



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

Derivados semisintéticos y análogos de compuestos naturales como agentes multifuncionales para la terapia de Alzheimer

Brunella Biscussi

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2020

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 22 de septiembre del 2015 y el 21 de abril del 2020, bajo la dirección de la Dra. Ana Paula Murray.

Brunella Biscussi



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación
Continua

La presente tesis ha sido aprobada el / / , mereciendo la calificación de(.....)

Agradecimientos

A la UNS, la ANPCyT y CONICET por el aporte financiero para el desarrollo de este trabajo de tesis.

A mi directora, la Dra. Ana Paula Murray por abrirme las puertas de su laboratorio, por la paciencia, el conocimiento, por sus consejos y la confianza de todos estos años.

Por sus trabajos en colaboración, a Silvia Antollini del INIBIBB, a Javier Baier del INBIOSUR y a Victoria Richmond de la UBA por los estudios de modelado molecular y principalmente, por su ayuda y buena predisposición siempre. También un agradecimiento especial para mi compañera Alejandra Sequeira por su ayuda y por todo su conocimiento brindado para llevar adelante el trabajo sobre los derivados de azobenceno.

Al profesor Marco A. Ceschi, de la UFRGS, por recibirme tan amablemente en su equipo de trabajo, permitiéndome seis valiosos meses de trabajo, aprendizaje y disfrute.

A todo el grupo de investigación de productos naturales, por su cariño y amistad, por todo el aprendizaje.

A mis compañeros y compañeras de los laboratorios de química orgánica por su buena predisposición, su linda energía y por todos los buenos momentos compartidos.

A mis amigos y amigas, los que coseche durante este doctorado y los de siempre, por su cariño y compañía en todo momento.

A mis padres, que me dieron la valiosa oportunidad de estudiar la carrera que elegí, tanto a mí como a mis hermanos, por su amor y por su ejemplo de esfuerzo, valoración y dedicación.

A mi novio, mis hermanos, mis tías y a toda mi familia.

Resumen

Este trabajo de tesis se basó en el diseño y síntesis de compuestos bioactivos, a partir de estructuras inspiradas en productos naturales, con el propósito de contribuir al descubrimiento de nuevos inhibidores de colinesterasas de carácter multifuncional, con potencial aplicación para la terapia de la enfermedad de Alzheimer.

En primer lugar, en el capítulo III de esta tesis se llevó a cabo la optimización mediante calentamiento con equipo de microondas, de la síntesis de derivados de azaestilbeno mediante la incorporación de un espaciador y una amina terciaria a una estructura análoga al azaresveratrol, de conocida actividad biológica. Se obtuvieron 19 compuestos, todos resultaron inhibidores de acetilcolinesterasa (ACE) y butirilcolinesterasa (BuCE). El derivado con un anillo de piperidina unido al azaestilbeno por un espaciador de siete carbonos (**12b**) fue el inhibidor más potente para ACE. Asimismo mostró inhibición significativa de ACE en células de neuroblastoma humanas SH-SY5Y, sin efecto citotóxico. A su vez, el estudio cinético enzimático mostró una inhibición no competitiva y el modelado molecular reveló interacciones con el sitio activo catalítico así como también con el sitio aniónico periférico de ACE. El estudio de dinámica molecular de los derivados con piperidina y *linker* de seis (**11b**), siete (**12b**) y ocho carbonos (**13b**) mostró que la conformación que adopta **12b** permite interacciones más efectivas que los otros análogos, justificando así su mayor potencia de inhibición observada experimentalmente. Por otro lado, el derivado con pirrolidina y un espaciador de siete carbonos (**12a**) fue el inhibidor más potente para BuCE.

Continuando con la misma estrategia de diseño, en el capítulo IV se obtuvieron 14 análogos de azobenceno mediante la síntesis asistida por microondas comprendida en dos etapas, en un tiempo total no superior a 40 minutos. Todos los compuestos resultaron potentes inhibidores de ACE. El derivado de azobenceno disustituído con dos *linkers* de cinco carbonos unidos a un anillo de piperidina, **21b**, fue el inhibidor más potente. Mediante exposición con luz UV, se logró la fotoisomerización *E*→*Z* de los derivados **18b** y **20b** evaluada por espectroscopia UV-Vis y RMN de ¹H. Ambos, mostraron una mayor potencia de inhibición enzimática en su configuración *Z* comparada con la *E*. De esta manera, el mejor resultado de IC₅₀ de toda la serie (*E* y *Z*) se obtuvo para el isómero *Z* del compuesto **20b**.

En el capítulo V, mediante síntesis asistida por microondas se obtuvieron 6 nuevos compuestos híbridos de teofilina y pirrolidina, con una cadena hidrocarbonada de 3 a 8 carbonos. El derivado **27a** con un *linker* de siete carbonos fue el inhibidor más potente de la serie. Por otro lado, **25a**, que presenta un espaciador de cinco carbonos, activó el receptor

muscular de acetilcolina (nAChR) a concentraciones muy bajas (de 0,01 pM) y a la concentración más alta probada (30 μM) se observó una disminución en la duración media de apertura, lo que sugiere que este compuesto actúa como un agonista del receptor y también un bloqueador de canal abierto.

Por último, la síntesis *one pot* de nuevas bislofinas es abordada en el capítulo VI, la cual se optimizó mediante calentamiento por microondas logrando una importante disminución de los tiempo de reacción y evitando el uso del ácido de Lewis como catalizador. Tres de los seis compuestos sintetizados resultaron inhibidores selectivos de BuCE. Por otro lado, de la serie completa de los derivados de bislofina evaluados como inhibidores enzimáticos, el compuesto **IIIB** fue el inhibidor selectivo más potente de BuCE, a escala nanomolar. El estudio cinético enzimático de este mostró una inhibición no competitiva.

Abstract

This work was based on the design and synthesis of bioactive compounds, inspired by natural products structures, with the aim of contributing to the discovery of new multifunctional cholinesterase inhibitors, with potential application in the Alzheimer's disease therapy.

Initially, in chapter III this thesis describes the optimization of the synthesis of azaestilbene derivatives, by microwave-assisted reactions. A spacer and a tertiary amine were incorporated into a structure analogous to azaresveratrol, a compound of known biological activity. Nineteen new compounds were obtained, all of them were able to inhibit both acetyl- and butyrylcholinesterase. For acetylcholinesterase, the best inhibition was achieved with the derivative **12b** with a seven-carbon spacer connecting the amine with the azastilbene portion. In addition, compound **12b** elicited significant inhibition of acetylcholinesterase activity in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, with no cytotoxicity. In turn, the enzymatic kinetic study showed non-competitive inhibition and the molecular modeling revealed interactions with the catalytic active site as well as with the peripheral anionic site of the enzyme. The molecular dynamic study of the derivatives with piperidine and linker of six (**11b**), seven (**12b**) and eight carbons (**13b**) was carried out. This study showed that the conformation that **12b** adopts allows more effective interactions than the other analogues. In this way, the greater inhibition efficiency observed experimentally for **12b**, is justified. On the other hand, the pyrrolidine derivative with a seven-carbon spacer (**12a**) was the most potent inhibitor for butyrylcholinesterase.

Continuing with the same design strategy, in Chapter IV, fourteen new azobenzene analogs were obtained by microwave-assisted synthesis. This synthesis was based on two steps, with a total reaction time no longer than 40 minutes. All the derivatives were potent acetylcholinesterase inhibitors. The azobenzene derivative disubstituted with two five-carbon linkers attached to a piperidine ring, **21b**, was the most potent inhibitor. Upon UV-light irradiation, isomerization from the *E*-form to the *Z*-form of derivatives **18b** and **20b** was achieved. The *E-Z* isomerization was corroborated by UV-Vis spectroscopy and ¹H NMR spectra. Both compounds showed a higher potency of enzyme inhibition in their *Z* configuration compared to *E*. Thus, the best IC₅₀ value of the entire series (*E* and *Z*) corresponds to the *Z* isomer of compound **20b**.

Chapter V details the microwave-assisted synthesis of five new hybrid compounds of theophylline and pyrrolidine, with a hydrocarbon chain of three to seven carbons. Derivative

27a with a seven-carbon linker was the most powerful inhibitor in the series. On the other hand, **25a**, which has a five-carbon spacer, activated muscle nAChR at an extremely low concentrations (from 0.01 pM). At the highest tested concentration (30 μ M) a decrease in the mean open duration was observed, which suggest that **25a** also acts as an open channel blocker.

Finally, the one-pot synthesis of new bislofinas is addressed in chapter VI. This synthesis was optimized by microwave heating, getting a significant reduction in reaction time and avoiding the use of Lewis acid as a catalyst. Three of the six synthesized compounds were selective butyrylcholinesterase inhibitors. On the other hand, compound **IIIB** was the most potent selective butyrylcholinesterase inhibitor in the whole series evaluated, with an IC_{50} value in the nanomolar scale. Its enzymatic kinetic study showed non-competitive inhibition.

Abreviaturas

Aβ	Péptido beta-amiloide
AC	Acetilcolina
ACE	Acetilcolinesterasa
AcOEt	Acetato de etilo
ATCI	Ioduro de acetiltiocolina
BACE-1	β -secretasa
BHE	Barrera hematoencefálica / <i>Blood brain barrier</i>
BC	Butirilcolina
BTCI	Ioduro de butirilcolina
BuCE	Butirilcolinesterasa
CAS	Sitio activo catalítico / <i>Catalytic Active Site</i>
CC	Cromatografía en columna
δ_c	Desplazamiento químico de ^{13}C
δ_H	Desplazamiento químico de ^1H
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DTNB	Ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzoico
EA	Enfermedad de Alzheimer
EIMS	<i>Electron Ionization Mass Spectroscopy</i>
EtOH	Etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HR-ESI-MS	<i>High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>

HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
iACE	Inhibidores de acetilcolinesterasa
iCE	Inhibidores de colinesterasas
IC₅₀	Concentración que inhibe al 50% la actividad enzimática máxima
IR	Espectroscopia infrarroja
MW	Microondas / <i>Microwave</i>
NFTs	Ovillos neurofibrilares / <i>Neurofibrillary tangles</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
os	Señal superpuesta
PAS	Sitio Aniónico Periférico / <i>Perypherical Anionic Site</i>
pf	Punto de fusión
PN	Producto natural
PPA	Proteína precursora amiloide
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SAR	<i>Structure-Activity Relationship</i>
SNC	Sistema nervioso central
TcACE	Acetilcolinesterasa de <i>Torpedo californica</i>
TLC	Cromatografía en capa fina / <i>Thin-layer chromatography</i>
UV	Espectroscopía ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visible

ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN.....	1
I.1	ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	1
I.1.1	<i>Factores de riesgo para la enfermedad de Alzheimer.....</i>	<i>1</i>
I.1.2	<i>Patología de la enfermedad de Alzheimer.....</i>	<i>3</i>
I.1.3	<i>Hipótesis colinérgica.....</i>	<i>8</i>
I.1.4	<i>Colinesterasas y su relación con la Enfermedad de Alzheimer.....</i>	<i>9</i>
I.1.5	<i>Medicamentos actuales para la Enfermedad de Alzheimer.....</i>	<i>13</i>
I.1.6	<i>Penetración de fármacos en el SNC. Barrera hematoencefálica.....</i>	<i>16</i>
I.2	DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE COLINESTERASA.....	17
I.3	ROL DE LA SEMISÍNTESIS A PARTIR DE PRODUCTOS NATURALES BIOACTIVOS.....	20
I.4	COMPUESTOS DEL TIPO HÍBRIDOS CON DIFERENTES GRUPOS FARMACÓFOROS.....	22
I.5	SÍNTESIS ASISTIDA POR MICROONDAS.....	25
I.5.1	<i>Principios del calentamiento por microondas.....</i>	<i>26</i>
I.5.2	<i>Propiedades dieléctricas.....</i>	<i>28</i>
I.5.3	<i>Beneficios de la síntesis de microondas.....</i>	<i>30</i>
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
II	OBJETIVOS.....	39
III	ANÁLOGOS DE AZAESTILBENO.....	41
III.1	OBTENCIÓN DE ANÁLOGOS DE AZAESTILBENO COMO INHIBIDORES DE ACE Y BUCE.....	41
III.1.1	<i>Descripción general y objetivos.....</i>	<i>41</i>
III.1.2	<i>Optimización de la síntesis mediante el uso de microondas.....</i>	<i>44</i>
III.1.2.1	Optimización de la obtención de los intermediarios alquilbromados 2-4.....	44
III.1.2.2	Optimización de la obtención de los intermediarios 2a-c – 4a-c.....	45
III.1.2.3	Optimización de la obtención de los derivados 8a-c – 10a-c.....	46
III.1.3	<i>Intermediarios alquilbromados 2 - 7.....</i>	<i>46</i>
III.1.4	<i>Derivados con pirrolidina (2a - 7a).....</i>	<i>49</i>
III.1.5	<i>Derivados con piperidina (2b – 7b).....</i>	<i>51</i>
III.1.6	<i>Derivados con dietilamina (2c – 7c).....</i>	<i>53</i>
III.1.7	<i>Derivados azaestilbeno (8a-c – 13a-c) y evaluación de la actividad biológica.....</i>	<i>56</i>
III.1.7.1	Derivados azaestilbeno con pirrolidina (8a – 13a).....	57
III.1.7.2	Derivados azaestilbeno con piperidina (8b – 13b).....	59
III.1.7.3	Derivados azaestilbeno con dietilamina (8c – 13c).....	61
III.1.7.4	Estudio de inhibición in vitro de ACE y BuCE de los derivados 8a-c – 13a-c.....	63
III.1.7.5	Predicción de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.....	64
III.1.8	<i>Derivado 12b.....</i>	<i>65</i>
III.1.8.1	Caracterización cinética de inhibición de ACE.....	65

III.1.8.2	Estudio de modelado molecular.....	67
III.1.9	<i>Derivado 14'b</i>	69
III.1.9.1	Estudio de inhibición in vitro de ACE y BuCE del derivado 14'b	69
III.1.10	<i>Estudio de Modelado Molecular de 11b, 12b, y 13b</i>	70
III.1.11	<i>Inhibición de ACE en células de neuroblastoma humanas SH-SY5Y</i>	73
III.2	CONCLUSIONES	75
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
IV	ANÁLOGOS DE AZOBENCENO	79
IV.1	OBTENCIÓN DE ANÁLOGOS DE AZOBENCENO COMO INHIBIDORES FOTOMODULABLES DE ACE	79
IV.1.1	<i>Descripción general y objetivos</i>	79
IV.1.2	<i>Derivados sintéticos 15 - 22 y evaluación de la actividad biológica</i>	83
IV.1.2.1	Derivados a partir de 4-fenilazofenol.....	84
IV.1.2.2	Derivados a partir de 4,4'-dihidroxiazobenceno	91
IV.1.2.3	Estudio de inhibición in vitro sobre ACE de los derivados 15 – 22	98
IV.1.2.4	Predicción de la barrera hematoencefálica	99
IV.1.2.5	Capacidad de fotomodulación de los derivados de azobenceno	100
IV.1.2.6	Estudio de inhibición in vitro sobre ACE de 16b (Z) – 20b (Z) y 17c (Z)	108
IV.2	CONCLUSIONES	111
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
V	ANÁLOGOS DE CAFÉINA	115
V.1	SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE CAFÉINA Y SU EVALUACIÓN COMO INHIBIDORES DE ACE Y POTENCIADORES DEL RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA	115
V.1.1	<i>Descripción general y objetivos</i>	115
V.1.2	<i>Derivados semisintéticos 23 - 27 y evaluación de la actividad biológica</i>	116
V.1.2.1	Intermediarios alquilbromados 23 - 27.....	117
V.1.2.2	Derivados con pirrolidina 23a - 27a	119
V.1.2.3	Estudio de inhibición in vitro de ACE de los derivados 23a - 27a	122
V.1.2.4	Predicción de la barrera hematoencefálica	123
V.1.3	<i>Estudio de la modulación del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) de los derivados 23a - 27a</i>	123
V.2	CONCLUSIONES	127
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
VI	BIS(N)-LOFINAS SUSTITUIDAS	130
VI.1	SÍNTESIS DE DÍMEROS BIS(N)-LOFINAS SUSTITUIDOS	130
VI.1.1	<i>Descripción general y objetivos</i>	130
VI.1.2	<i>Propuesta de mecanismo de formación de imidazoles tetrasustituídos</i>	131
VI.1.3	<i>Optimización de la síntesis de dímeros bis(n)-lofinas sustituidos</i>	133

VI.1.4	<i>Síntesis del dímero 28a</i>	136
VI.1.5	<i>Síntesis del dímero 28b</i>	140
VI.1.6	<i>Síntesis del dímero 28c</i>	144
VI.1.7	<i>Síntesis del dímero 29a</i>	148
VI.1.8	<i>Síntesis del dímero 29b</i>	150
VI.1.9	<i>Síntesis del dímero 29c</i>	152
VI.1.10	<i>Estudio de inhibición in vitro de ACE y BuCE de los derivados 28a-c y 29a-c.</i>	154
VI.1.11	<i>Derivado IIIB</i>	157
VI.1.11.1	Caracterización cinética de inhibición de BuCE del compuesto IIIB	157
VI.2	CONCLUSIONES	159
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160
VII	EXPERIMENTAL	162
VII.1	GENERAL	162
VII.1.1	<i>Materiales</i>	162
VII.1.2	<i>Equipos</i>	162
VII.2	OBTENCIÓN DE LOS ANÁLOGOS DE AZA RESVERATROL 8A-C – 13A-C.....	164
VII.2.1	<i>Procedimiento general para la síntesis de los intermediarios 2-7</i>	164
VII.2.1.1	4-(3-bromopropoxi)benzaldehído (2)	165
VII.2.1.2	4-(4-bromobutoxi)benzaldehído (3)	165
VII.2.1.3	4-(5-bromopentiloxi)benzaldehído (4)	165
VII.2.1.4	4-(6-bromohexiloxi)benzaldehído (5)	165
VII.2.1.5	4-(7-bromoheptiloxi)benzaldehído (6)	165
VII.2.1.6	4-(8-bromooctiloxi)benzaldehído (7).....	165
VII.2.2	<i>Procedimiento general para la síntesis de los intermediarios de p-(ω-aminoalcoxi)-benzaldehídos 2a-c - 7a-c</i>	166
VII.2.2.1	4-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)benzaldehido (2a)	166
VII.2.2.2	4-(4-(pirrolidin-1-il)butoxi)benzaldehido (3a)	166
VII.2.2.3	4-(5-(pirrolidin-1-il)pentiloxi)benzaldehido (4a)	166
VII.2.2.4	4-(6-(pirrolidin-1-il)hexiloxi)benzaldehido (5a)	166
VII.2.2.5	4-(7-(pirrolidin-1-il)heptiloxi)benzaldehido (6a)	167
VII.2.2.6	4-(8-(pirrolidin-1-il)octiloxi)benzaldehido (7a).....	167
VII.2.2.7	4-(3-(piperidin-1-il)propoxi)benzaldehido (2b)	167
VII.2.2.8	4-(4-(piperidin-1-il)butoxi)benzaldehido (3b).....	167
VII.2.2.9	4-(5-(piperidin-1-il)pentiloxi)benzaldehido (4b).....	167
VII.2.2.10	4-(6-(piperidin-1-il)hexiloxi)benzaldehido (5b)	168
VII.2.2.11	4-(7-(piperidin-1-il)heptiloxi)benzaldehido (6b).....	168
VII.2.2.12	4-(8-(piperidin-1-il)octiloxi)benzaldehido (7b)	168
VII.2.2.13	4-(3-(dietilamino)propoxi)benzaldehido (2c)	168
VII.2.2.14	4-(4-(dietilamino)butoxi)benzaldehido (3c)	168
VII.2.2.15	4-(5-(dietilamino)pentiloxi)benzaldehido (4c)	168

VII.2.2.16	4-(6-(dietilamino)hexiloxi)benzaldehido (5c)	169
VII.2.2.17	4-(7-(dietilamino)heptiloxi)benzaldehido (6c)	169
VII.2.2.18	4-(7-(dietilamino)heptiloxi)benzaldehido (7c)	169
VII.2.3	<i>Procedimiento general para la síntesis de los derivados azaestilbeno 8a-c – 13a-c</i>	
	169	
VII.2.3.1	(E)-4-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)azaestilbeno (8a)	170
VII.2.3.2	(E)-4-(4-(pirrolidin-1-il)butoxi)azaestilbeno (9a)	170
VII.2.3.3	(E)-4-(5-(pirrolidin-1-il)pentiloxi)azaestilbeno (10a)	170
VII.2.3.4	(E)-4-(6-(pirrolidin-1-il)hexiloxi)azaestilbeno (11a)	170
VII.2.3.5	(E)-4-(7-(pirrolidin-1-il)heptiloxi)azaestilbeno (12a)	170
VII.2.3.6	(E)-4-(8-(pirrolidin-1-il)octiloxi)azaestilbeno (13a).....	171
VII.2.3.7	(E)-4-(3-(piperidin-1-il)propoxi)azaestilbeno (8b)	171
VII.2.3.8	(E)-4-(4-(piperidin-1-il)butoxi)azaestilbeno (9b)	171
VII.2.3.9	(E)-4-(5-(piperidin-1-il)pentoxi)azaestilbeno (10b)	171
VII.2.3.10	(E)-4-(6-(piperidin-1-il)hexyloxi)azaestilbeno (11b)	172
VII.2.3.11	(E)-4-(7-(piperidin-1-il)heptyloxi)azaestilbeno (12b)	172
VII.2.3.12	(E)-4-(8-(piperidin-1-il)octyloxi)azaestilbeno (13b).....	172
VII.2.3.13	(E)-4-(3-(dietilamino)propoxi)azaestilbeno (8c).....	172
VII.2.3.14	(E)-4-(4-(dietilamino)butoxi)azaestilbeno (9c)	172
VII.2.3.15	(E)-4-(5-(dietilamino)pentoxi)azaestilbeno (10c)	173
VII.2.3.16	(E)-4-(6-(dietilamino)hexiloxi)azaestilbeno (11c).....	173
VII.2.3.17	(E)-4-(7-(dietilamino)heptiloxi)azaestilbeno (12c)	173
VII.2.3.18	(E)-4-(8-(dietilamino)octiloxi)azaestilbeno (13c).....	173
VII.3	PROCEDIMIENTO PARA LA SÍNTESIS DEL DERIVADO 14 ¹ B	174
VII.3.1	<i>Procedimiento para obtener el intermediario 6¹</i>	174
VII.3.2	<i>Procedimiento para obtener el intermediario 6¹b</i>	174
VII.3.3	<i>Procedimiento para obtener el intermediario 14¹b</i>	175
VII.4	OBTENCIÓN DE LOS DERIVADOS 15 - 22.....	175
VII.4.1	<i>Procedimiento general para la síntesis de los derivados de azobenceno</i>	
	<i>alquilbromados 15-22</i>	175
VII.4.1.1	Intermediarios alquilbromados 15-18	175
VII.4.1.2	Intermediarios alquilbromados 19-22	176
VII.4.2	<i>Procedimiento general para la síntesis de los derivados 15b – 18b, 17a, 17c.</i>	177
VII.4.2.1	(E)-1-(4-(4-(fenildiazenil)fenoxi)butil)piperidina (15b).....	177
VII.4.2.2	(E)-1-(6-(4-(fenildiazenil)fenoxi)hexil)piperidina (16b)	178
VII.4.2.3	(E)-1-(7-(4-(fenildiazenil)fenoxi)heptil)piperidina (17b)	178
VII.4.2.4	(E)-1-(8-(4-(fenildiazenil)fenoxi)octil)piperidina (18b)	178
VII.4.2.5	(E)-1-(7-(4-(fenildiazenil)fenoxi)heptil)pirrolidina (17a)	178
VII.4.2.6	(E)-1-(7-(4-(fenildiazenil)fenoxi)heptil)piperidina (17c)	179
VII.4.3	<i>Procedimiento general para la síntesis de los derivados 19a-b – 22a-b.</i>	179
VII.4.3.1	(E)-1,2-bis(4-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)fenil)diazeno (19a).....	179

VII.4.3.2	(E)-1,2-bis(4-(4-(pirrolidin-1-il)butoxi)fenil)diazeno (20a)	179
VII.4.3.3	(E)-1,2-bis(4-((5-(pirrolidin-1-il)pentil)oxi)fenil)diazeno (21a)	180
VII.4.3.4	(E)-1,2-bis(4-((6-(pirrolidin-1-il)hexil)oxi)fenil)diazeno (22a)	180
VII.4.3.5	(E)-1,2-bis(4-(3-(piperidin-1-il)propoxi)fenil)diazeno (19b)	180
VII.4.3.6	(E)-1,2-bis(4-(4-(piperidin-1-il)butoxi)fenil)diazeno (20b)	180
VII.4.3.7	(E)-1,2-bis(4-((5-(piperidin-1-il)pentil)oxi)fenil)diazeno (21b)	181
VII.4.3.8	(E)-1,2-bis(4-((6-(piperidin-1-il)hexil)oxi)fenil)diazeno (22b)	181
VII.5	OBTENCIÓN DE LOS DERIVADOS 23-27	181
VII.5.1	<i>Procedimiento general para la síntesis de los derivados de teofilina alquilbromados</i>	
23-27	181	
VII.5.1.1	7-(3-bromopropil)-1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (23)	182
VII.5.1.2	7-(4-bromobutil)-1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (24)	182
VII.5.1.3	7-(5-bromopentil)-1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (25)	182
VII.5.1.4	7-(6-bromoheíl)-1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (26)	182
VII.5.1.5	7-(7-bromoheptil)-1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (27)	182
VII.5.2	<i>Procedimiento general para la síntesis de los derivados de teofilina 23a-27a</i>	182
VII.5.2.1	1,3-dimetil-7-(3-(pirrolidin-1-il)propil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (23a)	183
VII.5.2.2	1,3-dimetil-7-(4-(pirrolidin-1-il)butil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (24a)	183
VII.5.2.3	1,3-dimetil-7-(5-(pirrolidin-1-il)pentil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (25a)	183
VII.5.2.4	1,3-dimetil-7-(6-(pirrolidin-1-il)hexil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (26a)	183
VII.5.2.5	1,3-dimetil-7-(7-(pirrolidin-1-il)heptil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (27a)	184
VII.6	OBTENCIÓN DE LOS DÍMEROS DE BIS(N)-LOFINA SUSTITUÍDOS 28A-C – 29A-C	184
VII.6.1	<i>Procedimiento general para la síntesis de los dímeros de bis(n)-lofina sustituidos</i>	
(28a-c – 29a-c)	184	
VII.6.1.1	1,8-bis(4,5-difenil-2-(piridin-4-il)-1H-imidazol-1-il)octano (28a)	184
VII.6.1.2	1,8-bis(4,5-difenil-2-(piridin-3-il)-1H-imidazol-1-il)octano (28b)	185
VII.6.1.3	1,8-bis(4,5-difenil-2-(piridin-2-il)-1H-imidazol-1-il)octano (28c)	185
VII.6.1.4	1,7-bis(4,5-difenil-2-(piridin-4-il)-1H-imidazol-1-il)heptano (29a)	185
VII.6.1.5	1,7-bis(4,5-difenil-2-(piridin-3-il)-1H-imidazol-1-il)heptano (29b)	186
VII.6.1.6	1,7-bis(4,5-difenil-2-(piridin-2-il)-1H-imidazol-1-il)heptano (29c)	186
VII.7	DETERMINACIONES DEL MODELADO MOLECULAR	186
VII.8	ACTIVIDADES BIOLÓGICAS	187
VII.8.1	<i>Ensayo cuantitativo de inhibición de colinesterasas</i>	187
	<i>Ensayo de inhibición enzimática del isómero Z</i>	188
VII.8.2	<i>Estudio cinético de inhibición de ACE y BuCE</i>	188
VII.8.3	<i>Actividad inhibitoria de ACE en células vivas</i>	188
VII.8.3.1	SH-SY5Y human neuroblastoma cells	188
VII.8.3.2	Determinación de la actividad de ACE	189
VII.8.3.3	Ensayo de citotoxicidad y medición de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH)	
	189	
VII.8.3.4	Análisis estadístico	190

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acumulación de proteínas patógenas en la EA (fuente https://blogdeunbioquimico.wordpress.com/2013/05/26/y-tu-quien-eres/).....	3
Figura 2. Corte proteolítico de APP [10].....	4
Figura 3. Cascada amiloide. Formación de placas amiloides (fuente https://infotiti.com/2018/08/beta-amiloide-alzheimer/).....	5
Figura 4. Desintegración de microtúbulos en EA, rol de la proteína tau (fuente https://infotiti.com/2016/07/proteina-vinculada-al-alzheimer/).	6
Figura 5. Representación esquemática de la acción de un quelante en la hendidura sináptica [17].....	7
Figura 6. Sinapsis neuronal. Hipótesis colinérgica. ACh, acetilcolina; AChE, acetilcolinesterasa; Acetil-CoA, acetil coenzima A [8].	8
Figura 7. Esquema de los sitios de unión en la cavidad de ACE de Torpedo californica. Imagen adaptada [22]	10
Figura 8. Mecanismo de hidrólisis de AC mediado por ACE.	11
Figura 9. a) estructura cristalina de TcACE: vista de las tres puertas secundarias. F330 y Y121 en el cuello de botella, y W84 en el Ω loop cerca de la "puerta trasera". La tríada catalítica (H440-E327-S200) se muestra como esferas. b) 14 residuos aromáticos en el sitio activo de TcACE y dos sitios de unión a ligando: CAS y PAS.	12
Figura 10. La flecha roja indica el sentido en el que se mueven los sustratos (AC y agua) y los productos (colina y acetato) en la enzima cuando la puerta trasera se encuentra A) cerrada o B) abierta. [25]	12
Figura 11. Fármacos aprobados para el tratamiento de la EA [32].	14
Figura 12. Estructuras de iCE en desarrollo: phenserine y tolserine	16
Figura 13. Método de Ellman para iCE	18
Figura 14. Curva absorbancia vs tiempo en presencia y ausencia de un inhibidor.....	19
Figura 15. Estructuras moleculares de iCEs derivados de la naturaleza: huperzina A y B, y cardanol.	22
Figura 16. Número de publicaciones sobre compuestos multitarget durante el período 1996-2015 [47].....	23
Figura 17. iCE híbridos. Estructura molecular de donepecilo-AP2238, donepecilo-tacrina, T6AF, tacrina-hidroxiquinolina y ladostigil.	24
Figura 18. Estrategia de diseño para compuestos híbridos	25
Figura 19. Espectro electromagnético	26

Figura 20. Ilustración esquemática de los dos principales mecanismos de calentamiento dieléctrico: polarización dipolar. Fuente https://wiki.anton-paar.com/ch-de/mikrowellenunterstuetzte-synthese/	28
Figura 21. Interacción de diferentes materiales con microondas: conductores eléctricos (metales), materiales absorbentes (solventes) y materiales de aislamiento (teflón, vidrio, cuarzo). Fuente: https://wiki.anton-paar.com/ch-de/mikrowellenunterstuetzte-synthese/	28
Figura 22. A) Descripción gráfica de la instrucción de calor a una mezcla de reacción por calentamiento convencional (izquierda) y por microondas (derecha) [57]. B) Diferencia de gradientes de temperatura después de 1 minuto de irradiación por microondas (izquierda) y por calentamiento convencional (derecha)[50].	30
Figura 23. Estructura química <i>del trans</i> -resveratrol y el <i>cis</i> -resveratrol.	41
Figura 24. Estructuras químicas del resveratrol, azaresveratrol y de un análogo hidroxilado de azaestilbeno.	42
Figura 25. Diseño de derivados de azaestilbeno como agentes multifuncionales para la terapia de la EA.	43
Figura 26. Espectro de ¹ H-RMN (300 MHz –CDCl ₃) del compuesto 12b – sección aromáticos...56	56
Figura 27. Estructuras químicas de (A) resvetratrol, (B) 4,4'-dihidroxi-azaestilbeno y (C) 4,4'-dihidroxi-azobenceno.	63
Figura 28. Efectos de la longitud de la cadena alquílica de los derivados 8a-c – 13a-c) sobre las actividades anti CE.	63
Figura 29. Gráfica de Lineweaver-Burk para la inhibición de ACE del compuesto 12b	66
Figura 30. Marcadas en verde y rojo se encuentran dos de las entradas a la enzima y en amarillo, los túneles que encontró el programa.	68
Figura 31. Otra perspectiva de la proteína para visualizar mejor los túneles que conectan con el exterior a través del PAS.	68
Figura 32. Conformación adoptada del compuesto 12b en la enzima.	71
Figura 33. Conformación adoptada del compuesto 11b en la enzima.	72
Figura 34. Actividad de ACE en células SH-SY5Y tratadas con 12a , 12b , 14'b o 13c . La actividad de ACE en células SH-SY5Y tratadas durante 1 h con vehículo (control) o 12a (0,56 μM), 12b (0,43 μM), 14'b (0,53 μM) o 13c (0,62 μM). La actividad de ACE se determinó de acuerdo con las referencias [16], [22], [23] en células vivas. Las actividades enzimáticas se expresan como % de control (actividad ACE) ± SEM (error estándar de la media) de al menos 7 experimentos independientes. ANOVA unidireccional seguido de test de Turkey; (*), (***) y (****) denotan valores de p <0.05, <0.001 y <0.0001, respectivamente.	73

