una disolución de acetato de hidroxitirosilo (2.5 g, 12.74 mmol) en MeOH (25 mL) se añade HCl 1N (25 mL), y la disolución resultante se calienta a 40 °C en la oscuridad y bajo atmósfera inerte durante 4 h. A continuación, el crudo de reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:5→AcOEt-hexano 1:1) para dar **59** como un sirupo.

Rendimiento: 1.82 g, 93%.

#### 9.3.2. 2-[3',4'-(*o*-Xililenodioxi)fenil]etanol (133)



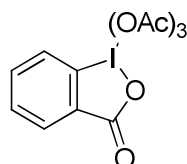
Se prepara siguiendo la metodología optimizada en nuestro grupo de investigación por López, M.A.<sup>1</sup> A una disolución de HT (560 mg, 3.63 mmol) en H<sub>2</sub>O–EtOH 10:1 (44 mL) se añade K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.00 g, 7.24 mmol), L-ascorbato sódico (720 mg, 3.63 mmol) y  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*o*-xileno (959 mg, 3.63 mmol) y la mezcla correspondiente se agita a 55 °C durante 4 horas bajo atmósfera inerte. A continuación, se concentra a sequedad, el residuo se disuelve en AcOEt y se lava con H<sub>2</sub>O y la fase acuosa se extrae (3x30 mL AcOEt). Las fases orgánicas reunidas se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y el filtrado se concentra a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en

<sup>1</sup> López, M.A. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, **2011**.

columna (hexano–AcOEt 5: 1→hexano–AcOEt 3: 1) para dar **133** como un sólido blanco.

Rendimiento: 461 mg, 48%.

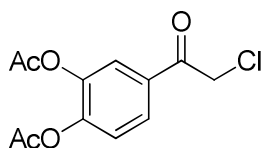
### 9.3.3. Peryodinano de Dess Martin (134)



Se prepara siguiendo una modificación de la metodología descrita por Dess, D.B. y Martin, J.C.<sup>2</sup> A una disolución de KBrO<sub>3</sub> (20.20 g, 120.96 mmol) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 M (191 mL) se le añade ácido 2-iodobenzoico (20.41 g, 82.29 mmol) en pequeñas porciones a 60°C y bajo atmósfera inerte. La mezcla resultante se mantiene agitando a dicha temperatura durante 2.5 h. Transcurrido ese tiempo, se enfría a 2-3°C, produciéndose la precipitación de un sólido. Dicho sólido se filtra a vacío y se lava con H<sub>2</sub>O (1x125 mL), EtOH absoluto (2x20 mL) y H<sub>2</sub>O (1x125 mL). A continuación, se disuelve en Ac<sub>2</sub>O (65 mL) y AcOH glacial (35 mL), y la mezcla se mantiene agitando a 85°C bajo atmósfera inerte hasta que se disuelve por completo; posteriormente se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente hasta la aparición de un nuevo precipitado, el cual se filtra y se lava con Et<sub>2</sub>O bajo atmósfera inerte.

Rendimiento: 22.82 g, 67%.

### 9.3.4. 2-cloro-3',4'-diacetoxiacetofenona (163)



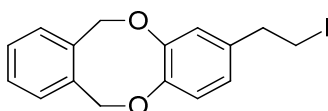
A una disolución de 2-cloro-3',4'-dihidroxiacetofenona (500 mg, 2.68 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (7 mL) se añade TEA (0.75 mL, 5.36 mmol) y cloruro de acetilo (0.38

<sup>2</sup> Dess, D.B.; Martin, J.C. *J. Org. Chem.* **1983**,48,4155-4156.

mL, 5.36 mmol). La mezcla resultante se agita a t.a. durante 12 h. Transcurrido ese tiempo, se concentra a sequedad, el crudo se disuelve en AcOEt (10 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (2x10 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentra a sequedad, obteniéndose el producto **163** como un sólido sin ser necesaria una purificación adicional.

Rendimiento: 643 mg, 89 %; *R<sub>F</sub>* 0.61 (hexano–AcOEt 1:1).

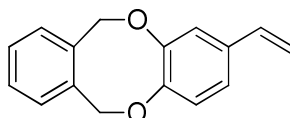
### 9.3.5. 1,2-(*o*-Xililenodioxi)-4-(2'-yodoetil)benceno (**169**)



Se prepara siguiendo la metodología optimizada en nuestro grupo de investigación por López, M.A.<sup>1</sup> A una disolución de 2-[3',4'-(*o*-xililenodioxi)fenil]etanol (171 mg, 0.67 mmol) en THF anhidro (5 mL) y bajo atmósfera inerte, se añade trifenilfosfano (175 mg, 0.67 mmol), imidazol (91 mg, 1.34 mmol), I<sub>2</sub> (169 mg, 0.67 mmol) y tamiz molecular de 4Å y la mezclas resultante se calienta a reflujo durante 2.5 h. A continuación, se filtra la mezcla de reacción, se evapora el disolvente y el residuo resultante se disuelve en AcOEt (20 mL); se añade una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) y una disolución acuosa saturada de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (5 mL), y se agita durante unos minutos hasta que desaparece el color amarillo, A continuación, se extrae la fase orgánica con AcOEt (3x15 mL), y las fases orgánicas reunidas se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtran y el filtrado se concentra a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 30:1) para dar **169** como un sólido blanco.

Rendimiento: 146 mg, 60%

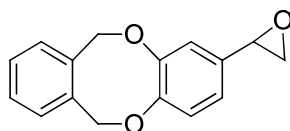
### 9.3.6. 1,2-(*o*-Xililenodioxi)-4-vinilbenceno (**170**)



Se prepara siguiendo la metodología optimizada en nuestro grupo de investigación por López, M.A.<sup>1</sup> A una disolución de 1,2- (*o*-xililenodioxi)-4-(2'-yodoetil)benceno (230 mg, 0.63 mmol) en DMF (3.0 mL) se añade a 0°C NaH (99%) (23 mg, 0.94 mmol) y la mezcla resultante se agita a t.a. durante 1 h. Posteriormente, se adicionan unas gotas de MeOH, y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se disuelve en AcOEt (20 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (3x10 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y el filtrado se concentra a sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt-hexano 1:30) para dar **170** como un sólido blanco.

Rendimiento: 126 mg, 84%.

### 9.3.7. ±1-[3',4'-(*o*-Xililenodioxi)fenil]oxirano (**171**)

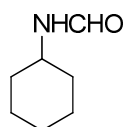


A una disolución de 1,2-(*o*-xililenodioxi)-4-vinilbenceno (126 mg, 0.53 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.5 mL) se le añade una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5.3 mL) y acetona (2.5 mL). La mezcla de reacción se enfría a 0°C y se añade gota a gota una disolución de Oxone® 0.4 M (2.6 mL) y se deja que alcance lentamente temperatura ambiente. Tras 2 h de reacción se comprueba por cromatografía en capa fina que la reacción no se completa, por lo que se añade una cantidad equivalente a la inicial de acetona, disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> y de disolución 0.4 M de Oxone®. El sistema se agita a temperatura ambiente hasta la desaparición del reactivo de partida (2 h). A continuación, se separa la fase orgánica y se lava con salmuera (3x10 mL); y la acuosa se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x10 mL). El conjunto de las fases orgánicas se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y el filtrado se concentra a sequedad, obteniéndose **171** como un sólido de color amarillento.

Rendimiento: 111 mg, 83%.

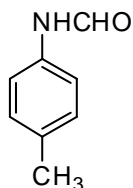
**Método general para la síntesis de formamidas.**

Las formamidas se han sintetizado siguiendo el método puesto a punto por nuestro grupo de investigación,<sup>3</sup> con ligeras modificaciones. A una disolución de la amina correspondiente (4.67 mmol) en formiato de etilo (5.0 mL) y AcOH (0.27 mL, 4.67 mmol) se refluxe durante el tiempo indicado en cada caso. A continuación, se concentra a sequedad y el sólido resultante se utiliza sin ninguna purificación adicional.

**9.3.8. N-(Ciclohexil)formamida (173)**

Se emplea ciclohexilamina (0.53 mL, 4.67 mmol). La reacción transcurre durante 9h.

Rendimiento: 590 mg, 99 %.

**9.3.9. N-(p-Metilfenil)formamida (174)**

Se emplea *p*-toluidina (500 mg, 4.67 mmol). La reacción transcurre durante 5h.

Rendimiento: 527 mg, 83%.

**Método general para la síntesis de isoselenocianatos**

La síntesis de los isoselenocianatos se basa en la metodología descrita por Barton.<sup>4</sup> A una disolución de trifosgeno (260 mg, 0.88 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (4.0 mL) se añade, gota a gota, durante 30 minutos sobre una disolución de la formamida

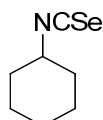
<sup>3</sup> López, O.; Maza, S.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J.G. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 2556-2566.

<sup>4</sup> Barton, D. H. R.; Parekh, S. I.; Tajbakhsh, M.; Theodorakis, E. A.; Tse, C.L. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 639-654.



correspondiente (1.65 mmol) y Et<sub>3</sub>N (1.0 mL, 7.17 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (4.0 mL), con tamiz molecular de 4 Å y bajo atmósfera de Ar. Finalizada la adición, la mezcla se calienta a reflujo durante 2.5 h, se añade Se negro (260 mg, 3.29 mmol;) y se calienta a reflujo en la oscuridad durante el tiempo indicado en cada caso. A continuación, se filtra sobre celita, el filtrado se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna.

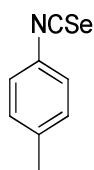
#### 9.3.10. Isoselenocianato de ciclohexilo (175)



Se emplea *N*-(ciclohexil)formamida (210 mg). El segundo paso de reacción transcurre durante 12 h. A continuación, se filtra sobre celita, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano–AcOEt 8:1 → hexano–AcOEt 4:1).

Rendimiento: 43 mg, 14%.

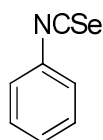
#### 9.3.11. Isoselenocianato de *p*-tolilo (176)



Se emplea *N*-(*p*-tolil)formamida (223 mg). El segundo paso de reacción transcurre durante 12 h. A continuación, se filtra sobre celita, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano).

Rendimiento: 265 mg, 82%.

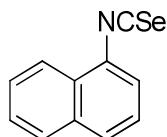
#### 9.3.12. Isoselenocianato de fenilo (177)



Se emplea formanilida (200 mg). El segundo paso de reacción transcurre durante 7 h. A continuación, se filtra sobre celita, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano).

Rendimiento: 225 mg, 75 %.

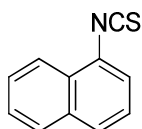
### 9.3.13. Isoselenocianato de $\alpha$ -naftilo (178)



Se emplea *N*-( $\alpha$ -naftil)formamida (284 mg.). El segundo paso de reacción transcurre durante 6h, obteniéndose **178** como un sólido blanco tras cristalización de EtOH.

Rendimiento: 295 mg, 77%.

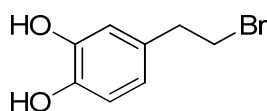
### 9.3.14. Isotiocianato de $\alpha$ -naftilo (180)



Se prepara a través de una modificación del procedimiento descrito por Ávalos González y col.<sup>223</sup> A una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{H}_2\text{O}$  1:1 (50 mL) se añade  $\alpha$ -naftilamina (500 mg, 3.49 mmol),  $\text{CaCO}_3$  (699 mg, 6.98 mmol) y tiofosgeno (0.40 mL, 5.33 mmol, 53% exceso). La mezcla resultante se agita a t.a. durante 1 h. A continuación, se filtra el crudo, se separa la fase orgánica y se extrae la fase acuosa con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x25 mL). Las fases orgánicas reunidas se secan sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtra y el filtrado se concentra a sequedad para dar **180** como un sirupo.

Rendimiento: 638 mg, 99%.

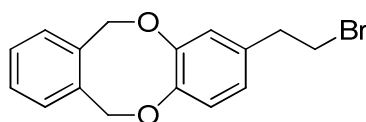
### 9.3.15. 4-(2'-Bromoetil)benceno-1,2-diol (255)



Se prepara siguiente la metodología descrita por nuestro grupo de investigación.<sup>5</sup> Una disolución de hidroxitirosol (500 mg, 3.24 mmol), tetrabromuro de carbono (1.96 g, 6.49 mmol), trifenilfosfano (2.69 g, 9.74 mmol) y L-ascorbato sódico (642 mg, 3.25 mmol) en DMF (10 mL), se agita bajo atmósfera inerte a 0 °C durante 1h y a t.a. durante 7 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla se concentra a sequedad, y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt–hexano 1:20→AcOEt–hexano 1:5), obteniéndose el bromuro **255** como un sólido de color marrón.

Rendimiento 564 mg, 80%.

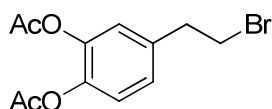
#### 9.3.16. 4-(2'-Bromoetil)-1,2-(*o*-xililenodioxo)benceno (256)



Se prepara siguiendo la metodología optimizada en nuestro grupo de investigación por Gómez, A.<sup>6</sup> Una disolución de 4-(2'-Bromoetil)benceno-1,2-diol (500 mg, 1.95 mmol), tetrabromuro de carbono (1.31 g, 3.95 mmol) y trifenilfosfano (1.56 g, 5.95 mmol) en acetonitrilo (15 mL), se agita bajo atmósfera inerte durante 3 h a temperatura ambiente. A continuación, se concentra a sequedad, y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt–hexano 1:10), obteniéndose el producto como un aceite anaranjado.

Rendimiento: 492 mg, 79%.

#### 9.3.17. 1,2-Diacetoxi-4-(2'-bromoetil)benceno (257)

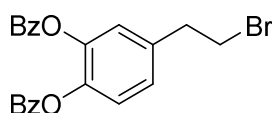


<sup>5</sup>Fernandez-Bolaños, J.M.; Maya, I.; López, M.A.; Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Gómez, A.; PCT Int. Appl., **2012**, WO 2012/164118 A1 20121206.

Se prepara siguiente la metodología descrita por nuestro grupo de investigación.<sup>6</sup> A una disolución enfriada a 0°C de 4-(2'-bromoetil)benceno-1,2-diol (685 mg, 3.16 mmol) en piridina (1.0 mL), se añade gota a gota anhídrido acético (1.0 mL), manteniéndose la agitación a t.a. durante 12 h. A continuación, se añade H<sub>2</sub>O para destruir el exceso de anhídrido acético y se concentra a sequedad a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt–hexano 1:20→AcOEt–hexano 1:5), obteniéndose **257** como un aceite de color amarillo amarillento.

Rendimiento: 685 mg, 72%.

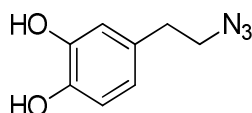
#### 9.3.18. 1,2-Dibenzoiloxi-4-(2'-bromoetil)benceno (258)



Se prepara siguiente la metodología descrita por nuestro grupo de investigación.<sup>6</sup> A una disolución enfriada a 0°C de 4-(2'-bromoetil)benceno-1,2-diol (685 mg, 3.16 mmol) en piridina (1.0 mL), se añade cloruro de benzoilo (0.63 mL, 6.32 mmol), manteniéndose la agitación a t.a. durante 12 h. A continuación, el crudo se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt–hexano 1:20→AcOEt–hexano 1:5), obteniéndose **258** como un sirupo.

Rendimiento: 685 mg, 51%.

#### 9.3.19. 4-(2'-Azidoetil)benceno-1,2-diol (259)



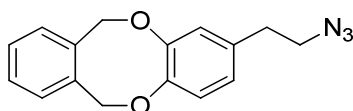
Se prepara siguiendo la metodología optimizada en nuestro grupo de investigación por Gómez, A.<sup>6</sup> A una disolución de 4-(2'-bromoetil)benceno-1,2-diol (400

<sup>6</sup> Gómez, A. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, **2012**.

mg, 1.84 mmol) en EtOH–H<sub>2</sub>O 10:1 (16.5 mL), se añade NaN<sub>3</sub> (174.7 mg, 2.69 mmol) y L-ascorbato sódico (365.2 mg, 1.843 mmol), y la mezcla resultante se agita a 55 °C en atmósfera inerte durante 5 h. Transcurrido ese tiempo, se concentra a sequedad, y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt–hexano 1:5→hexanoAcOEt–hexano 1:4) dando lugar a **259** como un aceite oscuro de elevada viscosidad.

Rendimiento 287 mg, 87%

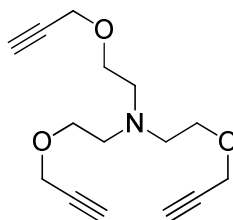
### 9.3.20. 4-(2'-Azidoetil)-1,2-(*o*-xililenodioxo)benceno (**260**)



Se prepara siguiendo la metodología optimizada en nuestro grupo de investigación por López, M.A.<sup>1</sup> A una disolución de 4-(2'-Bromoetil)-1,2-(*o*-xililenodioxo)benceno (160 mg, 0.44 mmol) en DMF (4 mL), se añade NaN<sub>3</sub> (34 mg, 0.52 mmol, 18% exceso) y se calienta con agitación y atmósfera inerte a 60 °C durante 4 h. A continuación, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt–hexano 1:30) obteniéndose el producto **260** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 107 mg, 86%.

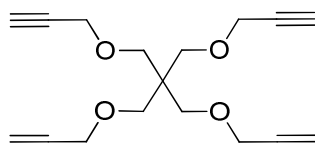
### 9.3.21. Tris(prop-2-iniloxietil)amina (**262**)



Se prepara mediante una modificación de la metodología propuesta por Peyjuan y colaboradores.<sup>7</sup> A una disolución enfriada a 0°C de trietanolamina (500 mg, 3.35 mmol) en DMF anhidra (7.0 mL) se añade NaH (99%) (483 mg, 20.13 mmol) y se mantiene a dicha temperatura durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se añade una disolución de bromuro de propargilo al 80% en tolueno (1.49 mL, 13.40 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 12 h. A continuación, el crudo de reacción se concentra a sequedad, se disuelve en AcOEt (30 mL) y se lava con salmuera (3x15 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentra a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt–hexano 1:5→ AcOEt–hexano 1:3) para dar **262** como un sirupo anaranjado-rojizo.

Rendimiento: 558 mg, 63%.

### 9.3.22. Tetrakis(prop-2-inoximetil)metano (**264**)



Se prepara mediante una modificación de la metodología propuesta por Zhu y colaboradores.<sup>8</sup> A una disolución enfriada a 0°C de pentaeritritol (300 mg, 2.20 mmol) en DMF anhidra (5.0 mL) se añade NaH (99%) (317 mg, 13.07 mmol) y se mantiene durante 20 minutos a dicha temperatura. A continuación, se añade una disolución de bromuro de propargilo al 80% en tolueno (1.23 mL, 11.02 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se concentra a sequedad, se disuelve en AcOEt (20 mL) y se lava con salmuera (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentra a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt–hexano 1:4) para dar **264** como un sólido amarillo

Rendimiento: 548 mg, 86%.

<sup>7</sup> Peiyuan, J.; Jinrong, L.; Changqi, Z.; Yong, J. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 1673-1677.

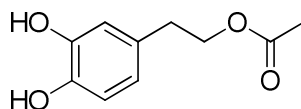
<sup>8</sup> Zhu, J.; Zhu, X.; Kang, E.T.; Neoh, K.G. *Polymer*, **2007**, *48*, 6992-6999.

#### **9.4. NUEVAS INVESTIGACIONES**

## 9.4. NUEVAS INVESTIGACIONES

### 9.4.1. SÍNTESIS DE ÉSTERES DERIVADOS DEL HIDROXITIRO SOL

#### 9.4.1.1. Acetato de 2-(3',4'-dihidroxifenil)etilo (**1**)



A una disolución de HT (54 mg, 0.35 mmol) en AcOEt (10 mL) se añade resina Amberlita IR-120 (H<sup>+</sup>) (200 mg), la mezcla resultante se refluxe bajo atmósfera inerte durante 11 h. El crudo de reacción se filtra, se concentra a sequedad, y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano–AcOEt 5:1 → hexano–AcOEt 2:1) para dar **1** como un sirupo anaranjado.