Figura 35. Efecto citotóxico de 12a , 12b , 14'b y 13c en células SH-SY5Y. Viabilidad celular de las células SH-SY5Y tratadas por 24 h con vehículo (control) o 12a (5,6 μM), 12b (4,3 μM), 14'b (5,3 μM) y 13c (6,2 μM), es decir, 10x IC_{50} . La viabilidad celular se representó respecto a 100% de liberación de LDH (barra con líneas diagonales). Los datos se expresan como las medias \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. (***) denota valores $p < 0,0001$ respecto del 100% de liberación de LDH (barra con líneas diagonales).....	74
Figura 36. Fotoisomerización del azobenceno [6].....	80
Figura 37. Ejemplo representativo del espectro de UV de azobenceno: línea azul, isómero trans; línea rosa, isómero cis.....	81
Figura 38. Gráfica de IC_{50} de los derivados 19-22 en función del número de carbonos del <i>linker</i>	99
Figura 39. A) Espectro de Absorción UV-Vis de 16b (45 μM) antes y después de la irradiación con luz UV (360 nm, 8 watts, 5 min) en metanol. El equilibrio fotoestacionario alcanzado después de la iluminación UV muestra una variación del porcentaje de E:Z (19:81). B) Reversión en oscuridad (unidad de tiempo en horas): reversión total Z-E a las 24 h.....	101
Figura 40. A) Espectro de Absorción UV-Vis de 18b (45 μM) antes y después de la irradiación con luz UV (360 nm, 8 watts, 5 min) en metanol. El equilibrio fotoestacionario alcanzado después de la iluminación UV muestra una variación del porcentaje de E:Z (16:84). B) Reversión en oscuridad (unidad de tiempo en horas): reversión total Z-E a las 24 h.....	101
Figura 41. Espectros de absorción UV-Vis antes y después de la irradiación con luz UV (360 nm, 8 watts, 5 min) en metanol. A) El equilibrio fotoestacionario de 19b (45 μM) alcanzado después de la iluminación UV muestra una variación del porcentaje de E:Z (11:89). B) Reversión en oscuridad total Z-E a las 17 horas. C) Para 20b (43 μM) la variación del porcentaje de E:Z fue (9:91). D) La reversión total Z-E en oscuridad fue a las 24 h.	102
Figura 42. Tubo de RMN con solución de 18b en cloroformo deuterado A) Antes de exponer a luz ultravioleta, color amarillo claro. B) Luego de exposición con luz UV durante 30 minutos (360 nm, 8 watts), color amarillo fuerte. C) Luego de exposición con luz UV durante 90 minutos (360 nm, 8 watts), color naranja.	104
Figura 43. Zona aromática del espectro RMN de ^1H de 18b . A) Antes de irradiar con luz UV (t_0), asignación de 18b (E). B) Después de irradiar con luz UV (360 nm, 8 watts, 30 minutos), se observa la presencia del 50% del isómero Z. C) Luego de irradiar con luz UV 90 minutos, asignación de 18b (Z), 90%.....	105
Figura 44. RMN de ^1H de 18b . A) Antes de irradiar con luz UV, asignando 18b (E). B) Luego de irradiar 30' con luz UV, aparecen las señales del isómero Z. C) Luego de irradiar con luz UV 90 minutos, se observan las señales de 18b (Z) en un 90%.....	106

Figura 45. Zona aromática del espectro RMN de ^1H de 20b. A) Antes de irradiar con luz UV (t_0), asignando 20b (E). B) Después de irradiar con luz UV (360 nm, 8 watts, 5 minutos), mostrando la presencia de 10% del isómero Z. C) Luego de irradiar con luz UV 90 minutos, asignando a 20b (Z).....	107
Figura 47. Gráfica de IC_{50} de los isómero E y Z de los derivados 16b-20b . Se refleja mediante barras que el isómero Z de aquellos compuestos con linkers impares incrementó su potencia de inhibición de ACE en comparación al isómero E.....	110
Figura 48. Estructuras químicas de las metilxantinas.....	115
Figura 49. Inhibidores de ACE y agonista del nAChR (nicotina), estructuras base para el diseño de nuevos análogos de cafeína como inhibidores de ACE y moduladores del nAChR.....	116
Figura 50. Espectro de RMN de ^1H y asignación de señales del compuesto 27a	120
Figura 51. Estructura general de los derivados de cafeína.....	122
Figura 52. Estructura general del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).	123
Figura 53. Esquema básico de activación y desensibilización de los pLGICs.	124
Figura 54. Estructura del imidazol y su derivado, lofina.....	130
Figura 55. Izquierda: Híbrido de tacrina-lofina, potente inhibidor de ACE y BuCE. Derecha: bis(8)-lofina, potente inhibidor selectivo de ACE.	131
Figura 56. Síntesis de bis(n)-lofinas.....	131
Figura 57. Equipo de microondas <i>Digester MARS 6</i>	133
Figura 58. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto 28a – región de los aromáticos.	137
Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto 28a – región de los alifáticos.....	137
Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 28a – región de los aromáticos. Hacia arriba, las señales singulete (carbonos cuaternarios). Hacia abajo, las señales doblete (-CH).....	138
Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 28a – región de los alifáticos. Hacia arriba, señales triplete (- CH_2).	138
Figura 62. Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C -HSQC (CDCl_3) del compuesto 28a – A) región de los alifáticos; B) región de los aromáticos.....	139
Figura 63. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto 28b – región de los alifáticos.....	141
Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto 28b – región de los aromáticos.	141

Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 28b – región de los aromáticos. Hacia arriba, las señales singulete (carbonos cuaternarios). Hacia abajo, las señales doblete (-CH).....	142
Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 28b – región de los alifáticos. Hacia arriba, señales triplete (- CH_2).	142
Figura 67. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HSQC (CDCl_3) del compuesto 28b – a) región de los alifáticos; b) región de los aromáticos.....	143
Figura 68. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto 28c – región de los alifáticos.	145
Figura 69. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto 28c – región de los aromáticos.	145
Figura 70. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 28c – región de los aromáticos.	146
Figura 71. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) del Compuesto 28c – región de los alifáticos.	146
Figura 72. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HSQC (CDCl_3) del compuesto 28c – A) región dos alifáticos; B) región de los aromáticos.....	147
Figura 73. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 29a	149
Figura 74. Espectro de RMN de ^{13}C (APT) del compuesto 28a . Hacia arriba, las señales singulete y triplete (- CH_2). Hacia abajo, las señales doblete (-CH).	149
Figura 75. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 29b	151
Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C (APT) del compuesto 29b . Hacia arriba, las señales singulete y triplete (- CH_2). Hacia abajo, las señales doblete (-CH).	151
Figura 77. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 29c	153
Figura 78. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 29c	153
Figura 79. Gráfica de Lineweaver-Burk para la inhibición de BuCE del compuesto IIIB	158

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntesis de los derivados 8a-c – 13a-c. a) $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{Br}$, K_2CO_3 , acetonitrilo, MW; b) HNR_1R_2 , K_2CO_3 , DMF, MW; c) anilina, etanol, MW.	44
Esquema 2. Preparación de intermediarios 2-7.	47
Esquema 3. Obtención de derivados 2a-7a.	50
Esquema 4. Obtención de derivados 2b-7b.	52
Esquema 5. Obtención de derivados 2c-7c.	54
Esquema 6. Obtención de análogos de azaresveratrol.	56
Esquema 7. Síntesis del derivado 14'b	69
Esquema 8. Propuestas mecanísticas de la isomerización de azobencenos.	82
Esquema 9. Diseño de nuevos inhibidores de ACE a partir de la azologación de los derivados de azaestilbeno.	83
Esquema 10. Síntesis de los derivados 15-22 a) $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{Br}$, K_2CO_3 , DMF, MW; b) NHR_1R_2 , DMF, MW.	84
Esquema 11. Preparación de intermediarios 15-18.....	85
Esquema 12. Obtención de derivados 15b-18b.	88
Esquema 13. Obtención del derivado 17a	90
Esquema 14. Obtención del derivado 17c	91
Esquema 15. Preparación de intermediarios 19-22	92
Esquema 16. Obtención de los derivados 19a-22a.	94
Esquema 17. Obtención de los derivados 19b-22b.	96
Esquema 18. Fotoisomerización mediante exposición con luz UV (360 nm, 8 watts, 10 min) en metanol. A) Derivados 16b – 18b y 17c. B) Derivados 19b y 20b.	109
Esquema 19. Síntesis de derivados 23a-27a. (a) K_2CO_3 anh, DMF anh, MW; (b) DMF anh, MW.	116
Esquema 20. Preparación de intermediarios 23-27.	117
Esquema 21. Obtención de los derivados 23a-27a.	119
Esquema 22. Propuesta de mecanismo para la síntesis de imidazoles tetrasustituídos.....	132
Esquema 23. Síntesis asistida por microondas del dímero 28a.	134
Esquema 24. Esquema general de reacción para la obtención de los dímeros 28a-c y 29a-c.	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características farmacológicas de los principales iCE para el tratamiento de la EA [8], [19], [31].....	14
Tabla 2. Características farmacológicas de los principales iCE naturales para el tratamiento de la EA [8]......	21
Tabla 3. Características farmacológicas de los principales iCE híbridos para el tratamiento de la EA [8]......	23
Tabla 4. Comparación de tipos de radiación y energías de enlace [52].	27
Tabla 5. Solventes orgánicos clasificados según su eficiencia de calentamiento ($\tan \delta$) en MW (2,45 GHz, 20 °C) [50].	29
Tabla 6. Optimización de la reacción a (Esquema 1) por método de microondas.	45
Tabla 7. Optimización de la reacción b (Esquema 1) por método de microondas.	45
Tabla 8. Optimización de la reacción c (Esquema 1) por método de microondas.....	46
Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 2-7 . En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).	48
Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 2-7 . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad).	49
Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 2a-7a . En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).	50
Tabla 12. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 2a-7a . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad).	51
Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 2b-7b . En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).	52
Tabla 14. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 2b-7b . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad).	53
Tabla 15. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 2c-7c . En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).	54
Tabla 16. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 2c-7c . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad).	55
Tabla 17. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 8a-13a . En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).	57
Tabla 18. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 8a-13a . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad).	58

Tabla 19. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 8b-13b . En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).	59
Tabla 20. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 8b-13b . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad).	60
Tabla 21. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 8c-13c . En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm, (multiplicidad, J en Hz).	61
Tabla 22. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 2c-7c . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad)	62
Tabla 23. Actividad inhibitoria de ACE y BuCE de los derivados 8-13	64
Tabla 24. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 15-18 . En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).	86
Tabla 25. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 15-18 . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad).	87
Tabla 26. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de los derivados 15b-18b . En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).	88
Tabla 27. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 15b-18b . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad).	89
Tabla 28. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C del derivado 17b . En CDCl_3 , δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).	90
Tabla 29. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C del derivado 17c . En CDCl_3 , δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).	91
Tabla 30. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 19-22 . En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).	93
Tabla 31 Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 19-22 . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad).	93
Tabla 32. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 19a-22a . En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).	94
Tabla 33. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 19a-22a . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad).	95
Tabla 34. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 19b-22b . En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).	96
Tabla 35. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 19b-22b . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad).	96
Tabla 36. Actividad inhibitoria sobre ACE de los derivados 15-22	98

Tabla 37. Comparación de los $\lambda_{\text{máx.}}$ de las transiciones $\pi-\pi^*$ y $n-\pi^*$ antes y después de la fotoisomerización indicando el porcentaje de fotoconversión en cada caso.	103
Tabla 38. Actividad inhibitoria sobre ACE de los isómeros <i>E</i> y <i>Z</i> de los derivados 16b-20b y 17c	109
Tabla 39. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 23-27 . En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm; <i>J</i> en Hz.	118
Tabla 40. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 23-27 . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm.	119
Tabla 41. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 23a-27a . En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm; <i>J</i> en Hz.	120
Tabla 42. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 21a-25a . En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm.	121
Tabla 43. Actividad inhibitoria de ACE de los derivados 23a-27a	122
Tabla 44. Reacción de condensación tetracomponente para la obtención del dímero 28a en diferentes condiciones de reacción.	134
Tabla 45. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 28a . En CDCl_3 a 400 MHz.	136
Tabla 46. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 28a . En CDCl_3 a 100 MHz.	137
Tabla 47. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 28b . En CDCl_3 a 400 MHz.	140
Tabla 48. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 28b . En CDCl_3 a 100 MHz.	141
Tabla 49. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 28c . En CDCl_3 a 400 MHz.	144
Tabla 50. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 28c . En CDCl_3 a 75 MHz.	145
Tabla 51. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 29a . En CDCl_3 a 400 MHz.	148
Tabla 52. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 29a . En CDCl_3 a 75 MHz.	149
Tabla 53. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 29b . En CDCl_3 a 400 MHz.	150
Tabla 54. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 29b . En CDCl_3 a 100 MHz.	151
Tabla 55. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de 29c . En CDCl_3 a 400 MHz.	152
Tabla 56. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de 29c . En CDCl_3 a 75 MHz.	153
Tabla 57 . Actividad inhibitoria sobre ACE y BuCE de 28a-c y 19a-c	154
Tabla 58. Actividad inhibitoria de 28a-c – 29a-c y de los derivados posteriormente sintetizados por el grupo de investigación del Prof. Ceschi.	156

CAPÍTULO I

Introducción

I INTRODUCCIÓN

I.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo que afecta la memoria, el pensamiento, el razonamiento y el lenguaje, terminando por desarrollar cambios en la personalidad del paciente haciéndolo incapaz de cuidarse por sí mismo. La EA, que es la forma más común de demencia, acapara entre un 60% y un 70% de los casos en la población mundial (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>). El porcentaje de personas con Alzheimer aumenta dramáticamente con la edad: el 3% de las personas de 65 a 74 años, el 17% de 75 a 84 años y el 32% de 85 años o más padecen la EA [1].

El Alzheimer empeora con el tiempo, es una enfermedad progresiva, en la que los síntomas de demencia aumentan gradualmente con el paso de los años. En sus primeras etapas, la pérdida de memoria es leve, pero en la etapa final de la EA, las personas pierden la capacidad de mantener una conversación y responder al entorno. Las personas con EA viven un promedio de ocho años después de que los síntomas se vuelven evidentes, pero la supervivencia puede oscilar entre 4 y 20 años, dependiendo de la edad y otras afecciones de salud (<https://www.alz.org/alzheimer-demencia/que-es-la-enfermedad-de-alzheimer>).

Según ADI (*Alzheimer's Disease International*, la federación internacional de asociaciones de Alzheimer en todo el mundo) se estima que en el año 2019 hubo más de 50 millones de personas que vivieron con demencia en todo el mundo, una cifra que aumentará a 152 millones para 2050. Alguien desarrolla demencia cada tres segundos y el costo anual actual de la demencia se estima a US \$ 1 billón, una cifra que se duplicará para 2030 [2]. Este aumento desmedido en el número de pacientes es consecuencia directa de las mejoras en el servicio de salud, aumento de la esperanza de vida y edad promedio de la población mundial. La EA representa un problema social y financiero, no sólo para el paciente y su familia, sino también para la sociedad entera.

I.1.1 Factores de riesgo para la enfermedad de Alzheimer

El mayor factor de riesgo para la EA es la edad. La mayoría de las personas con Alzheimer tienen 65 años o más, aunque es importante tener en cuenta que la EA no es una fase normal del envejecimiento, ya que la edad por sí sola no es suficiente para causar la enfermedad. Otros factores de riesgo no modificables para la EA incluyen antecedentes

familiares y el genotipo de la apolipoproteína E4 (ApoE4). Por otro lado, otros factores que predisponen a la enfermedad son diabetes, hipertensión, obesidad, hipercolesterolemia, lesión cerebral traumática y un bajo nivel educativo. Existe evidencia suficiente de que una dieta saludable, el aprendizaje permanente y el entrenamiento cognitivo, están asociados con un menor riesgo de deterioro cognitivo [1].

La EA puede definirse en términos generales como de inicio temprano, que ocurre antes de los 65 años, o de inicio tardío (mucho más común, 96,5% de los casos), que ocurre después de los 65 años. Las mutaciones en los genes de las presenilinas (PSEN) y de la proteína precursora amiloide (APP) se asocian con la EA autosómica dominante de inicio temprano. Las presenilinas son una familia de proteínas transmembrana que constituyen la subunidad catalítica de la enzima γ -secretasa (enzima con actividad proteasa presente en la membrana celular). Se han descrito dos presenilinas, la presenilina 1 o PSEN1, cuyo gen se encuentra en el cromosoma 14 humano y la presenilina 2 o PSEN2, codificada en el cromosoma 1. Clínicamente, los portadores de estas mutaciones en PSEN1 y PSEN2 muestran un inicio de la enfermedad antes de los 65 años de edad. Neuropatológicamente, la EA de inicio temprano y EA de inicio tardío son indistinguibles. Desafortunadamente, la genética de la EA de inicio tardío es más compleja [3], [4].

En los últimos años, se ha hecho énfasis en la apolipoproteína E4 (ApoE4) como un factor de riesgo genético importante para la EA de inicio tardío. La apolipoproteína E (ApoE) es una proteína que transporta colesterol en el torrente sanguíneo. Los humanos expresan tres variantes genéticas de ApoE: ApoE2, ApoE3 y ApoE4, las cuales exhiben distintas propiedades de unión al receptor y afectan de manera diferente en la EA. Todos los humanos heredan una de las tres formas (alelos) del gen ApoE (e2, e3 o e4) de cada padre, lo que resulta en seis posibles pares ApoE: e2/e2, e2/e3, e2/e4, e3/e3, e3/e4 y e4/e4. La ApoE4 es la isoforma que aumenta el riesgo de desarrollar la EA, siendo que la presencia de un alelo del gen de ApoE4 triplica el riesgo de padecer la enfermedad, mientras que en los individuos que heredaron los dos alelos, el riesgo aumenta a un 90% [1], [5]. Por el contrario, ApoE2 actúa como protectora contra la EA y ApoE3 se considera neutral al riesgo ya que es la isoforma más común de las tres y, por lo tanto, la estándar para la población general. En el cerebro, las lipoproteínas que contienen ApoE son secretadas por astrocitos activados y microglia, pero las funciones y su papel en la patogénesis de EA son en gran parte desconocidas. Una amplia evidencia sugiere que ApoE4 induce una desregulación microglial e impide la eliminación del péptido beta amiloide (A β) favoreciendo así su acumulación y por lo tanto, la formación de placas amiloides características de la EA [5], [6]. Un estudio reciente llevado a cabo por Liao y colaboradores,

publicado en *Journal of Neuroscience*, demostró que la inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales contra ApoE redujo significativamente la deposición de placas amiloides y los síntomas de la EA en ratones [7].

I.1.2 Patología de la enfermedad de Alzheimer

Neuropatológicamente la EA está caracterizada por depósitos extracelulares del péptido A β llamados placas seniles o placas amiloides, depósitos intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada (conocidos como ovillos neurofibrilares o NFTs), pérdida neuronal y pérdida sináptica (Figura 1). En los últimos años, diversas investigaciones han descrito una serie de diferentes mecanismos patogénicos subyacentes a las causas de la EA que comprenden neuroinflamación, estrés oxidativo, la teoría del calcio, desregulación del metabolismo del hierro, reducción de la utilización de glucosa, señalización imperfecta de la insulina, homeostasis anormal del colesterol y disfunción mitocondrial [8]. Estas evidencias han llevado a los científicos a establecer hipótesis que se correlacionen con los hechos observados. Las de mayor importancia y aceptación son la **hipótesis de la cascada amiloide**, la **de la proteína tau** y la **hipótesis colinérgica**.

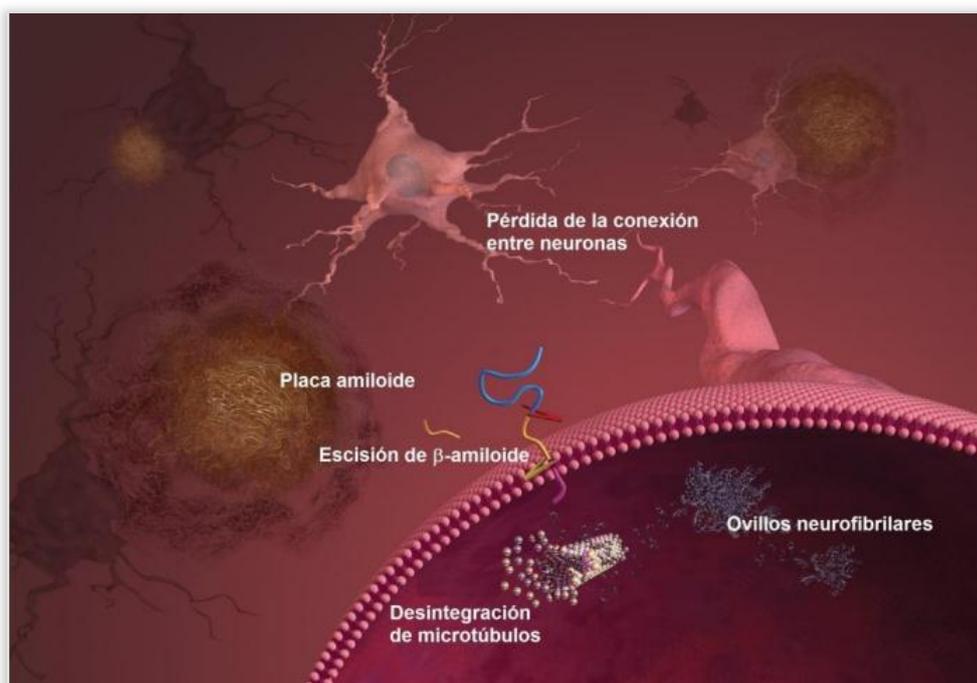


Figura 1. Acumulación de proteínas patógenas en la EA (fuente <https://blogdeunbioquimico.wordpress.com/2013/05/26/y-tu-quien-eres/>).

El carácter patogénico del péptido A β ha dado origen a la llamada **hipótesis amiloide**. Esta establece que la formación y deposición de pequeños péptidos de A β genera fibras amiloides largas e insolubles, que se acumulan como placas seniles en regiones críticas del cerebro, llevando al desarrollo y progreso de la EA, la cual eventualmente conduce a discapacidades crecientes y finalmente a la muerte. Los péptidos A β patogénicos, junto con otros péptidos no patogénicos, son originados por la actividad proteolítica de la APP, una proteína normal de las membranas celulares. La actividad de distintas secretasas (α , β o γ -secretasa) escinde la APP, produciendo diferentes péptidos dependiendo de dos rutas: la ruta α (o no-amiloidogénica) la cual deriva en la formación de APP soluble (sAPP α), y la ruta de la β -secretasa (o amiloidogénica), mediada por la acción secuencial de β -secretasa (BACE-1) y γ -secretasa, resultando en la formación de péptidos A β . La primera en llevar a cabo la función de endoproteasa en la APP es β -secretasa que libera un derivado largo que luego es secretado (sAPP β). Un fragmento de 99 aminoácidos (CTF β) queda anclado a la membrana, el cual es cortado inmediatamente por γ -secretasa generando el péptido A β . El corte producido por γ -secretasa es impreciso y ocasiona una heterogeneidad en el extremo C-terminal de los péptidos resultantes. Es por esta razón que existen distintos péptidos A β que difiere solo en su longitud (entre 39-43 aminoácidos). Las especies dominantes son A β 1-40, constituyendo 80-90% de los péptidos A β , y A β 1-42, el cual en condiciones normales constituye entre 5-10% (Figura 2). Ese pequeño alargamiento (Ile-Ala) del tramo de residuos hidrofóbicos en la región C-terminal en A β 1-42, aumenta drásticamente su tendencia de agregación, convirtiéndolo en un péptido altamente tóxico [9].

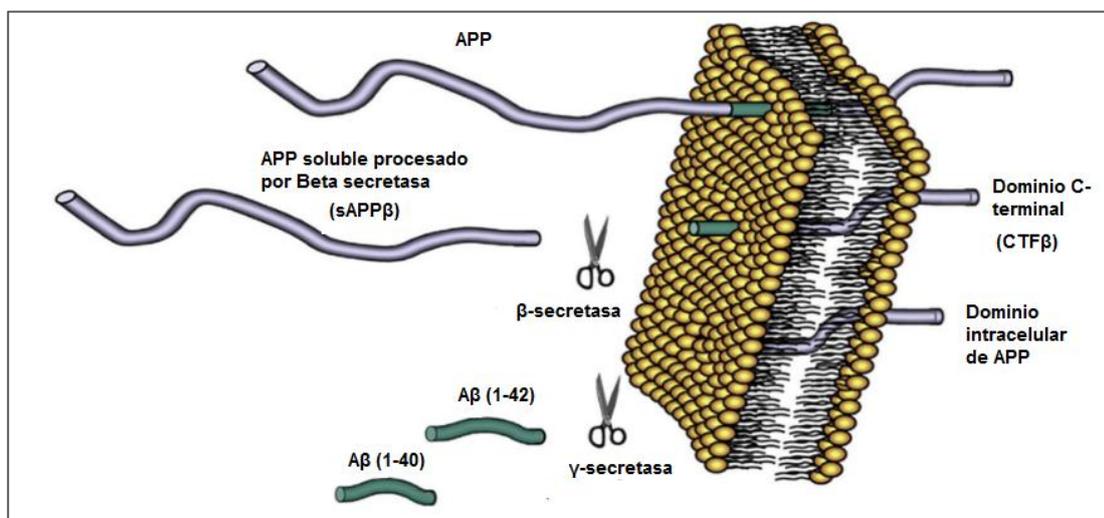


Figura 2. Corte proteolítico de APP [10].

Debido al papel esencial en la generación del péptido A β , las enzimas β - y γ -secretasas son consideradas como posibles blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos contra la EA. Diversos factores, genéticos y ambientales, hacen que la proporción de las especies de péptidos A β varíe, desencadenando la acumulación de oligómeros y polímeros A β 1-42 de mayor toxicidad y activando una cascada de enzimas responsables del estrés oxidativo y de la regulación de los niveles de Ca²⁺ en las células. Consecuentemente se produce la formación de radicales libres, respuesta inflamatoria, un aumento en la fosforilación de la proteína tau y depósito de NFTs, concluyendo finalmente con la muerte neuronal. La expresión y actividad de la enzima β -secretasa incrementa con el aumento de la edad, contribuyendo a una mayor incidencia de demencia en ancianos. (Figura 3) [4], [10], [11].

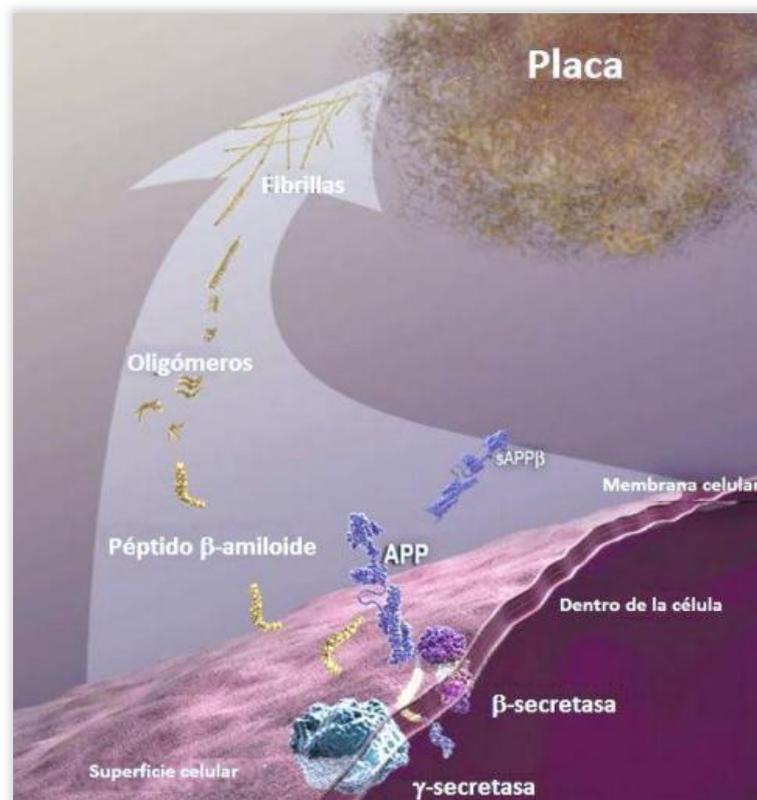


Figura 3. Cascada amiloide. Formación de placas amiloides (fuente <https://infotiti.com/2018/08/beta-amiloide-alzheimer/>).

Sin embargo, algunos investigadores sostienen que la hipótesis de la cascada amiloide no engloba todos los componentes cruciales de los procesos fisiopatológicos de la enfermedad. Un argumento común es que la patología de la placa y su diseminación no siempre se correlacionan con los hallazgos clínicos en la EA. Las placas amiloides cerebrales pueden existir en individuos sanos, sin deterioro cognitivo asociado. Hasta el 30% de los ancianos sanos en sus 70 años pueden tener placas amiloides sin disfunción cognitiva [12].

Estos hechos han dado origen a la **hipótesis de la proteína tau**. Los ovillos neurofibrilares (NFTs), el otro agregado de proteína distintivo en la EA, están compuestos de proteína tau hiperfosforilada. En condiciones normales, tau promueve la estabilización de los microtúbulos; Durante la EA, la fosforilación de la proteína tau se ve aumentada regulando negativamente su unión a los microtúbulos, afectando el transporte axonal e incrementando la capacidad de tau de autoensamblarse y formar agregados, conduciendo a su deposición como NFTs (Figura 4). La tau también es un requisito para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, pero las mutaciones en el gen tau causan demencia frontotemporal sin placas amiloides, es decir, la tau puede actuar independientemente de A β para causar neurodegeneración. Aunque en la hipótesis amiloide, se pensaba que las alteraciones patológicas de la tau eran eventos posteriores a la deposición de A β , llevando a la pérdida neuronal y a un mayor compromiso de la función neurotransmisora, es igualmente plausible que la tau y la A β actúen en vías paralelas causando la EA y aumentando los efectos tóxicos de cada uno [4], [13] .

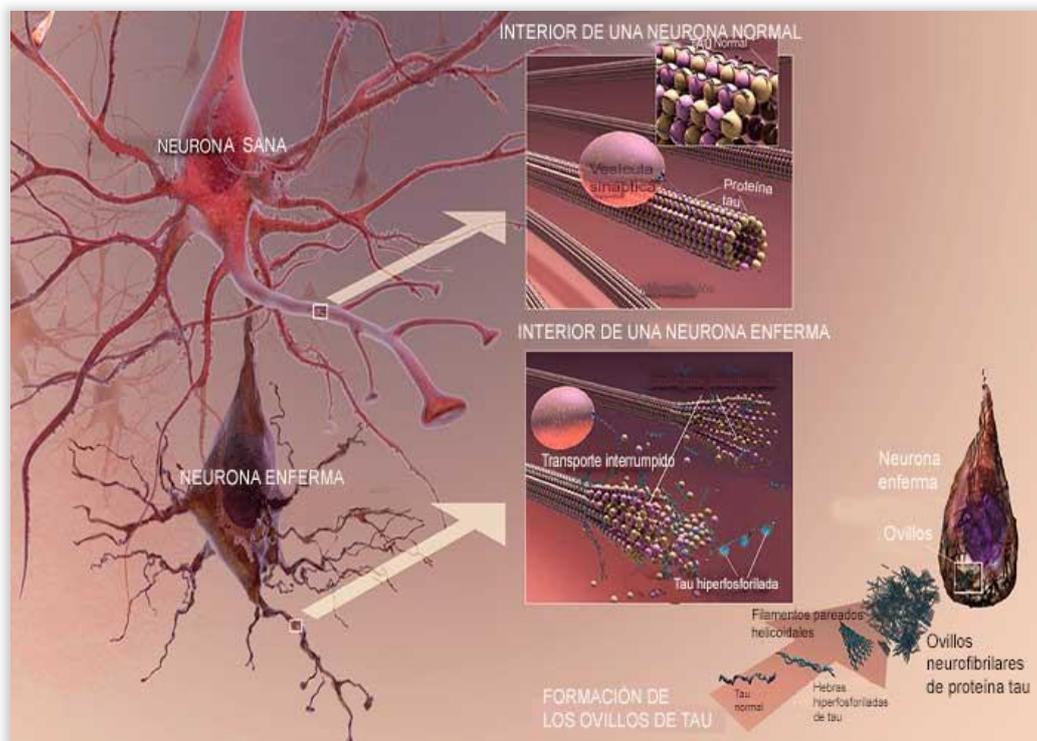


Figura 4. Desintegración de microtúbulos en EA, rol de la proteína tau (fuente <https://infotiti.com/2016/07/proteina-vinculada-al-alzheimer/>).

Otra de las hipótesis sobre la EA abordada principalmente en las últimas décadas es la **hipótesis de los metales** la cual propone que la desregulación de los metales como Cu, Zn y Fe podría estar relacionada con otras patologías de la EA, incluida la agregación de A β y la

hiperfosforilación de tau. Diversos estudios han comprobado que las placas amiloides presentan niveles anormalmente altos de estos tres metales en comparación con la concentración extracelular normal de los mismos [14]. Además, los complejos de Cu-amiloide se han relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), disfunción mitocondrial y muerte celular neuronal. Por otro lado, se ha demostrado que el zinc puede acelerar la agregación de la proteína tau mediante enlaces intermoleculares con residuos claves de cisteína. El Fe, al igual que el Cu, se ha asociado con la generación de radicales libres a través de la reacción de Fenton, lo que lleva a la formación de un radical hidroxilo altamente reactivo. Sumado a ello, se encontró que el Fe^{3+} también tiene la capacidad de unirse a tau hiperfosforilada e inducir su agregación *in vitro* [14]–[16]. Estos antecedentes han llevado en la actualidad a la investigación de una serie de estrategias terapéuticas para la EA con el objetivo de mejorar o inhibir la agregación de A β y la generación inducida de ROS mediante el uso de antioxidantes y quelantes de metales (Figura 5).