Rendimiento: 51 mg, 74%;  $R_F$  0.37 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10:1)

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.79 (d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.0$  Hz, H-5'), 6.74 (d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.7$  Hz, H-2'), 6.65 (dd, 1H, H-6'), 4.23 (t, 2H,  $J_{H,H} = 7.1$  Hz, CH<sub>2</sub>O), 2.82 (t, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 172.1 (CO), 143.9 (C-3'), 142.6 (C-4'), 130.5 (C-1'), 121.3 (C-6'), 116.0, 115.5 (C-2', C-5'), 65.5 (CH<sub>2</sub>O), 34.5 (CH<sub>2</sub>Ar), 21.2 (CH<sub>3</sub>CO) ppm.

CIMS: 196 ([M]<sup>+</sup>, 4 %).

HRCIMS  $m/z$  calculado para C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: 196.0736, encontrado 196.0742.

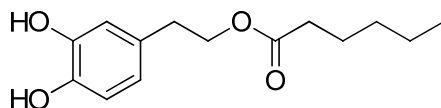
#### Método general para la preparación de los ésteres 2-4.

A una disolución del HT (54 mg, 0.35 mmol) y el éster metílico correspondiente (2.34 mmol) en THF anhidro (2.0 mL) se añade resina Amberlita IR-120 (H<sup>+</sup>). (400 mg). La mezcla resultante se refluxe bajo atmósfera inerte durante 24-48 h. El crudo de



reacción se filtra, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt–hexano 1:2).

#### 9.4.1.2. Hexanoato de 2-(3',4'-dihidroxifenil)etilo (2)



Se emplea hexanoato de metilo (0.34 mL) La mezcla se refluxe bajo atmósfera inerte durante 26 h.

Rendimiento: 27 mg, 31%;  $R_F$  0.2 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH 10:1).

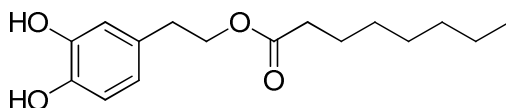
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.78 (d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.0$  Hz, H-5'), 6.73 (d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.7$  Hz, H-2'), 6.60 (dd, 1H, H-6'), 4.23 (t, 2H,  $J_{H,H} = 7.1$  Hz, CH<sub>2</sub>O), 2.79 (t, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 2.29 (t, 2H,  $J_{H,H} = 7.6$  Hz, CH<sub>2</sub>CO), 1.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.26 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 0.87 (t, 3H,  $J_{H,H} = 6.9$  Hz, CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 175.1 (CO), 143.9 (C-3'), 142.6 (C-4'), 130.4 (C-1'), 121.3 (C-6'), 116.0, 115.5 (C-2', C-5'), 65.4 (CH<sub>2</sub>O), 34.5 (x2) (CH<sub>2</sub>Ar, CH<sub>2</sub>CO), 31.4 (CH<sub>2</sub>), 24.7 (CH<sub>2</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>), 14.0 (CH<sub>3</sub>) ppm.

CIMS 252 ([M]<sup>+</sup>, 28%).

HRCIMS  $m/z$  calculado para C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: 252.1362, encontrado 252.1352.

#### 9.4.1.3. Octanoato de 2-(3',4'-dihidroxifenil)etilo (3)



Se emplea octanoato de metilo (0.42 mL). La mezcla se refluxe bajo atmósfera inerte durante 28 h.

Rendimiento: 15 mg, 16 %;  $R_F$  0.32 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10:1).

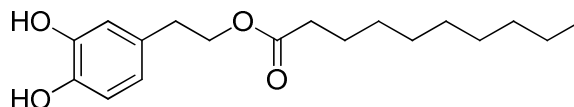
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.78 (d, 1H,  $J_{5',6'} = .0$  Hz, H-5'), 6.73 (d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.7$  Hz, H-2'), 6.60 (dd, 1H, H-6'), 4.23 (t, 2H,  $J_{H,H} = 7.1$  Hz, CH<sub>2</sub>O), 2.81 (t, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 2.34 (t, 2H,  $J_{H,H} = 7.6$  Hz, CH<sub>2</sub>CO), 2.28 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CO), 1.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.29 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, 3H,  $J_{H,H} = 6.9$  Hz, CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 179.8 (CO), 143.9, 142.6 (C-3', C-4'), 130.4 (C-1'), 121.1 (C-6'), 116.0 (C-2'), 115.5, (C-5'), 65.4 (CH<sub>2</sub>O), 34.5 (CH<sub>2</sub>CO), 31.4 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>) 28.8 (CH<sub>2</sub>), 24.9, (CH<sub>2</sub>), 24.7 (CH<sub>2</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>) ppm.

CIMS 280 ([M]<sup>+</sup>, 1%).

HRCIMS  $m/z$  calculado para C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>Na [M]<sup>+</sup>: 280.1675, encontrado 280.1672.

#### 9.4.1.4. Decanoato de 2-(3',4'-dihidroxifenil)etilo (4)



Se emplea decanoato de metilo (0.5 mL). La mezcla se refluxe bajo atmósfera inerte y se mantiene con agitación durante 48 h.

Rendimiento: 29 mg, 27%;  $R_F$  0.33 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10:1).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.79 (d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.1$  Hz, H-5'), 6.74 (d, 1H,  $J_{2',6'} = 2.0$  Hz, H-2'), 6.62 (dd, 1H, H-6'), 4.24 (t, 2H,  $J_{H,H} = 7.2$  Hz, CH<sub>2</sub>O), 2.81 (t, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 2.29 (t, 2H,  $J_{H,H} = 7.6$  Hz, CH<sub>2</sub>CO), 1.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.26 (m, 12H, 6CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, 3H,  $J_{H,H} = 6.5$  Hz, CH<sub>3</sub>) ppm.

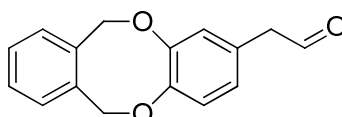
<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 174.6 (CO), 144.0, 142.6 (C-3', C-4'), 130.5 (C-1'), 121.3 (C-6'), 115.9, 115.4 (C-2', C-5'), 65.2 (CH<sub>2</sub>O), 34.6 (CH<sub>2</sub>Ar),

34.5 (CH<sub>2</sub>CO), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (x2) (2 CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 25.1 (CH<sub>2</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>) ppm.

CIMS 308 ([M]<sup>+</sup>, 4%).

HRCIMS *m/z* calculado para C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: 308.1988, encontrado 308.1978.

#### 9.4.1.5. 2-[3',4'-(*o*-Xililenodioxi)fenil]acetaldehído] (5)



A una disolución de 2-[3',4'-(*o*-xililenodioxo)fenil]etanol (70 mg, 0.27 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (3 mL) se añade peryodinato de Dess-Martin (120 mg, 0.54 mmol). La mezcla resultante se mantiene en agitación bajo atmósfera inerte y a temperatura ambiente durante 29 h. Transcurrido ese tiempo, se añade Et<sub>2</sub>O (3 mL) y una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (4 mL) que contenga Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (4% p/v). Tras agitación vigorosa durante 30 minutos, la mezcla se diluye con Et<sub>2</sub>O (6 mL) y se lava con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2x5 mL) y con H<sub>2</sub>O (2x5 mL). La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el filtrado se concentra a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt-hexano 1:3) para dar **5** como un sólido blanco

Rendimiento: 60 mg, 87%; *R<sub>F</sub>* 0.35 (hexano–AcOEt 3:1).

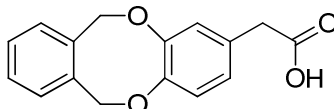
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.65 (t, 1H, *J*<sub>H,H</sub>=2.3 Hz, CHO), 7.26 (m, 2H, 2Ar-H), 7.18 (m, 2H, Ar-H), 6.98 (d, 1H, *J*<sub>5',6'</sub>=8.2 Hz, H-5'), 6.84 (d, 1H, *J*<sub>2',6'</sub>=2.1 Hz, H-2'), 6.74 (dd, 1H, H-6'), 5.41 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OAr), 5.39 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OAr), 3.52 (d, 2H, CH<sub>2</sub>CO) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 199.4 (CO), 150.1 (C-3'), 149.1 (C-4'), 135.8 (C-1'''), 135.6 (C-2'''), 129.4, 129.0, 128.7, 128.6 (C-3''', C-4''', C-5''', C-6'''), 127.4 (C-1'), 124.7 (C-6'), 123.1 (C-2'), 122.6 (C-5'), 75.5 (CH<sub>2</sub>OAr), 75.2 (CH<sub>2</sub>OAr), 49.8 (CH<sub>2</sub>) ppm.

CIMS 254 ( $[M]^+$ , 34%).

HRCIMS  $m/z$  calculado para  $C_{16}H_{14}O_3$   $[M]^+$ : 254.0943, encontrado 254.0940.

#### 9.4.1.6. Ácido 2-[3',4'-(*o*-xililenodioxi)fenil]acético (6)



**Método A:** A una disolución de 2-[3',4'-(*o*-xililenodioxi)fenil]acetaldehído **5** (243 mg, 0.96 mmol) en *t*-BuOH (9 mL) se le añade 2-metil-but-2-eno (2.5 mL, 0.02 mmol), y una disolución acuosa (5 mL) de  $NaClO_2$  (0.72 M) y  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  (0.22 M) gota a gota y a 0°C. La mezcla resultante se agita a esa temperatura durante 30 minutos y a t.a. durante 8 h. Transcurrido ese tiempo se añade HCl 1M (20 mL) y se agita a t.a. durante 30 minutos adicionales. Posteriormente, el crudo de reacción se extrae con AcOEt (3x10 mL). Los extractos orgánicos se reúnen, se secan sobre  $Na_2SO_4$ , se filtran y el filtrado se concentra a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna ( $CH_2Cl_2$ -MeOH  $\rightarrow$   $CH_2Cl_2$ -MeOH 10:1) para dar **6** como un sólido blanco.

Rendimiento: 238 mg, 92%;  $R_F$  0.58 ( $CH_2Cl_2$ -MeOH 10:1); p.f. 97-99 °C.

**Método B:** A una disolución de (x) (47 mg, 0.18 mmol) en acetonitrilo (1.0 mL) se añade una disolución tampón de fosfato 0.67 M de pH 6.7 (0.7 mL) y TEMPO (2 mg, 0.01 mmol). La mezcla resultante se calienta a 35°C, y a continuación se añade una disolución acuosa (1 mL) de  $NaClO_2$  (0.34 M) y a continuación otra de NaClO 14% p/v (2  $\mu$ L,) manteniéndose con agitación a t.a. durante 21 h. A continuación, se añade  $H_2O$  (3 mL) y se ajusta el pH a 8 mediante la adición de una disolución acuosa de NaOH 2M. La mezcla se vierte sobre una disolución saturada de sulfito sódico (5.0 mL) a 0°C, y se agita durante 30 minutos. Se añade  $CH_2Cl_2$  (5 mL) y se agita durante 10 minutos adicionales, tras lo cual se acidifica añadiendo HCl 2M hasta pH 3 y se separan las dos fases. La fase acuosa se extrae varias veces con  $CH_2Cl_2$ , y se reúnen todas las fases orgánicas, que se lavan con  $H_2O$ , se secan sobre  $MgSO_4$ , se filtran y se concentran a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna ( $CH_2Cl_2$ -MeOH  $\rightarrow$   $CH_2Cl_2$ -MeOH 10:1) para dar **6** como un sólido blanco.

Rendimiento: 43 mg, 87 %.

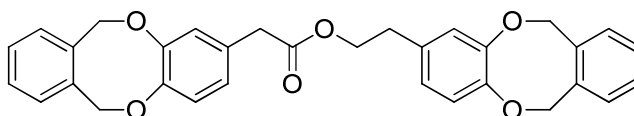
$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.26 (m, 2H, 2Ar-H), 7.18 (m, 2H, 2Ar-H), 6.95 (d, 1H,  $J_{5',6'}=8.2$  Hz, H-5'), 6.92 (d, 1H,  $J_{2',6'}=2.1$  Hz, H-2'), 6.82 (dd, 1H, H-6'), 5.39 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.38 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.51 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 177.5 (CO), 149.9 (C-3'), 149.2 (C-4'), 135.9 (C-1'''), 135.8 (C-2'''), 129.2, 129.0, 128.8, 128.7 (C-3''', C-4''', C-5''', C-6'''), 128.6 (C-1'), 124.6 (C-6'), 123.0 (C-2'), 122.1 (C-5'), 75.5 ( $\text{CH}_2\text{OAr}$ ), 75.4, ( $\text{CH}_2\text{OAr}$ ), 40.3 ( $\text{CH}_2\text{COOH}$ ) ppm.

CIMS 270 ( $[\text{M}]^+$ , 41%).

HRCIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$   $[\text{M}]^+$ : 270.0892, encontrado 270.0888.

**9.4.1.7. 2-[3',4'-(*o*-Xilenedioxi)fenil]acetato de 2''-[3''',4''']-(*o*-xilenedioxi)fenil]etilo (7)**



El ácido **6** (85 mg, 0.32 mmol) se disuelve en  $\text{SOCl}_2$  (0.5 mL) y la disolución se mantiene bajo atmósfera inerte y a temperatura ambiente durante 2 h para obtener el correspondiente cloruro de ácido. A continuación, el crudo se concentra a sequedad y se emplea directamente en el siguiente paso sin ninguna purificación adicional. El residuo se disuelve en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (2.0 mL) y se añade gota a gota y en frío sobre una disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2.0 mL) que contiene  $\text{Bu}_4\text{NI}$  como catalizador de transferencia de fase (5 mg, 0.01 mmol) y **133** (40 mg, 0.16 mmol). Se deja que la disolución alcance la t.a. y se mantiene bajo agitación durante 1.5 h. Transcurrido ese tiempo, se añade  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL), y se lava sucesivas veces con las fases con  $\text{NaHCO}_3$  aq. sat. (2x10 mL) y  $\text{H}_2\text{O}$  (2x10 mL). La fracción orgánica se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtra, el filtrado se concentra a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 3:1) para dar **7** como un sólido blanco.

Rendimiento: 53 mg, 65%;  $R_F$  0.56 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10:1); p.f 93-95 °C.

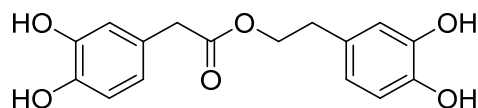
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.26 (m, 4H, 4Ar-H), 7.18 (m, 4H, 4Ar-H), 6.93 (d, 1H,  $J_{5',6'}=8.3$  Hz, H-5'), 6.91 (d, 1H,  $J_{2'',6''}=2.2$  Hz, H-2''), 6.89 (d, 1H,  $J_{5'',6''}=8.0$  Hz, H-5''), 6.79 (d, 1H,  $J_{2',6'}=2.2$  Hz, H-2'), 6.77 (dd, 1H, H-6''), 6.67 (dd, 1H, H-6'), 5.40 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OAr), 5.39 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OAr), 5.38 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OAr), 5.37 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OAr), 4.20 (t, 2H,  $J_{H,H}=6.8$  Hz, H-1'), 3.44 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2.76 (t, 2H, H-2'), ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 171.5 (CO), 149.9 (Ar-CO), 149.8 (Ar-CO), 149.0 (Ar-CO), 148.5 (Ar-CO), 136.1, 136.0, 135.9, 135.8 (C-3', C-3'', C-4', C-4''), 133.4 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 129.3 (Ar-C), 129.2 (Ar-C), 129.0 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 128.6 (2C, Ar-C), 128.5 (2C, Ar-C), 124.5 (C-6''), 124.0 (C-6'), 122.8 (C-5''), 122.2 (C-5'), 122.1 (C-2'), 122.0 (C-2''), 75.6 (CH<sub>2</sub>OAr), 75.5 (CH<sub>2</sub>OAr), 75.3 (CH<sub>2</sub>OAr), 75.2 (CH<sub>2</sub>OAr), 65.4 (CH<sub>2</sub>O), 40.7, (CH<sub>2</sub>CO), 34.4 (CH<sub>2</sub>) ppm.

CIMS 508 ([M]<sup>+</sup>, 20%).

HRCIMS  $m/z$  calculado para C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup>: 508.1886, encontrado 508.1882.

#### 9.4.1.8. 2-(3',4'-Dihidroxifenil)acetato de 2''-(3'',4'')-dihidroxifenil)etilo (8)



Una suspensión de **7** (53 mg, 0.10 mmol) y Pd/C (5 mg) en AcOEt (5.0 mL) se hidrogena a presión atmosférica y t.a. durante 24 h. A continuación se filtra sobre celita y el filtrado se concentra a sequedad para dar **8** como un producto cromatográficamente puro.

Rendimiento: 25 mg, 82%,  $R_F$  0.53 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10:1)

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.69 (m, 2H, H-5', H-2''), 6.65 (m, 2H, H-5'', H-2'), 6.53 (dd, 1H,  $J_{2',6'}=2.0$  Hz,  $J_{5',6'}=8.1$  Hz, H-6'), 6.48 (dd, 1H,

$J_{2'',6''}=2.0$  Hz,  $J_{5'',6''}=8.0$  Hz, H-6''), 4.41 (t, 2H,  $J_{1'',2''}=7.1$  Hz, H-1''), 3.43 (s, 2H, H-2), 2.74 (t, 2H, H-2'') ppm.

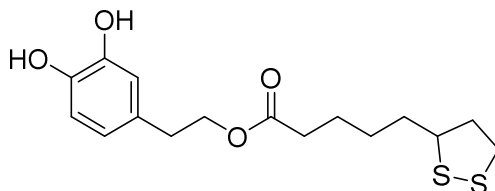
$^{13}\text{C}$ -RMN (125.7 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ : 174.1 (CO), 146.3, 146.2 (C-3', C-4'), 145.4, 144.9 (C-3'', C-4''), 130.7 (C-1'), 126.9 (C-1''), 121.7 (C-6'), 121.3 (C-6''), 117.4 (C-5''), 117.0 (C-5'), 116.4 (C-2''), 116.3 (C-2'), 66.9 (C-1''), 41.5 (C-2), 35.4 (C-2'') ppm.

CIMS 304 ( $[\text{M}]^+$ , 4%).

HRCIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_6$   $[\text{M}]^+$ : 304.0947, encontrado 304.0951.

## 9.4.2. SÍNTESIS DE TIO Y SELENODERIVADOS CON FRAGMENTOS CATECOL

### 9.4.2.1. (±)-5-(1',2'-Ditiolan-3'-il)pentanoato de 2''-(3''',4'''-dihidroxifenil)etilo (9)



A una disolución de ácido lipoico (100 mg, 0.48 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (1 mL) se añade gota a gota y en frío  $\text{SOCl}_2$  (46  $\mu\text{L}$ , 0.63 mmol). La mezcla se mantiene en agitación bajo atmósfera inerte a temperatura ambiente durante una hora. Tras este tiempo se añade  $\text{CeCl}_3$  (6 mg, 0.02 mmol) e hidroxitirosol (75 mg, 0.48 mmol) disuelto en THF (1 mL). La mezcla resultante se mantiene con agitación bajo atmósfera inerte durante 22 h. Transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano  $\rightarrow$  hexano-AcOEt 4:1) para dar **9** como un sirupo amarillento.

Rendimiento: 106 mg, 65 %;  $R_f$  0.45 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 10:1).

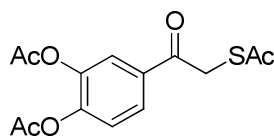
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.79 (d, 1H,  $J_{5''',6'''}=7.8$  Hz, H-5'''), 6.74 (d, 1H,  $J_{2''',6'''}=1.9$  Hz, H-2'''), 6.64 (dd, 1H, H-6'''), 4.25 (t, 2H,  $J_{\text{H,H}}=7.0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.82 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 2.44 (m, 1H, CHS), 2.30 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.88 (m, 2H, H-4'), 1.62 (x3) (m, 6H, 3 $\text{CH}_2$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$ -RMN (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 174.0 (CO), 144.2, 142.1 (C-3''', C-4'''), 131.2 (C-1'''), 121.6 (C-6'''), 116.2 (C-2'''), 115.5 (C-5'''), 65.0 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 56.8 (HCS), 40.4 (C-4'), 38.6 ( $\text{CH}_2\text{S}$ ), 34.7 ( $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 34.2 ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 28.8 ( $\text{CH}_2$ ), 24.8 (x2) (2 $\text{CH}_2$ ) ppm.

CIMS 342 ( $[\text{M}]^+$ , 10%).

HRCIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{S}_2$   $[\text{M}]^+$ : 342.0960, encontrado 342.0959.



9.4.2.2. 2-Tioacetato-3',4'-diacetoxibenzofenona (**10**)

A una disolución de 2-cloro-3',4'-diacetoxiacetofenona (253 mg, 0.93 mmol) en butanona (5 mL), se añade tioacetato potásico (160 mg, 1.40 mmol) y la mezcla resultante se refluxe durante 4 h. A continuación, se concentra a sequedad, y el residuo se disuelve en AcOEt (15 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (2x15 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y se concentra a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 2:1) obteniéndose **10** como un sólido anaranjado.

Rendimiento: 129 mg, 45%;  $R_F$  0.75 (hexano–AcOEt 1:1); p.f. 116–118°C.

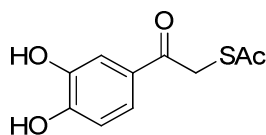
FT-IR  $\nu_{\max}$  2362, 2360, 1759, 1682, 1599, 1501, 1420, 1364, 1305, 1247, 1200, 1112, 1015, 968, 927, 850, 752, 669, 622 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.90 (dd, 1H,  $J_{5',6'}=8.5$  Hz,  $J_{2',6'}=2.1$  Hz, H-6'), 7.82 (d, 1H, H-2'), 7.31 (d, 1H, H-5'), 4.33 (s, 2H, CH<sub>2</sub>S), 2.39 (s, 3H, SAc), 2.31 (s, 3H, OAc), 2.30 (s, 3H, OAc) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 194.1 (C-2), 191.6 (COAr), 168.0 (CO), 167.5 (CO), 146.7, 142.5 (C-3', C-4'), 134.0 (C-1'), 127.2 (C-6'), 124.1 (C-5'), 123.8, (C-2') 36.4 (CH<sub>2</sub>S), 30.4 (CH<sub>3</sub>), 20.8 (OAc), 20.6 (OAc) ppm.

LSIMS 333 ([M+Na]<sup>+</sup>, 9%).

HRLSIMS  $m/z$  calculado para C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 333.0904, encontrado 333.0397.

9.4.2.3. 2-Tioacetato-3',4'-dihidroxifenacilo (**11**)

**Método A:** A una disolución de 2-cloro-3',4'-dihidroxiacetofenona (50 mg, 0.27 mmol) en butanona (3 mL) se añade L-ascorbato sódico (53 mg, 0.27 mmol) y tioacetato potásico (43 mg, 0.38 mmol); la mezcla resultante se refluje durante 10 h bajo atmósfera inerte. A continuación se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 1:2) para dar **11** como un sólido blanco.

Rendimiento: 18 mg, 30%;  $R_F$  0.44 (hexano–AcOEt 1:1)

**Método B:** A una disolución de **10** (30 mg, 0.10 mmol) en una mezcla 1:1 de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ –MeOH (2 mL), se añade  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (10 mg, 0.072 mmol); la mezcla resultante se agita bajo atmósfera inerte en la oscuridad durante 30 minutos. A continuación, se acidifica hasta pH 5 empleando resina Amberlita IR120 (H+), se filtra y el filtrado se concentra a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 2:1) para dar **11** como un sólido blanco.

Rendimiento: 12 mg, 67%;  $R_F$  0.44 (hexano–AcOEt 1:1).

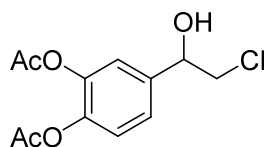
FT-IR  $\nu_{\text{max}}$  2971, 2928, 1757, 1701, 1683, 1606, 1502, 1420, 1363, 1305, 1249, 1194, 1176, 1151, 1113, 1016  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.46 (dd, 1H,  $J_{2',6'} = 2.1$ ,  $J_{5',6'} = 8.3$  Hz, H-6'), 7.42 (d, 1H, H-2'), 6.84 (d, 1H, H-5'), 4.35 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.36 (s, 3H, Ac) ppm.

$^{13}\text{C}$ -RMN (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 196.0, 194.1 (2CO), 152.6, 146.6 (C-3', C-4'), 129.2 (C-1'), 123.6 (C-6'), 116.2 (C-2'), 115.8 (C-5'), 36.9 ( $\text{CH}_2$ ), 30.1 (Ac) ppm.

CIMS 227 ( $[\text{M}]^+$ , 39%).

HRCIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M}]^+$ : 227.0378, encontrado 227.0380.

9.4.2.4. 1-Cloro-2-hidroxi-(3',4'-diacetoxifenil)etilo (**12**)

A una disolución de 2-cloro-3',4'-diacetoxiacetofenona (150 mg, 0.66 mmol) en ácido acético (3 mL), se añade  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (352 mg, 1.66 mmol) en pequeñas porciones a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte. Transcurridos 30 minutos, el crudo de reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 2:1) para dar **12** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 142 mg, 79%;  $R_F$  0.43 (hexano–AcOEt 2:1).

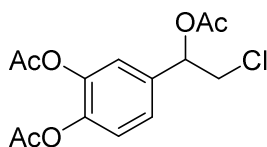
FT-IR  $\nu_{\text{max}}$  2359, 1771, 1505, 1367, 1214, 1081, 1007  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.28-7.25 (m, 2H, H-2', H-6'), 7.19 (d, 1H,  $J_{5',6'}=8.9$  Hz, H-5'), 4.88 (dd, 1H,  $J_{2,1a}=3.4$  Hz,  $J_{2,1b}=8.6$  Hz, CHOH), 3.73 (dd, 1H,  $J_{1a,1b}=11.4$  Hz,  $\text{CH}_{2a}$ ), 3.61 (dd, 1H,  $\text{CH}_{1b}$ ), 2.30 (s, 6H, 2OCH<sub>3</sub>) ppm.

$^{13}\text{C}$ -RMN (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 168.3 (2xCO), 142.2, 141.9 (C-3', C-4'), 139.0 (C-1'), 124.3 (C-6'), 123.6 (C-5'), 121.3 (C-2'), 73.2 (CHOH), 50.58 ( $\text{CH}_2\text{Cl}$ ), 20.7 (2xOCH<sub>3</sub>) ppm.

LSIMS 295 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 51%).

HRLSIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{NaCl}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 295.0349, encontrado 295.0355.

9.4.2.5. ( $\pm$ )-Acetato de 2-cloro-(3',4'-diacetoxifenil)etilo (**13**)

A una disolución de **12** (114 mg, 0.42 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (5 mL) se añade TEA (58  $\mu\text{L}$ , 0.42 mmol) y cloruro de acetilo (30  $\mu\text{L}$ , 0.42 mmol). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido ese tiempo, se concentra a sequedad, y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano $\rightarrow$ hexano-AcOEt 2:1) para dar **13** como un sirupo incoloro.

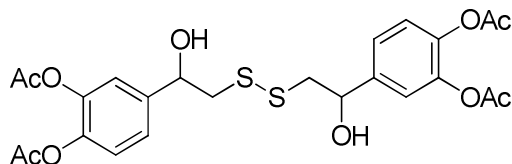
Rendimiento: 74 mg, 56 %;  $R_f$  0.27 (hexano-AcOEt 3:1).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.31-7.23 (m, 3H, H-2', H-5', H-6'), 6.00 (dd, 1H,  $J_{1,2a} = 5.0$  Hz,  $J_{1,2b} = 7.3$  Hz, CHOAc), 3.81 (dd, 1H,  $J_{2a,2b} = 11.8$  Hz,  $\text{CH}_{2a}$ ), 3.75 (dd, 1H,  $\text{CH}_{2b}$ ), 2.33 (s, 3H, OAc-Ar), 2.32 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -OAc-Ar), 2.18 (s, 3H, OAc) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 169.7 (CO-C-1), 168.1 (CO), 168.0 (CO), 142.4, 142.3 (C-3', C-4'), 135.9 (C-1'), 125.0, 123.8, 122.0 (C-2', C-5', C-6'), 74.0 (C-1), 46.2 (C-2), 20.9, 20.7, 20.6 (3 $\text{CH}_3$ ) ppm.

EIMS 314 ( $[\text{M}]^+$ , 6%).

HREIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_6\text{Cl}$   $[\text{M}]^+$ : 314.0557, encontrado 314.0563.

9.4.2.6. Disulfuro de bis[1-dihidroxi-(3',4'-diacetoxifenil)etilo] (**14**)

A una disolución de 2-tioacetoxi-(3,4-diacetoxi)acetofenona **10** (50 mg, 0.16 mmol) en ácido acético (1 mL) se añade  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (102 mg, 0.48 mmol) en pequeñas

porciones a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte. Transcurridos 30 min., el crudo de reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 2:1) obteniéndose **14** como un sirupo incoloro.

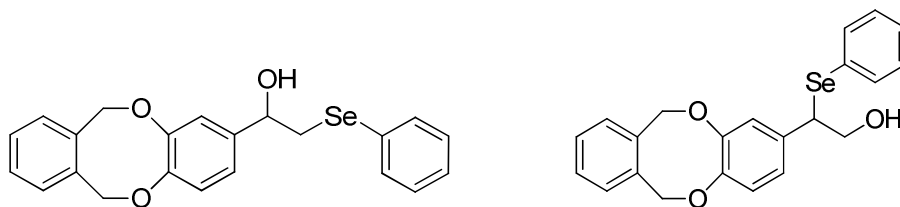
Rendimiento: 21 mg, 49%;  $R_F$  0.62 (hexano–AcOEt 2:1).

FT-IR  $\nu_{\max}$  2365, 2342, 2164, 1996, 1771, 1509, 1210, 1057, 1003, 635  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.28(m, 2H, 2H-6'), 7.26 (m, 2H, 2H-2'), 7.19 (m, 2H,  $J_{5',6'}=8.9$  Hz, 2H-5'), 4.88 (dd, 2H,  $J_{1,2a}=3.6$  Hz,  $J_{1,2b}=8.7$  Hz, 2CHOH), 3.73 (dd, 2H,  $J_{2a,2b}=11.3$  Hz, 2CH<sub>2a</sub>), 3.61 (dd, 2H, 2CH<sub>2b</sub>), 2.30 (s, 12H, 4OCH<sub>3</sub>) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 168.4 (2OAc), 168.3 (2OAc), 142.3, 142.0 (2C-3', 2C-4'), 138.9 (2C-1'), 124.3 (2C-6'), 123.7 (2C-5'), 121.3 (2C-2'), 73.3 (2CHOH), 50.7 (2CH<sub>2</sub>S), 20.7 (4CH<sub>3</sub>) ppm.

#### 9.4.2.7. 2-(Fenilseleno)-1-[3',4'-(*o*-xililenodioxo)fenil]etanol (**15**) y 2-(Fenilseleno)-2-[3',4'-(*o*-xililenodioxo)fenil]etanol (**16**)



A una disolución del epóxido **171** (32 mg, 0.13 mmol) en DMF (2 mL) se le añade diselenuro de difenilo (39 mg, 0.13 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (35 mg, 0.25 mmol) y rongalita (58 mg, 0.38 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 3.5 h. A continuación, el crudo se concentra a sequedad, el residuo se disuelve en AcOEt (10 mL) y se lava con  $\text{H}_2\text{O}$  (3x5 mL). La fase orgánica se seca sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtra y el filtrado se concentra a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano–hexano–AcOEt 5:1) obteniéndose **14** y **15** como sirupos de color amarillo.

Datos para **15**: Rendimiento: 28 mg, 54%;  $R_F$  0.62 (hexano–AcOEt 2:1),  $[\alpha]_D^{28} + 0.85$  (c 1.0,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.51 (m, 2H, Ar-H) 7.29-7.14 (m, 7H, 7Ar-H), 6.98 (d, 1H,  $J_{2',6'} = 2.0$  Hz, H-2'), 6.95 (d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.2$  Hz, H-5'), 6.86 (dd, 1H, H-6'), 5.40 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.39 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.61 (m, 1H,  $\text{CHOH}$ ), 3.23 (dd, 1H,  $J_{1,2a} = 3.5$  Hz,  $J_{2a,2b} = 12.8$  Hz,  $\text{CH}_a\text{Se}$ ), 3.02 (dd, 1H,  $J_{1,2b} = 9.3$  Hz,  $\text{CH}_b\text{Se}$ ), 2.74 (sa, 1H, OH) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 149.6, 149.3 (C-3', C-4'), 138.0 (C-1'), 135.7, 135.6 (C-1'', C-2''), 133.0 (*ipso*-C<sub>Ph</sub>), 129.2 (*o*-C<sub>Ph</sub>), 129.1, 128.9, (C-3'', C-4'', C-5'', C-6''), 128.5 (*m*-C<sub>Ph</sub>), 127.3 (*p*-C<sub>Ph</sub>), 121.9 (C-5'), 120.9 (C-6'), 119.3 (C-2'), 75.2 ( $\text{CH}_2\text{OAr}$ ), 75.1 ( $\text{CH}_2\text{OAr}$ ), 71.6 ( $\text{CHOH}$ ), 38.2 ( $\text{CH}_2\text{Se}$ ) ppm.

CIMS 412 ( $[\text{M}]^+$ , 16%).

HR-CIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{Se}$   $[\text{M}]^+$ : 412.0573 encontrado 412.0578

Datos para **16**: Rendimiento: 9 mg, 5%;  $R_F$  0.45 (hexano–AcOEt 2:1).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.43–7.14 (m, 9H, Ar-H), 6.90 (d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.2$  Hz, H-5'), 6.85 (d, 1H,  $J_{2',6'} = 2.1$  Hz, H-2'), 6.77 (dd, 1H, H-6'), 5.38 (x2) (m, 4H, 2 $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.29 (t, 1H,  $J_{1,2} = 7.0$  Hz, ArCHSe), 3.88 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 1.93 (t, 1H,  $J_{1,\text{OH}} = 6.2$  Hz, OH) ppm.

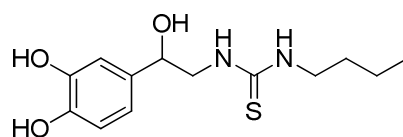
$^{13}\text{C-RMN}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 149.8, 149.2 (C-3', C-4'), 137.7, 135.8, (C-1'', C-2''), 134.7 (C-1'), 129.2, 129.1 (C-3'', C-4'', C-5'', C-6''), 128.6 (*m*-C<sub>Ph</sub>), 128.3 (*p*-C<sub>Ph</sub>), 128.1 (*o*-C<sub>Ph</sub>), 123.3 (C-5'), 122.2 (C-6'), 121.6 (C-2'), 75.4 ( $\text{CH}_2\text{OAr}$ ), 75.3 ( $\text{CH}_2\text{OAr}$ ), 65.0 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 50.3 (ArCHSe) ppm.

CIMS 412 ( $[\text{M}]^+$ , 1%).

HRCIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{Se}$   $[\text{M}]^+$ : 412.0578, encontrado 412.0590

**Método general para la síntesis de seleno y tioureas**

A una disolución de clorhidrato de norepinefrina (50 mg, 0.24 mmol) en MeOH (5 mL) se añade TEA (40  $\mu$ L, 0.29 mmol) y el isotiocianato o isoselenocianato correspondiente (0.29 mmol) bajo atmósfera inerte. La reacción transcurre con agitación en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  20:1).

**9.4.2.8. N-Butil-N'-[2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-hidroxiethyl]tiourea (17)**

Se parte de isotiocianato de butilo comercial (35  $\mu$ L, 0.29 mmol).

Rendimiento: 38 mg, 56%;  $R_F$  0.33 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  10:1).

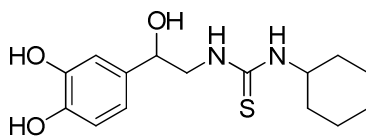
FT-IR  $\nu_{\text{max}}$  3325, 2932, 2829, 1460, 1406, 1116, 1018, 634  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 6.84 (d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.7$  Hz, H-2'), 6.74 (d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.0$  Hz, H-5'), 6.70 (dd, 1H, H-6'), 4.72 (dd,  $J_{1a,2} = 4.6$  Hz,  $J_{1b,2} = 7.6$  Hz, CHOH), 3.83-3.67 (m, 1H,  $\text{CH}_a\text{N}'$ ), 3.58-3.36 (m, 3H,  $\text{CH}_b\text{N}'$ ), 1.57-1.48 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.42-1.29 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 0.94 (t, 3H,  $J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 183.5 (CS), 146.3, 145.8 (C-3', C-4'), 135.5 (C-1'), 118.6 (C-6'), 116.2 (C-5'), 114.4 (C-2'), 73.7 (CHOH), 52.8 ( $\text{CH}_2\text{N}'$ ), 45.1 ( $\text{NCH}_2$ ), 32.5 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 21.2 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 14.3 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

LSIMS 307 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 100%).

HRLSIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_3\text{S}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ : 307.1092, encontrado 307.1090.

**9.4.2.9. *N*-Ciclohexil-*N'*-[2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-hidroxietyl]tiourea (18)**

Se parte de ciclohexilisotiocianato comercial (41  $\mu$ L, 0.29 mmol).

Rendimiento: 54 mg, 72%;  $R_F$  0.43 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 10:1).

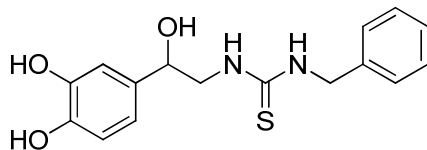
FT-IR  $\nu_{\text{max}}$  3316, 2941, 2829, 2299, 1451, 1416, 1111, 1018  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ : 6.91 (d, 1H,  $J_{2',6'}=1.6$  Hz, H-2'), 6.78 (d, 1H,  $J_{5',6'}=8.0$  Hz, H-5'), 6.74 (dd, 1H, H-6'), 4.79 (dd, 1H,  $J_{1a,2'}=4.4$  Hz,  $J_{1b,2'}=7.6$  Hz, CHOH), 3.76-3.72 (m, 1H, H-1<sup>a</sup>,  $\text{CH}_a\text{N}'$ ), 3.54-3.47 (m, 1H, H-1<sup>b</sup>,  $\text{CH}_b\text{N}'$ ), 1.95-1.91 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.76-1.69 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.62-1.58 (m, 1H, CHN-ciclohexilo), 1.42-1.13 (m, 6H, 3 $\text{CH}_2$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$ -RMN (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 182.5 (CS), 146.3, 145.8 (C-3', C-4'), 135.5 (C-1'), 118.6 (C-6'), 116.2 (C-5'), 114.3 (C-2'), 73.5 (CHOH), 53.5 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 33.7 (x2) ( $2\text{CH}_2$ ), 26.6 ( $\text{CH}_2$ ), 25.9 (x2) ( $2\text{CH}_2$ ) ppm.

LSIMS 311 ( $[\text{M}]^+$ , 19%).

HRLSIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$   $[\text{M}]^+$ : 311.1429, encontrado 311.1449.

**9.4.2.10. *N*-Bencil-*N'*-[2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-hidroxietyl]tiourea (19)**

Se parte de isotiocianato de bencil comercial (39  $\mu$ L, 0.29 mmol).

Rendimiento: 22 mg, 28%;  $R_F$  0.33 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 10:1).

FT-IR  $\nu_{\text{max}}$  2966, 2863, 2356, 1987, 1559, 1509, 1052, 1027, 1003  $\text{cm}^{-1}$ .