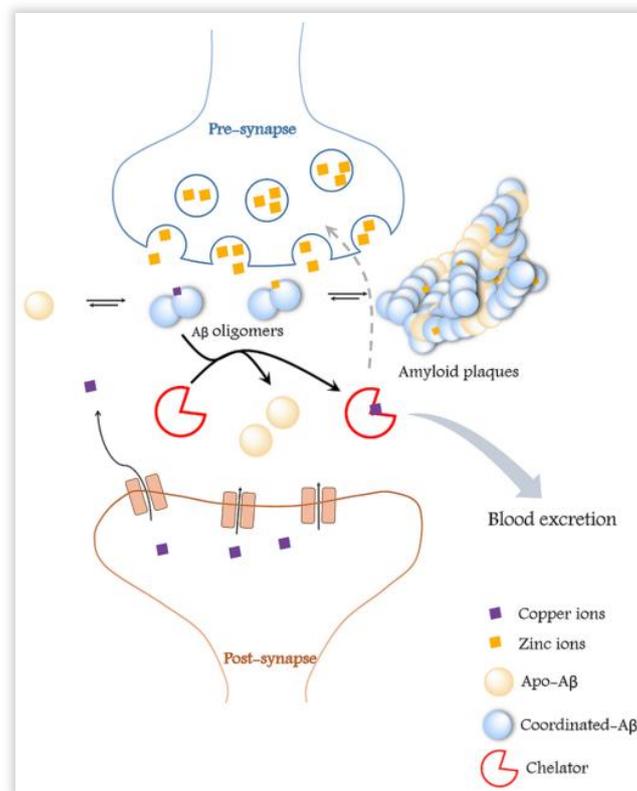


Figura 5. Representación esquemática de la acción de un quelante en la hendidura sináptica [17].

Entre los pocos quelantes probados hasta el momento, el clioquinol, un derivado de 8-hidroxiquinolina, fue el primero en llegar a ensayos clínicos de fase II demostrando su aplicabilidad como quelante de metales exógenos, aunque debido a sus efectos colaterales y a

su complicación en la producción a gran escala, se ha suspendido su investigación para su uso en la terapia de EA [18].

I.1.3 Hipótesis colinérgica.

La deficiencia neuroquímica más importante en la EA es el deterioro de la acetilcolina (AC). La base anatómica de los déficits colinérgicos es la atrofia y la degeneración de las neuronas colinérgicas subcorticales, especialmente aquellas en el lóbulo frontal basal que proporcionan inervación colinérgica de la corteza cerebral. La deficiencia selectiva de acetilcolina en la EA, así como la observación de que los antagonistas colinérgicos centrales como la atropina pueden inducir un estado confuso similar a la demencia de Alzheimer, han llevado a la aparición de la **hipótesis colinérgica** basada en que la deficiencia de AC es crítica en el inicio de los síntomas de AD [8].

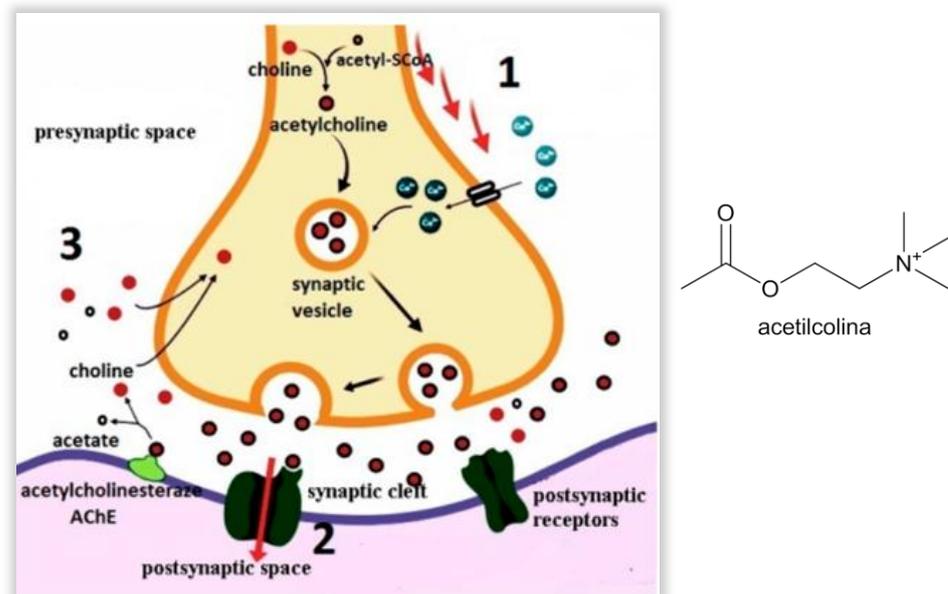


Figura 6. Sinapsis neuronal. Hipótesis colinérgica. ACh, acetilcolina; AChE, acetilcolinesterasa; Acetil-CoA, acetil coenzima A [8].

La acetilcolina, primer neurotransmisor identificado en el año 1914, es utilizado por las neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central (SNC) y periférico para mediar en la actividad sináptica del sistema nervioso. Es sintetizada a partir de colina y acetil CoA, derivados del metabolismo de la glucosa, a través de la enzima colinaacetiltransferasa. La AC es almacenada en vesículas, y estas vesículas se acoplan a la membrana de la neurona presináptica en respuesta al potencial de acción generado por la entrada de calcio, liberando

mediante el neurotransmisor al medio sináptico (Figura 6 (1)). La acetilcolina se une a los receptores nicotínicos y muscarínicos en la membrana postsináptica transmitiendo la señal del nervio (Figura 6 (2)). La enzima acetilcolinesterasa (ACE), ubicada también en la membrana postsináptica, cataliza la descomposición de la acetilcolina y las moléculas de colina son reabsorbidas por la neurona presináptica (Figura 6 (3)) [8], [19].

Se ha demostrado que ACE es el objetivo terapéutico más importante para la mejora sintomática de la EA, ya que su inhibición se consideró alcanzable como objetivo terapéutico. Hay dos tipos de colinesterasa, la **acetilcolinesterasa** (ACE, E.C.¹ 3.1.1.7) que se encuentra principalmente en la sangre y las sinapsis neuronales, y la **butirilcolinesterasa** (BuCE, EC 3.1.1.8) presente principalmente en el hígado. Ambas son serina hidrolasas que catalizan la reacción de hidrólisis de ésteres derivados de colina o similares. A diferencia de ACE, BuCE hidroliza la butirilcolina más rápido que ACE.

I.1.4 Colinesterasas y su relación con la Enfermedad de Alzheimer

La estructura en tres dimensiones de la enzima ACE ha sido determinada en base a la misma enzima extraída de la raya eléctrica *Torpedo californica* ya que su estructura es muy similar a la que está presente en mamíferos. Se ha determinado que ACE posee un bolsillo enzimático que posee 20 Å de profundidad y 5 Å de ancho y en el fondo del mismo se encuentra el sitio activo donde ocurre la hidrólisis de la AC. El bolsillo presenta 14 residuos aromáticos los cuales cumplen un rol importante en la difusión de la AC hacia el sitio activo mediante interacciones π -catión con la carga positiva del neurotransmisor [20].

En la entrada del bolsillo de la enzima se encuentra el sitio aniónico periférico (PAS), situado aproximadamente a 14 Å del sitio activo catalítico (CAS). En TcACE el PAS consiste en los residuos aromáticos: Asp72, Tyr70, Tyr121, Trp279 y Phe290 que dirigen al neurotransmisor hacia el sitio activo. Entre estos residuos de aminoácidos, Trp279 es un residuo clave, responsable de la función de adhesión de la enzima ACE. Entre el PAS y el CAS, los residuos Phe330 y Tyr121 forman un “cuello de botella” que dificultan el acceso al interior del bolsillo en donde se localiza el sitio activo [21].

¹ El número EC (*Enzyme Commission*) es una clasificación de las enzimas de acuerdo con la reacción catalizada, determinada por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB). <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.

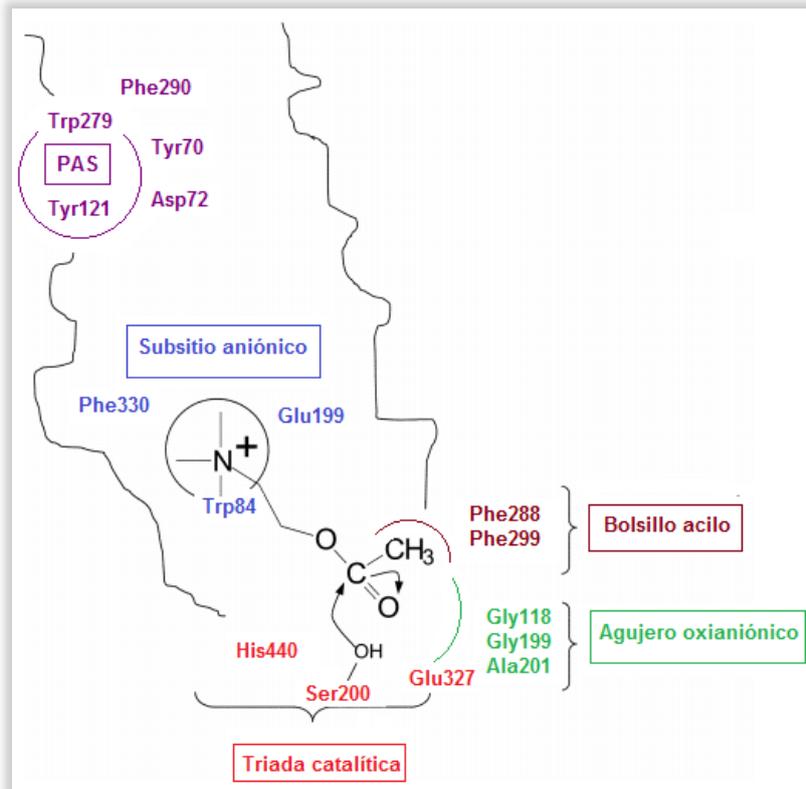


Figura 7. Esquema de los sitios de unión en la cavidad de ACE de Torpedo californica. Imagen adaptada [22]

El CAS está conformado por dos subsitios: el sitio aniónico y el esteárico. El primero, sin carga y lipofílico, posee los aminoácidos Trp84 y Phe330 que pueden interactuar con la carga positiva de la AC mediante interacciones π -catión de manera que quede perfectamente ubicada para que sea hidrolizada. El subsitio esteárico, donde la acetilcolina es hidrolizada a colina y acetato, contiene la llamada tríada catalítica de los aminoácidos Ser200, His440 y Glu327. El grupo hidroxilo de la serina es el que ataca nucleofílicamente al éster del neurotransmisor, liberando colina al medio y una acil-enzima. Luego, la acil-enzima sufre un ataque nucleofílico por una molécula de agua, asistida por el grupo His440, liberando ácido acético y regenerando la enzima libre. Las colinesterasas usan esta tríada catalítica Ser-His-Glu para mejorar la nucleofilia de la serina catalítica ya que el enlace de hidrógeno entre His y Ser mejora la capacidad de Ser para llevar a cabo un ataque nucleofílico en el sustrato mientras que Glu estabiliza el catión histidinio del estado de transición (Figura 8) [19], [22].

Los residuos Gly118, Gly119 y Ala201 constituyen el “agujero oxianiónico” que estabiliza el intermediario de AC formado durante la hidrólisis por interacciones puente de hidrógeno. Otro subsitio ubicado en el fondo de la cavidad es el “bolsillo acilo”, el cual consiste en Phe288 y Phe290, y se cree que su rol es limitar la dimensión de los sustratos que puedan ingresar al CAS (en la enzima BuCE estos residuos fenilalanina son reemplazados por residuos

de menor tamaño: Leu286 y val288, permitiendo así alojar sustratos más voluminosos) (Figura 7 y 8) [22].

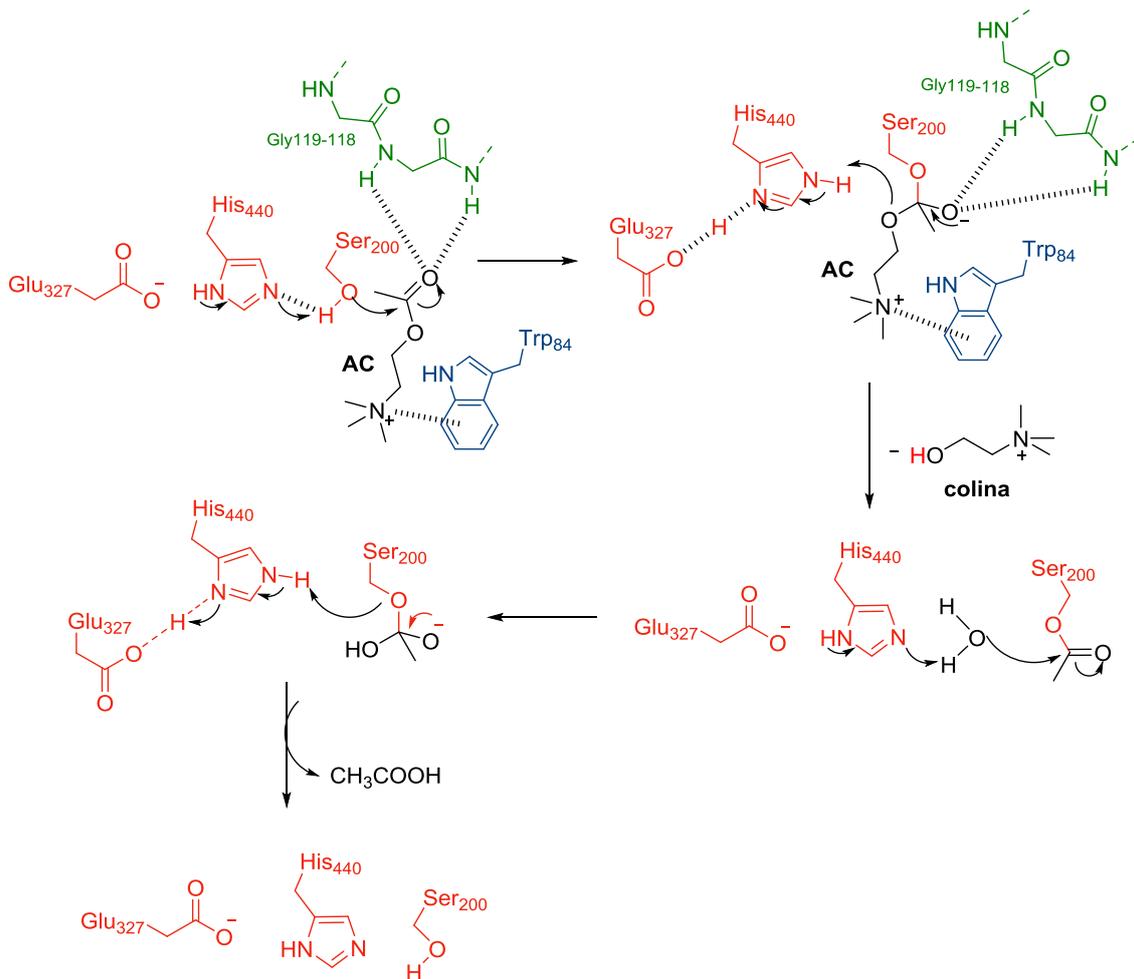


Figura 8. Mecanismo de hidrólisis de AC mediado por ACE.

Además, hasta la actualidad se han reportado mediante estudios de modelado molecular tres puertas secundarias presentes en la enzima donde tanto la acetilcolina y el agua (sustratos de la enzima) como la colina y el acetato (productos) podrían ingresar o salir del sitio activo, aumentando la eficacia catalítica de la enzima. Estas son: una **puerta trasera** (*backdoor*) formada por residuos Trp84, Trp 432, Val129, Gyp441 y Tyr442 que presenta un enlace H único que une las cadenas laterales de Tyr442 y Trp84 en los dos subdominios de *TcACE*. Si este enlace H se rompe, se abre el canal. Una **puerta lateral** ubicada a 15 Å de la triada catalítica y perpendicular a la entrada de la garganta, formada por los residuos Asp74, Thr75, Leu76, Thr83, Glu84 y Asn87 y una **puerta acyl loop** compuesta por Trp236, Arg247 y Phe297 [23], [24].

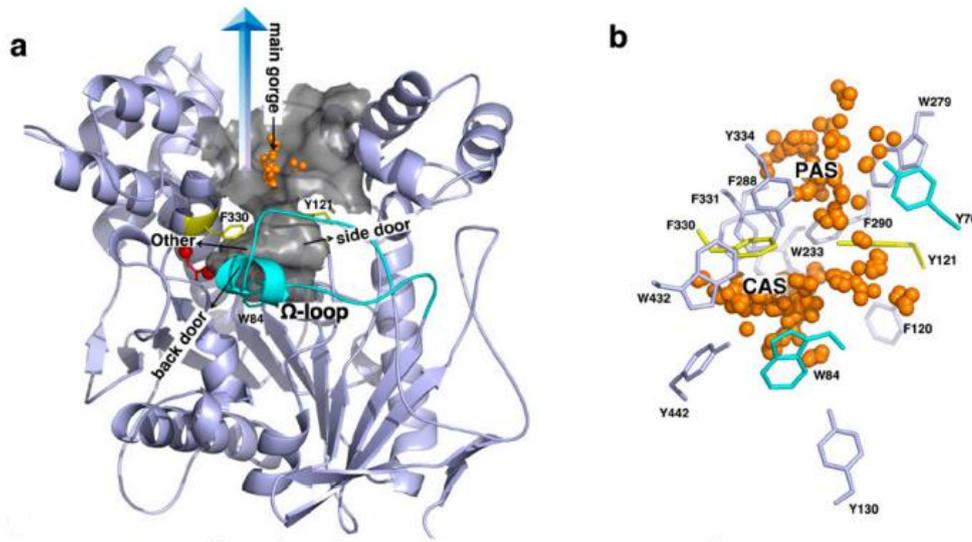


Figura 9. a) estructura cristalina de TcACE: vista de las tres puertas secundarias. F330 y Y121 en el cuello de botella, y W84 en el Ω loop cerca de la "puerta trasera". La tríada catalítica (H440-E327-S200) se muestra como esferas. b) 14 residuos aromáticos en el sitio activo de TcACE y dos sitios de unión a ligando: CAS y PAS.

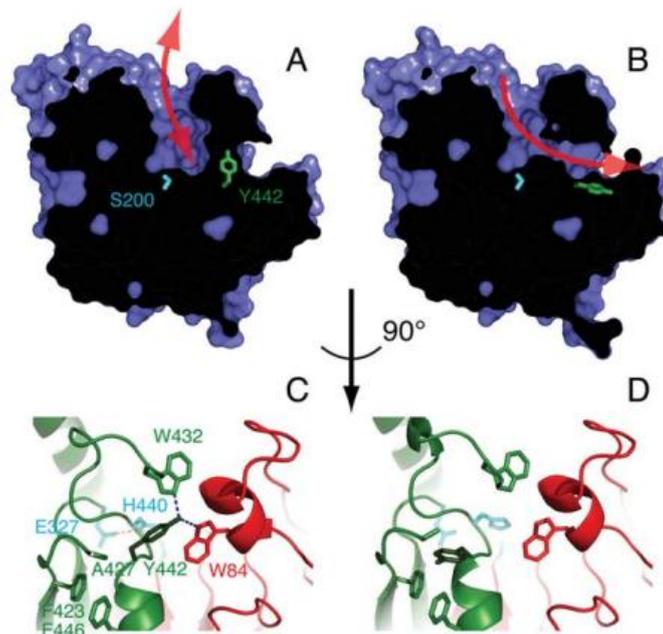


Figura 10. La flecha roja indica el sentido en el que se mueven los sustratos (AC y agua) y los productos (colina y acetato) en la enzima cuando la puerta trasera se encuentra A) cerrada o B) abierta. [25]

De manera simplificada, en la figura 10 se grafica una sección de la ACE en la que el exterior no está conectado con el sitio activo (A) y en la que se encuentra conectado (B). En el mecanismo de la puerta trasera se encuentra involucrado un enlace H que une las cadenas laterales de Tyr442 y Trp84 en los dos subdominios de TcACE. Si este enlace H se rompe, el canal de la puerta trasera se abre (C y D) [25].

La ACE también puede cumplir funciones no colinérgicas en la EA. Varios estudios han demostrado que ACE se une al A β e induce la formación de fibrillas de A β formando un complejo macromolecular con fibrillas en crecimiento, colaborando así a la acumulación de placas seniles. Estos estudios sugirieron que ACE humana interactúa con el péptido A β mediante aminoácidos hidrofóbicos localizado en el PAS de la enzima [26]. Estos resultados hicieron pensar que la inhibición de ACE mediante el bloqueo del PAS, podría afectar la deposición de este péptido tóxico inducida por la enzima, llevando a la reducción de la expresión de una de las patologías de la enfermedad. Sobre la base de estas premisas, las nuevas clases de inhibidores de ACE (IACE) dirigidos al PAS se han convertido en prometedores candidatos a fármacos anti-Alzheimer modificadores de la enfermedad [27].

Por otro lado, la enzima BuCE también es capaz de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina. Mientras que ACE se encuentra asociada principalmente a neuronas y axones, BuCE es expresada y secretada por células gliales en el cerebro. En un cerebro sano, ACE y BuCE se encuentran en una proporción 4:1. Sin embargo, en cerebros de pacientes con la EA la actividad de ACE puede disminuir hasta un 45% durante el progreso de la enfermedad, reflejando la desaparición de neuronas y axones a las cuales se encuentra asociada, mientras que la actividad de BuCE puede hasta duplicarse. Se ha demostrado también, que niveles en crecimiento de BuCE se correlacionan con el depósito de placas amiloides y NFTs. Ambas enzimas, ACE y BuCE, interactúan con las fibrillas cerebrales de los péptidos A β . Sin embargo, BuCE no produce un efecto observable en la formación de las placas seniles y esto se debe, a que BuCE carece de tres de los aminoácidos aromáticos presentes en el PAS de ACE (Tyr-70, Tyr-121, Trp-279). Por lo tanto, el PAS de BuCE, que media la activación del sustrato, tiene una afinidad más débil que el PAS en ACE [28].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se ha establecido que una inhibición reversible selectiva de BuCE o inhibidores reversibles duales de ACE y BuCE podrían ser cruciales en la patogénesis de estadios de medios a avanzados de la EA, con el fin de evitar un mayor declive en las habilidades cognitivas y mentales mientras persiste la disminución de neuronas colinérgicas [29], [30].

I.1.5 Medicamentos actuales para la Enfermedad de Alzheimer

Los inhibidores de ACE (iACE) son utilizados de dos formas principales: como productos farmacéuticos (inhibidores reversibles) y como pesticidas (inhibidores irreversibles). En

personas afectadas por EA se ha demostrado que el uso de iACEs reversibles tiene un impacto positivo tanto en los síntomas psiquiátricos como en los conductuales [19], [22].

En la actualidad existen cinco medicamentos aprobados por agencias regulatorias internacionales como US-FDA (United States Food and Drug Administration) y la EMA (European Medicines Agency) para el tratamiento de las manifestaciones cognitivas de la EA y el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes: tacrina (ya retirada del mercado), donepecilo, rivastigmina y galantamina como inhibidores de ACE reversibles, y memantina como un antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Figura 11) [8], [19], [31]. En la Tabla 1, se presentan las características farmacológicas de los principales inhibidores de la colinesterasa (iCE): iCE tradicionales (Figura 11), iCE en desarrollo (Figura 12).

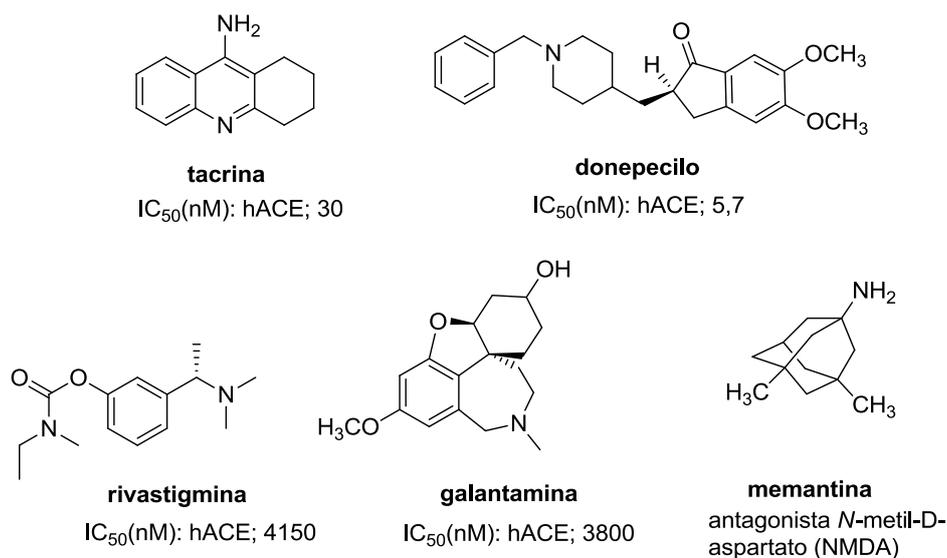


Figura 11. Fármacos aprobados para el tratamiento de la EA [32].

Tabla 1. Características farmacológicas de los principales iCE para el tratamiento de la EA [8], [19], [31].

	Droga	Aspectos farmacológicos
iCEs tradicionales	<i>Tacrina</i>	El primer compuesto aprobado en 1993 para la terapia de la EA. Es un inhibidor no competitivo y rápidamente reversible tanto de ACE como de BuCE. La biodisponibilidad de la tacrina varía entre un 17-37%. Presentó una mejora del rendimiento cognitivo de entre el 5 y el 40% después del tratamiento, en pacientes con EA media a moderada. Su uso, sin embargo, ha sido dejado de lado por la alta incidencia de efectos secundarios gastrointestinales y alta hepatotoxicidad.
	<i>Donepecilo</i>	Aprobado en 1996 para la terapia de la EA leve a moderada. Es un inhibidor selectivo de ACE, no competitivo y rápidamente reversible. Se une al PAS de la enzima, exhibiendo no solo tratamiento sintomático, sino retrasando además la deposición de

	<p>placas amiloides. Este medicamento tiene mejores propiedades que tacrina sin presentar hepatotoxicidad, mostrando pocos efectos secundarios gastrointestinales. Además, presenta una biodisponibilidad del 100%.</p>
	<p><i>Rivastigmina</i> Aprobado en 2000 para el tratamiento de la EA leve a moderada, es un derivado del alcaloide natural fisostigmina, inhibidor pseudorreversible potente que bloquea la actividad de ACE uniéndose a la parte esteárica del sitio activo de la enzima. Se considera un inhibidor no competitivo tanto de ACE como de BuCE con igual competencia. La biodisponibilidad de rivastigmina es del 40%. Produce sólo efectos secundarios colinérgicos como náuseas, vómitos y dolores de cabeza.</p>
	<p><i>Galantamina</i> Es un alcaloide natural aislado de la planta <i>Galanthus woronowii</i> aprobado para el tratamiento de la EA leve a moderada en 2001. Es un inhibidor selectivo, competitivo y rápidamente reversible de ACE que interactúa con el subsitio aniónico y con la garganta aromática de la enzima. Además, mejora la transmisión colinérgica por la modulación alostérica de receptores nicotínicos y se ha utilizado para tratar los síntomas de otras formas de demencia. Presenta una biodisponibilidad entre 80 y 100% y los efectos secundarios, al igual que otros iACE, son mayormente gastrointestinales. Aunque se ha conseguido la síntesis total de este alcaloide, la comercialización actual se basa en la extracción, con bajo rendimiento y alto costo, de distintas poblaciones de <i>Leucojum aestivum</i>.</p>
iCE en desarrollo	<p><i>Phenserine</i> Phenserine está siendo desarrollada por Axonyx. Es un inhibidor selectivo de ACE, no competitivo y es un agente prometedor para desarrollar nuevas estrategias en la terapia de la EA ya que, a diferencia de los inhibidores de ACE comercializados actualmente, tiene un doble mecanismo de acción que también incluye actividad anti-amiloide.</p>
	<p><i>Tolserine</i> Inhibidor de ACE reversible, no competitivo. La selectividad de tolserine sobre ACE es mucho mayor que la de phenserine (200:75). La incorporación de un metilo en la molécula aumenta las propiedades hidrofóbicas para tolserine en comparación con la phenserine, mejorando su permeabilidad de la barrera hematoencefálica, asegurando así una alta absorción cerebral.</p>
	<p><i>Eserolina</i> Considerada como un metabolito de la fisostigmina, la eserolina es un inhibidor reversible, competitivo de la ACE. Además actúa como agonista opioide, produciendo potentes efectos analgésicos. Esta combinación de actividades le da a la eserolina un perfil farmacológico inusual. Zhan y colaboradores [33] encontraron que un carbamato de alquilo cíclico derivado de la eserolina más efectivo contra ACE con una gran selectividad en comparación con BuCE.</p>

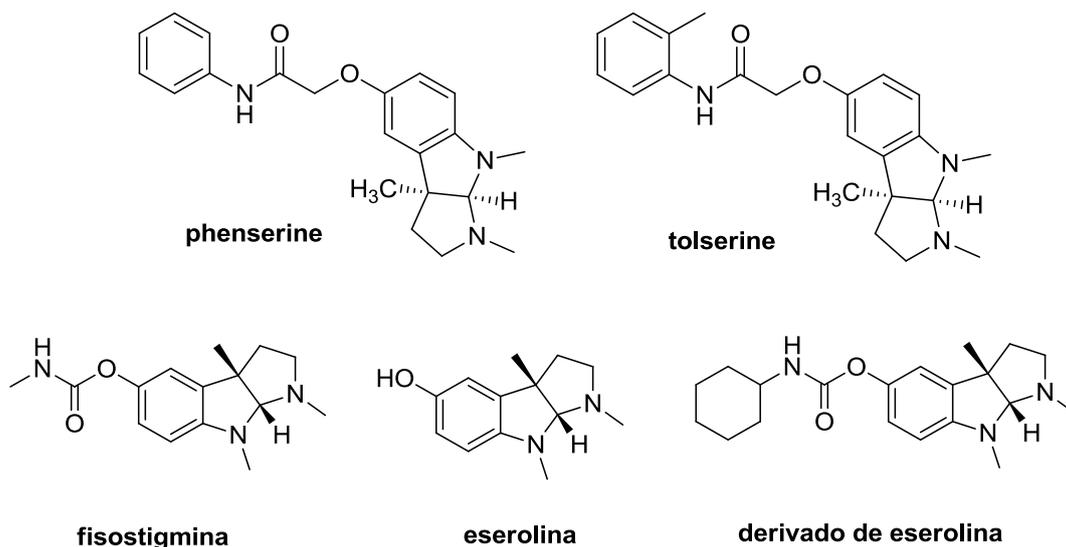


Figura 12. Estructuras de iCE en desarrollo: phenserine y tolserine

La memantina tiene un mecanismo de acción completamente diferente al de los otros compuestos mencionados. Es un antagonista no competitivo con afinidad media del receptor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA). Protege a las neuronas de una actividad glutamatergica excesiva, que resulta en excitotoxicidad. Además, disminuye la hiperfosforilación de la proteína tau. Muchos estudios clínicos han demostrado que mejora la cognición y los efectos neuropsiquiátricos y conductuales de la EA. Memantina está aprobada desde 2002 para casos de EA moderada a severa y su utilización clínica es en combinación con los iACEs en etapas avanzadas de la enfermedad así como en otras demencias [12].

Debido a que la disfunción neuronal comienza en las etapas iniciales de la EA, la utilidad de los iACEs es la de proveer alivio de la sintomatología clínica en el período de transición, apoyando las funciones cerebrales con las neuronas disponibles. Al aumentar el daño neuronal, la efectividad terapéutica de los iACEs disminuye gradualmente. Estudios recientes indican que en la actualidad, el beneficio evidenciado en el tratamiento con iACEs comerciales es variable, pudiendo durar hasta cuatro años [34].

I.1.6 Penetración de fármacos en el SNC. Barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (BHE) es una barrera física y metabólica que aísla al sistema nervioso central (SNC) del resto del organismo, localizada en el sistema vascular y más concretamente en los capilares. Está constituida por tejido endotelial rodeado por pies de astrocitos que actúan principalmente como soporte del capilar. Las células endoteliales están

fuertemente unidas, sin fisuras, lo que impide que las moléculas solubles en agua puedan pasar entre ellas mediante difusión paracelular. La membrana lipídica de dichas células constituye una barrera adicional al paso de moléculas hidrófilas. En la BHE existen transportadores específicos y canales iónicos, que regulan el paso de las especies químicas necesarias para el metabolismo cerebral, así como sistemas enzimáticos que metabolizan sustancias tóxicas y transportadores activos que eliminan desechos e impiden el paso de moléculas lipófilas perjudiciales [35].

La BHE representa un obstáculo importante para los fármacos a nivel cerebral, imponiendo limitaciones bioquímicas y de tamaño molecular para el paso de los compuestos desde la sangre al cerebro. Así, cuando se trabaja en enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central (SNC), como es la EA, es imprescindible que la molécula sea capaz de atravesar la BHE para alcanzar sus dianas terapéuticas situadas en el cerebro. Por el contrario, cuando lo que se pretende es desarrollar medicamentos que actúen en otros órganos, su penetración en el cerebro no es deseable porque disminuye la concentración efectiva del fármaco que llega a la diana terapéutica y porque frecuentemente aparecen efectos secundarios, debido a interacciones no deseadas con receptores cerebrales. Dada la importancia de conocer si un determinado candidato a fármaco será capaz de penetrar en el SNC, en los últimos años se viene trabajando activamente en el desarrollo de métodos *in vitro*, tanto computacionales [36]–[38] como experimentales [39], para la predicción del paso de la BHE.

En los pacientes con EA las complicaciones son mayores debido a la disminución de la perfusión cerebral causada por el deterioro de vasos sanguíneos, lo que provoca, entre otras cosas, una disfuncionalidad de la BHE [40]. Esto ha llevado a numerosas investigaciones basadas en el estudio de modificaciones químicas sobre moléculas activas para la EA con el objetivo de obtener un mejoramiento en su biodisponibilidad [8].