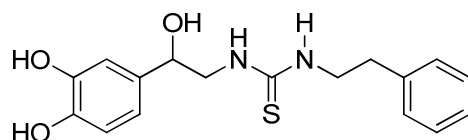
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ:7.34-7.20 (m, 5H, Ar-H), 6.85 (d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.9$  Hz, H-2'), 6.74 (d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.0$  Hz, H-5'), 6.70 (dd, 1H, H-6'), 4.72 (dd, 1H,  $J_{1a,2} = 4.6$  Hz,  $J_{1b,2} = 7.5$  Hz, CHOH), 4.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 3.80-3.76 (m, 1H, CH<sub>a</sub>N'), 3.55 (dd, 1H,  $J_{1a,1b} = 13.6$  Hz, CH<sub>b</sub>N') ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ:184.5 (CS), 146.3, 146.0 (C-3', C-4'), 140.0 (Ar-C) 135.4 (C-1'), 129.6 (x2) (2Ar-C), 128.5 (x2) (2Ar-C), 128.2 (Ar-C), 118.7 (C-6'), 116.2 (C-5'), 114.4 (C-2'), 73.4 (CHOH), 52.7 (CH<sub>2</sub>N'), 30.7(CH<sub>2</sub>Ar) ppm.

LSIMS 341 ([M+Na]<sup>+</sup>, 13%).

HRLSIMS *m/z* calculado para C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub>S [M+Na]<sup>+</sup>: 341.0936, encontrado 341.0933.

#### 9.4.2.11. N-[2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-hidroxietyl]-N'-(fenetil)tiourea (20)



Se parte de fenetilisotiocianato comercial (44 μL, 0.29 mmol).

Rendimiento: 35 mg, 43%; *R<sub>F</sub>* 0.34 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10:1).

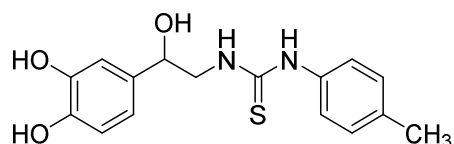
FT-IR  $\nu_{\max}$  3690, 2995, 2892, 2853, 2794, 2356, 1077, 1037, 993 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.30-7.18 (m, 5H, Ar-H), 6.84 (d, 1H,  $J_{2',6'} = 1.9$  Hz, H-2'), 6.74 (d, 1H,  $J_{5',6'} = 8.0$  Hz), 6.69 (dd, 1H, H-6'), 4.71 (dd, 1H,  $J_{1a,2} = 4.6$  Hz,  $J_{1b,2} = 7.5$  Hz, CHOH), 3.77-3.61 (m, 1H, CH<sub>a</sub>N), 3.57-3.44 (m, 1H, CH<sub>b</sub>N), 2.85 (t, 2H,  $J_{H,H} = 7.3$  Hz, CH<sub>2</sub>Ar) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 183.8 (CS), 146.3, 145.9 (C-3', C-4'), 140.5 (Ar-C), 135.5 (C-1'), 129.8 (x2) (2Ar-C), 129.5 (x2) (2Ar-C), 127.2 (Ar-C), 118.6 (C-6'), 116.17 (C-5'), 114.4 (C-2'), 73.33 (CHOH), 52.5 (CH<sub>2</sub>N) 46.4 (CH<sub>2</sub>N'), 36.35 (CH<sub>2</sub>Ar) ppm.

LSIMS	355 ( $[M+Na]^+$ , 94%).
HRLSIMS	$m/z$ calculado para $C_{17}H_{20}NaN_2O_3S$ $[M+Na]^+$ : 355.1092, encontrado 355.1098.

#### 9.4.2.12. *N*-[2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-hidroxietyl]-*N'*-(*p*-tolil)tiourea (21)



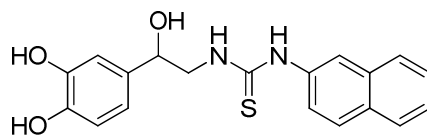
Se parte de isotiocianato de *p*-tolilo comercial (43 mg, 0.29 mmol).

Rendimiento: 63 mg, 81%;  $R_F$  0.41 ( $CH_2Cl_2$ -MeOH 10:1).

FT-IR	$\nu_{max}$ 3325, 2941, 2829, 2299, 1451, 1116, 1023, 615 $cm^{-1}$ .
$^1H$ -RMN	(300 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ : 7.15 (m, 2H, Ar-H), 7.06 (m, 2H, Ar-H), 6.83 (d, 1H, $J_{2',6'} = 1.9$ Hz, H-2'), 6.74 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.0$ Hz, H-5'), 6.69 (dd, 1H, H-6'), 4.78 (dd, 1H, $J_{1a,2} = 4.9$ Hz, $J_{1b,2} = 7.8$ Hz, CHOH), 3.84 (dd, 1H, $J_{1a,2} = 4.9$ Hz, $J_{1a,1b} = 13.5$ Hz, CHa $N$ ), 3.64 (dd, 1H, CHb $N$ ), 2.31 (s, 3H, $CH_3$ ) ppm.
$^{13}C$ -RMN	(75.5 MHz, $CD_3OD$ ) $\delta$ : 182.0 (CS), 146.4, 145.9 (C-3', C-4'), 137.2 ( $N'C$ -Ar), 135.3 (C-1'), 130.9 (x2) (2Ar-C), 125.8 (x2) (2Ar-C), 118.7 (C-6'), 116.3 (C-5'), 114.3 (C-2'), 72.6 (CHOH), 53.0 ( $CH_2N$ ), 21.1 ( $CH_3$ -Ar) ppm.

LSIMS 341 ( $[M+Na]^+$ , 100%).

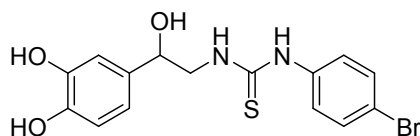
HRLSIMS	$m/z$ calculado para $C_{16}H_{18}N_2NaO_3S$ $[M+Na]^+$ : 341.0936, encontrado 341.0933.
---------	--

9.4.2.13. *N*-[2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-hidroxietyl]-*N'*-( $\alpha$ -naftil)tiourea (22)

Se parte de isotiocianato de naftilo (54 mg, 0.29 mmol).

Rendimiento: 47 mg, 55%;  $R_F$  0.50 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 10:1).

FT-IR	$\nu_{\text{max}}$ 3709, 3680, 2966, 2946, 2868, 2838, 1535, 1532, 1052, 1008, 609 $\text{cm}^{-1}$ .
$^1\text{H}$ -RMN	(300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ : 7.94-7.84 (m, 3H, Ar-H), 7.56-7.44 (m, 3H, Ar-H), 7.34 (d, 1H, $J_{\text{H,H}}=7.3$ Hz, Ar-H) 6.77 (m, 1H, H-2'), 6.65 (d, 1H, $J_{5',6'}=8.1$ Hz, H-5'), 6.57-6.54 (m, 1H, H-6'), 4.74 (dd, 1H, $J_{1a,2}=5.2$ Hz, $J_{1b,2}=7.7$ Hz, CHOH), 3.80 (dd, 1H, $J_{1a,1b}=13.5$ Hz, $\text{CH}_a\text{N}$ ), 3.63 (dd, 1H, $\text{CH}_b\text{N}$ ) ppm.
$^{13}\text{C}$ -RMN	(75.5 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ : 183.5 (CS), 146.3, 145.9 (C-3',C-4'), 136.1 (NC-Ar), 135.1 (C-1'), 131.5 (x2) (2Ar-C), 129.3(x2) (2Ar-C), 129.2, 127.9, 127.6, 126.7, 126.4, 123.7 (7 Ar-C), 118.5 (C-6'), 116.1 (C-5'), 114.3 (C-2'), 72.9 (CHOH), 52.9 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ) ppm.
LSIMS	307 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 100%).
HRLSIMS	$m/z$ calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ : 377.0936, encontrado 377.0933.

**9.4.2.14. *N*-(*p*-Bromofenil)-*N'*-[2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-hidroxietyl]tiourea (23)**

Se parte de 4-bromofenilisotiocianato comercial (63 mg, 0.29 mmol).

Rendimiento: 67 mg, 72%;  $R_F$  0.45 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 10:1); p.f.: 86-88 °C.

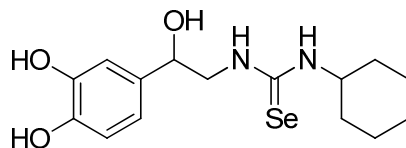
FT-IR  $\nu_{\text{max}}$  3301, 3217, 1613, 1524, 1446, 1382, 1278, 1235, 1180, 1106, 1062, 1013, 949, 875, 816, 718, 648  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.47-7.42 (m, 2H, Ar-H), 7.24-7.21 (m, 2H, Ar-H), 6.85 (d, 1H,  $J_{2',6'}=1.9$  Hz, H-2'), 6.76 (d, 1H,  $J_{5',6'}=8.0$  Hz, H-5'), 6.72 (dd, 1H, H-6'), 4.81 (dd, 1H,  $J_{1a,2}=5.1$  Hz,  $J_{1b,2}=8.1$  Hz, CHOH), 3.90-3.70 (m, 1H,  $\text{CH}_a\text{N}'$ ), 3.64 (dd, 1H,  $J_{1a,1b}=13.6$  Hz,  $\text{CH}_b\text{N}'$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$ -RMN (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 182.4 (CS), 146.4, 146.0 (C-3', C-4'), 139.2 (CBr), 135.3 (NC-Ar), 133.1 (x2) (2Ar-C), 126.9 (x2) (2Ar-C), 119.1 (C-1'), 118.7 (C-6'), 116.3 (C-5'), 114.5 (C-2'), 72.8 (CHOH), 52.8 ( $\text{CH}_2\text{N}'$ ) ppm.

CIMS 363 ( $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , 3%).

HRCIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_2\text{S}$   $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ : 363.9881, encontrado 363.9884.

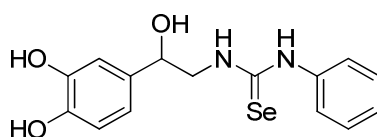
**9.4.2.15. *N*-Ciclohexil-*N'*-[2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-hidroxietyl]selenourea (24)**

Se parte de isoselenocianato de ciclohexilo (55 mg, 0.29 mmol).

Rendimiento: 46 mg, 53%;  $R_F$  0.61 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 10:1).

FT-IR	$\nu_{\max}$ 3865, 3055, 2995, 2892, 2848, 1043, 983 $\text{cm}^{-1}$ .
$^1\text{H}$ -RMN	(300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) $\delta$ : 6.91 (d, 1H, $J_{2',6'}=1.6$ Hz, H-2'), 6.78 (d, 1H, $J_{5',6'}=8.2$ Hz, H-5'), 6.74 (dd, 1H, H-6'), 4.79 (dd, 1H, $J_{1a,2}=3.4$ Hz, $J_{1b,2}=7.9$ Hz, CHOH), 4.38-3.92 (m, 1H, $\text{CH}_a\text{N}'$ ), 3.62-3.36 (m, 1H, $\text{CH}_b\text{N}'$ ), 2.03-1.95 (m, 2H, $\text{CH}_2$ ), 1.78-1.53 (m, 3H, $\text{CH}_2$ , CH), 1.42-1.14 (m, 6H, 3 $\text{CH}_2$ ) ppm.
$^{13}\text{C}$ -RMN	(75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) $\delta$ : 189.9 (CSe), 145.7, 145.2 (C-3', C-4'), 135.7 (C-1') 118.3 (C-6'), 115.8 (C-5'), 113.9 (C-2'), 73.2 (CHOH), 53.3 ( $\text{CH}_2\text{N}'$ ), 33.3 ( $\text{CH}_2$ ), 33.2 ( $\text{CH}_2$ ), 26.2 ( $\text{CH}_2$ ), 25.5 (x2) (2 $\text{CH}_2$ ) ppm.
LSIMS	381 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 4%).
HRLSIMS	$m/z$ calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_3\text{Se}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 381.0693, encontrado 381.0695.

#### 9.4.2.16. *N*-[2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-hidroxietyl]-*N'*-(fenil)selenourea (25)



Se parte de isoselenocianato de fenilo (40 mg, 0.29 mmol)

Rendimiento: 60 mg, 70%;  $R_F$  0.40 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 10:1).

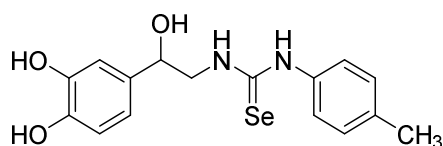
FT-IR	$\nu_{\max}$ 3311, 2941, 2902, 2833, 1451, 1416, 1116, 1018, 629 $\text{cm}^{-1}$ .
$^1\text{H}$ -RMN	(300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ : 7.39-7.14 (m, 5H, 5Ar-H), 6.85 (d, 1H, $J_{2',6'}=1.7$ Hz, H-2'), 6.75 (d, 1H, $J_{5',6'}=8.0$ Hz, H-5'), 6.70 (dd, 1H, H-6'), 4.85 (dd, 1H, $J_{1a,2}=4.9$ Hz, $J_{1b,2}=7.8$ Hz, CHOH), 3.94 (dd, 1H, $J_{1a, 1b}=13.4$ Hz, $\text{CH}_a\text{N}$ ), 3.71 (dd, 1H, $\text{CH}_b\text{N}$ ) ppm.
$^{13}\text{C}$ -RMN	(75.5 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ : 179.3 (CSe), 146.4, 146.0 (C-3', C-4'), 138.5 (NC-Ar), 135.1 (C-1'), 130.8 (x2) (2Ar-C), 127.7 (Ar-C), 126.0 (x2)

(2Ar-C), 118.7 (C-6'), 116.2 (C-5'), 114.4 (C-2'), 72.7 (CHOH), 55.48 (CH<sub>2</sub>N) ppm.

LSIMS 375 ([M+ Na]<sup>+</sup>, 4%).

HRLSIMS *m/z* calculado para C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub>Se [M+ Na]<sup>+</sup>: 375.0224, encontrado 375.0201.

#### 9.4.2.17. *N*-[2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-hidroxietyl]-*N'*-(*p*-tolil)selenourea (26)



Se parte de isoselenocianato de toliilo (57 mg, 0.29 mmol).

Rendimiento: 79 mg, 89%; *R<sub>F</sub>* 0.24 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10:1).

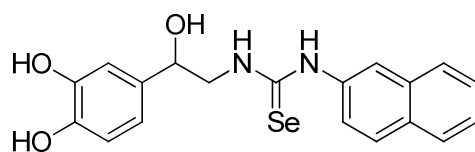
FT-IR  $\nu_{\max}$  3704, 3665, 2971, 2941, 2868, 1343, 1057, 1013 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.18 (d, 2H, *J*<sub>H,H</sub>=8.0 Hz, Ar-H), 7.01 (d, 2H, 2Ar-H), 6.84 (d, 1H, *J*<sub>2',6'</sub>=1.8 Hz, H-2'), 6.74 (d, 1H, *J*<sub>5',6'</sub>=8.0 Hz, H-5'), 6.69 (dd, 1H, H-6'), 4.85-4.80 (m, 1H, CHOH), 3.91 (dd, 1H, *J*<sub>1a,2</sub>=4.9 Hz, *J*<sub>1a,1b</sub>=13.3 Hz, CH<sub>a</sub>N), 3.71 (dd, 1H, *J*<sub>1b,2</sub>=7.9 Hz, CH<sub>b</sub>N), 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 179.1 (CSe), 146.4, 146.0 (C-3', C-4') 138.4 (*N'*C-Ar), 135.4 (C-1'), 131.4 (x2) (Ar-C) 126.0 (x2) (2Ar-C), 118.8 (C-6'), 116.4 (C-5'), 114.5 (C-2'), 72.5 (CHOH), 55.6 (CH<sub>2</sub>N), 14.2 (CH<sub>3</sub>) ppm.

LSIMS 389 ([M+Na]<sup>+</sup>, 64 %).

HRLSIMS *m/z* calculado para C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub>Se [M+Na]<sup>+</sup>: 389.0380, encontrado 389.0385.

9.4.2.18. *N*-[2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-hidroxietyl]-*N'*-( $\alpha$ -naftil)selenourea (27)

Se parte de isoselenocianato de naftilo (68 mg, 0.29 mmol).

Rendimiento: 91 mg, 93%;  $R_F$  0.41 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10:1).

FT-IR  $\nu_{\max}$  3311, 2941, 2892, 2833, 1441, 1416, 1097, 1023, 954, 639 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.94-7.87 (m, 3H, Ar-H), 7.56-7.45 (m, 3H, Ar-H), 7.32 (d, 1H,  $J_{H,H}=7.0$  Hz, Ar-H), 6.76 (d, 1H,  $J_{2',6'}=1.7$  Hz, H-2'), 6.63 (d, 1H,  $J_{5',6'}=8.1$  Hz, H-5'), 6.54 (dd, 1H, H-6'), 4.76 (dd, 1H,  $J_{1a,2}=5.1$  Hz,  $J_{1b,1}=7.7$  Hz, CHOH), 3.87 (dd, 1H,  $J_{1a,1b}=13.5$  Hz, CH<sub>a</sub>N), 3.66 (dd, 1H, CH<sub>b</sub>N) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 180.1 (CSe), 146.3, 145.9 (C-3', C-4'), 136.1 (N'C-Ar), 134.9 (x2) (2Ar-C), 134.0 (C-1'), 131.2, 129.7 (Ar-C), 129.4, 128.1, 127.8, 126.8, 126.3, 123.7 (6Ar-C), 118.5 (C-6'), 116.1 (C-5'), 114.3 (C-2'), 72.8 (CHOH), 55.4 (CH<sub>2</sub>N) ppm.

LSIMS 425 ([M+ Na]<sup>+</sup>, 4%).

HRLSIMS  $m/z$  calculado para C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub>Se [M+Na]<sup>+</sup>: 425.0380, encontrado 425.0371.

### 9.4.3. SÍNTESIS DE DERIVADOS PEPTÍDICOS POLIFENÓLICOS DERIVADOS DE L-AMINOÁCIDOS

#### Método general para la síntesis de amidas del ácido 3,4-(metilendioxi)fenilacético

**Método A1.** A una disolución de ácido 3,4-(metilendioxi)fenilacético (50 mg, 0.28 mmol) en diclorometano anhidro (1.5 mL) se le añade PyBOP (166 mg, 0.32 mmol, 1.15 eq.), el hidrocloreuro del aminoéster correspondiente (0.28 mmol, 1.0 eq.) y DIPEA (0.83 mL, 4.86 mmol, 17.5 eq.). La mezcla resultante se agita a t.a. y atmósfera inerte durante un tiempo comprendido entre 24-48 h. Posteriormente, el producto se purifica según lo indicado en cada caso.

**Método A2.** A una disolución de ácido 3,4-(metilendioxi)fenilacético (50 mg, 0.28 mmol) en DMF anhidro (4 mL), se añade a 0 °C PyBOP (144 mg, 0.28 mmol, 1.0 eq.), el hidrocloreuro del aminoéster correspondiente en cada caso (0.28 mmol, 1.0 eq.) y TEA (0.16 mL, 1.11 mmol, 4.0 eq.). La mezcla resultante se mantiene con agitación a t.a. y atmósfera inerte durante un tiempo comprendido entre 15-38 h. Posteriormente, el disolvente se evapora bajo presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna, usando el eluyente indicado en cada caso.

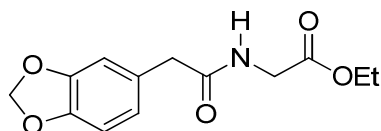
**Método B.** A una disolución de ácido 3,4-(metilendioxi)fenilacético (50 mg, 0.28 mmol) en diclorometano anhidro (3 mL) se añade HOBt (41 mg, 0.31 mmol, 1.1 eq.), EDC (64 mg, 0.33 mmol, 1.2 eq.), el hidrocloreuro del aminoéster correspondiente en cada caso (0.31 mmol, 1.1 eq.) y TEA (0.06 mL, 0.42 mmol, 1.5 eq.). La mezcla resultante se agita a t.a. y atmósfera inerte durante el tiempo que se indica en cada caso. A continuación, la disolución se diluye con AcOEt (15 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (1x15 mL). La fase acuosa se lava con AcOEt (3x10 mL), reuniéndose las fracciones orgánicas con la anterior. La fase orgánica se lava con NaHCO<sub>3</sub> aq. sat. (1x10 mL) y salmuera (1x10 mL), se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y el filtrado se concentra a sequedad; el residuo se purifica mediante cromatografía en columna, usando el eluyente indicado en cada caso.

**Método C.** A una disolución de 3,4-(metilendioxi)fenilacético (50 mg, 0.28 mmol) en diclorometano anhidro (2 mL), se añade HATU (116 mg, 0.31 mmol, 1.1 eq), el hidrocloreuro del aminoéster correspondiente (0.29 mmol, 1.05 eq.) y DIPEA (0.58 mmol, 0.10 mL, 2.1 eq.). La mezcla resultante se mantiene con agitación a t.a. y



atmósfera inerte durante el tiempo indicado. Transcurrido ese tiempo, la fase orgánica se lava con HCl acuoso 1N (1x10 mL), NaHCO<sub>3</sub> aq. sat. (1x10 mL) y salmuera (1x10 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y el filtrado se concentra a sequedad.

#### 9.4.3.1.2[2'-(3'',4'')-Metilendioxfenil]acetamido]acetato de etilo (**28**)



**Método A1.** Se emplea el hidrocloreuro del éster etílico de la glicina (39 mg, 0.28 mmol). La reacción transcurre durante 48 horas. El disolvente se evapora bajo presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 1:2) para dar **28**.

Rendimiento: 51 mg, 69%.

**Método A2.** Se emplea el hidrocloreuro del éster etílico de la glicina (39 mg, 0.28 mmol). La reacción transcurre durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo la fase orgánica se lava con HCl acuoso 1N (1x10 mL), una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (1x10 mL) y salmuera (1x10 mL), se seca sobre MgSO<sub>4</sub> y se filtra; el filtrado se concentra a sequedad, obteniéndose **28**.

Rendimiento: 65 mg, 89%; *R<sub>F</sub>* 0.62 (hexano–AcOEt 1:2).

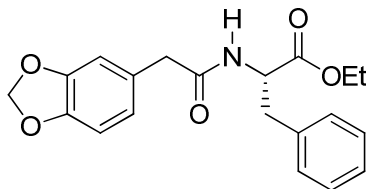
**Método B.** Se emplea el hidrocloreuro del éster etílico de la glicina (43 mg, 0.31 mmol). La reacción transcurre durante 60 horas. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano -AcOEt 1:2) para dar lugar a **28**.

Rendimiento: 58 mg, 79%.

**Método C.** Se emplea el hidrocloreuro del éster etílico de la glicina (41 mg, 0.29 mmol). La mezcla resultante se mantiene con agitación a t.a. y atmósfera inerte durante 72 h. Tras la eliminación del disolvente, se obtiene un crudo de reacción de 77 mg. Se confirma la formación de **28** mediante un espectro de <sup>1</sup>H-RMN.

$^1\text{H-RMN}$	(300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ : 6.79-6.76 (m, 2H, H-2'', H-5''), 6.71 (dd, 1H, $J_{2'',6''}=1.7$ Hz, $J_{5'',6''}=7.8$ Hz, H-6''), 6.03 (sa, 1H, NH), 5.94 (s, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 4.17 (c, 2H, $J_{\text{H,H}}=7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3.98 (d, 2H, $J_{2,\text{NH}}=5.3$ Hz, H-2), 3.51 (s, 2H, H-2'), 1.25 (t, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ) ppm.
$^{13}\text{C-RMN}$	(75.5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ : 171.3 (C-1'), 169.9 (C-1), 148.2 (C-3''), 147.1 (C-4''), 128.1 (C-1''), 122.8 (C-6''), 109.9 (C-2''), 108.7 (C-5''), 101.2 (O- $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 61.6 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 43.1 (C-2'), 41.6 (C-2), 14.2 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ) ppm.
CIMS	265 ( $[\text{M}]^+$ , 57%).
HRCIMS	$m/z$ calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ $[\text{M}]^+$ : 265.0950, encontrado: 265.0946.

#### 9.4.3.2. S-3-Fenil-2-[2'-(3'',4''-Metilendioxfenil)acetamido]propanoato de etilo (29)



**Método A1.** Se emplea el hidrocloreto del éster etílico de la L-fenilalanina (68 mg, 0.30 mmol). La reacción transcurre durante 24 horas. Posteriormente se concentra a sequedad y se confirma la formación de **29** mediante un espectro de  $^1\text{H-RMN}$ .

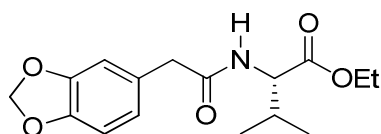
**Método A2.** Se emplea el hidrocloreto del éster etílico de la L-fenilalanina (64 mg, 0.28 mmol). La reacción transcurre durante 38 horas. La cromatografía en columna (hexano $\rightarrow$ hexano-AcOEt 1:1) conduce a **29**.

Rendimiento: 76 mg, 77%;  $R_F$  0.48 (hexano-AcOEt 1: 2);  $[\alpha]_D^{26}$ -5 ( $c$  0.94, MeOH).

$^1\text{H-RMN}$	(300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta$ 7.28-7.16 (m, 3H, Ar-H), 7.15-7.10 (m, 2H, Ar-H), 6.70 (d, 1H, $J_{5'',6''}=7.8$ Hz, H-5''), 6.67 (d, 1H, $J_{2'',6''}=1.3$ Hz, H-2''), 6.63 (dd, 1H, H-6''), 5.91 (s, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 4.64 (dd, 1H, $J_{2,3a}=5.7$ Hz, $J_{2,3b}=8.8$ Hz, H-2), 4.13 (c, 2H, $J_{\text{H,H}}=7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3.39 (s, 2H, H-2'), 3.14 (dd, 1H, $J_{3a,3b}=13.9$ Hz, H-3a), 2.96 (dd, 1H, H-3b), 1.20 (t, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ) ppm.
------------------	--

$^{13}\text{C}$ -RMN	(75.5 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta$ 173.9 (C-1'), 173.0 (C-1), 149.2 (C-3''), 148.0 (C-4''), 138.0 (Ar-C), 130.2 (x2) (2Ar-C), 130.1 (x2) (2Ar-C), 129.5 (C-1''), 127.9 (Ar-C), 123.4 (Ar-C), 110.4 (C-2''), 109.1 (C-5''), 102.3 (O- $\text{CH}_2$ -O), 62.4 ( $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ), 55.3 (C-2), 43.1 (C-2'), 38.3 (C-3), 13.4 ( $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ) ppm.
CIMS	355 ( $[\text{M}]^+$ , 52%).
HRCIMS	$m/z$ calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ $[\text{M}]^+$ : 355.1420, encontrado 355.1408.

#### 9.4.3.3. S-3-Metill-[2'-(3'',4''-metilendioxfenil)acetamido]butanoato de etilo (30)



**Método A1.** Se emplea el hidrocloreuro del éster etílico de la L-valina (50 mg, 0.28 mmol). La reacción transcurre durante 44 horas. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 2:1) para dar lugar a **30**.

Rendimiento: 34 mg, 40%.

**Método A2.** Se emplea el hidrocloreuro del éster etílico de la L-valina (50 mg, 0.28 mmol). La reacción transcurre durante 17 horas. La cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 1:2) conduce a **30**.

Rendimiento: 81 mg, 95%;  $R_F$  0.54 (hexano–AcOEt 1:2);  $[\alpha]_D^{24} +9$  ( $c$  0.98,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.78 (d, 1H,  $J_{5'',6''}=7.9$  Hz, H-5''), 6.76 (d, 1H,  $J_{2'',6''}=1.4$  Hz, H-2''), 6.72 (dd, 1H, H-6''), 6.02 (m, 1H, NH), 5.95 (s, 2H, O- $\text{CH}_2$ -O), 4.51 (dd, 1H,  $J_{2,3}=4.8$  Hz,  $J_{2,\text{NH}}=8.8$  Hz, H-2), 4.15 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ), 3.53 (d, 1H,  $J_{2a',2b'}=16.3$  Hz, H-2a'), 3.48 (d, 1H, H-2b'), 2.11 (m, 1H, H-3), 1.25 (t, 3H,  $J_{\text{H,H}}=7.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ), 0.87, 0.79 (2d, 3H cada uno,  $J_{\text{H,H}}=6.9$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

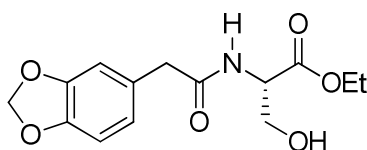
$^{13}\text{C}$ -RMN (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171.9 (C-1'), 171.0 (C-1), 148.2 (C-4''), 147.1 (C-3''), 128.4 (C-1''), 122.7 (C-6''), 109.9 (C-5''), 108.8 (C-2''), 101.3 (O-

CH<sub>2</sub>-O), 61.3 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 57.2 (C-2), 43.5 (C-2'), 31.4 (C-3), 19.0, 17.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm.

CIMS 307 ([M]<sup>+</sup>, 64%).

HRCIMS *m/z* calculado para C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub> [M]<sup>+</sup>: 307.1420, encontrado 307.1424.

**9.4.3.4. S-3-Hidroxi-2-[2'-(3'',4''-Metilendioxfenil)acetamido]propanoato de etilo (31)**



**Método A1.** Se emplea el hidrocloreuro del éster etílico de la L-serina (47 mg, 0.31 mmol). La reacción transcurre durante 30 horas. La cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 1:3) conduce a **31**.

Rendimiento: 61 mg, 74%.

**Método A2.** Se emplea el hidrocloreuro del éster etílico de la L-serina (47 mg, 0.28 mmol). La reacción transcurre durante 19 horas. La cromatografía en columna (Hexano→Hexano–AcOEt 1:6) conduce a **31**.

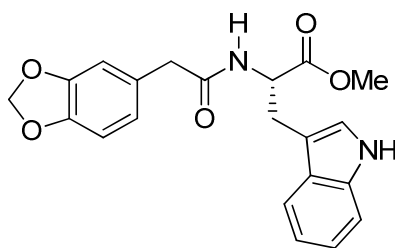
Rendimiento: 65 mg, 80%.

**Método B.** Se emplea hidrocloreuro del éster etílico de la L-serina (52 mg, 0.31 mmol). La reacción transcurre durante 60 horas. Los lavados de la fase orgánica y la evaporación del disolvente, sin necesidad de cromatografía, conducen al producto **31**. Rendimiento: 45 mg, 55%; *R<sub>F</sub>* 0.64 (hexano–AcOEt 1:2);  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +3$  (*c* 1.22, MeOH).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 7.30 (da, 1H, *J*<sub>NH,2</sub>=5.4 Hz, NH), 6.89 (d, 1H, *J*<sub>2'',6''</sub>=1.9 Hz, H-2''), 6.81 (dd, 1H, *J*<sub>5'',6''</sub>= 7.9 Hz, H-6''), 6.76 (d, 1H, H-5''), 5.96 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O), 4.49 (m, 1H, H-2), 4.13 (c, 2H, *J*<sub>H,H</sub>=7.0 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.92-3.88 (m, 1H, H-3a), 3.80-3.76 (m, 1H, H-3b), 3.54

	(d, 1H, $J_{2a',2b'}=14.7$ Hz, H-2a), 3.50 (d, 1H, H-2b'), 1.21 (t, 3H, CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ).
<sup>13</sup> C-RMN	(75.5 MHz, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO): δ 171.3 (C-1'), 171.2 (C-1), 148.6 (C-4''), 147.3 (C-3''), 130.6 (C-1''), 123.2 (C-6''), 110.5 (C-5''), 108.8 (C-2''), 101.9 (O-CH <sub>2</sub> -O), 63.0 (C-3), 61.5 (CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ), 55.8 (C-2), 43.0 (C-2'), 14.4 (CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ).
CIMS	295 ([M] <sup>+</sup> 58%).
HRCIMS	<i>m/z</i> calculado para C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>6</sub> [M] <sup>+</sup> : 295.1056, encontrado 295.1049.

**9.4.3.5.S-3-(1'''H-indol-3'''-il)-2-[2'-(3'',4''-metilendioxfenil)acetamido]propanoato de metilo (32)**



**Método A2.** Se emplea el hidrocloreuro del éster metílico del L-triptófano (71 mg, 0.28 mmol). La reacción transcurre durante 15 h. La cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOt 1:7) conduce a **32**.

Rendimiento: 106 mg, cuant.

**Método B.** Se emplea el hidrocloreuro del éster metílico del L-triptófano (78 mg, 0.31 mmol). La reacción transcurre durante 60 h. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 1:2) para dar lugar a **32**.

Rendimiento: 35 mg, 33%; *R<sub>F</sub>* 0.55 (hexano–AcOEt 1:2);  $[\alpha]_D^{24} +28$  (c 1.10, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.9 (sa, NH-Ar), 8.41 (d, 1H,  $J_{NH,H2}= 7.6$  Hz, NH-CO), 7.47 (da, 1H,  $J_{4''',5'''}= 7.8$  Hz, H-4'''), 7.34 (da,  $J_{6''',7'''}= 8.0$  Hz, H-7'''), 7.11 (d, 1H,  $J_{NH,H2'''}= 2.3$  Hz, H-2'''), 7.07 (td, 1H,  $J_{4''',6'''}= 1.2$  Hz, H-6'''), 6.97 (td,  $J_{5''',7'''}= 1.1$  Hz, H-5'''), 6.77 (d, 1H,  $J_{5''',6'''}= 7.9$  Hz,

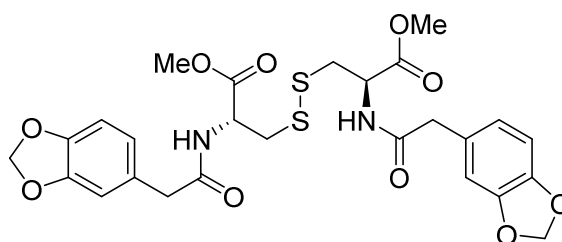
H-5''), 6.74 (d, 1H,  $J_{2'',6''}= 1.6$  Hz, H-2''), 6.61 (dd, 1H, H-6''), 5.96 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O), 4.50 (ddd, 1H,  $J_{2,3a}= 5.6$  Hz,  $J_{2,3b}= 8.3$ Hz, H-2), 3.57 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.36 (s, 2H, H-2'), 3.16 (dd, 1H,  $J_{3a,3b}= 14.6$  Hz, H-3a), 3.05 (dd, 1H, H-3b) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (125.7 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 172.4, 170.4 (C-1, C-1'), 147.0 (C-3''), 145.7 (C-4''), 136.1 (C-7''a), 129.7 (C-1'''), 127.1 (C-3''a), 123.7 (C-2'''), 122.0 (C-6''), 121.0 (C-6'''), 118.5 (C-5'''), 118.0 (C-4'''), 111.5 (C-7'''), 109.4, 109.2 (C-2'', C-3'''), 107.9 (C-5''), 100.7 (O-CH<sub>2</sub>-O), 53.2 (C-2), 51.8 (OCH<sub>3</sub>), 41.4 (C-2'), 27.1 (C-3) ppm.

CIMS 381 ([M]<sup>+</sup>, 21%).

HRCIMS *m/z* calculado para C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 381.1450, encontrado 381.1436.

**9.4.3.6. (S,S)-3,3'-Ditiobis{2-[2''-(3''',4'''-metilendioxi)fenil]acetamido]propanoato de metilo} (33)**



A una suspensión del dihidrocloruro del dimetiléster de la L-cistina (102 mg, 0.03 mmol) en DMF (4 mL) se añade, a 0°C, TEA (0.33 mL, 2.40 mmol), ácido 3,4-(metilendioxi)fenilacético (108 mg, 0.60 mmol) y PyBOP (312 mg, 0.60 mmol). La mezcla resultante se mantiene con agitación a t.a. en la oscuridad y bajo atmósfera inerte durante 7 h. Transcurrido este tiempo el crudo se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>→CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 5:1) para dar **33** como un sólido blanco.

Rendimiento: 147 mg, 83%; *R<sub>F</sub>* 0.44 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 20:1);  $[\alpha]_D^{28}$  77 (*c* 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) p.f 133-135 °C.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.78 (x2) (d, 2H,  $J_{2',6'}=1.5$  Hz, 2H-2'''), 6.75 (x2) (d, 2H,  $J_{5',6'}=8.7$  Hz, 2H-5''') 6.72 (x2) (dd, 2H, 2H-6'''), 6.45 (x2) (d,

2H,  $J_{2,NH}=7.5$  Hz, 2NH), 5.94 (x2) (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>O), 4.81 (x2) (m, 2H, 2CHNH), 3.73 (x2) (s, 6H, 2OMe), 3.51 (x2) (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>Ar), 3.10 (x2) (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>S) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 171.0 (2 x CO), 170.7 (2 x CO), 148.2, 147.1 (x2) (2C-3''', 2C-4'''), 127.9 (x2) (2C-1'''), 122.7 (x2) (2C-6'''), 109.9 (x2) (2C-2'''), 108.7 (2 x C-5'''), 101.2 (x2) (2O-CH<sub>2</sub>-O), 52.8 (x2) (2OMe), 52.0 x2) (2CHNH), 43.1 (x2) (2CH<sub>2</sub>-Ar), 40.5 (x2) (2CH<sub>2</sub>S) ppm.

CIMS 593 ([M+H]<sup>+</sup> 4%).

HRCIMS *m/z* calculado para C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 593.1264, encontrado 593.1245.

### Método general para la síntesis de amidas de DOPAC

**Método A1.** A una disolución de DOPAC (50 mg, 0.30 mmol) en diclorometano anhidro (1.5 mL) se añade PyBOP (178 mg, 0.34 mmol, 1.15 eq.), el hidrocloreuro del aminoéster correspondiente en cada caso (0.30 mmol, 1.0 eq.) y DIPEA (0.89 mL, 5.20 mmol, 17.5 eq.). La mezcla se agita a t.a. bajo atmósfera inerte durante 48-72 h. Posteriormente el producto se purifica según lo indicado en cada caso.

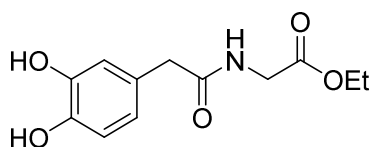
**Método A2.** A una disolución de DOPAC (50 mg, 0.30 mmol) en DMF anhidro (4 mL), se añade a 0 °C PyBOP (155 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq.), el hidrocloreuro del aminoéster correspondiente en cada caso (0.30 mmol, 1.0 eq.) y TEA (0.17 mL, 1.19 mmol, 4.0 eq.). La mezcla se mantiene con agitación a t.a. y atmósfera inerte durante 16-38 h. Posteriormente el disolvente se evapora y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna, usando el eluyente indicado en cada caso.

**Método B.** A una disolución de DOPAC (50 mg, 0.30 mmol) en diclorometano anhidro (3 mL) se le añade HOBt (44 mg, 0.33 mmol, 1.1 eq.), EDC (68 mg, 0.36 mmol, 1.2 eq.), el hidrocloreuro del aminoéster correspondiente en cada caso (0.33 mmol, 1.1 eq.) y TEA (0.06 mL, 0.45 mmol, 1.5 eq.), agitándose a t.a. y atmósfera inerte de argón durante 48-60 h. A continuación, la disolución se diluye en 15 mL de AcOEt y se lava con H<sub>2</sub>O (1x15 mL). La fase acuosa se lava con AcOEt (3x10 mL). La fases orgánicas reunidas se lavan con HCl acuoso 1N (10 mL), NaHCO<sub>3</sub> aq. sat. (1x10 mL) y salmuera (1x10 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y el filtrado se concentra a

sequedad; el residuo se purifica mediante cromatografía en columna, usando el eluyente indicado en cada caso.