I.2 Detección de la actividad inhibitoria de colinesterasa

La elección de un ensayo de *screening* apropiado es crucial. De hecho, la actividad biológica demostrada por compuestos naturales y sintéticos con distintos test *y/o* realizada por diversos grupos de investigación puede ser muy variable. En las últimas décadas, la introducción del método de Ellman [41] como un método de *screening* rápido ha resultado en el descubrimiento de un gran número de nuevos iACEs, convirtiéndolo en el método más

difundido [42]. El ensayo de Ellman emplea ioduro de acetiltiocolina (ATCI) como sustrato de la enzima ACE y ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) como reactivo de color. El método se basa en la reacción entre la tiocolina, liberada a partir de la hidrólisis del sustrato por acción de la ACE, con el reactivo de color DTNB. El producto resultante genera un anión de color amarillo que puede detectarse en el UV por su absorción a 405 nm (Figura 13).

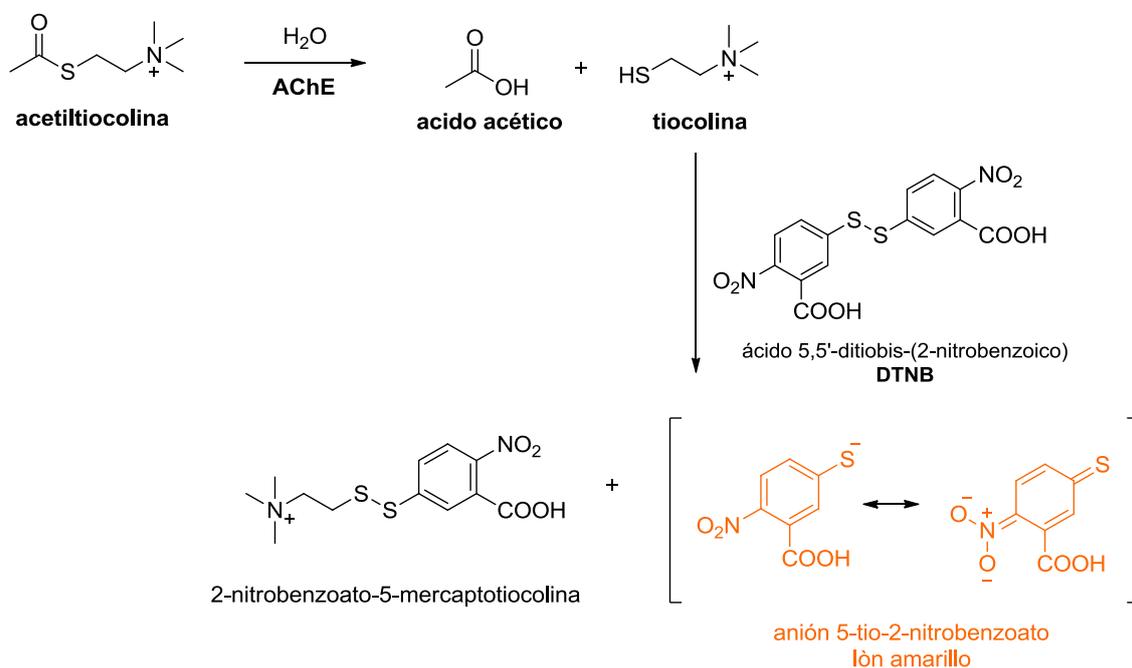


Figura 13. Método de Ellman para iCE

Cuanto mayor es la cantidad de sustrato hidrolizado, mayor es la absorbancia de la muestra. En ausencia de un inhibidor, la curva de absorbancia vs tiempo tiene pendiente positiva y permite medir la velocidad inicial de la enzima. En cambio, en presencia de un inhibidor la pendiente de la curva disminuye, ya que la actividad enzimática es menor, siendo cero para el 100% de inhibición (Figura 14).

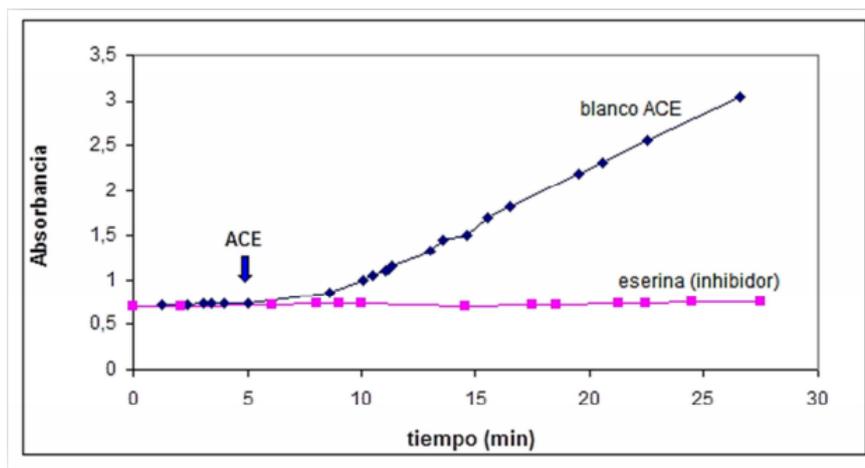


Figura 14. Curva absorbancia vs tiempo en presencia y ausencia de un inhibidor.

López y colaboradores modificaron el ensayo de Ellman para detectar inhibición de ACE en extractos considerando que muchos de ellos son muestras poco solubles en medios acuosos. Para ello, incluyeron el empleo de un tensioactivo no iónico (Tween 20), a bajas concentraciones en los buffers empleados para el ensayo, como emulsionante [43]. La reacción de Ellman también ha sido adaptada a ensayos cualitativos realizados sobre cromatografías en capa fina. Este método bioautográfico permite el screening rápido de extractos, fracciones y/o compuestos puros. Además, posibilita el reconocimiento de inhibidores conocidos en etapas tempranas de la investigación y la elección de los extractos más promisorios para el descubrimiento de nuevas estructuras. Utilizando el método en TLC en combinación con la cuantificación espectrofotométrica, es posible obtener información valiosa para los pasos de purificación posteriores a la extracción [44].

En la actualidad, con el surgimiento de los conocimientos sobre BuCE y su rol en la EA y enfermedades relacionadas, el método de Ellman ha sido también adaptado para determinar la actividad inhibitoria de esta enzima. Para esto, se utiliza como sustrato de la enzima BuCE, ioduro de butiriltiocolina (BTCl), manteniendo el resto de los parámetros en la determinación.

En el caso de ACE, puede adquirirse comercialmente enzima ACE liofilizada purificada del órgano eléctrico de la anguila *Electrophorus electricus* (electric eel) y de eritrocitos humanos. Ambas pueden utilizarse con ciertas modificaciones para realizar mediciones usando el método de Ellman. De igual forma, la enzima BuCE puede obtenerse en forma comercial purificada de suero equino o suero humano.

I.3 Rol de la semisíntesis a partir de productos naturales bioactivos

Los productos naturales (PNs) son usualmente moléculas pequeñas producidas por una fuente biológica como plantas, animales o microorganismos, y cuya ocurrencia puede estar limitada a una familia taxonómica, género o especie particular. Generalmente, el término producto natural es considerado sinónimo de metabolito secundario. Considerando a este último como un compuesto orgánico con una estructura determinada para ejercer una actividad biológica, que no tiene una función primaria directamente involucrada en el crecimiento, desarrollo y reproducción normal de un organismo, sino que es utilizado por éste para controlar relaciones ecológicas [45].

Los PNs y sus derivados constituyen un gran porcentaje de todos los productos farmacéuticos en el mercado. Si bien existen muchas rutas puramente biológicas o químicas para estas moléculas, cada una de ellas tiene ciertas limitaciones, dependiendo del objetivo. Esto lleva a adoptar un enfoque semisintético, en el que el PN se aísla de su productor nativo y posteriormente se derivatiza químicamente.

Se han aislado varios inhibidores de ACE y BuCE de varias fuentes naturales, como se describe ampliamente en la literatura. Es de destacar que la mayoría de los compuestos han demostrado solo actividad *in vitro*; pocos de ellos han sido probados en modelos animales, lo cual es imprescindible para demostrar su capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica y ejercer efectos beneficiosos en el cerebro. Entre estos productos naturales, los alcaloides se consideran los candidatos más prometedores para su uso en el tratamiento de la EA, debido a sus complejas estructuras que contienen nitrógeno, capaz de interactuar con el CAS de la enzima ACE. Los principales alcaloides con reconocida actividad anti-ACE son la galantamina y la huperzina A (Figura 11 y 15). El sitio de unión periférico de ACE, permite que la enzima sea inhibida por otros compuestos diferentes a los alcaloides, principalmente terpenoides, flavonoides, xantonas y cumarinas [31], [46].

La obtención de derivados semisintéticos a partir de un PN bioactivo es una estrategia ampliamente empleada para generar compuestos con mejor actividad biológica y propiedades farmacéuticas, así como una herramienta para realizar estudios de relación estructura-actividad (SAR). Muchas veces, la optimización de un PN mediante semisíntesis es requerida para aumentar la potencia terapéutica, la biodisponibilidad, para reducir los efectos secundarios o para suplir la escasez del producto natural. Tal es el caso de la fisostigmina, un alcaloide obtenido de las semillas de *Physostigma venenosum* inhibidor reversible de las

colinesterasas, limitado en su uso por sus efectos secundarios gastrointestinales, por su corta vida media y por su estrecha ventana terapéutica, que llevó a la semisíntesis de su análogo rivastigmina (Tabla 1) con un mejor perfil terapéutico y actualmente utilizado en la terapia de la EA [31]. En la Tabla 2, se presentan las características farmacológicas de los principales inhibidores de la colinesterasa derivados de la Naturaleza (Figura 15).

Tabla 2. Características farmacológicas de los principales iCE naturales para el tratamiento de la EA [8].

	Droga	Aspectos farmacológicos
iCE derivados de la naturaleza	<i>Huperzina</i>	Un alcaloide de <i>Lycopodium</i> extraído de la planta medicinal china <i>Huperzia serrata</i> . La huperzina es un inhibidor de ACE eficaz, reversible y muy selectivo. Presenta una biodisponibilidad oral de más del 96%. En China es el medicamento seleccionado para la terapia contra la EA. En los Estados Unidos, los estudios de Fase II han demostrado un efecto modesto pero clínicamente importante en la cognición de los pacientes con EA.
	<i>Flavonoides</i>	Los flavonoides han llamado la atención debido a sus propiedades de eliminar radicales libres, influyendo en la cognición y el aprendizaje en humanos y modelos animales con EA. Galangin, un flavonol extraído y aislado de los rizomas de <i>Alpiniae officinarum</i> , confirmó la actividad inhibitoria más importante contra ACE. Sin embargo, la toxicidad de estos candidatos alternativos para la terapia de Alzheimer no se ha explorado en estudios preclínicos y no se han descrito ensayos clínicos hasta la fecha.
	<i>Cardanol</i>	Los derivados de cardanol como nuevos candidatos potenciales de inhibidores de ACE han revelado resultados favorables, diseñados a partir de lípidos fenólicos de anacardo obtenidos del líquido de cáscara de nuez de <i>Anacardium occidentale</i> . El desarrollo de derivados de cardanol parece ser atractivo debido a la abundancia de la fuente de materias primas. Sin embargo, hasta la fecha no se han informado estudios preclínicos y de toxicidad.

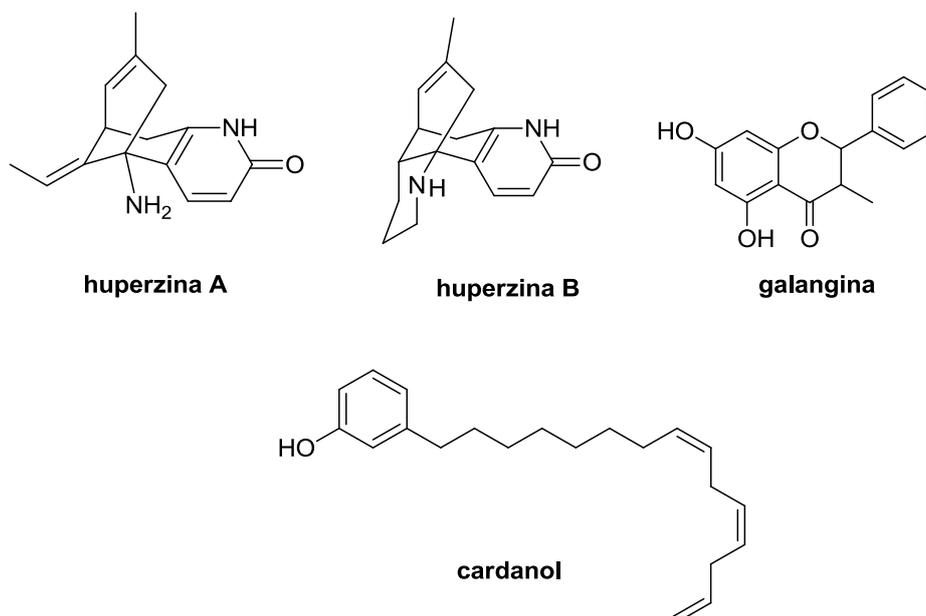


Figura 15. Estructuras moleculares de iCEs derivados de la naturaleza: huperzina A y B, y cardanol.

I.4 Compuestos del tipo híbridos con diferentes grupos farmacóforos

La creciente conciencia de la complejidad de la EA hace insostenible la pretensión de desarrollar fármacos efectivos a través de la modulación de un solo objetivo biológico involucrado en el proceso patogénico. En cambio, los medicamentos de múltiples objetivos (*multitarget*), es decir, los compuestos que pueden alcanzar simultáneamente varios objetivos clave de la patología de la enfermedad, están emergiendo como un enfoque terapéutico más realista. Se están realizando esfuerzos de investigación muy importantes para diseñar y desarrollar compuestos híbridos anti-Alzheimer multitarget que combinen estructuras farmacofóricas distintas, impartiendo la capacidad de interactuar con objetivos biológicos distintos. Junto con el cáncer, la EA es el campo donde la actividad de investigación sobre agentes multitarget ha experimentado un mayor crecimiento en las últimas décadas (Figura 16). Esta estrategia generalmente involucra el diseño y la síntesis de compuestos híbridos que posean en una única molécula dos o más núcleos de interés farmacológico, de los cuales, generalmente uno es del tipo iACE [32], [47]. En la Tabla 3 se resumen los principales híbridos inhibidores de CE y sus características farmacológicas para la terapia de la EA (Figura 17).

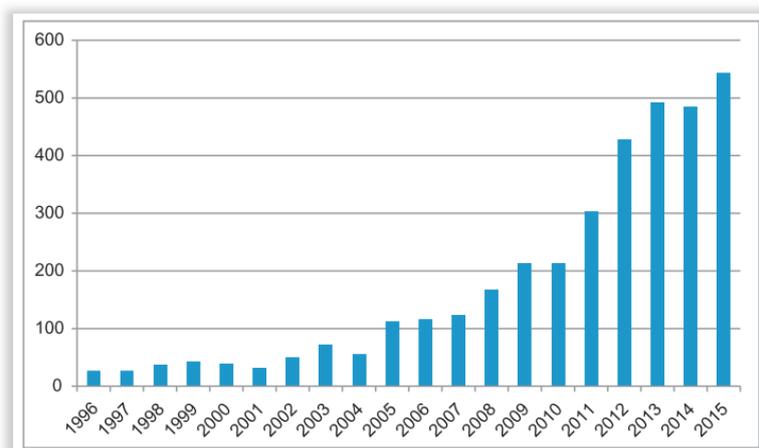


Figura 16. Número de publicaciones sobre compuestos multitarget durante el período 1996-2015 [47].

Tabla 3. Características farmacológicas de los principales iCE híbridos para el tratamiento de la EA [8].

	Droga	Aspectos farmacológicos
iACE híbridos	<i>Híbrido Donepecilo-AP2238</i>	El primer inhibidor capaz de unirse a los sitios catalíticos y periféricos de ACE. Este híbrido tiene una actividad contra ACE similar a la del donepecilo pero con una mayor capacidad para inhibir la toxicidad mediada por A β . En la actualidad, no hay informes de estudios en humanos.
	<i>Híbrido Donepecilo-tacrina</i>	Estos híbridos han demostrado ser inhibidores altamente potentes de ACE y BuCE así como también inhibidores de la agregación del péptido A β determinada por ACE.
	<i>Híbrido Tacrina-ácido ferúlico (T6AF)</i>	Estudios <i>in vitro</i> han demostrado que T6AF puede inhibir significativamente la agregación del péptido A β , bloqueando la muerte celular inducida por A β . Además, en un modelo de roedor con EA, T6FA enriqueció considerablemente la capacidad cognitiva junto con el crecimiento de la actividad de ACT y superóxido dismutasa, reduciendo la actividad de ACE.
	<i>Híbrido de Tacrina y 8-hidroxiquinolina</i>	Diseñado y sintetizado por [48], los nuevos híbridos han demostrado ser más efectivos que la tacrina. Los compuestos revelaron tener baja toxicidad celular, ser antioxidantes y presentar actividades quelantes de cobre.

Ladostigil

Derivado de la combinación de dos farmacóforos: la porción carbamato de rivastigmina y el grupo propargilo de rasagilina (inhibidor irreversible selectivo de la monoamino oxidasa B (MAO-B) utilizado para la enfermedad de Parkinson). Ladostigil representa un nuevo compuesto anti-EA, que combina propiedades neuroprotectoras con actividades inhibitoras de la MAO y CE del cerebro. El medicamento actualmente se encuentra en ensayo clínico de fase IIb para la terapia de la EA y la demencia comórbida asociada con afecciones extrapiramidales y depresión.

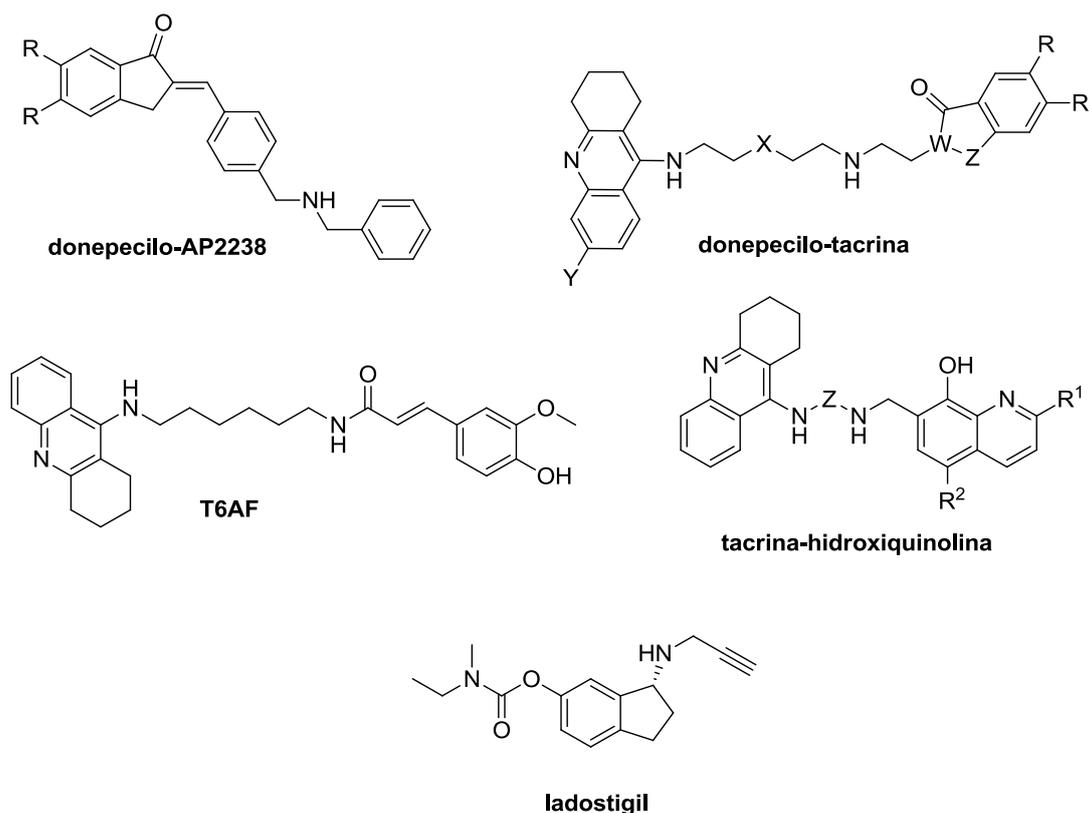


Figura 17. iCE híbridos. Estructura molecular de donepecilo-AP2238, donepecilo-tacrina, T6AF, tacrina-hidroxiquinolina y ladostigil.

Cuando hablamos de la combinación de dos estructuras o farmacóforos, el híbrido resultante puede clasificarse de tres maneras diferentes: *unido*, *fusionado* o *combinado*. La generación de los distintos híbridos dependerá del objetivo (*target*), de la disponibilidad de las estructuras de partida y de la viabilidad química. Los híbridos *unidos* se generan cuando un espaciador (o *linker*), que no está presente en las estructuras de partida, conecta los farmacóforos. Por otro lado, cuando los farmacóforos resultan integrados sin espaciadores discernibles, se denominan *híbridos fusionados*. Y finalmente, cuando las estructuras

farmacofóricas poseen un grado evidente de solapamiento, hablamos de *híbridos combinados* (Figura 18).

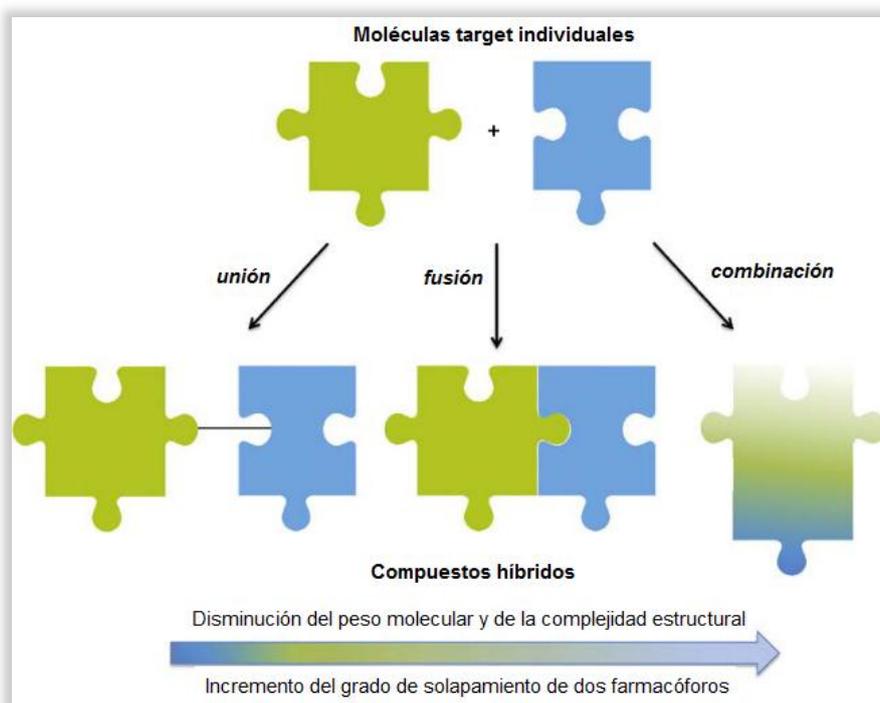


Figura 18. Estrategia de diseño para compuestos híbridos

En el curso de esta tesis, se trabajó en la obtención de híbridos de unión mediante semisíntesis a partir de compuestos naturales o de estructuras inspiradas en compuestos naturales, de propiedades conocidas para la EA, con el objetivo de obtener moléculas multifuncionales con un mejoramiento en los perfiles de actividad biológica para la terapia de la EA. Por otro lado, para las síntesis orgánicas comprendidas en esta tesis se hizo uso del equipo de microondas reemplazando el calentamiento convencional, en busca de una disminución en los tiempos de reacción y mejoramiento de la eficiencia y rendimiento de reacción.

1.5 Síntesis asistida por microondas

El uso de la energía de microondas (MW) ha incrementado rápidamente en las últimas dos décadas con nuevas e innovadoras aplicaciones en síntesis orgánica. Se ha demostrado que la radiación con microondas reduce drásticamente el tiempo de reacción, aumenta el rendimiento y mejora la pureza del producto respecto a los métodos convencionales

informados [49]. Además, la síntesis asistida por microondas es considerada una rama de la Química Verde teniendo en cuenta que las transformaciones químicas son libres de contaminación ya que no solo reducen la cantidad de residuos de solvente generados, sino que también los productos a menudo necesitan muy poca o ninguna purificación [50]. Por ello, es de esperar que estos procesos sean adoptados por las grandes industrias y contribuyan al mejoramiento del medio ambiente [51]. A continuación, se intentará explicar brevemente el fundamento de este método.

I.5.1 Principios del calentamiento por microondas

La radiación de microondas (MW) es radiación electromagnética en el rango de frecuencia de 0,3 a 300 GHz, correspondiente a longitudes de onda entre 1 mm y 1 m (Figura 19). Todos los hornos de microondas domésticos de "cocina", así como los reactores de microondas específicos para síntesis química, funcionan a una frecuencia de 2,45 GHz (correspondiente a una longitud de onda de 12,25 cm).

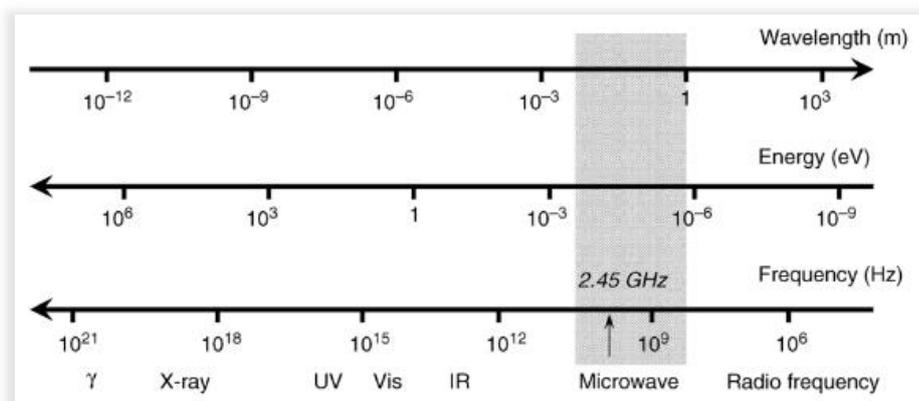


Figura 19. Espectro electromagnético

Teniendo en cuenta la comparación de los datos de la Tabla 4, se puede entender que un fotón de microondas a una frecuencia de 2,45 GHz (cerca de 10^{-5} eV) tiene una energía demasiado baja para romper enlaces moleculares. Por lo tanto, está claro que la radiación de microondas no puede "inducir" reacciones químicas mediante la absorción directa de esta, lo cual sí es posible empleando radiación de mayor energía (por ejemplo, UV o luz visible: fotoquímica). Sin embargo, la radiación con microondas proporciona efectos térmicos únicos, que son altamente beneficiosos para la síntesis química [52]. La activación por microondas tiene que darse entonces mediante otros mecanismos.

Tabla 4. Comparación de tipos de radiación y energías de enlace [52].

Tipo de radiación	Frecuencia (MHz)	Energía cuántica (eV)	Tipo de enlace	Energía de enlace (eV)
Rayos gamma	$3,0 \times 10^{14}$	$1,24 \times 10^6$	C–C	3,61
Rayos X	$3,0 \times 10^{13}$	$1,24 \times 10^5$	C=C	6,35
Ultravioleta	$1,0 \times 10^9$	4,1	C–O	3,74
Visible	$6,0 \times 10^8$	2,5	C=O	7,71
Infrarrojo	$3,0 \times 10^6$	0,012	C–H	4,28
Microondas	2450	$1,01 \times 10^{-5}$	O–O	4,80
Ondas de radio	1	$4,0 \times 10^{-9}$	Enlace de hidrógeno	0,04 – 0,44

La química de microondas se basa en el calentamiento eficiente de materiales (en la mayoría de los casos solventes) por efectos de calentamiento dieléctrico. El calentamiento dieléctrico funciona mediante dos mecanismos principales [51], [53], [54]:

- **Polarización dipolar:** para que una sustancia pueda generar calor cuando se irradia con microondas, debe ser un dipolo, es decir, su estructura molecular debe presentar una carga parcial positiva y negativa. Como el campo de microondas oscila, los dipolos en el campo se alinean con el campo oscilante. Esta alineación causa rotación, lo que resulta en fricción y finalmente en energía térmica.
- **Conducción iónica:** Durante la conducción iónica, las partículas disueltas cargadas (generalmente iones) oscilan de un lado a otro bajo la influencia de la radiación de microondas. Esta oscilación provoca colisiones de las partículas cargadas con moléculas o átomos vecinos, que son los responsables en última instancia de crear energía térmica.

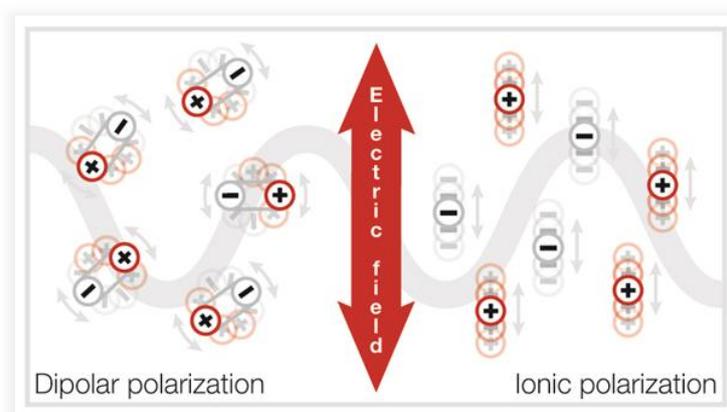


Figura 20. Ilustración esquemática de los dos principales mecanismos de calentamiento dieléctrico: polarización dipolar. Fuente <https://wiki.anton-paar.com/ch-de/mikrowellenunterstuetzte-synthese/>.

En general, la interacción de la radiación de microondas con la materia se caracteriza por tres procesos diferentes: absorción, transmisión y reflexión (Figura 21). Los materiales altamente dieléctricos, como los solventes orgánicos polares, permiten una fuerte absorción de las microondas y, en consecuencia, un calentamiento rápido del medio. Por otro lado, los materiales no polares (transparentes a las microondas) muestran solo pequeñas interacciones con este tipo de radiación (transmisión), las microondas pasan a través de dichos materiales y esto los convierte en materiales adecuados para la construcción de reactores. Si la superficie del material refleja la radiación de microondas, casi no se introduce energía en el sistema [52].

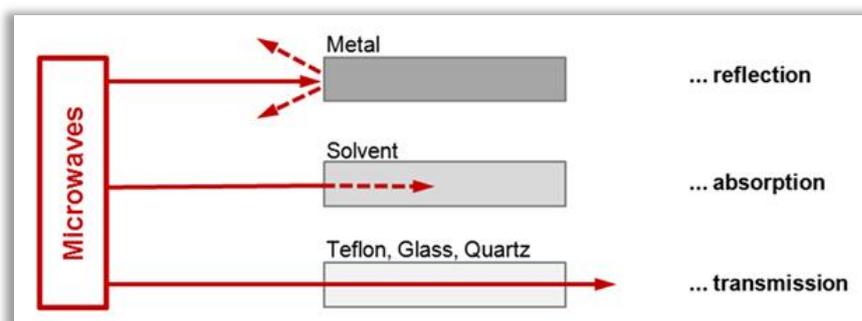


Figura 21. Interacción de diferentes materiales con microondas: conductores eléctricos (metales), materiales absorbentes (solventes) y materiales de aislamiento (teflón, vidrio, cuarzo). Fuente: <https://wiki.anton-paar.com/ch-de/mikrowellenunterstuetzte-synthese/>.

1.5.2 Propiedades dieléctricas

Como sugiere el término "calentamiento dieléctrico", un material debe poseer ciertas propiedades dieléctricas para ser calentado eficientemente en el campo de microondas. Las

características de calentamiento de un material en particular (por ejemplo, un solvente) mediante radiación de microondas dependen de la capacidad de una sustancia específica para convertir energía electromagnética en calor. Esta capacidad está determinada por la llamada tangente de pérdida, $\tan \delta$. El valor de $\tan \delta$ se define como el cociente ϵ''/ϵ' , donde ϵ'' es la pérdida dieléctrica (eficacia con la que la radiación electromagnética se convierte en calor) y ϵ' es la constante dieléctrica, que describe la capacidad de las moléculas para polarizarse en un campo eléctrico [55], [50].

Tabla 5. Solventes orgánicos clasificados según su eficiencia de calentamiento ($\tan \delta$) en MW (2,45 GHz, 20 °C) [50].

Alta (> 0,5)		Media (0,5 – 0,1)		Baja (<0,1)	
Solvente	Tan δ	Solvente	Tan δ	Solvente	Tan δ
Etilenglicol	1,350	2-butanol	0,447	Cloroformo	0,091
Etanol	0,941	Diclorobenceno	0,280	Acetonitrilo	0,062
Dimetil sulfóxido	0,825	N-meti-2-pirrolidina	0,275	Acetato de etilo	0,059
2-propanol	0,799	Ácido acético	0,174	Acetona	0,054
Acido fórmico	0,722	Dimetilformamida	0,161	Tetrahidrofurano	0,047
Metanol	0,659	Dicloroetano	0,127	Diclorometano	0,042
Nitrobenceno	0,589	Agua	0,123	Tolueno	0,040
1-butanol	0,571	Clorobenceno	0,101	Hexano	0,020

Los valores de $\tan \delta$ para algunos solventes orgánicos de uso común se resumen en la Tabla 5 [52]. Esta tabla muestra la clasificación de los solventes en alta ($\tan \delta > 0,5$), media ($\tan \delta$ 0,1-0,5) y baja absorción de microondas ($\tan \delta < 0,1$). Los disolventes sin momento dipolar, como el benceno y el dioxano, son transparentes a las microondas ($\tan \delta < 0,01$).