**Método C.** A una disolución de DOPAC (50 mg, 0.30 mmol) en diclorometano anhidro (2 mL), se añade HATU (124 mg, 0.33 mmol, 1.1 eq.), el hidrocloreto del aminoéster indicado (0.31 mmol, 1.05 eq.) y DIPEA (0.11 mL, 0.62 mmol, 2.1 eq.). La mezcla se mantiene con agitación a t.a. y atmósfera inerte durante 72 h. Transcurrido ese tiempo la disolución se lava con HCl 1N (1x10 mL), NaHCO<sub>3</sub> aq. sat. (1x10 mL) y salmuera (1x10 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y el filtrado se concentra a sequedad.

#### 9.4.3.7. 2-[2'-(3'',4'')-Dihidroxifenil]acetamido]acetato de etilo (**34**)



**Método A1.** Se emplea el hidrocloreto del éster etílico de la glicina (42 mg, 0.30 mmol). La reacción transcurre durante 48 horas. Posteriormente el disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>→CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10:1) conduciendo a **34**.

Rendimiento: 32 mg, 43%.

**Método A2.** Se emplea el hidrocloreto del éster etílico de la glicina (42 mg, 0.30 mmol). La reacción transcurre durante 22 horas. La cromatografía en columna (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>→CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10:1) conduce a **34**.

Rendimiento: 151 mg, cuant.

**Método B.** Se emplea el hidrocloreto del éster etílico de la glicina (46 mg, 0.33 mmol). La reacción transcurre durante 60 horas. La cromatografía en columna (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>→CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 10:1) conduce a **34**.

Rendimiento: 54 mg, 72%.

**Método C.** Se emplea el hidrocloreto del éster etílico de la glicina (44 mg, 0.31



mmol). La reacción transcurre durante 72 h. Posteriormente a la eliminación del disolvente se realiza un ensayo de  $^1\text{H}$ -RMN con fines cualitativos, observándose la formación del producto.

$R_F$  0.81 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 40:1).

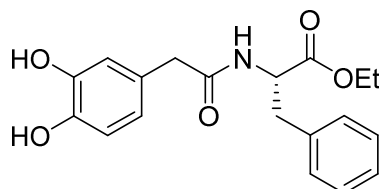
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  7.36 (sa, 1H, NH), 6.81 (d, 1H,  $J_{2'',6''}=2.0$  Hz, H-2''), 6.74 (d, 1H,  $J_{5'',6''}=8.0$  Hz, H-5''), 6.62 (dd, 1H, H-6''), 4.10 (c, 2H,  $J_{\text{H,H}}=7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3.91 (s, 2H, H-2), 3.41 (s, 2H, H-2'), 1.19 (t, 3H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$ -RMN (75.5 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  172.6 (C-1'), 170.6 (C-1), 145.8, 144.8 (C-3'', C-4''), 127.9 (C-1''), 121.5 (C-6''), 117.2 (C-5''), 116.0 (C-2''), 61.4 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 42.8 (C-2'), 41.8 (C-2), 14.4 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ) ppm.

LSIMS 276 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 16%)

HRLSIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{Na NO}_5$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 276.0848, encontrado 6.0842).

#### 9.4.3.8. S-2-[2'-(3'',4''-Dihidroxifenil)acetamido]-3-fenilpropanoato de etilo (35)



**Método A1.** Se emplea el hidrocloreuro del éster etílico de la L-fenilalanina (68 mg, 0.30 mmol). La reacción transcurre durante 72 horas. Transcurrido ese tiempo, la fase orgánica se lava con HCl acuoso 1N (1x10 mL),  $\text{NaHCO}_3$  aq. sat. (1x10 mL) y salmuera (1x10 mL). La fase orgánica se seca sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtra y el filtrado se concentra a sequedad; se realiza un ensayo de  $^1\text{H}$ -RMN con fines cualitativos, observándose la formación del producto.

**Método A2.** Se emplea el hidrocloreuro del éster etílico de la L-fenilalanina (68 mg, 0.30 mmol). La reacción transcurre durante 38 horas. La cromatografía en columna

(hexano→hexano–AcOEt 1:4) conduce a **35**.

Rendimiento: 102 mg, cuant;  $R_F$  0.40 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH 10:1);  $[\alpha]_D^{21}$ -4 (*c* 0.95, MeOH).

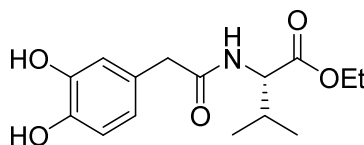
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.21 (m, 3H, Ar-H), 7.08 (m, 2H, Ar-H), 6.67 (m, 2H, H-2'', H-5''), 6.50 (dd, 1H,  $J_{2'',6''}=2.1$  Hz,  $J_{5'',6''}=8.0$  Hz, H-6''), 4.62 (dd, 1H,  $J_{2,3a}=5.8$  Hz,  $J_{2,3b}=8.2$  Hz, H-2), 4.11 (c, 2H,  $J_{H,H}=7.1$  Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.33 (s, 2H, H-2'), 3.09 (dd, 1H,  $J_{3a,3b}=13.8$  Hz, H-3a), 2.97 (dd, 1H, H-3b), 1.18 (t, 3H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 174.3 (C-1'), 172.9 (C-1), 146.4, 145.4 (C-3'', C-4''), 137.8 (Ar-C), 130.2 (x2) (2Ar-C), 129.5 (x2) (2Ar-C), 127.8 (C-1''), 127.7 (Ar-C), 121.6 (C-6''), 117.4 (C-2''), 116.5 (C-5''), 62.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 55.2 (C-2), 43.0 (C-2'), 38.3 (C-3), 14.3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

CIMS 344 ([M+H]<sup>+</sup>, 29%).

HRCIMS *m/z* calculado para C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 344.1498, encontrado 344.1503.

#### 9.4.3.9. S-2-[2'-(3'',4''-Dihidroxifenil)acetamido]-3-metilbutanoato de etilo (**36**)



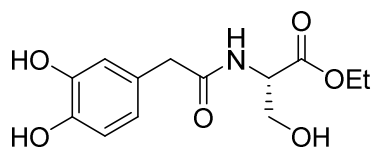
**Método A2.** Se emplea el hidrocloreuro del éster etílico de la L-valina (54 mg, 0.30 mmol). La reacción transcurre durante 16 horas. La cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 1:2) conduce a **36**.

Rendimiento: 84 mg, 96%.;  $R_F$  0.38 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH 10:1);  $[\alpha]_D^{25}$ -6 (*c* 0.71, DMSO).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 6.75 (d, 1H,  $J_{2'',6''}=2.1$  Hz, H-2''), 6.71 (d, 1H,  $J_{5'',6''}=8.1$  Hz, H-5''), 6.62 (dd, 1H, H-6''), 4.28 (d, 1H,  $J_{2,3}=5.9$  Hz, H-2), 4.16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.44 (d, 1H,  $J_{2',a2'b}=14.5$  Hz, H-2'a), 3.41 (d, 1H, H-2'b) 2.12 (m, 1H, H-3), 1.24 (t, 3H,  $J_{H,H}=7.1$  Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.92, 0.91 (x2) (2d, 3H,  $J_{H,H}=6.9$  Hz, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

$^{13}\text{C}$ -RMN	(75.5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ 173.0 (C-1'), 172.0 (C-1), 144.7, 144.0 (C-3'', C-4''), 126.2 (C-1''), 121.4 (C-6''), 116.3 (C-5''), 115.7 (C-2''), 61.6 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 57.5 (C-2), 43.0 (C-2'), 31.3 (C-3), 19.0, 17.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 14.2 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ) ppm.
CIMS	295 ( $[\text{M}]^+$ , 38%); 296 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 34%).
HRCIMS	$m/z$ calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ $[\text{M}]^+$ : 295.1420, encontrado 295.1428. $m/z$ calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 296.1498, encontrado 296.1488.

#### 9.4.3.10. S-2-[2'-(3'',4''-Dihidroxifenil)acetamido]-3-hidroxiopropanoato de etilo (37)

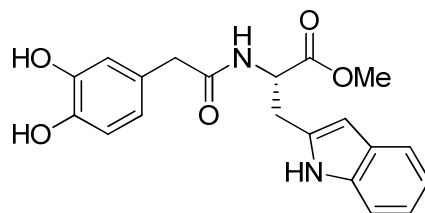


**Método A2:** Se emplea el hidrocloreuro del éster etílico de la L-serina (50 mg, 0.30 mmol). La reacción transcurre durante 38 horas. La cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 1:2) conduce a **37**.

Rendimiento: 84 mg, cuant.;  $R_f$  0.39 (hexano–AcOEt 1:2);  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -6 ( $c$  1.02, MeOH).

$^1\text{H}$ -RMN	(300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ): $\delta$ 7.10 (da, $J_{\text{NH},2} = 7.1$ Hz, 1H, NH), 6.83 (d, 1H, $J_{2'',6''} = 2.2$ Hz, H-2''), 6.75 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8.0$ Hz, H-5''), 6.66 (dd, 1H, H-6''), 4.48 (m, 1H, H-2), 4.12 (c, 2H, $J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3.89 (m, 1H, H-3a), 3.76 (m, 1H, H-3b), 3.43 (s, 2H, H-2'), 1.21 (t, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ) ppm.
$^{13}\text{C}$ -RMN	(75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ): $\delta$ 171.7 (C-1'), 171.2 (C-1), 145.9, 144.8 (C-3'', C-4''), 128.3 (C-1''), 121.6 (C-6''), 117.3 (C-5''), 116.1 (C-2''), 63.1 (C-3), 61.5 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 55.8 (C-2), 43.0 (C-2'), 14.4 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ) ppm.
CIMS	283 ( $[\text{M}]^+$ , 4%).
HRCIMS	$m/z$ calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_6$ $[\text{M}]^+$ : 283.1056, encontrado 283.1054.

**9.4.3.11. S-2-[2'-(3'',4''-Dihidroxifenil)acetamido]-3-(1''''H-indol-3''''-il)propanoato de metilo (38)**



**Método A2.** Se emplea el hidrocloreuro del éster metílico del L-triptófano (76 mg, 0.30 mmol). La reacción transcurre durante 38 horas. La cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 1:7) conduce a **38**.

Rendimiento: 110 mg, cuant.;  $R_F$  0.33 (hexano–AcOEt 1:2);  $[\alpha]_D^{23} +4$  ( $c$  1.15, DMF).

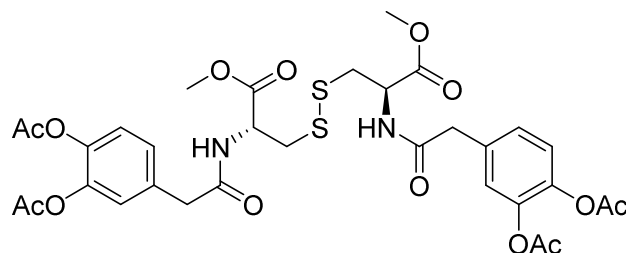
$^1\text{H-RMN}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.8 (sa, 1H, NH-Ar), 8.71, 8.62 (2s, 1H cada uno, 2OH), 8.29 (d, 1H,  $J_{\text{NH,H-2}} = 7.5$  Hz, NH-CO), 7.46 (d, 1H,  $J_{4'',5''} = 8.0$  Hz, H-4''), 7.33 (d, 1H,  $J_{6'',7''} = 8.2$  Hz, H-7''), 7.11 (da,  $J_{\text{NH,H-2''}} = 2.5$  Hz, H-2''), 7.06 (td, 1H,  $J_{5'',6''} = 8.0$  Hz,  $J_{5'',7''} = 1.0$  Hz, H-5''), 6.98 (td, 1H,  $J_{4'',6''} = 1.0$  Hz, H-6''), 6.63 (d, 1H,  $J_{2'',6''} = 1.2$  Hz, H-2''), 6.60 (d, 1H,  $J_{5'',6''} = 8.0$  Hz, H-5''), 6.41 (dd, 1H, H-6'), 4.49 (m, 1H, H-2), 3.55 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.26 (d, 1H,  $J_{2',a,2'b} = 8.0$  Hz, H-2'a), 3.23 (d, 1H, H-2'b), 3.14 (dd, 1H,  $J_{2,3a} = 6.0$  Hz,  $J_{3a,3b} = 14.5$  Hz, H-3a), 3.05 (dd, 1H,  $J_{2,3b} = 8.0$  Hz, H-3b) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  172.4, 170.7 (C-1, C-1'), 144.8, 143.7 (C-3'', C-4''), 136.1 (C-7''''a), 127.1, (C-3''''a), 126.7 (C-1''), 123.6, (C-2''). 120.9, 119.7 (C-6'', C-6''), 118.4 (C-5''), 118.0 (C-4''), 116.6 (C-5''), 115.3 (C-2''), 111.4 (C-7''), 109.4 (C-3''), 53.2 (C-2), 51.7 (OCH<sub>3</sub>), 41.2 (C-2'), 27.2 (C-3) ppm.

LSIMS 391 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 24%).

HRLSIMS  $m/z$  Calculado para C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub>  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 391.1270, encontrado 391.1276.

**9.4.3.12. (S,S)-3,3'-Ditiobis{2-[2''-(3''',4'''-diacetoxifenil)acetamido]propanoato de metilo} (39)**



A una suspensión del dihidrocloruro del dimetiléster de L-cistina (102 mg, 0.30 mmol) en DMF (4 mL), se añade TEA (0.33 mL, 2.40 mmol), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (101 mg, 0.60 mmol) y PyBOP (312 mg, 0.60 mmol). La mezcla resultante se agita a t.a. bajo atmósfera inerte y en la oscuridad durante 12 h. A continuación, la mezcla de reacción se concentra a sequedad y se acetila de manera convencional con una mezcla 1:1 de Ac<sub>2</sub>O–Py (2 mL) durante 6.5 h. Transcurrido este tiempo, se hidroliza el anhídrido acético con H<sub>2</sub>O y se concentra a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>→CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH 60:1) para dar lugar a **39**.

Rendimiento: 158 mg, 72%; *R<sub>F</sub>* 0.64 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH 10:1); [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> + 1 (*c* 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

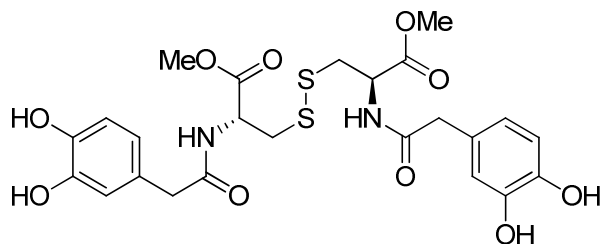
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.20-7.12 (m, 6H, 2H-2''', 2H-5''', 2H-6'''), 6.65 (x2) (d, 2H, *J*<sub>H,H</sub>=7.6 Hz, 2NH), 4.83-4.77 (x2) (m, 2H, 2CHNH), 3.72 (x2) (s, 6H, 2OMe), 3.58 (x2) (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>Ar), 3.05 (x2) (dd, 2H, *J*<sub>CH<sub>2</sub>a, CH<sub>2</sub>b</sub>=14.4, *J*<sub>H,H</sub>=4.8 Hz, 4H, 2CH<sub>2</sub>aS), 2.97 (dd, 2H, *J*<sub>H,H</sub>=4.8 Hz, 2CH<sub>2</sub>bS), 2.26 (x4) (s, 12H, 4OCH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 170.7, 170.2 (x2) 2(C-1, 2C-1''), 168.4, 168.2 (x4)(4COAc), 142.2, 141.3 (x2) (2C-3''', 2C-4'''), 133.4 (x2) (2C-1'''), 127.7 (x2) (2C-6'''), 124.5 (x2) (2C-2'''), 123.8 (x2) (2C-5'''), 52.8 (x2) (2CH<sub>3</sub>CO), 52.3 (x2) (2CHNH), 42.6 (x2) (2CH<sub>2</sub>-Ar), 39.7 (x2) (2CH<sub>2</sub>S), 20.8, 20.7 (x2) (2CH<sub>3</sub>-CO) ppm.

LSIMS 759 ([M+Na]<sup>+</sup> 41%).

HRLIMS *m/z* calculado para C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>Na O<sub>14</sub>S<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 759.1506, encontrado 759.1502.

**9.4.3.13. (*S,S*)-3,3'-Ditiobis{2-[2''-(3''',4''')-dihidroxifenil]acetamido]propanoato de metilo} (40)**



A una disolución de **39** (96 mg, 0.130 mmol) en una mezcla 1:1 de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (2 mL), se añade  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (10 mg, 0.031 mmol), y la correspondiente mezcla se agita a t.a. en la oscuridad y bajo atmósfera inerte durante 30 minutos. A continuación, se neutraliza el crudo de reacción empleando Amberlita IR-120 ( $\text{H}^+$ ), se filtra, se lava con MeOH y se concentra a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 20:1) para dar **40** como un sirupo amarillento.

Rendimiento: 48 mg, 65%;  $R_f$  0.38 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 10:1);  $[\alpha]_D^{26} +28$  (c 1.0, MeOH).

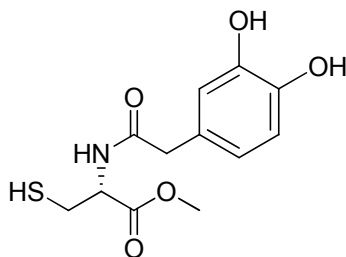
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ : 7.50 (x2) (d, 2H,  $J_{\text{H,H}}=8.2$  Hz, 2NH), 6.81 (x2) (d, 2H,  $J_{2'',6''}=2.0$  Hz, 2H-2'''), 6.73 (x2) (d, 2H,  $J_{2'',5''}=8.0$ , 2H-5'''), 6.63 (x2)(dd, 2H, 2H-6'''), 4.81-4.72 (x2) (m, 2H, 2CH-NH), 3.68 (x2) (s, 6H, 2OMe), 3.44 (x2) (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>Ar), 3.13 (dd,  $J_{3\text{a,H}}=5.2$  Hz,  $J_{3\text{a,3b}}=13.9$  Hz, 2H, 2CH<sub>a</sub>S), 3.07 (dd,  $J_{3\text{b,H}}=7.6$  Hz, 2H, 2CH<sub>b</sub>S) ppm.

$^{13}\text{C}$ -RMN (75.5 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ : 172.2 (x2) (2C-1), 171.5 (x2) (2C-1''), 146.0, 145.0 (x2) (2C-3''', C-4'''), 133.4 (2 x C-1'''), 121.7 (2 x C-6'''), 117.2 (x2) (2C-2'''), 116.1 (x2) (2C-5'''), 52.7 (x2) (2CHNH), 52.6 (x2) (2OMe), 43.0 (x2) (2CH<sub>2</sub>-Ar), 41.1 (x2) (2CH<sub>2</sub>S) ppm.

LSIMS 591 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 11%).

HRLIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{NaO}_{10}\text{S}_2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 591.1083, encontrado 591.1058.

**9.4.3.13. (R)-2-[2'-(3'', 4''-Dihidroxifenil)acetamido]-3-mercaptopropanoato de metilo (41)**



A uma disolución de **40** (43 mg, 0.076 mmol) en uma mezcla 1:1 de MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidros (2 mL) se añade ditiotreitól (12 mg, 0.076 mmol). La mezcla resultante se agita a t.a. em la oscuridad y bajo atmosfera inerte durante 2h. A continuación, el crudo de reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano-AcOEt 1:10) para dar **41** como un sirupo.

Rendimiento: 19 mg, 44%; *R<sub>F</sub>* 0.48 (hexano-AcOEt 1:5);  $[\alpha]_D^{25}$  -15 (*c* 1.2, MeOH).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.75 (d, 1H, *J*<sub>2'',6''</sub>=2.0 Hz, H-2''), 6.71 (d, 1H, *J*<sub>5'',6''</sub>=8.0 Hz, H-5''), 6.63 (dd, 1H, H-6''), 4.61 (m, 1H, CH-NH), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.43 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar), 2.93 (dd, 1H, *J*<sub>3a,H</sub>=5.0 Hz, *J*<sub>3a,3b</sub>=14.0 Hz, CH<sub>3a</sub>S), 2.85 (dd, 1H, *J*<sub>3b,H</sub>=6.5 Hz, CH<sub>3b</sub>S) ppm.

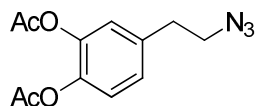
<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 174.7 (C-1), 172.0 (C-1'), 146.4, 145.4 (C-3'', C-4''), 127.8 (C-1''), 121.5 (C-6''), 117.3 (C-2''), 116.4 (C-5''), 56.1 (C-N), 52.9 (OCH<sub>3</sub>), 42.9 (CH<sub>2</sub>Ar), 26.5 (CH<sub>2</sub>S) ppm.

LSIMS: 308 ([M+Na]<sup>+</sup>, 12 %).

HRLIMS *m/z* calculado para C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NNaO<sub>5</sub>S<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 308.0569, encontrado 308.0569.

#### 9.4.4. SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL HIDROXITIRO SOL CON MÚLTIPLES FRAGMENTOS DE CATECOL VÍA *CLICK CHEMISTRY*.

##### 9.4.4.1. 4-(2'-Azidoetil)-1,2-Diacetoxibenceno (**42**)



A una disolución de 4-(2'-azidoetil)benceno 1,2-diol (45 mg, 0.26 mmol) en piridina (1 mL) enfriada a 0°C se añade gota a gota anhídrido acético (1 mL). La mezcla resultante se agita durante 12 h en la oscuridad y en atmósfera inerte. A continuación, se destruye el exceso de Ac<sub>2</sub>O con H<sub>2</sub>O y se coevapora con tolueno; y se obtiene de esta manera **42** como un aceite de color naranja, sin ninguna purificación adicional.

Rendimiento: 65 mg, 98%. *R<sub>F</sub>* 0.49 (Hexano-AcOEt 3:1).

FT-IR  $\nu_{\max}$  2357, 1769, 1504, 1426, 1370, 1263, 1210, 1183, 1109, 1012, 897, 732, 703 cm<sup>-1</sup>.

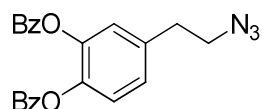
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.12 (d, 1H, *J*<sub>5,6</sub>=8.1 Hz, H-6), 7.11 (d, 1H, *J*<sub>3,5</sub>=1.9 Hz, H-3), 7.05 (dd, 1H, H-5), 3.51 (t, 2H, *J*<sub>1',2'</sub>=7.3 Hz, CH<sub>2</sub>Ar), 2.87 (t, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 168.4 (CO), 168.3 (CO), 142.2 (C-2), 141.0 (C-1), 136.9 (C-4), 126.9 (C-5), 123.8, 123.6 (C-3, C-6), 52.2 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 34.8 (CH<sub>2</sub>Ar), 20.8 (x2) (2CH<sub>3</sub>OAc) ppm.

CIMS 263 ([M]<sup>+</sup>, 8%).

HRCIMS *m/z* calculado para C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: 263.0916, encontrado 263.0906.



9.4.4.2. 4-(2'-Azidoetil)-1,2-Dibenzoiloxibenceno (**43**)

A una disolución de 4-(2'-azidoetil)benceno 1,2-diol (136 mg, 0.76 mmol) en piridina (0.12 mL) se le añade cloruro de benzoílo (0.23 mL, 2.28 mmol), la mezcla se resultante se agita a t.a. y en la oscuridad bajo atmósfera inerte durante 30 min. A continuación, se añade un poco de hielo para hidrolizar el exceso de cloruro de benzoílo y se concentra a sequedad. El crudo de reacción se disuelve en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) y se lava con  $\text{NaHCO}_3$  aq (3x10 mL) y  $\text{H}_2\text{O}$  (2x10 mL). La fase orgánica se seca sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtra y el filtrado se concentra a sequedad, el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→hexano–AcOEt 8:1) para dar **43** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 111 mg, 38%;  $R_F$  0.44 (hexano–AcOEt 5:1).

FT-IR  $\nu_{\text{max}}$  2359, 2102, 1744, 1598, 1506, 1542, 1259, 1199, 1178, 1113, 1057, 1024, 900, 861, 796, 732, 702  $\text{cm}^{-1}$ .

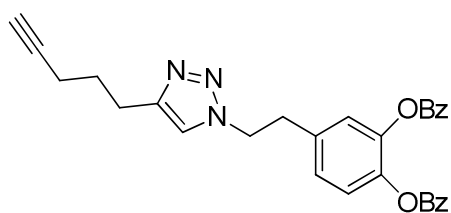
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.08-8.02 (m, 4H, Ar-H), 7.57-7.49 (m, 2H, Ar-H) 7.38-7.32 (m, 5H, 5Ar-H, H-6), 7.27 (d, 1H,  $J_{3,5}=2.1$  Hz, H-3), 7.20 (dd, 1H,  $J_{3,5}=8.3$  Hz, H-5), 3.56 (t, 2H,  $J_{1,2}=7.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 2.94 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$ -RMN (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 164.3, 164.2 (2CO), 142.5, 141.3 (C-1, C-2), 137.0, 133.7, 133.6 (3Ar-C), 130.1 (4Ar-C), 128.9 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 128.4 (2Ar-C), 126.9 (C-5) 123.8 (C-3), 123.6 (Ar-C), 52.1 ( $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 34.8 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ) ppm

CIMS 387 ( $[\text{M}]^+$ , 3%).

HRCIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_4$   $[\text{M}]^+$ : 387.1219, encontrado 387.1222.

## 9.4.4.3. 1-[2'-(3'', 4''-Dibenzoiloxifenil)etil]-4-(pent-4''-in-1-il)-1H-1,2,3-triazol (44)



A una disolución de la azida **43** (100 mg, 0.26 mmol) en una mezcla acetona-agua 2:1 (6 mL), se añade hepta-1,6-diino (0.025 ml, 0.21 mmol), sulfato de cobre (II) (12 mg, 0.075 mmol) y L-ascorbato sódico (32 mg, 0.16 mmol). La mezcla resultante se agita a t.a. durante 4 h; a continuación, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt), obteniéndose **44** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 45.6 mg, 42%;  $R_F$  0.83 (AcOEt).

FT-IR  $\nu_{\max}$  1740, 1600, 1583, 1506, 1451, 1314, 1245, 1199, 1176, 1112, 1078, 1054, 1023, 798, 702, 617  $\text{cm}^{-1}$

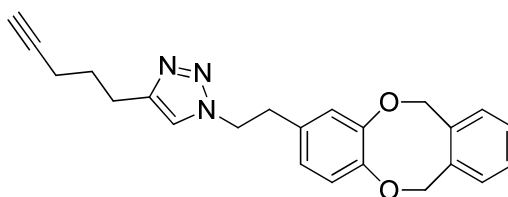
$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.98 (m, 4H, Ar-H), 7.57 (m, 2H, Ar-H), 7.55 (s, 1H, H-5), 7.39 (m, 4H, Ar-H), 7.31 (d, 1H,  $J_{5'',6''} = 8.1$  Hz, H-5''), 7.17 (d, 1H,  $J_{2'',6''} = 2.0$  Hz, H-2''), 7.13 (dd, 1H, H-6''), 4.66 (t, 2H,  $J_{1',2'} = 6.9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.27 (t, 2H, H-2'), 2.76 (t, 2H,  $J_{1'',2''} = 7.4$  Hz, H-1''), 2.21 (t, 1H, H-5'''), 2.18-2.13 (m, 2H, H-3'''), 1.81 (quint., 2H, H-2''') ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 165.6 (CO), 165.5 (CO), 143.9, 142.85 (C-3'', C-4''), 138.1 (C-1''), 135.1 (Ar-C), 131.0 (C-4), 129.8 (Ar-C), 128.3 (Ar-C), 125.1 (Ar-C), 124.8 (NC), 124.0 (Ar-C), 84.3 (C-2), 70.1 (C-1), 52.1 (C-1'), 36.9 (C-2'), 29.5 (C-5), 25.2 (C-4'''), 18.5 (C-3''') ppm.

CIMS 480 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 47 %).

HRCIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 480.1923, encontrado 480.1916.

## 9.4.4.4. 4-(Pent-4-in-1-il)-1-[2'-(3'', 4'')-(xililenodioxifenil)etil]-1H-1,2,3-triazol (45)



A una disolución de la azida **260** (100 mg, 0.36 mmol) en una mezcla 3:1 de acetonitrilo–AcOEt (4 mL) se añade hepta-1,6-diino (200  $\mu$ L, 1.78 mmol), CuI (135 mg, 0.71 mmol) y DIPEA (155  $\mu$ L, 0.89 mmol). La mezcla resultante se mantiene con agitación a t.a. durante 12 h. A continuación, el crudo de reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano–AcOEt 2:1  $\rightarrow$  AcOEt–MeOH 1:1) para dar **45** como un sirupo.

Rendimiento 53 mg, 40%;  $R_F$  0.72 (hexano–AcOEt 1:2).

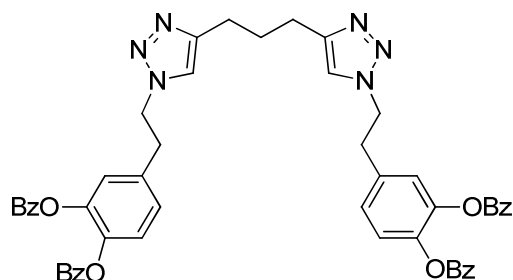
$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.33 (s, 1H, H-5), 7.28-7.16 (m, 4H, Ar-H), 6.82 (d, 1H,  $J_{5'',6''}=8.2$  Hz, H-6''), 6.68 (d, 1H,  $J_{2'',6''}=2.0$  Hz, H-2''), 6.59 (dd, 1H, H-5''), 5.37 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{OAr}$ ), 5.35 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{OAr}$ ), 4.49 (t, 2H,  $J_{1',2'}=7.0$  Hz, H-1'), 3.02 (t, 2H, H-2'), 2.71 (t, 2H,  $J_{1,2}=7.4$  Hz, C-1), 2.24 (t, 1H,  $J_{5,3}=2.6$  Hz, C-5), 2.15 (td, 2H,  $J_{\text{H,H}}=7.4$  Hz, C-3), 1.77 (quint., 2H, C-2) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 150.8 (Ar-C), 149.6 (Ar-C), 147.8 (Ar-C), 137.3 (Ar-C), 137.1 (Ar-C), 134.4 (CN), 130.4 (CH-Ar), 130.1 (CH-Ar), 129.7 (CH-Ar), 129.6 (CH-Ar), 124.9 (C-5'), 123.7 (HCN), 123.1 (C-2'), 84.3 (CCH), 76.0 ( $\text{CH}_2\text{OAr}$ ), 75.7 ( $\text{CH}_2\text{OAr}$ ), 70.1 (C-4), 52.5 (C-1'), 36.7 (C-2'), 29.4 (C-2), 25.0 (C-4), 18.4 (C-3) ppm.

LSIMS 396 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 100%).

HRLSIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{NaO}_2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 396.1688, encontrado 396.1677.

**9.4.4.5. 1,3-Bis{1'-[2''-(3''',4''')-dibenzoiloxifenil)etil]-1'H-1',2',3'-triazol-4'-il}propano(46)**



A una disolución de la azida **43** (0.100 g, 0.26 mmol) en una mezcla 2:1 de acetona-H<sub>2</sub>O (6 mL); se agrega hepta-1,6-diino (7.5 µL, 0.064 mmol), sulfato de cobre (II) (3.0 mg, 0.019 mmol) y L-ascorbato sódico (7.6 mg, 0.038 mmol), y la mezcla resultante se agita a t.a. durante 4 horas. A continuación, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt), obteniéndose **46** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 52.8 mg, 95 %;  $R_F$  0.39 (AcOEt).

FT-IR  $\nu_{\max}$  1739, 1599, 1557, 1506, 1451, 1246, 1199, 1177, 1111, 1054, 1023, 869, 799, 702 cm<sup>-1</sup>.

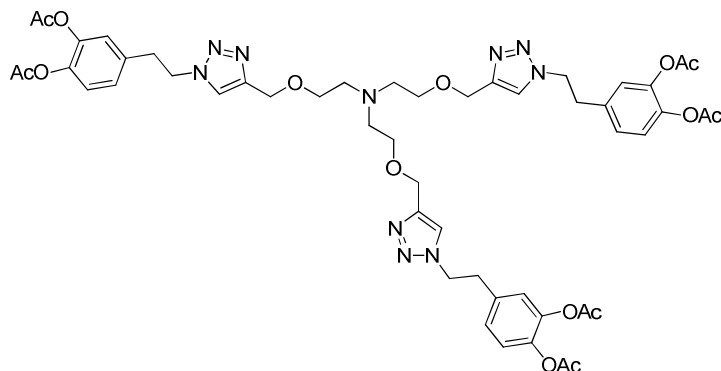
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.94 (m, 8H, 8Ar-H), 7.56 (m, 4H, 4Ar-H), 7.48 (s, H, H-5'), 7.37 (m, 8H, 8Ar-H), 7.26 (d, 2H,  $J_{5'',6''}=8.1$  Hz, 2H-5'''), 7.13 (d, 2H,  $J_{2'',6''}=2.0$  Hz, 2H-2'''), 7.06 (dd, 2H, 2H-6'''), 4.60 (t, 4H,  $J_{1'',2''}=6.9$  Hz, 2H-1''), 3.22 (t, 4H, 2H-2''), 2.63 (t, 4H,  $J_{H,H}=7.5$  Hz, H1, H-3), 1.94 (quint., 2H, H-2) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 165.5 (4CO), 143.8, 142.8, (2C-3''', 2C-4''') 138.0. (2C-Het), 135.1 (2C-1'''), 130.9 (8Ar-C), 129.89 (2Ar-C), 129.85 (2Ar-C), 129.77 (6Ar-C), 128.3 (2Ar-C), 125.0 (2C-6'''), 124.72 (2C-2'''), 123.9 (2C-5'''), 122.1 (2C-4'), 52.1 (2C-1''), 36.7 (2C-2''), 30.0 (C-1, C-3), 25.4 (C-2) ppm.

LSIMS 889 ([M+Na]<sup>+</sup>, 28 %).

HRLSIMS  $m/z$  calculado para C<sub>51</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 889.2962, encontrado 889.2966.

**9.4.4.6. Tris-1'--[2''-(3''',4'''-Diacetoxifeniltil)-1'H-1',2',3'-triazol-4'-il]-3-oxabutil}amina (47)**



A una disolución de **262** (11 mg, 0.04 mmol) en una mezcla 2:1 de acetona–H<sub>2</sub>O (3 mL) se añade la azida **42** (63 mg, 0.024 mmol), sulfato de cobre(II) (2 mg, 0.008 mmol) y L-ascorbato sódico (5 mg, 0.024 mmol) y la mezcla resultante se agita a t.a. y en la oscuridad durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt–MeOH 1:1) para obtener **47** como un sirupo.

Rendimiento: 38 mg, 90%;  $R_F$  0.21 (AcOEt).

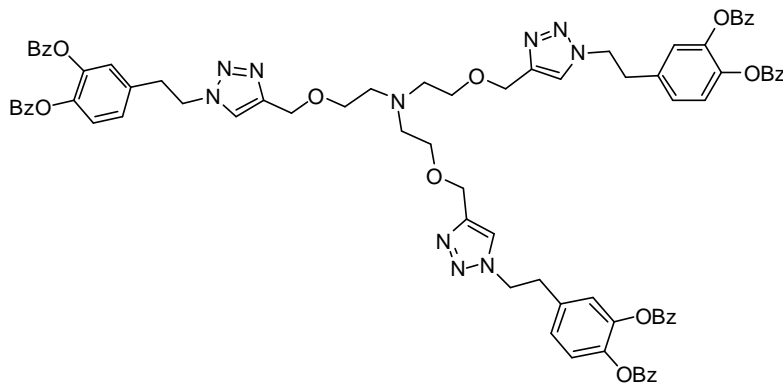
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 7.87 (s, 3H, 3CH-Het), 7.12-7.09 (m, 9H, 3H-2', H-5''', H-6'''), 4.66 (t, 6H,  $J_{1'',2''}=7.2$  Hz, 3H-1''), 4.56 (s, 6H, 3H-4), 3.52 (t, 6H,  $J_{H,H}=5.6$  Hz, 3H-2), 3.24 (t, 6H, 3H-2''), 2.70 (t, 6H, 3CH<sub>2</sub>N), 2.23 (s, 9H, 3OAc), 2.24 (s, 9H, 3OAc) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 168.8 (6CO), 145.4, 143.3, 142.1 (3C-3''', 3C-4''', 3C-1'''), 137.4 (3C-Het), 127.6, 124.7, 124.4 (3C-2''', 3C-5''', 3C-6'''), 124.2 (3CH-Het), 68.9 (3C-2), 64.8 (3C-4), 55.2 (3CH<sub>2</sub>N), 51.4 (3CH<sub>2</sub>-Het), 36.3 (3CH<sub>2</sub>Ar), 20.5 (6OCH<sub>3</sub>) ppm.

LSIMS 1859 ([M+Na]<sup>+</sup>, 4 %).

HRLSIMS  $m/z$  calculado para C<sub>105</sub>H<sub>88</sub>N<sub>12</sub>NaO<sub>20</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1859.6136, encontrado 1859.6134.

**9.4.4.7. Tris-1'--[2''-(3''',4''')-Dibenzoilfeniletíl)-1'H-1',2',3'-triazol-4'-il]-3-oxabutil}amina (48)**



A una disolución de **262** (9 mg, 0.04 mmol) en una mezcla 2:1 de acetona-H<sub>2</sub>O (3 mL) se añade 4-(2'-azidoetil)-1,2-dibenzoiloxibenceno **43** (54 mg, 0.14 mmol), sulfato de cobre (II) (1 mg, 0.007 mmol) y L-ascorbato sódico (4 mg, 0.021 mmol), y la mezcla resultante se agita a t.a. y en la oscuridad durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt-MeOH 1:1) para dar **48** como un sirupo anaranjado.

Rendimiento: 37 mg, 74%.

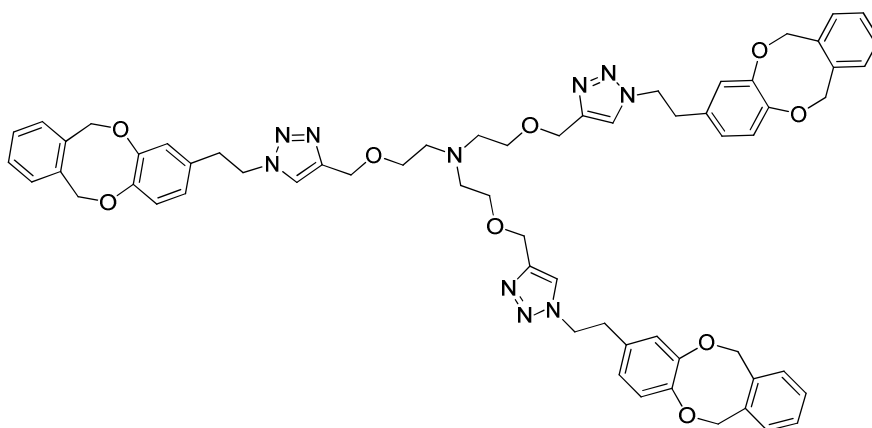
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 8.06-8.02 (m, 15H, 15Ar-H), 7.91 (s, 3H, 3CH-Het), 7.67-7.61 (m, 6H, 6Ar-H), 7.50-7.40 (m, 6H, 3H-2''', 3H-5'''), 7.26 (dd, 3H,  $J_{2''',6'''}=2.1$  Hz,  $J_{5''',6'''}=8.3$  Hz, 3H-6'''), 4.75 (t, 6H,  $J_{H,H}=7.2$  Hz, 3CH<sub>2</sub>-Het), 4.55 (s, 2H, 3H-4), 3.58 (t, 6H,  $J_{H,H}=5.7$  Hz, 3H-4), 3.35 (t, 6H, 3CH<sub>2</sub>Ar), 2.79 (t, 6H, 3CH<sub>2</sub>N) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 164.6 (3CO), 145.6, 143.5 (3C-3''', 3C-4'''), 142.3 (3C-Het), 137.8 (3C-1'''), 134.8 (3Ar-C), 134.7 (3Ar-C), 130.6 (3Ar-C), 129.8 (3Ar-C), 129.7 (3Ar-C), 129.6 (3Ar-C), 129.5 (3Ar-C), 128.0 (3C-6'''), 124.8, 124.5 (3C-2''', 3C-5'''), 124.2 (3CH-Het), 69.3 (3CH<sub>2</sub>O), 64.9 (3O-CH<sub>2</sub>-Het), 55.6 (3CH<sub>2</sub>N), 51.4 (3CH<sub>2</sub>-Het), 36.5 (3CH<sub>2</sub>Ar) ppm.