Se requiere un solvente con un alto $\tan \delta$ (Tabla 5) para un calentamiento rápido en el campo de microondas. Sin embargo, esto no significa que los solventes con valores bajos de $\tan \delta$ no puedan usarse para la síntesis de microondas. Dado que es probable que los sustratos o los reactivos/catalizadores sean polares, las propiedades dieléctricas generales de una mezcla de reacción en la mayoría de los casos permitirán un calentamiento suficiente por microondas, incluso con disolventes no polares. Sin embargo, si la mezcla no es polar, se pueden agregar elementos de calentamiento pasivos para ayudar al proceso de calentamiento [56], [52].

I.5.3 Beneficios de la síntesis de microondas

Tradicionalmente, la síntesis orgánica se lleva a cabo a reflujo de una mezcla de reacción usando un baño de aceite caliente y mantas calefactoras como fuente de calor. Sin embargo, esta forma de calentar una mezcla de reacción es relativamente lenta e ineficiente desde el punto de vista energético, ya que primero la energía térmica se transfiere desde el baño de aceite caliente a la superficie del recipiente de reacción, y luego la superficie caliente calienta el contenido del recipiente. Además, la superficie caliente puede conducir a un sobrecalentamiento local y dar lugar a la descomposición de los reactivos y/o productos. Por el contrario, la radiación de microondas produce un calentamiento interno eficiente energéticamente mediante el acoplamiento directo de la energía de microondas con dipolos y/o iones que están presentes en la mezcla de reacción. Las microondas pasan a través de la pared del recipiente (casi) transparente para microondas (Figura 21, transmisión) y calientan la mezcla de reacción por interacción directa con las moléculas (solventes, reactivos, catalizadores, etc., Figura 21, absorción). Debido a este calentamiento directo "en el núcleo" (sin calentamiento inicial de la superficie del recipiente), la irradiación de microondas produce gradientes de temperatura invertidos en comparación con un sistema calentado convencionalmente (Figura 22, B)[50], [57].

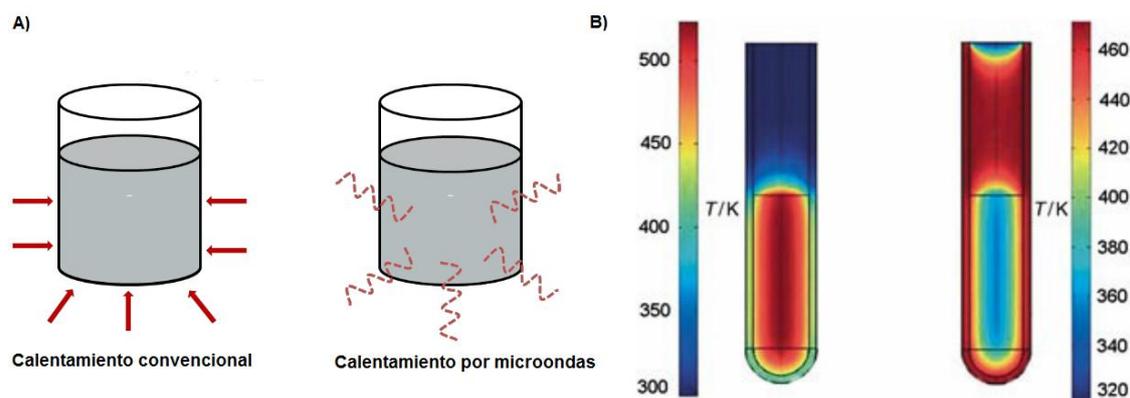


Figura 22. A) Descripción gráfica de la instrucción de calor a una mezcla de reacción por calentamiento convencional (izquierda) y por microondas (derecha) [57]. **B)** Diferencia de gradientes de temperatura después de 1 minuto de irradiación por microondas (izquierda) y por calentamiento convencional (derecha)[50].

Además, la conversión de energía electromagnética en energía térmica funciona de manera altamente eficiente y da como resultado velocidades de calentamiento extremadamente rápidas, no reproducibles con el calentamiento convencional. Debido al rápido calentamiento a la temperatura objetivo, se suprime la formación de subproductos. Esta es otra gran ventaja del calentamiento por microondas, ya que significa que se pueden

lograr mayores rendimientos del producto simplificando el trabajo. Esto se ha observado en muchos ejemplos de literatura y ha proporcionado grandes avances en la síntesis orgánica [49], [58]. Teniendo en cuenta los prolongados tiempos de reacción en las síntesis llevadas a cabo en nuestro grupo de investigación, estos antecedentes han sido una importante motivación para el trabajo sintético de ésta tesis.

Referencias bibliográficas

- [1] Alzheimer's Association, "Alzheimer's disease facts and figures.," *Alzheimers. Dement.*, vol. 10, no. 2, pp. 321–387, 2019.
- [2] Alzheimer's Disease International, "Informe Mundial sobre el Alzheimer 2019. Actitudes hacia la demencia," 2019.
- [3] J. P. Tavana, M. Rosene, N. O. Jensen, P. G. Ridge, J. S. K. Kauwe, and C. M. Karch, "RAB10: An alzheimer's disease resilience locus and potential drug target," *Clin. Interv. Aging*, vol. 14, pp. 73–79, 2019.
- [4] J. L. Cummings, G. Tong, and C. Ballard, "Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options," *J. Alzheimer's Dis.*, vol. 67, no. 3, pp. 779–794, 2019.
- [5] C. Lane-Donovan and J. Herz, "ApoE, ApoE Receptors, and the Synapse in Alzheimer's Disease," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 28, no. 4, pp. 273–284, 2017.
- [6] Y. W. A. Huang, B. Zhou, A. M. Nabet, M. Wernig, and T. C. Südhof, "Differential Signaling Mediated by ApoE2, ApoE3, and ApoE4 in Human Neurons Parallels Alzheimer's Disease Risk," *J. Neurosci.*, vol. 39, no. 37, pp. 7408–7427, 2019.
- [7] F. Liao *et al.*, "Anti-ApoE antibody given after plaque onset decreases A β accumulation and improves brain function in a mouse model of A β amyloidosis," *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 21, pp. 7281–7292, 2014.
- [8] G. D. Stanciu *et al.*, "Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement," *Biomolecules*, vol. 10, no. 1, pp. 1–20, 2019.
- [9] J. T. Jarrett, E. P. Berger, and P. T. Lansbury, "The C-Terminus of the β Protein is Critical in Amyloidogenesis," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 695, no. 1, pp. 144–148, 1993.
- [10] S. K. Yusufzai, M. S. Khan, O. Sulaiman, H. Osman, and D. N. Lamjin, "Molecular docking studies of coumarin hybrids as potential acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, monoamine oxidase A/B and β -amyloid inhibitors for Alzheimer's disease," *Chem. Cent. J.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–57, 2018.
- [11] A. E. Estrada Rodríguez and V. C. Zomosa Signoret, "Papel de la agregación del péptido

- Beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer,” *Rev. Educ. Bioquímica*, vol. 36, no. 1, pp. 2–11, 2017.
- [12] H. O. Tayeb, H. D. Yang, B. H. Price, and F. I. Tarazi, “Pharmacotherapies for Alzheimer’s disease: Beyond cholinesterase inhibitors,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 134, no. 1, pp. 8–25, 2012.
- [13] P. Scheltens *et al.*, “Alzheimer’s disease,” *Lancet*, vol. 388, no. 10043, pp. 505–517, 2016.
- [14] A. Budimir, “Metal ions, Alzheimer’s disease and chelation therapy,” *Acta Pharm.*, vol. 61, no. 1, pp. 1–14, 2011.
- [15] A. Yamamoto *et al.*, “Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated τ and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: Implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer’s disease,” *J. Neurochem.*, vol. 82, no. 5, pp. 1137–1147, 2002.
- [16] S. C. Young, “A systematic review of antiamyloidogenic and metal-chelating peptoids: Two structural motifs for the treatment of Alzheimer’s disease,” *Molecules*, vol. 23, no. 2, 2018.
- [17] C. Esmieu, D. Guettas, A. Conte-Daban, L. Sabater, P. Faller, and C. Hureau, “Copper-Targeting Approaches in Alzheimer’s Disease: How to Improve the Fallouts Obtained from in Vitro Studies,” *Inorg. Chem.*, vol. 58, no. 20, pp. 13509–13527, 2019.
- [18] S. Ayton, P. Lei, and A. I. Bush, “Metallostasis in Alzheimer’s disease,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 62, pp. 76–89, 2013.
- [19] M. B. Colovic, D. Z. Krstic, T. D. Lazarevic-Pasti, A. M. Bondzic, and V. M. Vasic, “Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 11, no. 3, pp. 315–335, 2013.
- [20] I. S. JOEL L. SUSSMAN, MICHAL HAREL, FELIX FROLOW, CHRISTIAN OEFNER, TADRIAN GOLDMANT LILLY TOKER,
“AtomicStructureofAcetylcholinesterasefromTorpedocalifornica:APrototypicAcetylcholine-BindingProtein,” *Science (80-.)*, vol. 253, no. 872–879, 1991.
- [21] M. Singh, M. Kaur, H. Kukreja, R. Chugh, O. Silakari, and D. Singh, “Acetylcholinesterase

- inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 70, pp. 165–188, 2013.
- [22] P. J. Houghton, Y. Ren, and M. J. Howes, "Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 23, no. 2, pp. 181–199, 2006.
- [23] Y. Xu, S. Cheng, J. L. Sussman, I. Silman, and H. Jiang, "Computational studies on acetylcholinesterases," *Molecules*, vol. 22, no. 8, 2017.
- [24] C. Roca *et al.*, "Identification of new allosteric sites and modulators of AChE through computational and experimental tools," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 33, no. 1, pp. 1034–1047, 2018.
- [25] B. Sanson *et al.*, "Backdoor opening mechanism in acetylcholinesterase based on X-ray crystallography and molecular dynamics simulations," *Protein Sci.*, vol. 20, no. 7, pp. 1114–1118, 2011.
- [26] G. V. De Ferrari, M. A. Canales, I. Shin, L. M. Weiner, I. Silman, and N. C. Inestrosa, "A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid β -peptide fibril formation," *Biochemistry*, vol. 40, no. 35, pp. 10447–10457, 2001.
- [27] H. Tang, H. T. Zhao, S. M. Zhong, Z. Y. Wang, Z. F. Chen, and H. Liang, "Novel oxoisoaporphine-based inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 22, no. 6, pp. 2257–2261, 2012.
- [28] S. Agatonovic-Kustrin, C. Kettle, and D. W. Morton, "A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 106, no. June, pp. 553–565, 2018.
- [29] Y. Furukawa-Hibi *et al.*, "Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- β peptide in mice," *Behav. Brain Res.*, vol. 225, no. 1, pp. 222–229, 2011.
- [30] Y. H. Wang, Q. L. Wan, C. D. Gu, H. R. Luo, and C. L. Long, "Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase," *Chem. Cent. J.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–6, 2012.
- [31] E. L. Konrath, C. D. S. Passos, L. C. Klein-Júnior, and A. T. Henriques, "Alkaloids as a

- source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 65, no. 12, pp. 1701–1725, 2013.
- [32] P. Mishra, A. Kumar, and G. Panda, "Anti-cholinesterase hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease (1998–2018)," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 27, no. 6, pp. 895–930, 2019.
- [33] Z. J. Zhan, H. L. Bian, J. W. Wang, and W. G. Shan, "Synthesis of physostigmine analogues and evaluation of their anticholinesterase activities," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 20, no. 5, pp. 1532–1534, 2010.
- [34] R. Anand, K. D. Gill, and A. A. Mahdi, "Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future," *Neuropharmacology*, vol. 76, no. PART A, pp. 27–50, 2014.
- [35] E. Zenaro, G. Piacentino, and G. Constantin, "The blood-brain barrier in Alzheimer's disease," *Neurobiol. Dis.*, vol. 107, pp. 41–56, 2017.
- [36] S. Van Damme, W. Langenaeker, and P. Bultinck, "Prediction of blood-brain partitioning: A model based on ab initio calculated quantum chemical descriptors," *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 26, no. 8, pp. 1223–1236, 2008.
- [37] A. S. Dyabina, E. V. Radchenko, V. A. Palyulin, and N. S. Zefirov, "Prediction of blood-brain barrier permeability of organic compounds," *Dokl. Biochem. Biophys.*, vol. 470, no. 1, pp. 371–374, 2016.
- [38] Y. Yuan, F. Zheng, and C. G. Zhan, "Improved Prediction of Blood–Brain Barrier Permeability Through Machine Learning with Combined Use of Molecular Property-Based Descriptors and Fingerprints," *AAPS J.*, vol. 20, no. 3, pp. 15–17, 2018.
- [39] M. A. Kaisar, R. K. Sajja, S. Prasad, V. V. Abhyankar, T. Liles, and L. Cucullo, "New experimental models of the blood-brain barrier for CNS drug discovery," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 12, no. 1, pp. 89–103, 2017.
- [40] A. Montagne, Z. Zhao, and B. V. Zlokovic, "Montagne2017," pp. 1–19, 2017.
- [41] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 7, no. 2, pp. 88–95, Jul. 1961.

- [42] S. Di Giovanni *et al.*, "In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 33, no. 2, pp. 109–119, 2008.
- [43] S. López, J. Bastida, F. Viladomat, and C. Codina, "Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts," *Life Sci.*, vol. 71, no. 21, pp. 2521–2529, 2002.
- [44] I. K. Rhee, M. Van De Meent, K. Ingkaninan, and R. Verpoorte, "Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining," *J. Chromatogr. A*, vol. 915, no. 1–2, pp. 217–223, 2001.
- [45] S. Bernardini, A. Tiezzi, V. Laghezza Masci, and E. Ovidi, "Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches," *Nat. Prod. Res.*, vol. 32, no. 16, pp. 1926–1950, 2018.
- [46] T. C. Dos Santos, T. M. Gomes, B. A. S. Pinto, A. L. Camara, and A. M. De Andrade Paes, "Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy," *Front. Pharmacol.*, vol. 9, no. OCT, pp. 1–14, 2018.
- [47] M. Decker, *Design of Hybrid Molecules for Drug Development*. Elsevier Inc., 2017.
- [48] M. I. Fernández-Bachiller *et al.*, "Novel tacrine-8-hydroxyquinoline hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimers disease, with neuroprotective, cholinergic, antioxidant, and copper-complexing properties," *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 13, pp. 4927–4937, 2010.
- [49] N. Sharma, U. K. Sharma, and E. V. Van Der Eycken, "Microwave-Assisted Organic Synthesis: Overview of Recent Applications," *Green Tech. Org. Synth. Andm. Chem.*, vol. Second Edi, pp. 441–468, 2018.
- [50] C. O. Kappe, "Controlled microwave heating in modern organic synthesis," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 43, no. 46, pp. 6250–6284, 2004.
- [51] M. Priyanka and S. L. Garg, "Benefits of microwave-assisted organic synthesis over conventional methods in synthetic chemistry," *Res. J. Chem. Environ.*, vol. 23, no. 4, pp. 103–108, 2019.

- [52] C. O. Kappe, A. Stadler, and D. Dallinger, *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH., vol. 52. Weinheim, Alemania, 2012.
- [53] Taylor M; Atri B; Minhas S., "Intellectual Property Developments in Microwave Chemistry," *Evalueserve*, pp. 1–50, 2005.
- [54] S. Caddick, "Microwave Assisted Organic Reactions," *Tetrahedron*, vol. 51, no. 38, pp. 10403–10432, 1995.
- [55] S. A. Galema, "Microwave chemistry," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 26, no. 3, p. 233, 1997.
- [56] P. Nilsson, M. Larhed, and A. Hallberg, "Highly regioselective, sequential, and multiple palladium-catalyzed arylations of vinyl ethers carrying a coordinating auxiliary: An example of a heck triarylation process," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 34, pp. 8217–8225, 2001.
- [57] A. S. Grewal, K. Kumar, S. Redhu, and S. Bhardwaj, "MICROWAVE ASSISTED SYNTHESIS: A GREEN CHEMISTRY APPROACH," *Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci.*, vol. 3, no. 5, pp. 278–285, 2013.
- [58] C. O. Kappe and D. Dallinger, "Controlled microwave heating in modern organic synthesis: Highlights from the 2004-2008 literature," *Mol. Divers.*, vol. 13, no. 2, pp. 71–193, 2009.

CAPÍTULO II

Objetivos

II OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es contribuir al descubrimiento nuevos derivados sintetizados a partir de compuestos de origen natural o de estructuras análogas, que presenten actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (ACE) y/o butirilcolinesterasa (BuCE), de potencial interés para el desarrollo de fármacos.

Los inhibidores de colinesterasa, que pueden pertenecer a distintos grupos de compuestos, encuentran aplicación como drogas para la terapia de la Enfermedad de Alzheimer (EA) u otras enfermedades neurodegenerativas que involucran la función colinérgica.

Teniendo en cuenta lo anterior se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- * Llevar a cabo el diseño racional y síntesis de nuevos compuestos análogos de productos naturales que sean capaces de inhibir, mediante interacción dual con el sitio activo catalítico (CAS) y el sitio aniónico periférico (PAS), las enzimas ACE y BuCE
- * Optimizar las etapas sintéticas (reducción de los tiempos de reacción y aumento de los rendimientos) mediante la implementación de reacciones asistidas por microondas.
- * Cuantificar la inhibición de las enzimas ACE y BuCE de los compuestos obtenidos, determinando su IC_{50} (concentración que inhibe la actividad de la enzima al 50%).
- * Evaluar el tipo de inhibición enzimática (estudio cinético enzimático) por el cual los compuestos interaccionan con ACE y BuCE.
- * Realizar el estudio de modelado molecular con los inhibidores más activos para estudiar *in silico* la interacción de cada uno de ellos con las enzimas.
- * Estudiar la capacidad de fotoisomerización $E \rightarrow Z$ de derivados fotomodulables, mediante espectroscopia UV-Visible y RMN de 1H . Determinar y comparar la potencia de inhibición enzimática del isómero *E* y *Z*.

Durante el desarrollo del trabajo de Tesis, y a raíz de una estancia de investigación en la Universidade do Rio Grande do Sul, bajo la dirección del profesor Marco Antonio Ceschi, surgió el siguiente objetivo secundario:

- * Síntesis y caracterización de dímeros de bis(n)-lofinas como inhibidores de ACE y BuCE.

CAPÍTULO III

Análogos de azaetilbena

III ANÁLOGOS DE AZAESTILBENO

III.1 Obtención de análogos de azaestilbeno como inhibidores de ACE y BuCE

III.1.1 Descripción general y objetivos

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural con una estructura de estilbeno. Su estructura base consiste en la unión de 2 anillos fenólicos por un doble enlace estireno que forman el 3,5,4'-trihidroxiestilbeno. Este doble enlace es el responsable de sus formas isoméricas *cis* y *trans* (Figura 23). El resveratrol se presenta ampliamente en alimentos y plantas medicinales y es conocido por ejercer una variedad de actividades biológicas prometedoras, incluyendo propiedades antiinflamatorias, neuroprotectoras, anticancerígenas y antioxidantes [1]–[3]. En los alimentos naturales, plantas o el vino, coexisten los isómeros *cis*- y *trans*- del resveratrol, sin embargo, la forma natural mayoritaria y más estable desde su punto de vista estérico, es el isómero *trans*- [4].

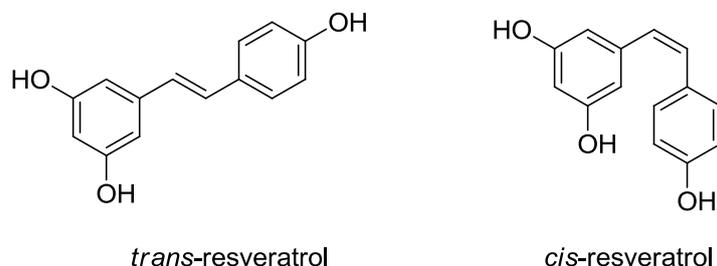


Figura 23. Estructura química del *trans*-resveratrol y el *cis*-resveratrol.

Recientemente, varios estudios han demostrado que el *trans*-resveratrol puede contrarrestar la toxicidad del péptido A β por sus propiedades antioxidantes en modelos celulares y que puede inhibir su agregación y evitar la formación de placas seniles, en modelos animales [5]–[7]. Sus propiedades neuroprotectoras lo llevaron a encontrarse actualmente en estudios de fase II y fase III en pacientes con EA [8], [9]. Aunque el resveratrol posee propiedades biológicas de gran importancia, también presenta parámetros farmacocinéticos limitados [10]. Esta limitación ha llevado al desarrollo de múltiples estrategias que buscan aumentar su biodisponibilidad y/o solubilidad, mediante la síntesis de análogos o derivados de resveratrol y de análogos de azaresveratrol (bases de Schiff sustituidas con hidroxilo) (Figura 24).



Figura 24. Estructuras químicas del resveratrol, azaresveratrol y de un análogo hidroxilado de azaestilbeno.

Las iminas, conocidas como bases de Schiff cuando son sustituidas, presentan un enlace C=N que de forma análoga al C=C, puede presentar isomería geométrica (*E/Z*). El aislamiento de las dos formas geométricas de una misma imina se encuentra dificultado, ya que ambos isómeros en solución, alcanzan rápidamente el equilibrio. Esto pudo lograrse por primera vez por Damrauer y Rutledge [11] para iminas derivadas de benzofenonas asimétricamente sustituidas. Por otro lado, Mekheimer y colaboradores reportaron el aislamiento y caracterización por RMN de los isómeros *E* y *Z* de bases de Schiff aromáticas, donde los espectros de RMN de ^1H mostraron desplazamientos menores para la señal ($-\text{CH}=\text{N}$) de los isómeros *Z* ($\delta \approx 8,14$ ppm) en comparación con la señal de los isómeros *E* ($\delta \approx 8,43$ ppm) [12].

Los análogos de azaresveratrol han cobrado gran importancia en los últimos años ya que han demostrado presentar interesante actividad antioxidante y anti cancerígena [13], [14]. También, se ha reportado la capacidad significativa de estos compuestos de inhibir la agregación del péptido A β autoinducida e inducida por Cu^{2+} , y su funcionalidad como potenciales antioxidantes y quelantes de biometales [15].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, pensamos que el *trans*-azaresveratrol puede ser una estructura de partida adecuada en el diseño de medicamentos multifuncionales para el tratamiento de la EA. Esto nos llevó a proponernos como objetivo el descubrimiento y desarrollo de una nueva serie de derivados de azaestilbeno que podrían emplearse como agentes multifuncionales de potencial aplicación en la EA.

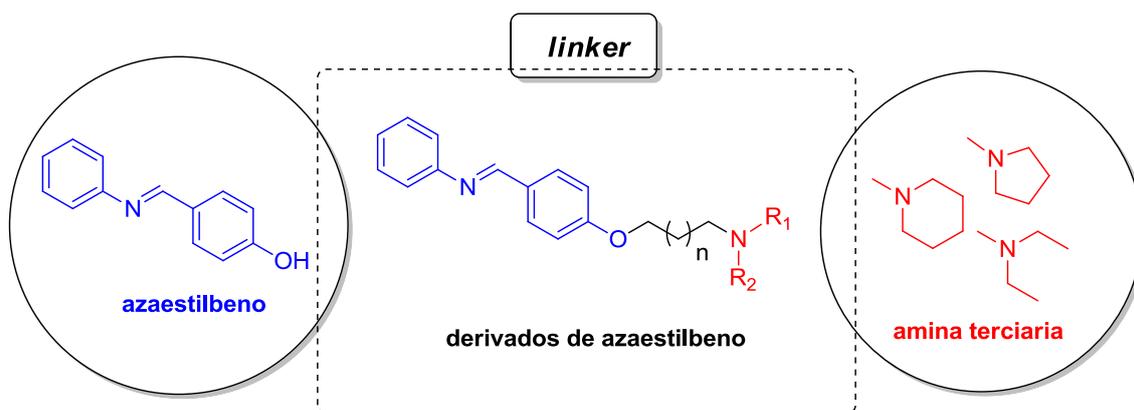
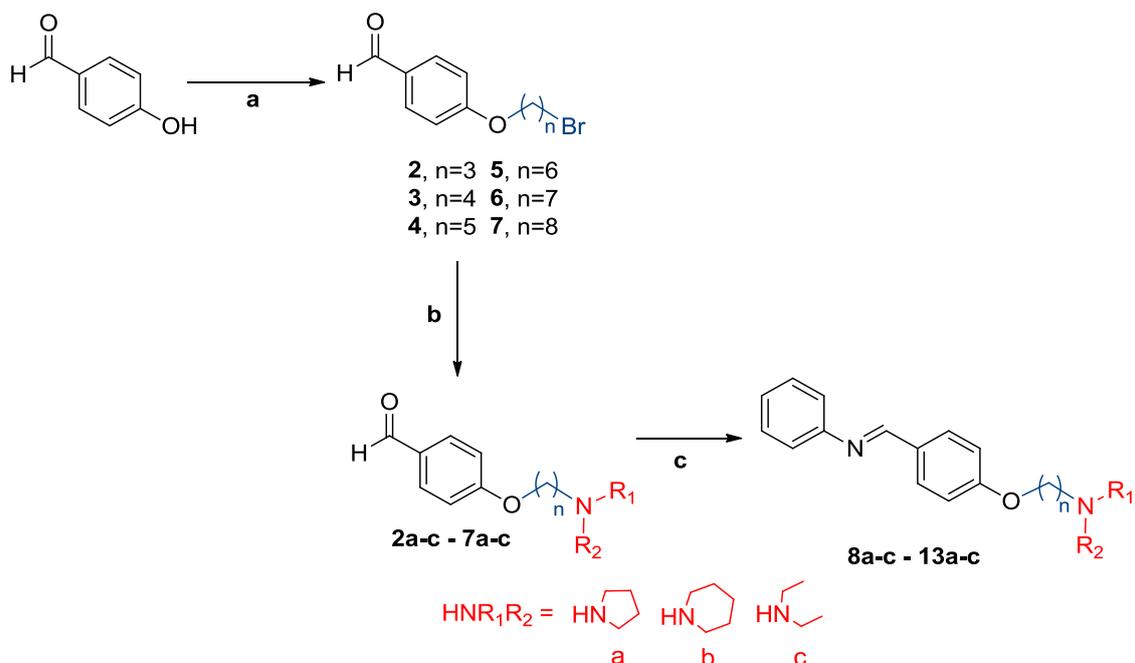


Figura 25. Diseño de derivados de azaestilbeno como agentes multifuncionales para la terapia de la EA.

Se trabajó sobre la hipótesis de que al incorporar una cadena hidrocarbonada unida a una amina terciaria, a una estructura que se sabe presenta una importante actividad biológica, incrementaría su actividad inhibitoria enzimática. Se decidió entonces diseñar y sintetizar una serie de análogos de azaestilbeno que actúen como inhibidores duales de ACE, es decir, que se unan tanto al CAS como al PAS de la enzima, conectando la estructura de azaestilbeno con aminas terciarias a través de espaciadores de distinta longitud (Figura 25). A pH fisiológico, el grupo amino protonado podría interaccionar con el CAS de ACE, mientras que la porción aromática podría interaccionar con el PAS de la enzima. A su vez, la variación de la longitud del espaciador podría afectar la capacidad del inhibidor de interaccionar simultáneamente con estos sitios y por lo tanto, afectar la potencia de inhibición. Esta estrategia ha sido empleada con éxito previamente en el grupo [16].

La preparación de los compuestos propuestos se llevó a cabo mediante la síntesis asistida por microondas (CEM Discover) de *p*-(ω -aminoalcoxi)-benzaldehídos partiendo de *p*-hidroxibenzaldehído y α,ω -dibromoalcanos de 3 a 8 metilenos, seguido de la sustitución del bromuro por la correspondiente amina secundaria (pirrolidina, piperidina y dietilamina). Posteriormente, se obtuvieron los distintos derivados de azaestilbeno por una reacción de condensación con anilina (Esquema 1). Este protocolo basado en tres pasos de síntesis asistida por microondas presentó ventajas frente al método de síntesis convencional tales como importante reducción en los tiempos de reacción, altos rendimientos y simple purificación.



Esquema 1. Síntesis de los derivados **8a-c – 13a-c**. a) $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{Br}$, K_2CO_3 , acetonitrilo, MW; b) HNR_1R_2 , K_2CO_3 , DMF, MW; c) anilina, etanol, MW.

III.1.2 Optimización de la síntesis mediante el uso de microondas

III.1.2.1 Optimización de la obtención de los intermediarios alquilbromados 2-4

En una primera instancia la obtención de los compuestos **2-4** se llevó a cabo mediante calentamiento convencional en acetona, a reflujo por 2 horas. Para esta reacción fue necesario un importante exceso del dibromoalcano correspondiente, en una relación *p*-hidroxibenzaldehído:dibromoalcano 1:5 para evitar la formación de subproducto generado por el ataque del fenóxido a ambos extremos del dibromoalcano [17], [18]. Con el objetivo de optimizar esta etapa de síntesis, se adaptaron los parámetros de reacción para llevar a cabo la síntesis asistida por microondas según lo reportado en bibliografía para reacciones similares [19]: el solvente fue cambiado por acetonitrilo, se trabajó a una temperatura de 80°C con una potencia de 150 watts, siguiendo la reacción por cromatografía en capa fina (TLC). Mediante la utilización del equipo de microondas se logró reducir los tiempos de reacción de 2 h a 10 minutos, con buenos rendimientos. Además, la síntesis asistida por microondas de **2-7** permitió también reducir significativamente la relación de reactivos *p*-hidroxibenzaldehído:dibromoalcano a 1:2, obteniendo un rendimiento de reacción similar o mejor y evitando el uso de un importante exceso del dibromoalcano (**Tabla 6**).

Tabla 6. Optimización de la reacción **a** (Esquema 1) por método de microondas.

COMPUETOS	MÉTODO CONVENCIONAL*			MÉTODO DE MICROONDAS**			
	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Rdto (%)	Potencia (watt)	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Rdto (%)
2	Reflujo	2	42	150	80	10	40
3	Reflujo	2	40	150	80	10	45
4	Reflujo	2	43	150	80	10	50

*Relación *p*-hidroxibenzaldehído:dibromoalcano 1:5** Relación *p*-hidroxibenzaldehído:dibromoalcano 1:2**III.1.2.2 Optimización de la obtención de los intermediarios 2a-c – 4a-c**

Los compuestos **2-4** se hicieron reaccionar con la correspondiente amina mediante calentamiento convencional a 40°C, en dimetilformamida (DMF) por 24 horas para dar los intermediarios aminoalquílicos **2a-c – 4a-c** con rendimientos muy buenos. Reemplazando el calentamiento convencional por microondas y siguiendo la reacción por TLC hasta observar ausencia del reactivo de partida, se logró reducir el tiempo a solo minutos (5 a 40 min) y con excelentes rendimientos, como se puede ver en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Optimización de la reacción **b** (Esquema 1) por método de microondas.

COMPUETOS	MÉTODO CONVENCIONAL*			MÉTODO DE MICROONDAS*			
	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Rdto (%)	Potencia (watt)	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Rdto (%)
2a	40°C	24	88	150	130	5	89
3a	40°C	24	94	150	130	8	93
4a	40°C	24	95	150	130	5	95
2b	40°C	24	80	150	80	10	89
3b	40°C	24	96	150	80	10	93
4b	40°C	24	75	150	80	5	95
2c	40°C	24	95	150	80	30	96
3c	40°C	24	95	150	80	30	95
4c	40°C	24	70	150	80	35	90

*Relación intermediario aminoalquílico:amina 1:3

III.1.2.3 Optimización de la obtención de los derivados 8a-c – 10a-c

Los intermediarios **2a-c – 4a-c** se hicieron reaccionar con anilina en una relación aldehído:anilina 1:1,1 mediante calentamiento convencional, en etanol a reflujo, por un tiempo de 24 a 48 hs. Nuevamente, con la intención de disminuir los prolongados tiempos de reacción, esta reacción fue llevada a cabo en el equipo de microondas para dar los compuestos **8a-c – 10a-c**. Mediante la síntesis asistida por microondas, y mediante el seguimiento por RMN de ^1H hasta observar la desaparición de la señal característica del aldehído de partida, se logró obtener los compuestos deseados en tiempos totales de 1 a 2 hs (**Tabla 8**).

Tabla 8. Optimización de la reacción **c** (Esquema 1) por método de microondas.

COMPUETOS	MÉTODO CONVENCIONAL*			MÉTODO DE MICROONDAS*			
	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Rdto (%)	Potencia (watt)	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Rdto (%)
8a	Reflujo	24	88	150	90	40	95
9a	Reflujo	24	94	150	90	40	87
10a	Reflujo	48	95	150	90	60	94
8b	Reflujo	24	80	150	90	60	94
9b	Reflujo	36	96	150	90	60	95
10b	Reflujo	48	75	150	90	80	93
8c	Reflujo	24	95	150	100	30	96
9c	Reflujo	36	95	150	100	40	94
10c	Reflujo	48	70	150	100	80	90

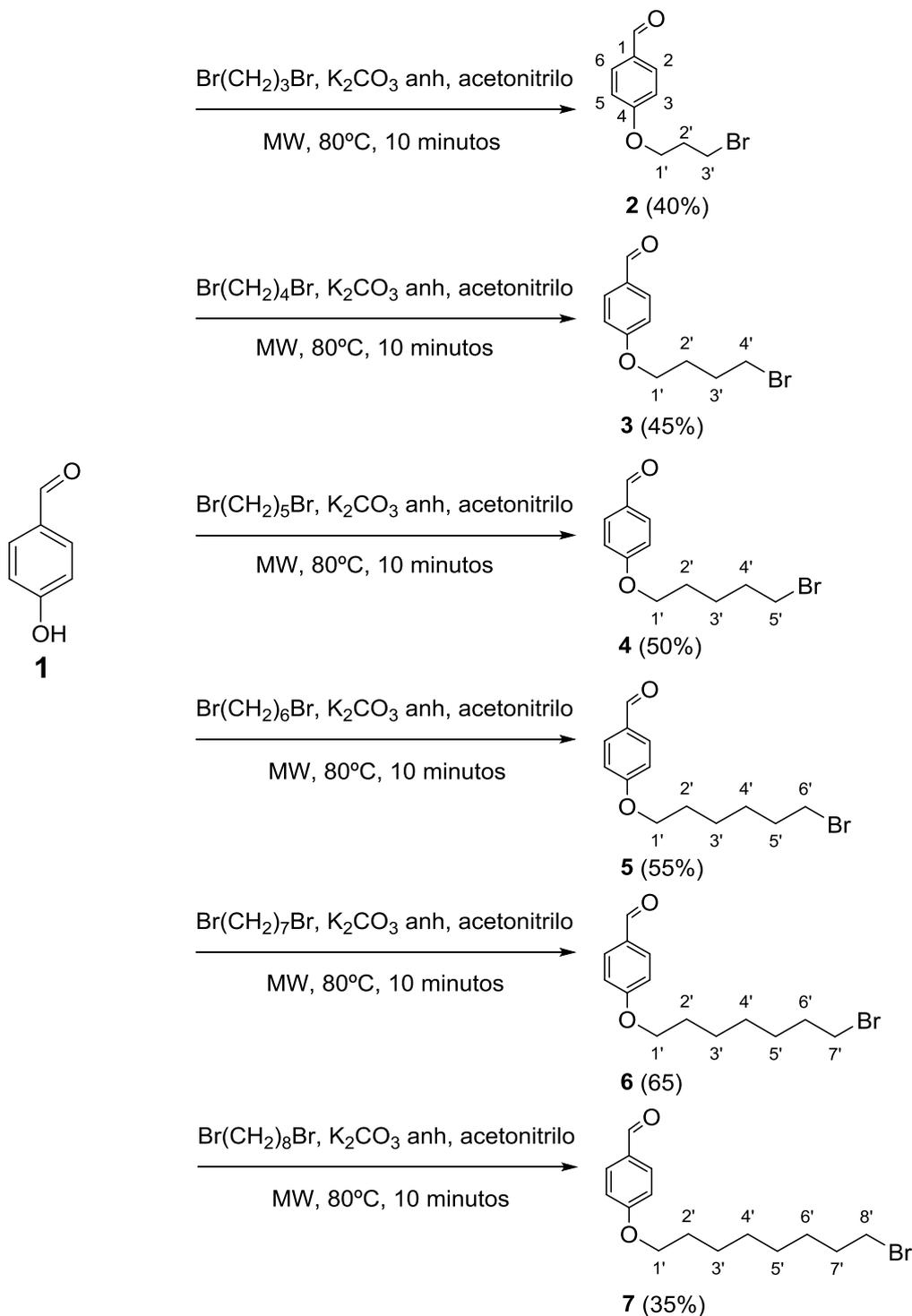
*Relación aldehído:anilina 1:1,5

De acuerdo con lo detallado para las tres técnicas mencionadas, se decidió continuar con la síntesis asistida por microondas del resto de los intermediarios **5-7**, **5a-c – 7a-c** necesarios para la obtención de los derivados de azaestilbeno **8a-c – 13a-c**, teniendo en cuenta las ventajas de la utilización del equipo de microondas para estas reacciones, en reemplazo del calentamiento convencional.

III.1.3 Intermediarios alquilbromados 2 - 7

El tratamiento de *p*-hidroxibenzaldehído con los correspondientes α,ω -dibromoalcanos produjo los intermediarios alquilbromados necesarios para la síntesis de los

compuestos de interés **2-7**, con rendimientos de 35 a 65%. En el **Esquema 2** se detalla la formación de todos los intermediarios, que poseen una cadena alquílica de dos a ocho átomos de carbono, unida al oxígeno del anillo aromático.



Esquema 2. Preparación de intermediarios **2-7**.

Las **Tabla 9** y **Tabla 10** muestran los desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C de los intermediarios **2-7**. Los compuestos presentaron las señales correspondientes al anillo

aromático sustituido en posición *para*, la señal propia del aldehído y las adicionales correspondientes a los grupos metilenos de las diferentes cadenas alquílicas, que confirmaron la unión de estas a la porción aromática. Así, en los espectros de RMN de ^1H de todos los compuestos se presentaron las señales a campo bajo (en la zona de aromáticos) de dos dobletes H2/H6 y H3/H5, y un singlete correspondiente a COH. En el espectro de RMN de ^1H de **2** se observaron dos tripletes de H1' y H3' y un quintuplete de H2', en el de **3** las cuatro señales de H1', H2', H3' y H4', en el de **4** las señales indicativas de la cadena de cinco carbonos H1'-H5; las seis señales de H1'-H6' fueron las adicionales en el espectro de **5**, así como H1'-H7' fueron para el de **6** y H1'-H8' para **7** (Tabla 9). En el espectro de RMN de ^{13}C de todos los derivados se asignaron las señales del anillo aromático: C1, C2/C6, C3/C5, C4 y la correspondiente al carbono del aldehído COH. Además, se identificaron las señales de las posiciones C1', C2' y C3' para **2**, C1'-C4' para **3**, C1'-C5' para **4**, C1'-C6' para **5**, C1'-C7' para **6** y C1'-C8' en el caso de **7** (Tabla 10).

Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **2-7**. En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm (*multiplicidad, J* en Hz).

POSICIÓN	2	3	4	5	6	7
2/6	7,83 (<i>d</i> , 8,8)	7,83 (<i>d</i> , 8,7)	7,82 (<i>d</i> , 8,8)	7,83 (<i>d</i> , 8,8)	7,83 (<i>d</i> , 8,8)	7,83 (<i>d</i> , 8,7)
3/5	7,01 (<i>d</i> , 8,7)	6,99 (<i>d</i> , 8,7)	6,99 (<i>d</i> , 8,7)	6,99 (<i>d</i> , 8,7)	6,99 (<i>d</i> , 8,7)	6,99 (<i>d</i> , 8,7)
COH	9,88 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)	9,87 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)
1'	4,19 (<i>t</i> , 5,8)	4,08 (<i>t</i> , 5,8)	4,05 (<i>t</i> , 6,4)	4,05 (<i>t</i> , 6,4)	4,04 (<i>t</i> , 6,4)	4,04 (<i>t</i> , 6,5)
2'	2,35 (<i>q</i> , 6,1)	2,16 – 1,92 (<i>os</i>) ^a	2,00 – 1,79 (<i>os</i>)	1,96 – 1,78 (<i>os</i>)	1,95 – 1,75 (<i>os</i>)	1,96 – 1,72 (<i>os</i>)
3'	3,61 (<i>t</i> , 6,4)	2,16 – 1,92 (<i>os</i>)	1,70 – 1,56 (<i>m</i>)	1,56 – 1,48 (<i>os</i>)	1,56 – 1,32 (<i>os</i>)	1,52 – 1,34 (<i>os</i>)
4'		3,50 (<i>t</i> , 6,3)	2,00 – 1,79 (<i>os</i>)	1,56 – 1,48 (<i>os</i>)	1,56 – 1,32 (<i>os</i>)	1,52 – 1,34 (<i>os</i>)
5'			3,44 (<i>t</i> , 6,7)	1,96 – 1,78 (<i>os</i>)	1,56 – 1,32 (<i>os</i>)	1,52 – 1,34 (<i>os</i>)
6'				3,43 (<i>t</i> , 6,7)	1,95 – 1,75 (<i>os</i>)	1,52 – 1,34 (<i>os</i>)
7'					3,42 (<i>t</i> , 6,8)	1,96 – 1,72 (<i>os</i>)
8'						3,42 (<i>t</i> , 6,8)

^aos = señal superpuesta

Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **2-7**. En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (*multiplicidad*).

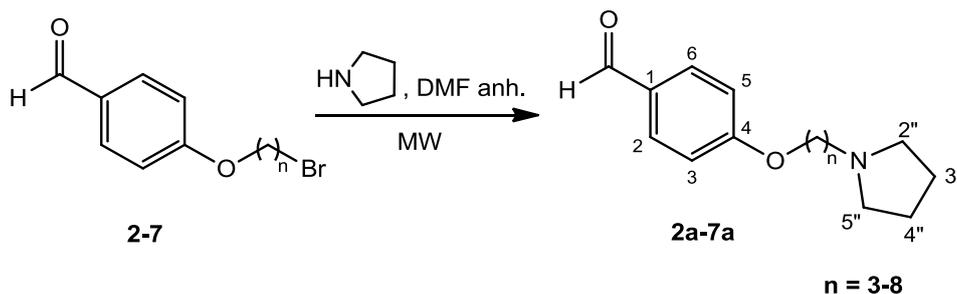
POSICIÓN	2	3	4	5	6	7
1	130,1 (s)	130,0 (s)	129,9 (s)	129,8 (s)	130,0 (s)	129,9 (s)
2/6	132,0 (d)	132,1 (d)	132,0 (d)	132,1 (d)	132,1 (d)	132,1 (d)
3/5	114,8 (d)	114,8 (d)	114,8 (d)	114,9 (d)	114,9 (d)	114,9 (d)
4	163,7 (s)	164,0 (s)	164,0 (s)	164,3 (s)	164,3 (s)	164,4 (s)
COH	190,7 (d)	190,9 (d)	190,8 (d)	190,9 (d)	190,9 (d)	191,0 (d)
1'	65,6 (t)	67,3 (t)	68,0 (t)	68,3 (t)	68,4 (t)	68,5 (t)
2'	29,7 (t)	29,4 (t)	28,2 (t)	29,0 (t)	29,1 (t)	29,3 (t)
3'	32,0 (t)	27,8 (t)	24,8 (t)	25,4 (t)	28,2 (t)	28,8 (t)
4'		33,4 (t)	32,4 (t)	28,0 (t)	26,0 (t)	26,0 (t)
5'			33,6 (t)	32,7 (t)	28,6 (t)	28,2 (t)
6'				33,8 (t)	32,8 (t)	29,1 (t)
7'					34,0 (t)	32,9 (t)
8'						34,1 (t)

III.1.4 Derivados con pirrolidina (**2a - 7a**)

Para obtener los derivados con espaciadores de tres a ocho átomos de carbono y pirrolidina como amina secundaria, se hicieron reaccionar **2-7** con la mencionada amina (**Esquema 3**). Los rendimientos fueron muy buenos (80-90%). La asignación completa de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C se informan en las **Tabla 11** y **Tabla 12**, respectivamente. Los detalles de tiempos de reacción y rendimientos para cada una de las reacciones se describen en el capítulo VII.

Los espectros de RMN de ^{13}C de los productos **2a-7a** mostraron dos señales adicionales más intensas, que fueron asignadas a la porción amino, $\text{C}2''/\text{C}5''$ y $\text{C}3''/\text{C}4''$ (**Tabla 12**). Asimismo, se observó en todos los casos una señal con un desplazamiento a campo bajo de la señal correspondiente al metileno de la cadena alquílica unido al nitrógeno de la amina: $\text{C}3'$ para **2a**, $\text{C}4'$ para **3a**, $\text{C}5'$ para **4a**, $\text{C}6'$ para **5a**, $\text{C}7'$ para **6a** y $\text{C}8'$ para **7a**. En el espectro de ^1H fueron identificadas las señales del anillo de pirrolidina ($\text{H}2''/\text{H}5''$ y $\text{H}3''/\text{H}4''$) junto con la señal del metileno de la cadena espaciadora unido a la amina, que en comparación con la señal de $\text{CH}_2\text{-Br}$ del reactivo de partida, se encuentra desplazada a campos altos en todos los derivados.

Se observó también el desplazamiento a campo alto de las señales asignadas a H2', H3', H4', H5', H6' y H7', para los derivados **2a**, **3a**, **4a**, **5a**, **6a**, **7a**, respectivamente (Tabla 11)



Esquema 3. Obtención de derivados **2a-7a**.

Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **2a-7a**. En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm (*multiplicidad*, *J* en Hz).

POSICIÓN	2a	3a	4a	5a	6a	7a
2/6	7,83 (<i>d</i> , 8,7)	7,82 (<i>d</i> , 8,7)	7,82 (<i>d</i> , 8,7)	7,83 (<i>d</i> , 8,8)	7,83 (<i>d</i> , 8,7)	7,83 (<i>d</i> , 8,7)
3/5	7,00 (<i>d</i> , 8,7)	6,98 (<i>d</i> , 8,7)	6,98 (<i>d</i> , 8,7)	6,99 (<i>d</i> , 8,7)	6,99 (<i>d</i> , 8,7)	6,99 (<i>d</i> , 8,7)
COH	9,88 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)	9,87 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)
1'	4,12 (<i>t</i> , 6,4)	4,07 (<i>t</i> , 6,3)	4,04 (<i>t</i> , 6,4)	4,04 (<i>t</i> , 6,5)	4,03 (<i>t</i> , 6,5)	4,03 (<i>t</i> , 6,5)
2'	2,04 (<i>q</i> , 6,1)	1,91 – 1,67 (<i>os</i>) ^a	1,91 – 1,77 (<i>os</i>)	1,88 – 1,74 (<i>os</i>)	1,85 – 1,76 (<i>os</i>)	1,82 – 1,75 (<i>os</i>)
3'	2,68 – 2,59 (<i>m</i>)	1,91 – 1,67 (<i>os</i>)	1,69 – 1,47 (<i>os</i>),	1,60 – 1,37 (<i>os</i>)	1,59 – 1,35 (<i>os</i>)	1,58 – 1,43 (<i>os</i>)
4'		2,58 – 2,51 (<i>os</i>)	1,69 – 1,47 (<i>os</i>)	1,60 – 1,37 (<i>os</i>)	1,59 – 1,35 (<i>os</i>)	1,40 – 1,32 (<i>os</i>)
5'			2,56 – 2,45 (<i>os</i>)	1,60 – 1,37 (<i>os</i>)	1,59 – 1,35 (<i>os</i>)	1,40 – 1,32 (<i>os</i>)
6'				2,52 – 2,41 (<i>os</i>)	1,59 – 1,35 (<i>os</i>)	1,40 – 1,32 (<i>os</i>)
7'					2,53 – 2,40 (<i>os</i>)	1,58 – 1,43 (<i>os</i>)
8'						2,46 – 2,39 (<i>m</i>)
2''/5''	2,53 (<i>t</i> , 6,5 Hz)	2,58 – 2,51 (<i>os</i>)	2,56 – 2,45 (<i>os</i>)	2,52 – 2,41 (<i>os</i>)	2,53 – 2,40 (<i>os</i>)	2,50 (<i>t</i> , 5,9)
3''/4''	1,83 – 1,76 (<i>m</i>)	1,91 – 1,67 (<i>os</i>)	1,91 – 1,77 (<i>os</i>)	1,88 – 1,74 (<i>os</i>)	1,85 – 1,76 (<i>os</i>)	1,82 – 1,75 (<i>os</i>)

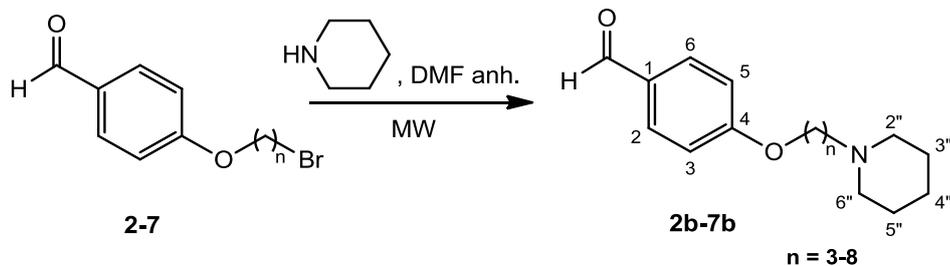
^aos = señal superpuesta

Tabla 12. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **2a-7a**. En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (*multiplicidad*).

POSICIÓN	2a	3a	4a	5a	6a	7a
1	129,9 (s)	129,9 (s)	129,9 (s)	129,9 (s)	129,8 (s)	129,9 (s)
2/6	132,1 (d)	132,1	132,1	132,1	132,0	132,1
3/5	114,9 (d)	114,9	114,8	114,9	114,8	114,9
4	164,3 (s)	164,3	164,3	164,4	164,2	164,4
COH	191,0 (d)	191,0	190,9	190,9	190,9	191,0
1'	67,0 (t)	68,3 (t)	68,3 (t)	68,5 (t)	68,2 (t)	68,5 (t)
2'	28,8 (t)	27,3 (t)	29,1 (t)	29,1 (t)	28,9 (t)	29,6 (t)
3'	53,1 (t)	25,5 (t)	24,2 (t)	26,1 (t)	25,8 (t)	28,8 (t)
4'		56,2 (t)	28,8 (t)	27,6 (t)	25,7 (t)	26,0 (t)
5'			56,5 (t)	29,1 (t)	26,8 (t)	27,8 (t)
6'				56,7 (t)	28,7 (t)	29,2 (t)
7'					55,6 (t)	29,2 (t)
8'						56,8 (t)
2''/5''	54,4 (t)	54,3 (t)	54,3 (t)	54,4 (t)	53,7 (t)	54,4 (t)
3''/4''	23,6 (t)	23,5 (t)	23,5 (t)	23,5 (t)	23,4 (t)	23,5 (t)

III.1.5 Derivados con piperidina (**2b – 7b**)

Al hacer reaccionar los intermediarios **2-7** con piperidina, se obtuvieron los derivados con cadena espaciadora de dos a ocho carbonos **2b-7b** (Esquema 4), con rendimientos de 85 a 93%. Los detalles de tiempos y rendimientos para cada reacción se detallan en el capítulo VII. La unión de la amina a la cadena alquílica se confirmó por la presencia de las señales H2''/H6'', H3''/H5'' y H4'' en los espectros de RMN ^1H de los derivados, así como el desplazamiento a campo alto de las señales del metileno del espaciador unido a piperidina (Tabla 13). También fueron desplazadas a campo alto las señales de H2', H4', H5', H6', H7', para los derivados **2b**, **4b**, **5b**, **6b**, **7b**, respectivamente, y a campo más bajo la señal de H3' para el derivado **3b** (Tabla 13). Las tres señales de RMN de ^{13}C de la porción piperidina de los derivados **2b-7b**, se observaron a δ_c 53,44-54,79 (C2''/C6''), δ_c 22,82-26,09 (C3''/C5'') y δ_c 24,61-21,00 (C4'') (Tabla 14). Además, se desplazaron a campo bajo las señales de metileno del espaciador unido a nitrógeno (que antes estaba unido a bromo), y a campo alto las señales correspondientes a C2', C3', C4', C5', C6', y C7' en los espectros de los derivados **2b-7b**, respectivamente (Tabla 14).



Esquema 4. Obtención de derivados **2b-7b**.

Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **2b-7b**. En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm (*multiplicidad*, *J* en Hz).

POSICIÓN	2b	3b	4b	5b	6b	7b
2/6	7,82 (<i>d</i> , 8,7)	7,83 (<i>d</i> , 8,5)	7,82 (<i>d</i> , 8,8)	7,82 (<i>d</i> , 8,7)	7,83 (<i>d</i> , 8,7)	7,83 (<i>d</i> , 8,7)
3/5	7,00 (<i>d</i> , 8,7)	6,98 (<i>d</i> , 8,5)	6,98 (<i>d</i> , 8,7)	6,98 (<i>d</i> , 8,7)	6,99 (<i>d</i> , 8,7)	6,99 (<i>d</i> , 8,7)
COH	9,88 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)
1'	4,10 (<i>t</i> , 6,4)	4,10 (<i>t</i> , 5,8)	4,04 (<i>t</i> , 6,5)	4,03 (<i>t</i> , 6,5)	4,03 (<i>t</i> , 6,5)	4,03 (<i>t</i> , 6,5)
2'	2,01 (<i>q</i> , 6,6)	1,93 (<i>q</i> , 6,7)	1,84 (<i>q</i> , 6,6)	1,82 (<i>q</i> , 6,6)	1,81 (<i>q</i> , 6,5)	1,81 (<i>q</i> , 6,6)
3'	2,53 – 2,44 (<i>m</i>)	2,24 – 2,01 (<i>os</i>) ^a	1,65 – 1,40 (<i>os</i>)	1,65 – 1,33 (<i>os</i>)	1,54 - 1,26 (<i>os</i>)	1,52 – 1,28 (<i>os</i>)
4'		3,20 – 2,99 (<i>os</i>)	1,65 – 1,40 (<i>os</i>)	1,65 – 1,33 (<i>os</i>)	1,54 - 1,26 (<i>os</i>)	1,52 – 1,28 (<i>os</i>)
5'			2,42 – 2,26 (<i>os</i>)	1,65 – 1,33 (<i>os</i>)	1,54 - 1,26 (<i>os</i>)	1,52 – 1,28 (<i>os</i>)
6'				2,43 – 2,27 (<i>os</i>)	1,54 - 1,26 (<i>os</i>)	1,52 – 1,28 (<i>os</i>)
7'					2,54 – 2,48 (<i>os</i>)	1,52 – 1,28 (<i>os</i>)
8'						2,37 - 2,24 (<i>os</i>)
2''/6''	2,41 (<i>sa</i>) ^b	3,20 – 2,99 (<i>os</i>)	2,42 – 2,26 (<i>os</i>)	2,43 – 2,27 (<i>os</i>)	2,54 – 2,48 (<i>os</i>)	2,37 - 2,24 (<i>os</i>)
3''/5''	1,65 – 1,53 (<i>m</i>)	2,24 – 2,01 (<i>os</i>)	1,65 – 1,40 (<i>os</i>)	1,65 – 1,33 (<i>os</i>)	1,59 (<i>q</i> , 5,6)	1,59 (<i>q</i> , 5,6)
4''	1,51 – 1,41 (<i>m</i>)	1,68 (<i>m</i>)	1,65 – 1,40 (<i>os</i>)	1,65 – 1,33 (<i>os</i>)	1,54 - 1,26 (<i>os</i>)	1,52 – 1,28 (<i>os</i>)

^a *os* = señal superpuesta

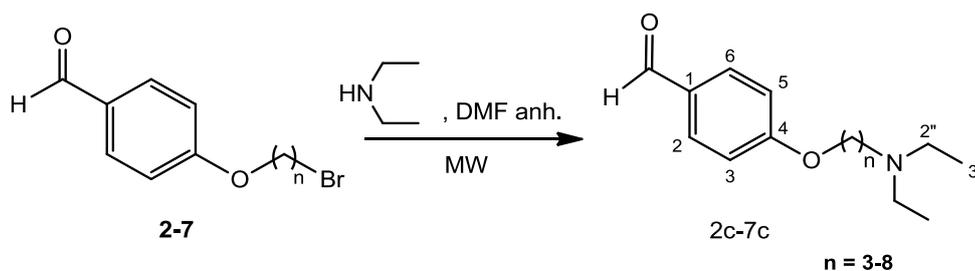
^b *sa* = singulete ancho

Tabla 14. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **2b-7b**. En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (*multiplicidad*).

POSICIÓN	2b	3b	4b	5b	6b	7b
1	129,9 (s)	130,1 (s)	129,9 (s)	129,3 (s)	129,9 (s)	129,9 (s)
2/6	132,1 (d)					
3/5	114,9 (d)	114,8 (d)	114,8 (d)	114,9 (d)	114,9 (d)	114,9 (d)
4	164,3 (s)	163,7 (s)	164,3 (s)	164,4 (s)	164,4 (s)	164,4 (s)
COH	190,9 (d)	191,0 (d)				
1'	67,0 (t)	67,4 (t)	68,3 (t)	68,4 (t)	68,5 (t)	68,5 (t)
2'	26,8 (t)	26,6 (t)	29,1 (t)	29,1 (t)	29,4 (t)	29,6 (t)
3'	55,9 (t)	22,2 (t)	24,6 (t)	26,0 (t)	27,8 (t)	29,2 (t)
4'		57,3 (t)	26,8 (t)	26,9 (t)	24,6 (t)	27,0 (t)
5'			59,5 (t)	27,5 (t)	26,9 (t)	26,0 (t)
6'				59,6 (t)	29,1 (t)	27,8 (t)
7'					59,7 (t)	29,4 (t)
8'						59,8 (t)
2"/6"	54,8 (t)	53,4 (t)	54,8 (t)	54,8 (t)	54,8 (t)	54,8 (t)
3"/5"	26,1 (t)	22,8 (t)	26,1 (t)	26,0 (t)	26,1 (t)	26,1 (t)
4"	24,5 (t)	21,0 (t)	24,2 (t)	24,6 (t)	24,6 (t)	24,6 (t)

III.1.6 Derivados con dietilamina (2c – 7c)

Con el propósito de obtener los derivados **2c-7c**, se trataron con dietilamina los respectivos intermediarios **2-7** (Esquema 5). Los rendimientos oscilaron entre 74 y 98%. Los detalles de tiempos y rendimientos para cada reacción se detallan en el capítulo VII. La presencia del grupo dietilamino se vio evidenciada en el espectro de RMN de ^1H de los compuestos **2c-7c** por la señal de un triplete de área seis entre δ_{H} 1,02 y 1,44 y un cuarteto de área cuatro entre δ_{H} 2,48 y 3,23 (excepto **2c** y **3c** en los que la señal estaba superpuesta) (Tabla 15). En el espectro de ^{13}C se observaron las señales respectivas en los rangos δ_{C} 8,67 y 11,93 y δ_{C} 46,84 y 47,15 (Tabla 16). Al igual que en los demás derivados, la unión de esta amina a la cadena alquílica provocó el desplazamiento de la señal del metileno ahora unido al nitrógeno, a campo bajo del espectro de RMN de ^{13}C (Tabla 16) y a campo alto en el espectro de RMN de ^1H (aunque en menor medida para los derivados **3c**, **4c** y **5c**) (Tabla 15). Conjuntamente, el espectro de RMN de ^1H mostró desplazamiento a campo alto de las señales de H2', H3', H4', H5', H6', H7' para los derivados **2c**, **3c**, **4c**, **5c**, **6c**, **7c**, respectivamente (Tabla 15). Las señales asignadas a C2' de **2c**, C3' de **3c**, C4' de **4c**, C5' de **5c**, C6' de **6c** y C7' de **7c** se desplazaron también a campo alto en los espectros de RMN de ^{13}C (Tabla 16).



Esquema 5. Obtención de derivados **2c-7c**.

Tabla 15. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **2c-7c**. En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm (*multiplicidad, J* en Hz).

POSICIÓN	2c	3c	4c	5c	6c	7c
2/6	7,81 (<i>d</i> , 8,8)	7,79 (<i>d</i> , 8,8)	7,82 (<i>d</i> , 8,8)	7,83 (<i>d</i> , 8,6)	7,82 (<i>d</i> , 8,8)	7,82 (<i>d</i> , 8,7)
3/5	6,99 (<i>d</i> , 8,7)	6,95 (<i>d</i> , 8,7)	6,97 (<i>d</i> , 8,7)	6,99 (<i>d</i> , 8,7)	6,99 (<i>d</i> , 8,7)	6,99 (<i>d</i> , 8,7)
COH	9,86 (<i>s</i>)	9,84 (<i>s</i>)	9,87 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)	9,88 (<i>s</i>)
1'	4,09 (<i>t</i> , 6,3)	4,07 (<i>t</i> , 5,8)	4,06 (<i>t</i> , 6,0)	4,05 (<i>t</i> , 6,2)	4,04 (<i>t</i> , 6,5)	4,03 (<i>t</i> , 6,5)
2'	1,94 (<i>q</i> , 13,2, 6,4)	1,90 (<i>q</i> , 13,9, 6,4)	2,04 – 1,82 (<i>os</i>)	1,98 – 1,78 (<i>os</i>)	1,82 (<i>q</i> , 6,6)	1,87 – 1,75 (<i>os</i>)
3'	2,64 – 2,49 (<i>os</i>) ^a	2,13 – 2,00 (<i>m</i>)	1,60 (<i>q</i> , 7,7)	1,63 – 1,38 (<i>os</i>)	1,52 – 1,31 (<i>os</i>)	1,51 – 1,27 (<i>os</i>)
4'		3,23 – 3,07 (<i>os</i>)	2,04 – 1,82 (<i>os</i>)	1,63 – 1,38 (<i>os</i>)	1,52 – 1,31 (<i>os</i>)	1,51 – 1,27 (<i>os</i>)
5'			3,09 – 2,99 (<i>m</i>)	1,98 – 1,78 (<i>os</i>)	1,52 – 1,31 (<i>os</i>)	1,51 – 1,27 (<i>os</i>)
6'				3,09 – 2,98 (<i>m</i>)	1,52 – 1,31 (<i>os</i>)	1,51 – 1,27 (<i>os</i>)
7'					2,46 – 2,35 (<i>m</i>)	1,87 – 1,75 (<i>os</i>)
8'						2,45 – 2,37 (<i>m</i>)
2''	2,64 – 2,49 (<i>os</i>)	3,23 – 3,07 (<i>os</i>)	3,16 (<i>c</i> , 7,0)	3,17 (<i>c</i> , 7,2)	2,52 (<i>c</i> , 7,2)	2,53 (<i>c</i> , 7,2)
3''	1,01 (<i>t</i> , 7,1)	1,41 (<i>t</i> , 7,3)	1,43 (<i>t</i> , 7,3)	1,44 (<i>t</i> , 7,3)	1,02 (<i>t</i> , 7,2)	1,02 (<i>t</i> , 7,2)

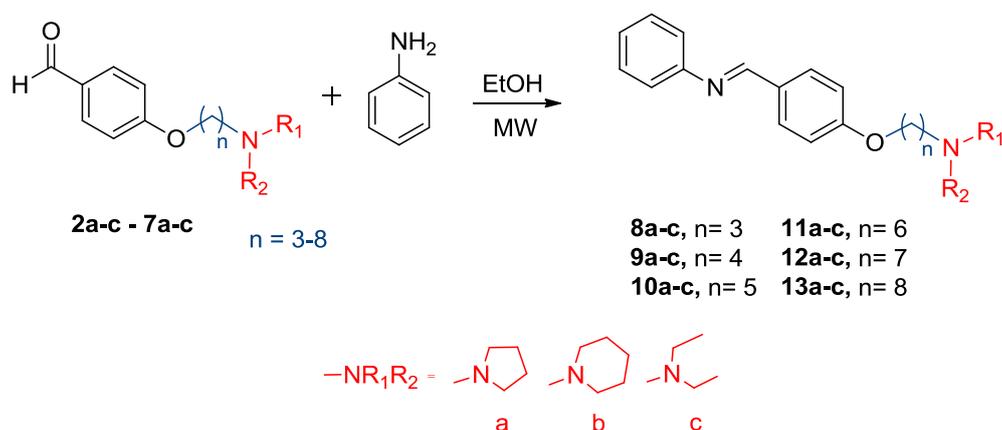
^a os = señal superpuesta

Tabla 16. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **2c-7c**. En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (*multiplicidad*).

POSICIÓN	2c	3c	4c	5c	6c	7c
1	129,9 (s)	130,2 (s)	130,1 (s)	130,0 (s)	129,9 (s)	129,8 (s)
2/6	132,1 (d)	132,1 (d)	132,1 (d)	132,1 (d)	132,2 (d)	132,1 (d)
3/5	114,9 (d)	114,8 (d)	114,8 (d)	114,8 (d)	114,9 (d)	114,8 (d)
4	164,3 (s)	163,6 (s)	164,0 (s)	164,1 (s)	164,4 (s)	164,4 (s)
COH	190,9 (d)					
1'	66,9 (t)	67,2 (t)	67,7 (t)	68,0 (t)	68,5 (t)	68,5 (t)
2'	27,1 (t)	26,5 (t)	28,6 (t)	28,9 (t)	29,4 (t)	29,6 (t)
3'	49,3 (t)	20,6 (t)	23,4 (t)	25,6 (t)	27,7 (t)	29,4 (t)
4'		51,3 (t)	23,7 (t)	23,4 (t)	27,1 (t)	27,0 (t)
5'			51,6 (t)	26,7 (t)	26,1 (t)	26,0 (t)
6'				51,5 (t)	29,1 (t)	27,6 (t)
7'					53,1 (t)	29,1 (t)
8'						53,0 (t)
2''	47,2 (t)	46,8 (t)	46,8 (t)	46,8 (t)	47,0 (t)	46,9 (t)
3''	11,9 (c)	8,7 (c)	8,7 (c)	8,7 (c)	11,7 (c)	11,7 (c)

III.1.7 Derivados azaestilbeno (8a-c – 13a-c) y evaluación de la actividad biológica

Con el objetivo de obtener una quimioteca de compuestos para ser evaluados como inhibidores de las enzimas ACE y BuCE se prosiguió con la última etapa de esta ruta sintética, la cual consistió en una reacción de condensación entre los distintos derivados *p*-(ω -aminoalcoxi)-benzaldehídos y anilina (Esquema 6). Los rendimientos variaron de buenos a muy buenos (80 a 95%). Los detalles de tiempos y rendimientos para cada reacción se detallan en el capítulo VII.



Esquema 6. Obtención de análogos de azaresveratrol.

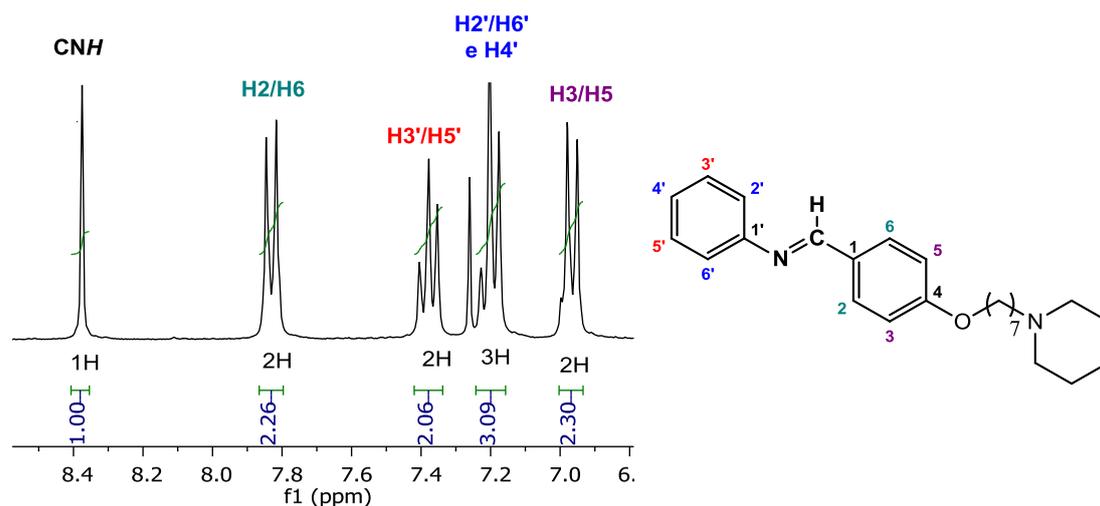


Figura 26. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz $-\text{CDCl}_3$) del compuesto **12b** – sección aromáticos.