LSIMS 1447 ([M+Na]<sup>+</sup>, 8%).

HRLIMS  $m/z$  calculado para  $C_{81}H_{72}N_{10}Na O_{15}$   $[M+Na]^+$ : 1447.5076, encontrado 1447.5072.

**9.4.4.8. Tris-1'-{[2''-(3''',4''')-dixililenoifeniletil]-1'H-1',2',3'-triazol-4'-il]-3-oxabutil}amina (49)**



A una disolución de **262** (14 mg, 0.04 mmol) en una mezcla 2:1 de acetona–H<sub>2</sub>O (3 mL) se añade 4-(2-azidoetil)-1,2-(*o*-xilileno)dióxido de benceno (40 mg, 0.14 mmol), CuSO<sub>4</sub> (1 mg, 0.007 mmol) y L-ascorbato sódico (4 mg, 0.02 mmol) y la mezcla resultante se agita a t.a. y en la oscuridad durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt–MeOH 1:1) para obtener **49** como un sirupo anaranjado.

Rendimiento: 42 mg, 99%.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$ : 7.71 (s, 3H, 3CH-Het), 7.30-7.21 (m, 12H, 12Ar-H), 6.86 (d, 3H,  $J_{5'',6'''}=8.3$  Hz, 3H-5'''), 6.79 (d, 3H,  $J_{2'',6'''}=2.1$  Hz, 3H-2'''), 6.69 (dd, 3H, 3H-6'''), 5.39 (s, 6H, 3ArCH<sub>2</sub>O), 5.38 (s, 6H, 3ArCH<sub>2</sub>O), 4.53 (t, 6H,  $J_{H,H}=7.2$  Hz, 3CH<sub>2</sub>-Het), 4.51 (s, 6H, 3H-4), 3.50 (t, 6H,  $J_{H,H}=5.7$  Hz, 3C-2), 3.04 (t, 6H, 3CH<sub>2</sub>Ar), 2.70 (t, 6H, 3CH<sub>2</sub>N) ppm.

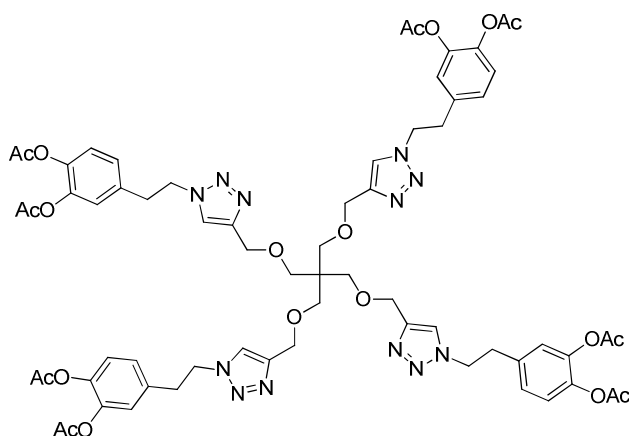
<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$ : 150.3, 149.1 (3C-3''', 3C-4'''), 145.4 (3C-Het), 137.0 (3Ar-C), 136.7 (3Ar-C), 134.2 (3C-1'''), 130.2 (3Ar-C),

129.9 (3Ar-C), 129.4 (3Ar-C), 129.3 (3Ar-C), 124.7 (3C-6'''), 124.0 (3CH-Het), 122.9 (3C-5'''), 122.8 (3C-2'''), 75.5 (3CH<sub>2</sub>OAr), 75.2 (3CH<sub>2</sub>OAr), 69.4 (3C-2), 64.8 (3C-4), 55.6 (3CH<sub>2</sub>N), 51.6 (3CH<sub>2</sub>-Het), 36.3 (3CH<sub>2</sub>Ar) ppm.

LSIMS 1129 ([M+Na]<sup>+</sup>, 73 %).

HRLIMS *m/z* calculado para C<sub>61</sub>H<sub>66</sub>N<sub>10</sub>NaO<sub>9</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1129.4912, encontrado 1129.4874.

#### 9.4.4.9. Tetrakis-1'--{[2''-(3''',4''')-Diacetoxifeniletil]-1'*H*-1',2',3'-triazol-4'-il]metoximetil}metano (50)



A una disolución de **264** (10 mg, 0.04 mmol) en una mezcla 2:1 de acetona-H<sub>2</sub>O (3 mL) se añade la azida **42** (74 mg, 0.280 mmol), sulfato de cobre(II) (1 mg, 0.007 mmol) y L-ascorbato sódico (4 mg, 0.02 mmol) y la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt–MeOH 1:1) para dar **50**.

Rendimiento: 50 mg, 99% *R<sub>F</sub>* 0.83 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH 5:1).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 7.87 (s, 4H, 4CH-Het), 7.12-7.10 (m, 12H, 4H-2''', 4H-5''', 4H-6'''), 4.66 (t, 8H, *J*<sub>1'',2''</sub>=7.2 Hz, 4C-1''), 4.57 (s, 8H,



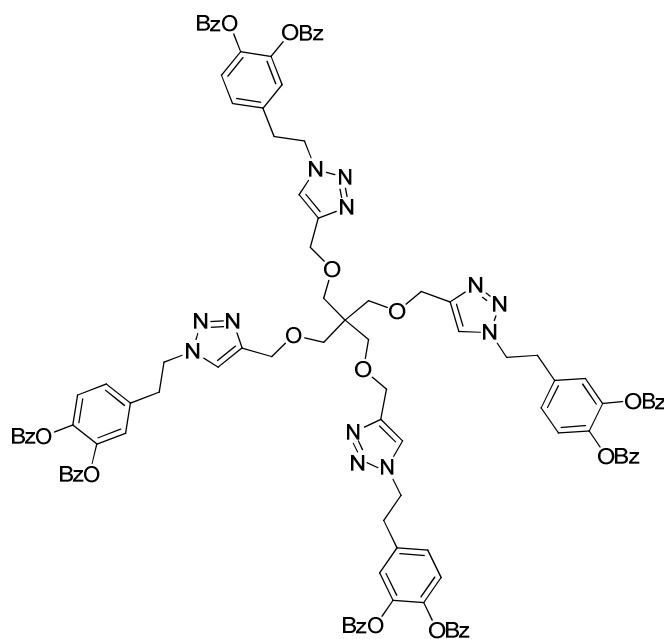
4O-CH<sub>2</sub>-Het), 3.42 (s, 8H, 4C-CH<sub>2</sub>-O), 3.24 (t, 8H, 4C-2''), 2.24 (s, 12H, 4OAc) 2.23 (s, 12H, 4OAc) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 168.7 (8CO), 145.3, 143.3 (4C-3''', 4C-4'''), 142.2 (4C-Het), 137.3 (4C-1'''), 127.6, 124.7, 124.4 (4C-2''', 4C-5''', 4C-6'''), 124.2 (4CH-Het), 68.9 (4C-CH<sub>2</sub>-O), 64.7 (4O-CH<sub>2</sub>-Het), 55.2 (C-CH<sub>2</sub>-O), 51.4 (4C-1''), 36.3 (4C-2''), 20.5 (8COCH<sub>3</sub>) ppm.

LSIMS 1063 ([M+Na]<sup>+</sup>, 7 %).

HRLIMS *m/z* calculado para C<sub>65</sub>H<sub>72</sub>N<sub>12</sub>NaO<sub>20</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1363.4889. encontrado 1363.4884.

#### 9.4.4.10. Tetrakis-1'-{[2''-(3''',4'''-Dibenzoiloxifeniletil)-1'*H*-1',2',3'-triazol-4'-il]metoximetil}metano (51)



A una disolución de **264** (19 mg, 0.064 mmol) en una mezcla 2:1 de acetona-H<sub>2</sub>O (3 mL) se añade la azida **43** (199 mg, 0.52 mmol), sulfato de cobre (II) (2 mg, 0.007 mmol) y L-ascorbato sódico (8 mg, 0.04 mmol); la mezcla resultante se agita a t.a. y en la oscuridad durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se

concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt–MeOH 1:1) para dar **51** como un sirupo anaranjado.

Rendimiento: 106 mg, 90%;  $R_F$  0.33 (AcOEt)

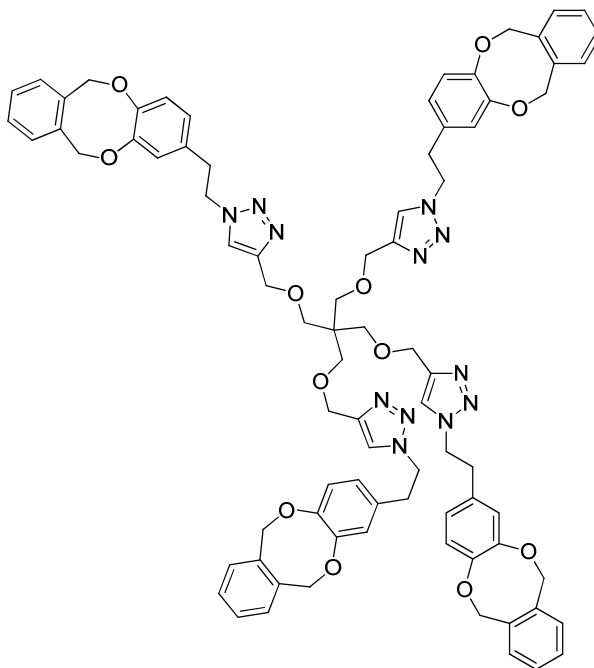
$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ : 8.02-7.98 (m, 16H, 16Ar-H), 7.91 (s, 4H, 4CH-Het), 7.63-7.57 (m, 8H, 8Ar-H) 7.46-7.39 (m, 20H, 16Ar-H, 4H-2'''), 7.37 (d, 4H,  $J_{5''',6'''}=8.2$  Hz, 4H-5'''), 7.22 (dd, 4H,  $J_{2''',6'''}=2.1$  Hz, 4H-6'''), 4.70 (t, 8H,  $J_{1'',2''}=7.2$  Hz, 4C-1''), 4.50 (s, 8H, 4O-CH<sub>2</sub>-Het), 3.43 (s, 8H, 4C-CH<sub>2</sub>-O), 3.31 (t, 8H, 4C-2'') ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75.5 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ : 164.6 (8CO), 145.7 y 143.5 (4C-3''', 4C-4'''), 142.4 (4C-Het), 137.8 (4C-1'''), 134.7 (x2) (8Ar-C), 130.7 (x4) (16Ar-C), 129.6 (x4) (16Ar-C), 128.0 (4C-6'''), 124.9 (4C-2'''), 124.5 (4C-5'''), 124.0 (4CH-Het), 69.6 (4C-CH<sub>2</sub>-O), 65.6 (4O-CH<sub>2</sub>-Het), 51.4 (4C-1''), 46.1 (4C-CH<sub>2</sub>-O), 36.5 (4C-2'') ppm.

LSIMS 1075 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 40 %).

HRLIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{51}\text{H}_{60}\text{NaO}_{15}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 1075.4121, encontrado 1075.4137.

**9.4.4.11. Tetrakis-1'-[2''-(3''',4'''-Dixilifeniletil)-1'H-1',2',3'-triazol-4'-il]metoximetil}metano (52)**



A una disolución de **264** (10 mg, 0.04 mmol) en una mezcla 2:1 de acetona-H<sub>2</sub>O (3 mL) se añade 4-(2-azidoetil)-1,2-(*o*-xililenodioxo)benceno (60 mg, 0.21 mmol), sulfato de cobre (II) (1 mg, 0.007 mmol) y L-ascorbato sódico (4 mg, 0.02 mmol) y la mezcla resultante se agita a t.a. y en la oscuridad durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se concentra a sequedad y el producto se purifica mediante cromatografía en columna (hexano→AcOEt–MeOH 1:1) para dar **52** como un sirupo anaranjado.

Rendimiento: 43 mg, 84%;  $R_F$  0.20 (AcOEt).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$ : 7.70 (s, 4H, 4CH-Het), 7.30-7.21 (m, 16H, 16Ar-H), 6.85 (d, 4H,  $J_{5''',6'''}=8.2$  Hz, 4H-5'''), 6.82 (d, 4H,  $J_{2''',6'''}=2.0$  Hz, 4H-2'''), 6.69 (dd, 4H, 4H-6'''), 5.39 (s, 8H, 4CH<sub>2</sub>OAr), 5.38 (s, 8H, 4CH<sub>2</sub>OAr), 4.53 (t, 8H,  $J_{1'',2''}=7.2$  Hz, 4C-1''), 4.47 (s, 8H, 4O-CH<sub>2</sub>-Het), 3.40 (s, 8H, 4C-CH<sub>2</sub>-O), 3.04 (t, 8H, 4C-2'') ppm.

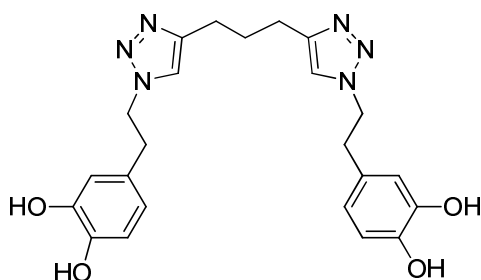
<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$ : 150.4, 149.1 (4C-3''', 4C-4'''), 145.5 (4C-Het), 137.0, 136.8 (x4) (8Ar-C), 130.2, 129.9, 129.4, 129.3(x4) (16Ar-C), 124.7 (4C-6'''), 123.9 (4CH-Het), 122.9 (4C-5'''), 122.8 (4C-2''), 75.5

(4CH<sub>2</sub>OAr), 75.2 (4CH<sub>2</sub>OAr), 69.5 4(C-CH<sub>2</sub>-O), 65.5 (4O-CH<sub>2</sub>-Het), 51.6 (4C-1''), 46.1 (4C-CH<sub>2</sub>-O), 36.3 (4C-2'') ppm.

LSIMS 1436 ([M+Na]<sup>+</sup>, 5 %).

HRLIMS *m/z* calculado para C<sub>81</sub>H<sub>80</sub>N<sub>10</sub>NaO<sub>15</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1435.5916, encontrado 1435.5861.

**9.4.4.12. 1,3-Bis{1'-[2''-(3''',4''')-dihidroxifenil)etil]-1'*H*-1',2',3'-triazol-4'-il}propano (53)**



**Método A:** Una disolución de **46** (100 mg, 0.12 mmol) en una mezcla 1:1 de HCl(1M)-MeOH (15 mL) se calienta a reflujo bajo atmósfera inerte de nitrógeno durante 72 h. A continuación se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>→CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 5:1), obteniéndose **53** como un sólido blanco.

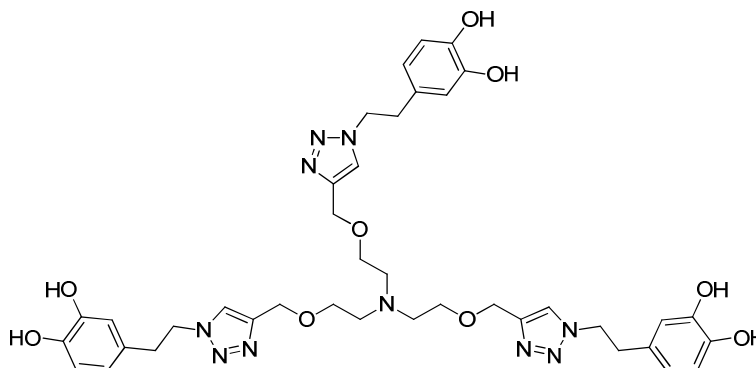
Rendimiento: 47 mg, 91%; *R<sub>F</sub>* 0.62 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 5:1); p.f.: 135-137 °C.

**Método B:** A una disolución de **46** (100 mg, 0.12 mmol) en una mezcla 1:4 de MeOH-H<sub>2</sub>O (10 mL) se añade NH<sub>4</sub>OAc (71 mg, 0.92 mmol); la mezcla resultante se calienta a reflujo bajo atmósfera inerte de nitrógeno durante 72 h. Transcurrido ese tiempo, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna de sílica fina (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>→CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 5:1), obteniéndose **53** como un sólido blanco.

Rendimiento: 45 mg, 87 %.

FT-IR	$\nu_{\max}$ 1602, 1520, 1446, 1363, 1280, 1261, 1207, 1114, 1067, 1040, 1023, 869, 806, 783, 715, 634, 607 $\text{cm}^{-1}$
$^1\text{H}$ -RMN	(300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ : 7.26 (s, 2H, H-5'), 6.64 (d, 2H, $J_{5'',6''}=8.0$ Hz, 2H-5'''), 6.52 (d, 2H, $J_{2'',6''}=2.0$ Hz, 2H-2'''), 6.41 (dd, 2H, 2H-6'''), 4.52 (t, 4H, $J_{1'',2''}=6.9$ Hz, 2H-1''), 3.02 (t, 4H, 2H-2''), 2.56 (t, 4H, $J_{\text{H,H}}=7.2$ Hz, H-1, H-3), 1.94 (q, 2H, H-2) ppm.
$^{13}\text{C}$ -RMN	(75.5 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ : 147.7 (Ar-C), 146.4 (Ar-C), 145.2 (Ar-C), 130.3 (Ar-C), 124.0 (Ar-C), 121.1 (C-5'), 116.9 (Ar-C), 116.5 (Ar-C), 52.9 (C-1''), 37.0 (C-2''), 29.8 (C-1, C-3), 24.9 (C-2) ppm.
LSIMS	473 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 21%).
HRLSIMS	$m/z$ calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 473.1913, encontrado 473.1919.

**9.4.4.13. Tris-1'-{[2''-(3''',4''')-Dioxifeniletíl]-1'H-1',2',3'-triazol-4'-il]-3-oxabutil}amina (54)**



A una disolución del compuesto **49** (53 mg, 0.05 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 1:1 (5 mL) se añade AcOH (2 gotas) y Pd/C (cat.) y la mezcla resultante se hidrogena a presión atmosférica y t.a. durante 12 h. A continuación se filtra sobre celita la mezcla de reacción, se lava con MeOH y  $\text{H}_2\text{O}$  y el filtrado se concentra a sequedad, obteniéndose **54** como un sirupo amarillento.

Rendimiento: 19 mg, 50%.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.66 (s, 3H, 3CH-Het), 6.64 (d, 3H,  $J_{5'',6''}=7.7$  Hz, 3H-5''), 6.46 (d, 3H,  $J_{2'',6''}=1.8$  Hz, 3H-2''), 6.43 (dd, 3H, 3H-6''), 4.57 (t, 6H,  $J_{\text{H,H}}=6.7$  Hz, 3 $\text{CH}_2$ -Het), 4.55 (s, 6H, 3H-4), 3.67 (t, 6H,  $J_{\text{H,H}}=4.1$  Hz, 3H-2), 3.03 (t, 6H, 3 $\text{CH}_2$ Ar), 2.77 (m, 6H, 3 $\text{CH}_2$ N) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 145.2, 144.6 (3C-3''), 3C-4''), 130.1 (3C-1''), 125.6 (3CH-Het), 121.1 (3C-6''), 121.0 (3C-5''), 117.0 (3C-2''), 116.5 (3C-5''), 72.8, 64.7 (3C-2), 64.6 (3C-4), 58.3 (3 $\text{CH}_2$ -Het), 52.9 (3 $\text{CH}_2$ N), 36.7 (3 $\text{CH}_2$ -Ar) ppm.

LSIMS 823 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 8%).

HRLIMS  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{39}\text{H}_{48}\text{N}_{10}\text{NaO}_9$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 823.3503, encontrado 823.3494.