La asignación completa de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C para cada uno de los compuestos obtenidos se informa a continuación, la cual se realizó teniendo en cuenta las correlaciones del espectro bidimensional de HSQC. En los espectros de RMN de ^1H todos los derivados presentaron a campo bajo (sección aromáticos) las señales adicionales características de la anilina. A su vez, la ausencia de la señal a δ_{H} 9.88 sirvió para identificar que

la reacción de condensación entre el aldehído y la anilina fue completa. Como se puede ver en la **Figura 26**, para el compuesto **12b** el espectro de RMN de ^1H presentó un singulete δ_{H} 8.37 (C=N-H), dos dobletes a δ_{H} 7.83 y 6.96 de H2/H6 y H3/5 respectivamente, un triplete a δ_{H} : 7.38 de área dos (H3'/5') y un multiplete de área 3 de los H2'/6' y H4' (señal superpuesta). Las señales fueron las correspondientes al isómero *trans*- del compuesto. No se encontraron señales a menores desplazamiento en la zona de aromáticos atribuibles al isómero *cis*- en ningún caso. El resto de los derivados presentaron esas mismas señales con mínimas diferencias en sus desplazamientos.

III.1.7.1 Derivados azaestilbeno con pirrolidina (8a – 13a)

Para obtener los derivados de azaestilbeno con cadena espaciadora de tres a ocho átomos de carbono unida a pirrolidina, se llevó a cabo la reacción de condensación entre los intermediarios **2a - 7a** y anilina. En la **Tabla 17** y **Tabla 18** se informa la asignación completa de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C para estos compuestos.

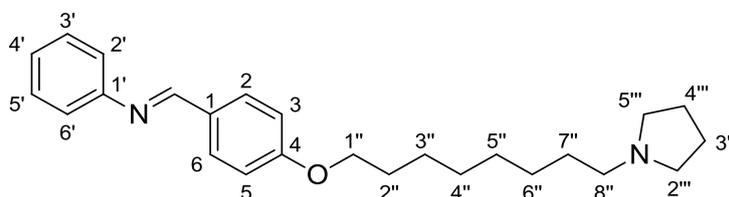


Tabla 17. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **8a-13a**. En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).

POSICIÓN	8a	9a	10a	11a	12a	13a
2/6	7,83 (d, 8,6)	7,83 (d, 8,7)	7,83 (d, 8,4)	7,83 (d, 8,6)	7,83 (d, 8,7)	7,83 (d, 8,7)
3/5	6,98 (d, 8,6)	6,96 (d, 8,7)	6,96 (d, 8,4)	6,96 (d, 8,6)	6,96 (d, 8,7)	6,97 (d, 8,7)
C=N-H	8,38 (s)	8,37 (s)	8,37 (s)	8,38 (s)	8,37 (s)	8,38 (s)
2'/6'	7,24 – 7,15 (os)	7,24 – 7,13 (os)	7,26 – 7,09 (os)	7,26 – 7,09 (os)	7,26 – 7,09 (os)	7,24 – 7,16 (os)
3'/5'	7,38 (t, 7,6)	7,37 (t, 7,7)	7,38 (t, 7,5)	7,38 (t, 7,6)	7,38 (t, 7,7)	7,38 (t, 7,7)
4'	7,24 – 7,15 (os)	7,24 – 7,13 (os)	7,26 – 7,09 (os)	7,26 – 7,09 (os)	7,26 – 7,09 (os)	7,24 – 7,16 (os)
1''	4,10 (t, 6,3)	4,04 (t, 6,3)	4,02 (t, 6,3)	4,01 (t, 6,3)	4,01 (t, 6,5)	4,02 (t, 6,5)
2''	2,04 (q, 6,6)	1,93 – 1,66 (os) ^a	1,93 – 1,76 (os)	1,91 – 1,74 (os)	1,81 – 1,76 (os)	1,86 – 1,76 (os)
3''	2,70 – 2,60 (m)	1,93 – 1,66 (os)	1,68 – 1,45 (m),	1,68 – 1,39 (os)	1,59 – 1,35 (os)	1,59 – 1,41 (os)

4''		2,60 – 2,50 (os)	1,68 – 1,45 (m)	1,68 – 1,39 (os)	1,59 – 1,35 (os)	1,40 – 1,31 (os)
5''			2,63 – 2,48 (os)	1,68 – 1,39 (os)	1,59 – 1,35 (os)	1,40 – 1,31 (os)
6''				2,73 – 2,52 (os)	1,59 – 1,35 (os)	1,40 – 1,31 (os)
7''					2,56 – 2,39 (os)	1,59 – 1,41 (os)
8''						2,56 – 2,40 (os)
2'''/5'''	2,60 – 2,48 (m)	2,60 – 2,50 (os)	2,63 – 2,48 (os)	2,73 – 2,52 (os)	2,56 – 2,39 (os)	2,56 – 2,40 (os)
3'''/4'''	1,85 – 1,75 (q, 3,2)	1,93 – 1,66 (os)	1,93 – 1,76 (os)	1,91 – 1,74 (os)	1,81 – 1,76 (os)	1,86 – 1,76 (os)

^a os = señal superpuesta

Tabla 18. Datos espectroscópicos de RMN de ¹³C de **8a-13a**. En CDCl₃ a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad).

POSICIÓN	8a	9a	10a	11a	12a	13a
1	129,2 (s)					
2/6	130,6 (d)					
3/5	114,9 (d)	114,8 (d)				
4	161,9 (s)	161,9 (s)	161,9 (s)	161,9 (s)	162,0 (s)	162,0 (s)
CNH	159,8 (d)	159,9 (d)				
1'	152,5 (s)	152,5 (s)	152,5 (t)	152,5 (s)	152,6 (s)	152,6 (s)
2'/6'	121,0 (d)					
3'/5'	129,3 (d)	129,3 (d)	129,2 (d)	129,2 (d)	129,2 (d)	129,2 (d)
4'	125,6 (d)					
1''	66,7 (t)	68,0 (t)	68,1 (t)	68,2 (t)	68,2 (t)	68,3 (t)
2''	28,9 (t)	27,4 (t)	29,2 (t)	29,2 (t)	28,9 (t)	29,6 (t)
3''	53,2 (t)	25,6 (t)	24,2 (t)	28,5 (t)	28,7 (t)	29,4 (t)
4''		56,2 (t)	28,6 (t)	26,0 (t)	25,7 (t)	27,8 (t)
5''			56,4 (t)	27,4 (t)	25,8 (t)	26,1 (t)
6''				56,5 (t)	26,8 (t)	29,1 (t)
7''					55,6 (t)	29,3 (t)
8''						56,8 (t)
2'''/5'''	54,4 (t)	54,3 (t)	54,2 (t)	54,2 (t)	53,7 (t)	54,4 (t)
3'''/4'''	23,6 (t)	23,5 (t)	23,5 (t)	23,5 (t)	23,4 (t)	23,5 (t)

III.1.7.2 Derivados azaestilbeno con piperidina (8b – 13b)

Los intermediarios **2b** – **7b** se hicieron reaccionar con anilina para obtener los derivados azaestilbeno con cadena de tres a ocho metilenos unida a piperidina (**8b** – **13b**). En las **Tablas 19** y **20** se informa la asignación completa de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C para estos compuestos.

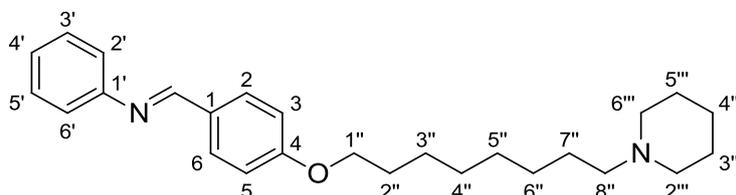


Tabla 19. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **8b-13b**. En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).

POSICIÓN	8b	9b	10b	11b	12b	13b
2/6	7,83 (d, 8,8)	7,83 (d, 8,7)	7,83 (d, 8,6)	7,83 (d, 8,5)	7,83 (d, 8,7)	7,83 (d, 8,7)
3/5	6,97 (d, 8,8)	6,96 (d, 8,7)	6,96 (d, 8,6)	6,96 (d, 8,5)	6,97 (d, 8,7)	6,97 (d, 8,7)
CNH	8,37 (s)	8,37 (s)	8,37 (s)	8,37 (s)	8,38 (s)	8,38 (s)
2'/6'	7,25 – 7,14 (m)	7,20 (t, 7,8)	7,20 (t, 7,7)	7,20 (t, 7,6)	7,20 (t, 7,9)	7,24 – 7,15 (m)
3'/5'	7,38 (t, 7,7)	7,38 (t, 7,7)	7,38 (t, 7,7)	7,38 (t, 7,5)	7,38 (t, 7,7)	7,38 (t, 7,7)
4'	7,25 – 7,15 (m)	7,20 (t, 7,8)	7,20 (t, 7,7)	7,20 (t, 7,6)	7,20 (t, 7,9)	7,24 – 7,16 (m)
1''	4,07 (t, 6,4)	4,04 (t, 6,3)	4,02 (t, 6,4)	4,01 (t, 6,4)	4,01 (t, 6,5)	4,01 (t, 6,5)
2''	2,00 (q, 6,4)	1,82 (q, 6,4)	1,83 (q, 6,6)	1,81 (q, 6,3)	1,80 (q, 6,6)	1,80 (q, 6,6)
3''	2,52 – 2,46 (m)	1,74 – 1,66 (m)	1,64 – 1,40 (os) ^a	1,66 – 1,33 (os)	1,54 – 1,29 (os)	1,53 – 1,26 (os)
4''		2,43 – 2,33 (os)	1,64 – 1,40 (os)	1,66 – 1,33 (os)	1,54 – 1,29 (os)	1,53 – 1,26 (os)
5''			2,47 – 2,30 (os)	1,66 – 1,33 (os)	1,54 – 1,29 (os)	1,53 – 1,26 (os)
6''				2,49 – 2,26 (os)	1,54 – 1,29 (os)	1,53 – 1,26 (os)
7''					2,34 – 2,26 (os)	1,53 – 1,26 (os)
8''						2,48 – 2,24 (os)
2'''/6'''	2,41 (sa)	2,43 – 2,33 (os)	2,47 – 2,30 (os)	2,49 – 2,26 (os)	2,39 sa	2,48 – 2,24 (os)
3'''/5'''	1,60 (q, 5,6)	1,60 (q, 5,7)	1,64 – 1,40 (os)	1,66 – 1,33 (os)	1,60 (q, 5,5)	1,61 (q, 5,6)

4'''	1,51 – 1,41 (m)	1,51 – 1,41 (m)	1,64 – 1,40 (os)	1,66 – 1,33 (os)	1,54 – 1,29 (os)	1,53 – 1,26 (os)
-------------	--------------------	--------------------	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------

^a Tabla 20. Datos espectroscópicos de RMN de ¹³C de **8b-13b**. En CDCl₃ a 75 MHz; δ en ppm
^b En un solo ancho (multiplicidad).

POSICIÓN	8b	9b	10b	11b	12b	13b
1	129,2 (s)	129,2 (s)	129,2 (s)	129,2 (s)	129,2 (s)	129,2 (s)
2/6	130,6 (d)	130,6 (d)	130,6 (d)	130,6 (d)	130,6 (d)	130,6 (d)
3/5	114,9 (d)	114,8 (d)	114,8 (d)	114,8 (d)	114,8 (d)	114,8 (d)
4	161,9 (s)	161,9 (s)	161,9 (s)	162,0 (s)	162,0 (s)	162,0 (s)
CNH	159,9 (d)	159,9 (d)	159,9 (d)	159,9 (d)	159,9 (d)	159,9 (d)
1'	152,6 (s)	152,6 (s)	152,5 (s)	152,6 (s)	152,6 (s)	152,6 (s)
2'/6'	121,0 (d)	121,0 (d)	121,0 (d)	121,0 (d)	121,0 (d)	121,0 (d)
3'/5'	129,4 (d)	129,4 (d)	129,2 (d)	129,2 (d)	129,2 (d)	129,2 (d)
4'	125,6 (d)	125,6 (d)	125,6 (d)	125,6 (d)	125,6 (d)	125,6 (d)
1''	66,9 (t)	68,1 (t)	68,1 (t)	68,2 (t)	68,3 (t)	68,3 (t)
2''	26,9 (t)	27,5 (t)	29,2 (t)	29,2 (t)	29,4 (t)	29,6 (t)
3''	56,0 (t)	24,6 (t)	24,6 (t)	27,6 (t)	29,3 (t)	29,4 (t)
4''		59,2 (t)	26,8 (t)	26,1 (t)	27,8 (t)	29,3 (t)
5''			59,5 (t)	26,9 (t)	26,1 (t)	27,8 (t)
6''				59,6 (t)	26,9 (t)	26,1 (t)
7''					59,7 (t)	26,9 (t)
8''						59,7 (t)
2'''/6'''	54,8 (t)	54,8 (t)	54,8 (t)	54,7 (t)	54,8 (t)	54,7 (t)
3'''/5'''	26,1 (t)	26,2 (t)	26,1 (t)	26,0 (t)	26,0 (t)	26,0 (t)
4'''	24,6 (t)	23,6 (t)	24,3 (t)	24,6 (t)	24,6 (t)	24,5 (t)

III.1.7.3 Derivados azaestilbeno con dietilamina (8c – 13c)

La reacción de condensación entre los intermediarios **2c – 7c** con anilina permitió obtener los análogos de azaestilbeno con cadena espaciadora de 3 a 8 metilenos unidos a dietilamina (**8c – 13c**). La asignación completa de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C para estos derivados se informa en las **Tablas 21** y **22**, respectivamente.

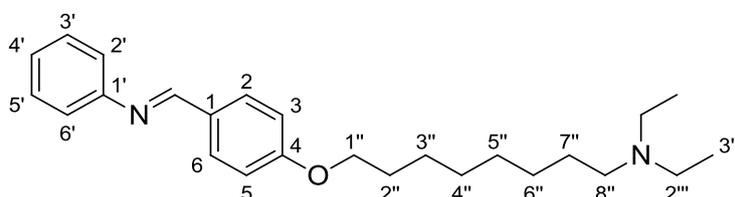


Tabla 21. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **8c-13c**. En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm, (multiplicidad, J en Hz).

POSICIÓN	8c	9c	10c	11c	12c	13c
2/6	7,83 (d, 8,7)	7,83 (d, 8,8)	7,82 (d, 8,8)	7,83 (d, 8,7)	7,83 (d, 8,7)	7,83 (d, 8,7)
3/5	6,97 (d, 8,7)	6,98 (d, 8,7)	6,97 (d, 8,7)	6,97 (d, 8,7)	6,97 (d, 8,7)	6,96 (d, 8,7)
CNH	8,36 (s)	8,37 (s)	8,38 (s)	8,38 (s)	8,37 (s)	8,37 (s)
2'/6'	7,18 (q, 7,8)	7,24 – 7,12 (m)	7,26 – 7,09 (m)	7,26 – 7,09 (m)	7,26 – 7,09 (m)	7,24 – 7,16 (m)
3'/5'	7,37 (t, 7,7)	7,38 (t, 7,7)	7,38 (t, 7,7)	7,38 (t, 7,7)	7,38 (t, 7,7)	7,38 (t, 7,7)
4'	7,18 (q, 7,8)	7,20 (t, 7,8)	7,26 – 7,09 (m)	7,26 – 7,09 (m)	7,26 – 7,09 (m)	7,24 – 7,16 (m)
1''	4,06 (t, 6,3)	4,02 (t, 5,8)	4,03 (t, 6,5)	4,03 (t, 6,5)	4,02 (t, 6,5)	4,01 (t, 6,5)
2''	1,95 (q, 6,4)	1,84 (q, 6,4)	1,89 – 1,79 (m) ^a	1,98 – 1,78 (os)	1,81 (q, 6,5)	1,80 (q, 6,6)
3''	2,70 – 2,47 (os)	1,59 – 1,45 (m)	1,58 – 1,44 (os)	1,98 – 1,78 (os)	1,56 – 1,30 (os)	1,53 – 1,25 (os)
4''		2,49 – 2,41 (os)	1,58 – 1,44 (os)	1,56 – 1,30 (os)	1,56 – 1,30 (os)	1,53 – 1,25 (os)
5''			2,48 – 2,43 (m)	1,56 – 1,30 (os)	1,56 – 1,30 (os)	1,53 – 1,25 (os)
6''				3,07 – 2,94 (m)	1,56 – 1,30 (os)	1,53 – 1,25 (os)
7''					2,48 – 2,38 (m)	1,53 – 1,25 (os)
8''						2,47 – 2,38 (m)
2'''	2,70 – 2,47 (os)	2,58 – 2,49 (os)	2,54 (c, 7,1)	3,15 (c, 7,3)	2,55 (c, 7,1)	2,54 (c, 7,1)
3'''	1,04 (t, 7,1)	1,03 (t, 7,2)	1,03 (t, 7,3)	1,44 (t, 7,1)	1,03 (t, 7,1)	1,03 (t, 7,2)

^a os = señal superpuesta

Tabla 22. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **2c-7c**. En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (*multiplicidad*)

POSICIÓN	8c	9c	10c	11c	12c	13c
1	130,0 (<i>s</i>)	131,6 (<i>s</i>)	130,1 (<i>s</i>)	130,0 (<i>s</i>)	129,2 (<i>s</i>)	129,1 (<i>s</i>)
2/6	130,7 (<i>d</i>)	130,6 (<i>d</i>)				
3/5	114,7 (<i>d</i>)	114,8 (<i>d</i>)				
4	160,8 (<i>s</i>)	162,0 (<i>s</i>)	161,9 (<i>s</i>)	161,8 (<i>s</i>)	162,0 (<i>s</i>)	162,0 (<i>s</i>)
CNH	159,5 (<i>d</i>)	159,9 (<i>d</i>)	159,9 (<i>d</i>)	159,8 (<i>d</i>)	159,9 (<i>d</i>)	159,9 (<i>d</i>)
1'	152,3 (<i>s</i>)	152,3 (<i>s</i>)	152,5 (<i>s</i>)	152,4 (<i>s</i>)	152,6 (<i>s</i>)	152,5 (<i>s</i>)
2'/6'	121,0 (<i>d</i>)					
3'/5'	129,2 (<i>d</i>)					
4'	125,8 (<i>d</i>)	125,7 (<i>d</i>)	125,6 (<i>d</i>)	125,7 (<i>d</i>)	125,6 (<i>d</i>)	125,6 (<i>d</i>)
1''	65,1 (<i>t</i>)	68,2 (<i>t</i>)	68,2 (<i>t</i>)	67,8 (<i>t</i>)	68,3 (<i>t</i>)	68,3 (<i>t</i>)
2''	24,2 (<i>t</i>)	27,4 (<i>t</i>)	29,3 (<i>t</i>)	29,0 (<i>t</i>)	29,5 (<i>t</i>)	29,6 (<i>t</i>)
3''	49,5 (<i>t</i>)	23,7 (<i>t</i>)	27,0 (<i>t</i>)	26,7 (<i>t</i>)	29,3 (<i>t</i>)	29,5 (<i>t</i>)
4''		52,7 (<i>t</i>)	24,3 (<i>t</i>)	23,4 (<i>t</i>)	27,7 (<i>t</i>)	29,3 (<i>t</i>)
5''			53,0 (<i>t</i>)	25,7 (<i>t</i>)	26,1 (<i>t</i>)	27,8 (<i>t</i>)
6''				51,4 (<i>t</i>)	26,9 (<i>t</i>)	26,1 (<i>t</i>)
7''					53,0 (<i>t</i>)	27,0 (<i>t</i>)
8''						53,0 (<i>t</i>)
2'''	47,1 (<i>t</i>)	47,0 (<i>t</i>)	47,0 (<i>t</i>)	46,8 (<i>t</i>)	47,0 (<i>t</i>)	47,0 (<i>t</i>)
3'''	8,8 (<i>c</i>)	11,8 (<i>c</i>)	11,8 (<i>c</i>)	8,7 (<i>c</i>)	11,7 (<i>c</i>)	11,7 (<i>c</i>)

III.1.7.4 Estudio de inhibición in vitro de ACE y BuCE de los derivados 8a-c – 13a-c

Se evaluó la actividad inhibitoria sobre ACE y BuCE de los derivados de azaestilbeno **8a-c – 13a-c**. Tacrina, un iACE conocido, se utilizó como inhibidor de referencia. Los valores de IC_{50} y los índices de selectividad (IS) para la inhibición de ACE sobre BuCE se muestra en la **Tabla 23**. También se evaluó la actividad inhibitoria sobre ACE de los compuestos A, B y C a una concentración de 100 μ M, estructuras bases para el diseño de nuevos análogos inhibidores de colinesterasas, con el objetivo de comparar la potencia de inhibición de estos con los nuevos derivados sintetizados.

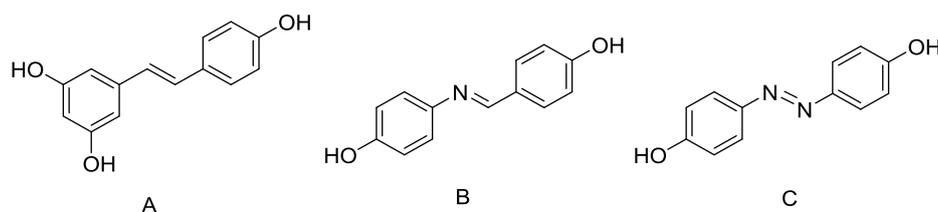


Figura 27. Estructuras químicas de (A) resvetratol, (B) 4,4'-dihidroxiastaestilbeno y (C) 4,4'-dihidroxiastobenceno.

Todos los derivados sintetizados resultaron ser significativamente mejores inhibidores de ACE y BuCE que el resveratrol natural (A), el azaestilbeno (B) y el azobenceno (C) mostrando una inhibición de moderada a potente para ambas enzimas. Los resultados mostraron una tendencia respecto a la longitud de la cadena espaciadora. Para ACE, la mejor inhibición se

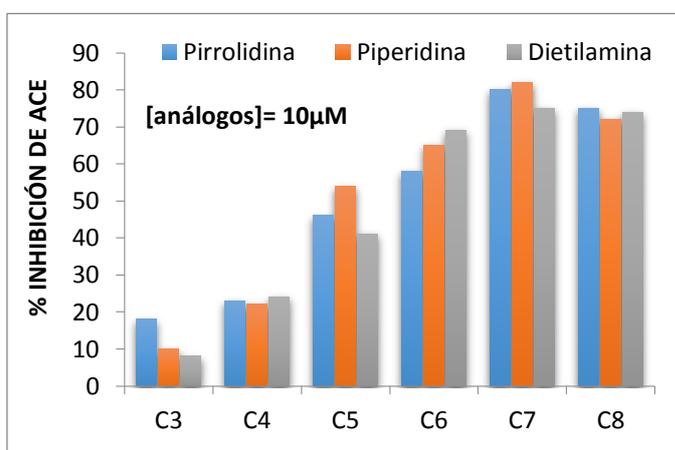


Figura 28. Efectos de la longitud de la cadena alquílica de los derivados **8a-c – 13a-c** sobre las actividades anti CE.

logró con los derivados con 7 u 8 carbonos que conectan la amina con la porción de azaestilbeno. El compuesto **12b**, con un *linker* de 7 carbonos unido al anillo de piperidina, resultó ser el más activo de todas las series, mientras que **12a**, **13a** y **13c** exhibieron también valores bajos de IC_{50} , por debajo de 1 μ M, comportándose como potentes inhibidores de ACE. Por otro lado, para BuCE, la longitud

óptima resultó ser una cadena de 5 o 7 carbonos. En este caso, el derivado más activo fue el compuesto **12a**, con un *linker* de 7 carbonos y unido al anillo de pirrolidina, seguido de los compuestos **10a** y **10b**, todos ellos con $IC_{50} \leq 1 \mu$ M.

Tabla 23. Actividad inhibitoria de ACE y BuCE de los derivados 8 a-c – 13 a-c

	Comp.	n	ACE		BuCE		Índice de selectividad ^a	(BBB permeation (±) and BBB score) ^b
			IC ₅₀ (μM)	log IC ₅₀ ± DS	IC ₅₀ (μM)	Log IC ₅₀ ± DS		
pirrolidina	8a	3	53,6	1,729 ± 0,114	21,1	1,325 ± 0,067	0,4	BBB+ (0,097)
	9a	4	30,4	1,489 ± 0,046	3,3	0,519 ± 0,110	0,1	BBB+ (0,101)
	10a	5	10,6	1,025 ± 0,059	0,77	-0,111 ± 0,066	0,07	BBB+ (0,101)
	11a	6	5,0	0,697 ± 0,082	4,3	0,634 ± 0,096	0,09	BBB+ (0,101)
	12a	7	0,56	-0,249 ± 0,131	0,31	-0,510 ± 0,071	0,54	BBB+ (0,101)
	13a	8	0,70	-0,157 ± 0,081	3,7	-0,573 ± 0,114	5,28	BBB+ (0,101)
piperidina	8b	3	84,3	1,926 ± 0,047	42,0	1,623 ± 0,063	0,5	BBB+ (0,090)
	9b	4	51,2	1,709 ± 0,063	13,3	1,124 ± 0,064	0,2	BBB+ (0,094)
	10b	5	10,1	1,002 ± 0,023	0,96	-0,019 ± 0,029	0,1	BBB+ (0,094)
	11b	6	4,2	0,622 ± 0,054	1,3	0,117 ± 0,078	0,3	BBB+ (0,094)
	12b	7	0,43	-0,361 ± 0,153	3,2	0,509 ± 0,0765	7,4	BBB+ (0,094)
	13b	8	1,5	0,184 ± 0,072	3,4	0,538 ± 0,020	2,1	BBB+ (0,094)
	14'b*	7	0,53	-0,277 ± 0,044	1,09	0,039 ± 0,064	2,0	BBB+ (0,119)
dietilamina	8c	3	85,0	1,929 ± 0,068	70,2	1,846 ± 0,111	0,8	BBB+ (0,046)
	9c	4	51,2	1,710 ± 0,628	3,3	0,102 ± 0,102	0,1	BBB+ (0,052)
	10c	5	12,3	1,089 ± 0,030	1,9	0,2685 ± 0,068	0,2	BBB+ (0,052)
	11c	6	3,6	0,562 ± 0,082	9,2	0,964 ± 0,112	2,5	BBB+ (0,052)
	12c	7	1,3	0,123 ± 0,072	6,9	0,842 ± 0,084	5,3	BBB+ (0,052)
	13c	8	0,62	-0,209 ± 0,032	19,1	1,280 ± 0,025	30,8	BBB+ (0,052)
resveratrol (A)			No inhibe a 100 μM				BBB+ (0,041)	
azaestilbeno (B)			18,6% de inhibición a 100 μM				BBB+ (0,081)	
azobenceno (C)			No inhibe a 100 μM				BBB+ (0,066)	
tacrina			0,029	-1,53 ± 0,05	0,004	-2,35 ± 0,07	BBB+ (0,120)	

^aÍndice de selectividad= IC₅₀ (BuCE)/IC₅₀ (ACE). DS: desvío estándar.

^bLa permeabilidad de BHE se predijo utilizando el servidor de predicción BBB (por sus siglas en ingles *blood-brain barrier*) en línea (<http://www.cbligand.org/BBB/>).

*Ir a pág. 69 (III.1.9)

III.1.7.5 Predicción de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

Aunque una buena actividad biológica es fundamental para el desarrollo de un nuevo fármaco, existen otros factores como la biodisponibilidad y la distribución entre diferentes tejidos que son igualmente importantes. Por ejemplo, el conocimiento del grado de penetración de un producto en el SNC es de vital importancia.

Así, cuando se trabaja en enfermedades relacionadas con el SNC, como es la EA, es imprescindible que la molécula sea capaz de atravesar la barrera hematoencefálica BHE para alcanzar sus dianas terapéuticas situadas en el cerebro.

Teniendo en cuenta esto, se llevó a cabo la predicción del paso de la BHE de los compuestos sintetizados utilizando un servidor predictor en línea (<http://www.cbligand.org/BBB/>), perteneciente a la base de conocimiento de quimiogenómica de la enfermedad de Alzheimer: AlzPlatform [20], [21]. Los resultados se incluyen en la **Tabla 23**. Todos los compuestos exhibieron una predicción de permeabilidad de BHE alta (BBB +) con puntajes que van desde 0,046 a 0,119. Es para resaltar que todos los derivados mostraron puntajes BBB más altos que el resveratrol que mostró el puntaje BBB más bajo (0.041). Además, para los compuestos **8a - 13a** y **8b - 14b**, los puntajes BBB previstos fueron más altos que los de azaetilbena (0,081) y cercanos al puntaje de tacrina (0,120) y donepezilo (0,135) cuyos índices son de referencia ya que son dos fármacos que atraviesan con facilidad la BHE, el último utilizado actualmente para la terapia de la EA.

III.1.8 Derivado 12b

Debido a que el compuesto **12b** fue el inhibidor de ACE más efectivo de la serie, fue seleccionado para el estudio cinético de inhibición enzimática y para el estudio de modelado molecular.

III.1.8.1 Caracterización cinética de inhibición de ACE

Con el fin de determinar el mecanismo de inhibición enzimática de **12b**, se realizó un estudio cinético de inhibición de ACE. Se midió la velocidad inicial de la reacción enzimática a concentraciones variables del sustrato, manteniendo fija la concentración del inhibidor (0; 0,25 y 0,5 μM de **12b**). Los resultados se presentan en forma de gráfico de *Lineweaver-Burk*, con los valores $1/V$ vs $1/[S]$. El gráfico de doble-recíproca mostró un patrón de líneas con una pendiente en aumento (disminución de V_{max}) a concentraciones mayores de **12b** y una intersección conjunta en el eje x (igual K_m), lo cual indicó una inhibición de tipo no competitivo. El mismo resultado se obtuvo por regresión no lineal de los datos empleando el programa GraphPad Prism 5, la cual se ajustó a un modelo no competitivo ($R^2 = 0,9820$) y permitió estimar un valor de constante de inhibición K_i de $0,3074 \pm 0,01093 \mu\text{M}$.

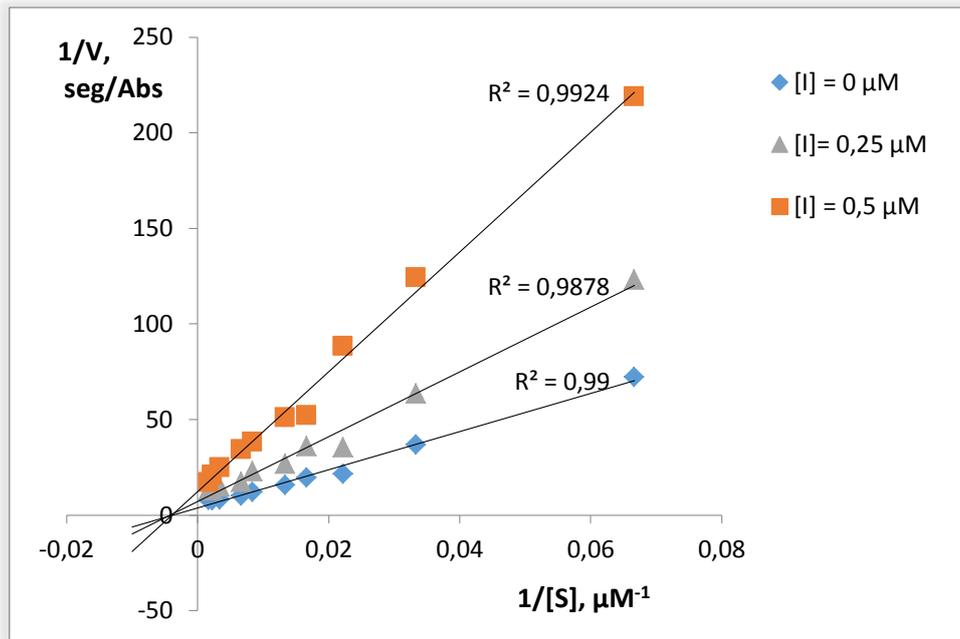


Figura 29. Gráfica de Lineweaver-Burk para la inhibición de ACE del compuesto 12b

III.1.8.2 Estudio de modelado molecular

Se realizaron estudios de modelado molecular con el propósito de obtener mayor información sobre la forma de unión y las interacciones entre la enzima y el compuesto **12b** y tener una visión molecular de su mecanismo de inhibición. Los estudios de modelado fueron realizados mediante una colaboración con la Dra. Victoria Richmond (UMYMFOR) con la enzima ACE cristalizada reportada en el Protein Data Bank (1UT6, <https://www.rcsb.org/structure/1UT6>) y haciendo uso de los siguientes programas: Autodock 4 para el estudio de *docking*, Amber 16 para realizar las dinámicas moleculares y Caver 3.0 para el estudio de túneles y cavidades.

III.1.8.2.1 Estudio de túneles y cavidades del complejo enzima-12b

Sabiendo que el compuesto **12b** es un inhibidor de tipo no competitivo, se trabajó primeramente bajo la hipótesis de que la base de su inhibición se atribuiría al correcto bloqueo de todas las puertas de la enzima, tanto la puerta primaria como las puertas secundarias. De este modo, el compuesto **12b** bloquearía físicamente el ingreso a la enzima, evitando así la entrada del neurotransmisor al sitio activo. Para ello, se llevó a cabo un estudio de túneles, el cual permite determinar la presencia de túneles que puedan conectar el sitio activo de la enzima con el exterior. Para esto, en primer lugar, fue necesario llevar a cabo un estudio de acoplamiento molecular o *docking* y posterior dinámica molecular de la conformación obtenida durante el estudio de *docking*. Posteriormente, se estudió la existencia de túneles que conecten el sitio activo de la ACE con el exterior de la enzima utilizando el programa Caver 3.0 y se analizaron un total de 50 fotos obtenidas a partir de las Dinámicas Moleculares (DM) (1 foto/ns) utilizando una sonda de 1.4 Å, ubicada en el sitio activo de la enzima. Los resultados, en principio, indicaron que en algunas de las fotos analizadas, aun en presencia del inhibidor, existe un canal en la enzima que comunica el sitio activo con el exterior a través del PAS. Este túnel va desde el sitio activo y rodea el anillo B del ligando (**Figura 30** y **Figura 31**).

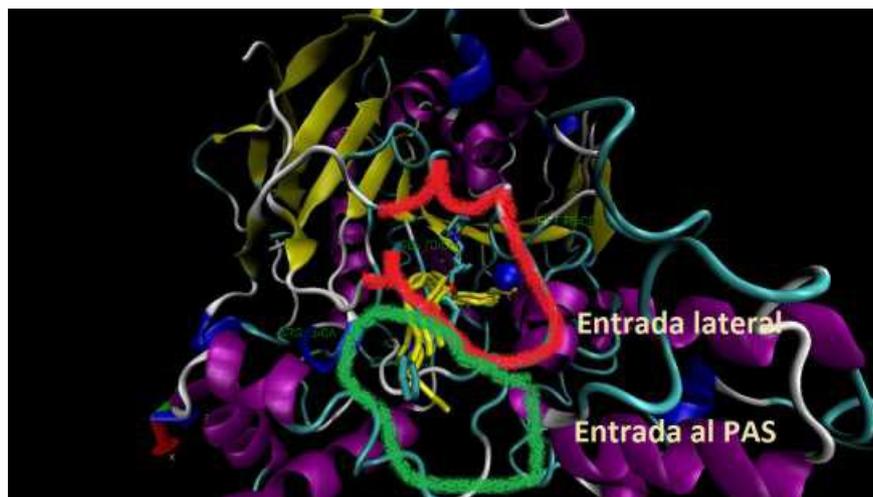


Figura 30. Marcadas en verde y rojo se encuentran dos de las entradas a la enzima y en amarillo, los túneles que encontró el programa.

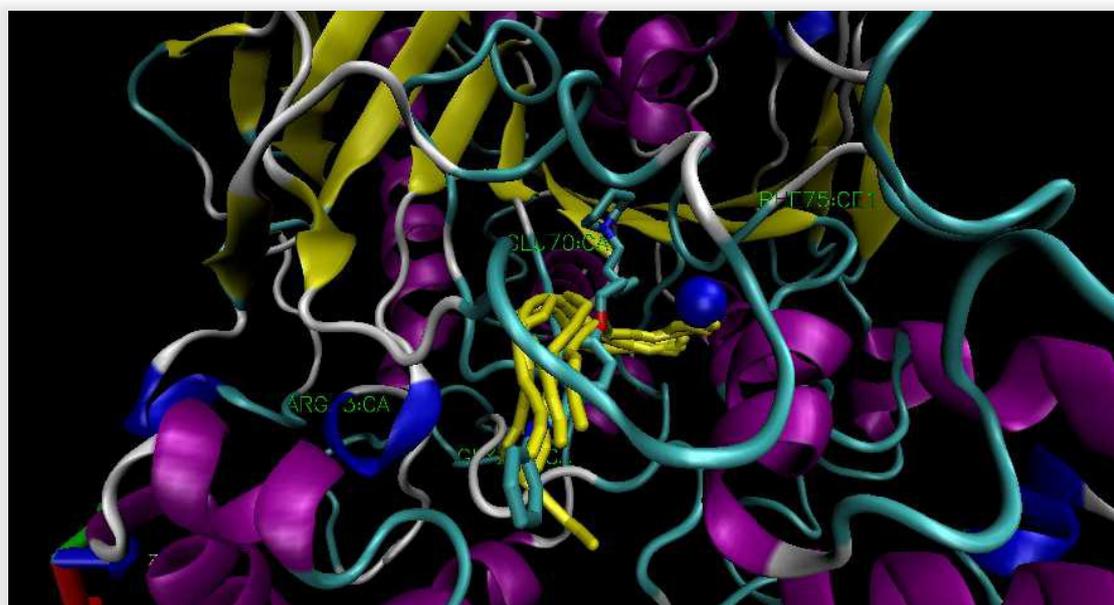
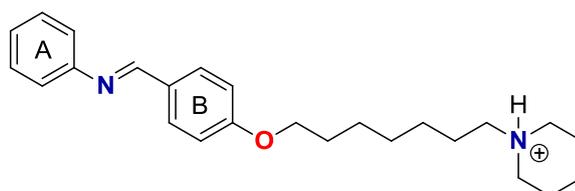


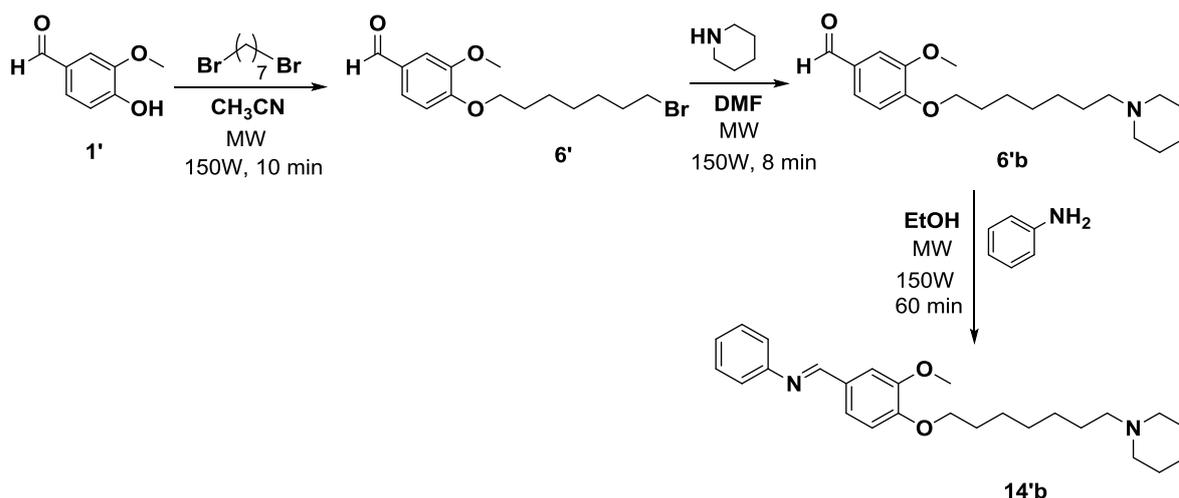
Figura 31. Otra perspectiva de la proteína para visualizar mejor los túneles que conectan con el exterior a través del PAS.

Este estudio, sugirió que la presencia de un sustituyente en el anillo B podría obstruir de manera más eficiente la entrada principal de la enzima y de esta forma, potenciar la actividad inhibitoria del compuesto.

Acorde a estos resultados, fue sintetizado el derivado **14'b** que a diferencia de **12b**, presenta un grupo metoxi en el anillo B.

III.1.9 Derivado 14'b

En una primera etapa, se llevó a cabo la reacción entre 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) y 1,7-dibromoheptano para obtener el intermediario alquilbromado 4-((7-bromoheptil)oxi)-3-metoxibenzaldehído que en un segundo paso, se hizo reaccionar con piperidina para dar como producto el derivado aminoalcoxibenzaldehído (3-methoxy-4-((7-(piperidin-1-il)heptil)oxi)benzaldehído). En un último paso se llevó a cabo la reacción de condensación entre el derivado aminoalcoxibenzaldehído y anilina, para obtener el derivado **14'b** (Esquema 7).

Esquema 7. Síntesis del derivado **14'b**III.1.9.1 Estudio de inhibición in vitro de ACE y BuCE del derivado **14'b**

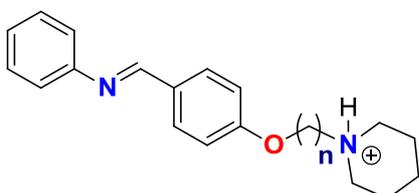
Se evaluó al derivado **14'b** por su capacidad de inhibir la actividad de las enzimas ACE y BuCE. El compuesto fue un potente inhibidor de ACE con un $IC_{50} = 0,53 \mu M$. Pese a las sugerencias del análisis de túneles, **14'b** no fue más potente que el inhibidor **12b** para ACE como se esperaba, pero sí lo fue para BuCE con un IC_{50} de $1,09 \mu M$. A su vez, observando la tabla de IC_{50} de esta quimioteca (**Tabla 23**) se puede destacar que éste último derivado sintetizado se posiciona como el segundo inhibidor más potente para ACE.

Cabe destacar que el compuesto no mejoró su actividad tal como se esperaba ya que, en un principio, los estudios de *docking* y posterior dinámica molecular fueron llevados a cabo con un estado de protonación del sitio activo que no era el correcto. El resultado fue muy

sensible a esto debido a la presencia de la amina protonada en **12b**. Por esto es que se obtuvo una conformación que no era la correcta en el estudio de acoplamiento.

A continuación, se describirá el estudio por modelado molecular de los compuestos **11b**, **12b**, y **13b**. De acuerdo con los resultados obtenidos para **12b** se observa que la introducción de un grupo -OMe en el anillo B no mejoraría su actividad dado que no hay un donador de H cerca. Además, el análisis de túneles que conecten con el exterior no resulta útil dado que estos compuestos interaccionan con el subsitio aniónico del CAS de la enzima. Con lo cual, aunque hubiese acceso al sitio activo desde el exterior, la acetilcolina (sustrato natural de la ACE) no podría ubicarse en su conformación correcta para su posterior hidrólisis y en esto reside el poder inhibitorio de estos análogos.

III.1.10 Estudio de Modelado Molecular de **11b**, **12b**, y **13b**



Con el fin de comprender el mecanismo molecular por el cual estas iminas inhiben la enzima ACE y de evaluar el impacto de la longitud del conector en la actividad inhibitoria, se realizaron estudios de modelado molecular de la familia de compuestos de piperidina. Particularmente, el compuesto **12b** (C7), el más activo de la serie, y los análogos **11b** (C6) y **13b** (C8) se seleccionaron para comprender el papel del *linker* en la inhibición de la ACE. Primero, los estudios de acoplamiento molecular -o *docking*-revelaron que los tres compuestos están ubicados en el sitio aniónico periférico (PAS) e interactúan con el subsitio aniónico del sitio activo catalítico (CAS) de ACE. Este resultado concuerda con los resultados para otros inhibidores no competitivos como tacrina y donepezilo. Dado que los estudios de acoplamiento son sistemas estáticos, un modelo más preciso del sistema inhibidor-enzima implica el análisis de su dinámica molecular, porque la estructura de la enzima, su dinámica y su función están estrechamente relacionadas. Así es que, se realizaron los correspondientes estudios de dinámica molecular de estos complejos para verificar la estabilidad del complejo inhibidor-enzima, para determinar si la enzima sufre reordenamientos estructurales, así como para verificar que las distancias y ángulos en las interacciones observadas estén dentro de un rango adecuado. Las dinámicas mostraron que los tres compuestos se pliegan dentro del bolsillo de manera similar, pero el compuesto **12b** adopta una conformación que permite mejores interacciones con la enzima que los otros dos análogos. Con respecto al enlace de hidrógeno, el grupo piperidinio del compuesto **12b**

interactúa con el grupo carboxilato de ASP72 (95% de ocupancia, 1,5Å, $\approx 161^\circ$) y el nitrógeno de la imina, con el grupo hidroxilo de TYR121 (92% de ocupancia, 1,9Å, $\approx 163^\circ$). Además, hay dos interacciones de apilamiento π - π entre ambos anillos aromáticos de los inhibidores y los residuos PHE330 (apilamiento en forma de T, 5,4 Å, 85°) y PHE331 (apilamiento paralelo desplazado, 4,6 Å, 21°), respectivamente. Estas interacciones se muestran en la **Figura 32**.

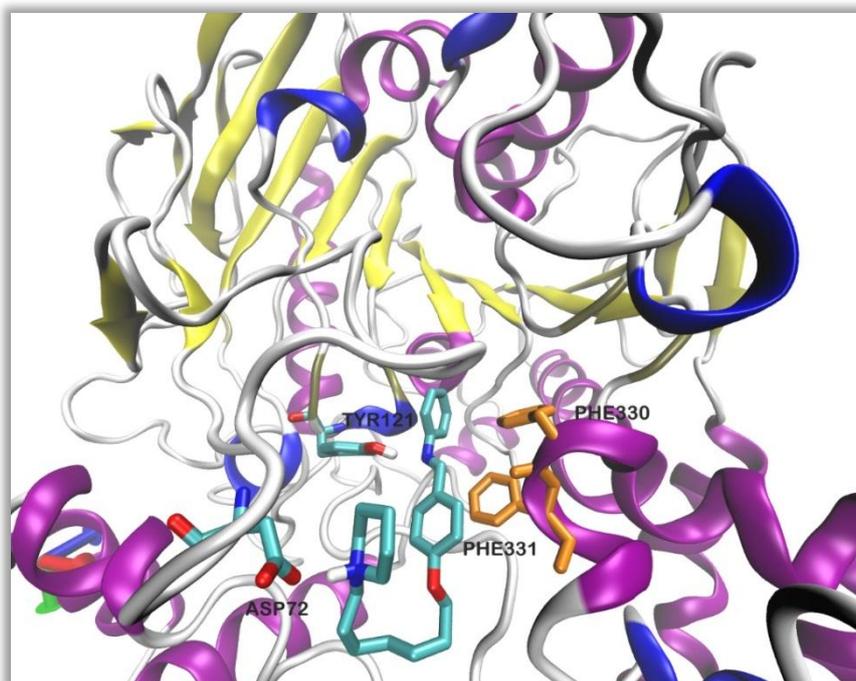


Figura 32. Conformación adoptada del compuesto **12b** en la enzima.

Con respecto al compuesto **13b**, se observaron interacciones similares a las descritas para **12b**, pero no fueron tan fuertes y estables como con el análogo C7. Cuando el grupo piperidinio del compuesto **13b** interactúa con el grupo carboxilato de ASP72 (1,9 Å, 161°), el nitrógeno de la imina no participa en ningún enlace de hidrógeno. Cuando, al contrario, se observó un enlace H efectiva y estable entre el nitrógeno de la imina y TYR121 (1,9 Å - 2,0 Å, 161° - 165°), se observó una baja interacción entre el resto piperidinio (**13b**) y el carboxilato ASP72 junto con la interacción entre el piperidinio y el grupo hidroxilo de SER81 (2,0 Å, 158°). Además, **13b** mostró interacciones de π - π stacking entre el anillo aromático terminal de los inhibidores y TRP84 (apilamiento en forma de T, 80° , 5,3 Å). Estos resultados están de acuerdo con la actividad ligeramente menor del compuesto **13b** con respecto al compuesto **12b**.

Por otro lado, el *linker* del compuesto **11b** parece no ser lo suficientemente largo como para permitir que la conformación adoptada establezca dos enlaces de hidrógeno simultáneamente. Se realizaron varias dinámicas moleculares para encontrar ambas

interacciones al mismo tiempo, pero solo el grupo piperidinio del compuesto **11b** interactúa alternativamente con el grupo carboxilato de ASP72 (1,9Å, 158°) o GLU73 (1,8Å, 164°). El compuesto **11b** también mostró interacciones de π - π stacking entre el anillo aromático terminal de los inhibidores y TRP84 (apilamiento en forma de T, 86 °, 5.1 Å) o PHE330 (apilamiento en forma de T, 73 °, 5.1 Å) (Figura 33).

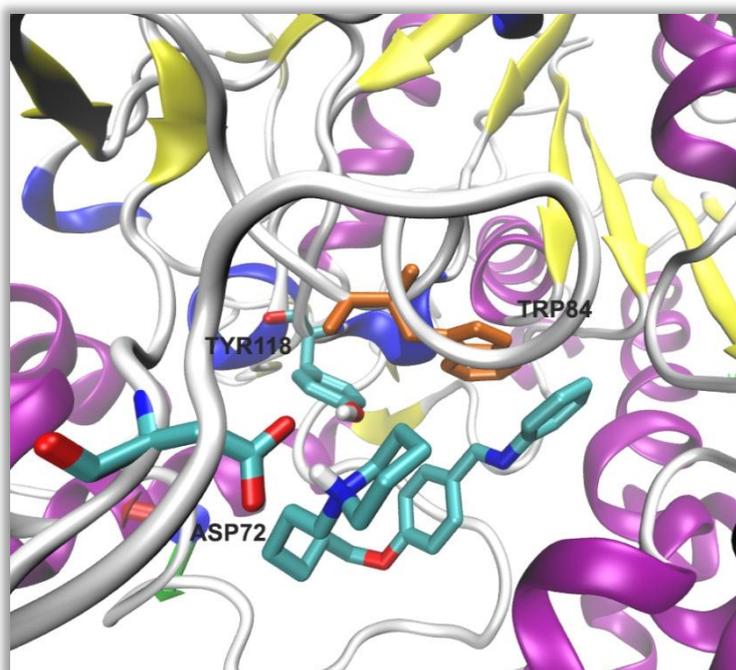


Figura 33. Conformación adoptada del compuesto **11b** en la enzima.

Las dinámicas moleculares revelaron que las interacciones entre los ligandos y el ACE son más fuertes en el sistema **12b** que en el complejo **13b**-ACE. Este resultado explica claramente la importancia de la longitud del conector ya que 7 carbonos permitieron las mejores interacciones con la proteína de acuerdo con la tendencia experimental observada para la familia de la piperidina.

Los estudios de modelado molecular nos permitieron establecer la conformación de los inhibidores en relación con la ACE, así como sus interacciones con la enzima. Este estudio permitió identificar las interacciones hidrofóbicas dentro del bolsillo, así como las interacciones de π - π stacking, electrostáticas y de enlace de hidrógeno como factores estabilizadores en el complejo inhibidor-enzima. Además, este trabajo permitió comprender las bases moleculares que gobiernan la inhibición y la correlación entre el número de carbonos en el conector y la actividad biológica.

III.1.11 Inhibición de ACE en células de neuroblastoma humanas SH-SY5Y

Se evaluaron los efectos de **12a**, **12b**, **13c** y **14'b** sobre la actividad de ACE en células vivas. Para ello se emplearon células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Esta determinación se realizó en el marco de una colaboración con el Dr. Carlos Javier Baier (INIBIBB). Para este propósito, las células SH-SY5Y se incubaron durante 1 h en presencia de las sustancias enumeradas anteriormente, y la actividad ACE se determinó mediante el método de Ellman [22]. Después de 1 h, **12a** (0,56 μM), **12b** (0,43 μM), **14'b** (0,53 μM) y **13c** (0,62 μM) inhibieron significativamente la actividad de ACE en el ensayo celular (**Figura 34**). La concentración de fármaco utilizada en este ensayo correspondió al IC_{50} previamente determinada in vitro.

Por otra parte, se evaluó el efecto citotóxico de **12a**, **12b**, **14'b** y **13c** en las células SH-SY5Y. Se determinó mediante la medición de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH). LDH es una enzima soluble localizada en el citoplasma celular, y su liberación en el medio de cultivo celular es un marcador aceptado de muerte celular. El tratamiento de las células SH-SY5Y con una concentración igual a 10 veces el IC_{50} del compuesto ensayado no afectó la viabilidad celular después del tratamiento de 24 h (**Figura 35**), por lo tanto, estos compuestos no resultaron citotóxicos para la célula.

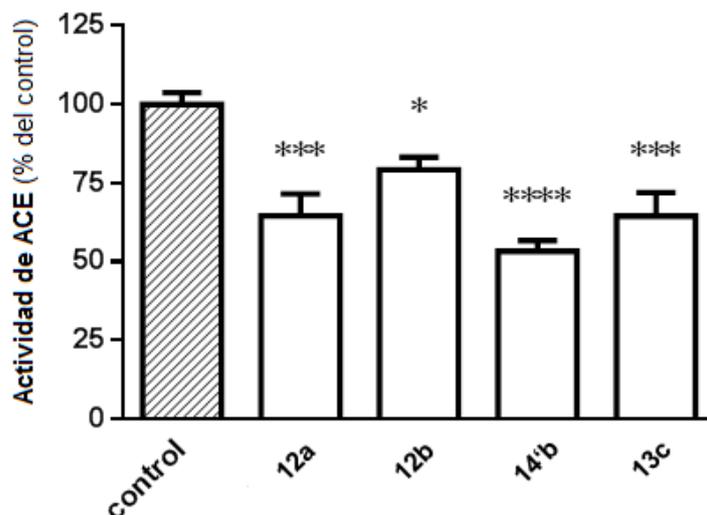


Figura 34. Actividad de ACE en células SH-SY5Y tratadas con **12a**, **12b**, **14'b** o **13c**. La actividad de ACE en células SH-SY5Y tratadas durante 1 h con vehículo (control) o **12a** (0,56 μM), **12b** (0,43 μM), **14'b** (0,53 μM) o **13c** (0,62 μM). La actividad de ACE se determinó de acuerdo con las referencias [16], [22], [23] en células vivas. Las actividades enzimáticas se expresan como % de control (actividad ACE) \pm SEM (error estándar de la media) de al menos 7 experimentos independientes. ANOVA unidireccional seguido de test de Turkey; (*), (***) y (****) denotan valores de $p < 0,05$, $< 0,001$ y $< 0,0001$, respectivamente.

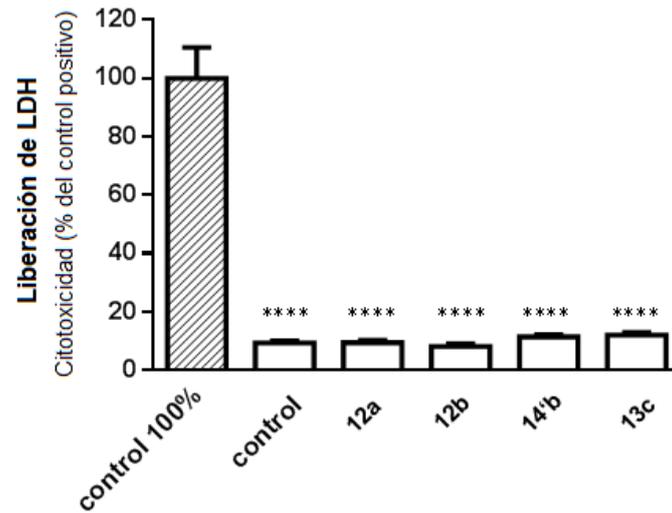


Figura 35. Efecto citotóxico de **12a**, **12b**, **14'b** y **13c** en células SH-SY5Y. Viabilidad celular de las células SH-SY5Y tratadas por 24 h con vehículo (control) o **12a** (5,6 μM), **12b** (4,3 μM), **14'b** (5,3 μM) y **13c** (6,2 μM), es decir, 10x IC_{50} . La viabilidad celular se representó respecto a 100% de liberación de LDH (barra con líneas diagonales). Los datos se expresan como las medias \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. (****) denota valores $p < 0,0001$ respecto del 100% de liberación de LDH (barra con líneas diagonales).

III.2 Conclusiones

Se preparó una serie de derivados de azaestilbeno diseñados como inhibidores de colinesterasas. Se obtuvieron 19 compuestos (**8a-c** – **13a-c**), los cuales son informados por primera vez. Todos ellos resultaron inhibidores de ACE y BuCE, la mayoría con valores de IC_{50} a escala micromolar. El derivado **12b**, con una piperidina unida a la estructura de azaestilbeno por una cadena de siete carbonos, fue el inhibidor más potente para ACE con un valor de IC_{50} de 0,43 μ M y **12a**, de igual longitud de cadena que el anterior pero con una pirrolidina, lo fue para BuCE con un IC_{50} de 0,31 μ M.

El uso de microondas para la síntesis de los análogos y sus intermediarios, permitió una importante disminución en el tiempo de reacción y la obtención de los mismos con muy buenos rendimientos.

El estudio cinético enzimático indicó que **12b** inhibe a la enzima ACE a través de un mecanismo no competitivo, lo cual fue confirmado por el docking molecular que reveló que **12b** se une reversiblemente a la enzima en el sitio aniónico periférico (PAS) e interactúan con el sitio activo catalítico (CAS), al igual que el derivado **11b** de cadena hidrocarbonada más corta (C6) y **13b** de cadena más larga (C8). Esta inhibición dual de la enzima es importante ya que permitiría que las iminas interfieran no solo con la hidrólisis del neurotransmisor AC sino también con la agregación del péptido β amiloide. Por otro lado, el estudio de dinámica molecular mostró que los tres compuestos **11b**, **12b** y **13b** se pliegan dentro del bolsillo enzimático de manera similar, pero que el compuesto **12b** lo hace adoptando una conformación que permite mejores interacciones con la enzima que los otros dos análogos, lo que justifica su mejor potencia de inhibición sobre ACE observada experimentalmente.

Los compuestos **12a**, **12b**, **13b** y **14'b** también fueron evaluados como inhibidores de ACE en células vivas de neuroblastoma humano SH-SY5Y, mostrando una inhibición significativa de la actividad de ACE. A su vez, se evaluó el efecto citotóxico de estos derivados los cuales no afectaron la viabilidad celular.

Referencias bibliográficas

- [1] M. Yáñez, N. Fraiz, E. Cano, and F. Orallo, "Inhibitory effects of cis- and trans-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 344, no. 2, pp. 688–695, Jun. 2006.
- [2] K. B. Harikumar and B. B. Aggarwal, "Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases," *Cell Cycle*, vol. 7, no. 8, pp. 1020–1037, 2008.
- [3] J. A. Baur and D. A. Sinclair, "Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 6, pp. 493–506, 2006.
- [4] B. C. Trela and A. L. Waterhouse, "Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 44, no. 5, pp. 1253–1257, 1996.
- [5] J.-F. Ge, J.-P. Qiao, C.-C. Qi, C.-W. Wang, and J.-N. Zhou, "The binding of resveratrol to monomer and fibril amyloid beta," *Neurochem. Int.*, vol. 61, no. 7, pp. 1192–1201, Dec. 2012.
- [6] R. L. Galli, D. F. Bielinski, A. Szprengiel, B. Shukitt-Hale, and J. A. Joseph, "Blueberry supplemented diet reverses age-related decline in hippocampal HSP70 neuroprotection," *Neurobiol. Aging*, vol. 27, no. 2, pp. 344–350, Feb. 2006.
- [7] C. Rivière *et al.*, "New stilbene dimers against amyloid fibril formation," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 20, no. 11, pp. 3441–3443, Jun. 2010.
- [8] J. M. Smoliga, J. A. Baur, and H. A. Hausenblas, "Resveratrol and health - A comprehensive review of human clinical trials," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 55, no. 8, pp. 1129–1141, 2011.
- [9] T. Pukrasook *et al.*, "Semisynthesis and biological evaluation of prenylated resveratrol derivatives as multi-targeted agents for Alzheimer's disease," *J. Nat. Med.*, vol. 71, no. 4, pp. 665–682, 2017.
- [10] T. Ahmed *et al.*, "Resveratrol and Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights," *Mol. Neurobiol.*, vol. 54, no. 4, pp. 2622–2635, 2017.
- [11] R. Damrauer and T. E. Rutledge, "The syn-anti isometization of imines of benzoylferrocene and benzoylruthenocene," *J. Organomet. Chem.*, vol. 29, no. 1, pp. 3–5, 1971.
- [12] R. A. Mekheimer, A. M. Abdel Hameed, and K. U. Sadek, "First synthesis and isolation of the E- and Z-isomers of some new Schiff bases. Reactions of 6-azido-5-formyl-2-pyridone with aromatic amines," *Molecules*, vol. 13, no. 1, pp. 195–203, 2008.
- [13] A. Siddiqui *et al.*, "Novel Aza-resveratrol analogs: Synthesis, characterization and anticancer activity against breast cancer cell lines," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 3, pp. 635–640, 2013.
- [14] W. Chen *et al.*, "Design, synthesis and biological evaluation of paralleled Aza resveratrol-chalcone compounds as potential anti-inflammatory agents for the treatment of acute lung injury," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 25, no. 15, pp. 2998–3004, Aug. 2015.
- [15] S. Y. Li, X. B. Wang, and L. Y. Kong, "Design, synthesis and biological evaluation of imine resveratrol derivatives as multi-targeted agents against Alzheimer's disease," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 71, pp. 36–45, 2014.

- [16] N. P. Alza, V. Richmond, C. J. Baier, E. Freire, R. Baggio, and A. P. Murray, "Synthesis and cholinesterase inhibition of cativic acid derivatives," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 22, no. 15, pp. 3838–3849, 2014.
- [17] L. F. Pan, X. B. Wang, S. S. Xie, S. Y. Li, and L. Y. Kong, "Multitarget-directed resveratrol derivatives: Anti-cholinesterases, anti- β -amyloid aggregation and monoamine oxidase inhibition properties against Alzheimer's disease," *Medchemcomm*, vol. 5, no. 5, pp. 609–616, 2014.
- [18] S. Y. Li *et al.*, "Multifunctional tacrine-flavonoid hybrids with cholinergic, β -amyloid-reducing, and metal chelating properties for the treatment of Alzheimer's disease," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 69, pp. 632–646, 2013.
- [19] A. De La Hoz, A. Díaz-Ortiz, and P. Prieto, "Microwave-assisted green organic synthesis," *RSC Green Chem.*, vol. 2016-Janua, no. 47, pp. 1–33, 2016.
- [20] J. Jeřábek *et al.*, "Tacrine-resveratrol fused hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 127, pp. 250–262, 2017.
- [21] H. Liu *et al.*, "AlzPlatform: An Alzheimer's disease domain-specific chemogenomics knowledgebase for polypharmacology and target identification research," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 54, no. 4, pp. 1050–1060, 2014.
- [22] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 7, no. 2, pp. 88–95, Jul. 1961.
- [23] V. Cavallaro, Y. F. Moglie, A. P. Murray, and G. E. Radivoy, "Alkynyl and β -ketophosphonates: Selective and potent butyrylcholinesterase inhibitors," *Bioorg. Chem.*, vol. 77, pp. 420–428, 2018.

CAPÍTULO IV

Análogos de azobenceno

IV ANÁLOGOS DE AZOBENCENO

IV.1 Obtención de análogos de azobenceno como inhibidores fotomodulables de ACE

IV.1.1 Descripción general y objetivos

Es conocido que los inhibidores de colinesterasas (iCE) juegan un rol importante en la mejora de la actividad sináptica colinérgica y por ende, tienen relevancia terapéutica para la EA, y también para otras enfermedades como miastenia gravis y glaucoma [1]. Dentro de este grupo de inhibidores, han cobrado principal importancia los iCE fotocromicos, debido a los grandes avances en la terapia fotofarmacológica [2]. El enfoque de esta terapia se basa en el uso de fotoconmutadores moleculares (*molecular photoswitches*), que son moléculas sintéticas que al iluminarlas son capaces de cambiar sus propiedades físicas, así como la geometría molecular, momento dipolar y el espectro de absorción. Asimismo, son capaces de unirse a sus proteínas diana y modificar su actividad fisiológica [3].

Existen diversas fracciones químicas sensibles a la luz, y entre ellas los azobencenos son una de las familia más ampliamente utilizadas [4], [5]. Estos compuestos están formados por dos anillos fenilo unidos por un doble enlace entre átomos de nitrógeno (N=N) y se caracterizan por ser muy coloreados. El grupo azobenceno puede ser considerado como un material fotocromico, es decir, que cambia de color al ser irradiado con luz, ya que al igual que los dobles enlaces carbonados -C=C- y las iminas -C=N-, los azobencenos poseen dos isómeros geométricos (*E/Z*) en torno al -N=N- que absorben a diferente longitud de onda, siendo el isómero *trans* (*E*) 12 kcal/mol (0,6 eV) más estable que el isómero *cis* (*Z*) [6].

El azobenceno es fotoisomerizable. Su configuración *trans*, de geometría plana y estable en la oscuridad, bajo iluminación con luz ultravioleta de longitud de onda 320-350 nm se isomeriza a configuración *cis*. La reacción es reversible y el isómero *trans* es recuperado por irradiación del isómero *cis* con luz de 400-450 nm. El isómero *cis* es menos estable que el isómero *trans* y por lo tanto *cis*-azobenceno también se convierte térmicamente de nuevo en *trans*-azobenceno en oscuridad. La fotoisomerización de *trans* a *cis* es extremadamente rápida (del orden de picosegundos), mientras que la reversión en oscuridad de *cis* a *trans* es mucho más lenta (milisegundos a días) [7]. Sin embargo, la sustitución de grupos que atraen o repelen

electrones puede alterar tanto la estabilidad térmica de la forma *cis* como el espectro de acción de la isomerización [8].

En el proceso de isomerización la distancia entre las posiciones más alejadas de los anillos aromáticos disminuye desde 9,0 Å (*trans*) hasta 5,5 Å (*cis*) (Figura) [9]. El isómero *trans* es prácticamente plano ($\mu \sim 0$), mientras que el isómero *cis* adopta una geometría angular, en la que uno de los anillos gira para evitar repulsiones estéricas, enfrentando una de las nube π de un anillo aromático al otro, dando como resultado un $\mu \sim 3,0$ D [10]. Esta disposición de los anillos aromáticos se refleja también en los espectros de RMN de ^1H . Las señales correspondientes al isómero *cis* sufren un apantallamiento, debido al efecto anisotrópico de la nube π del anillo aromático, apareciendo a campo más alto que las señales correspondientes del isómero *trans* [11].

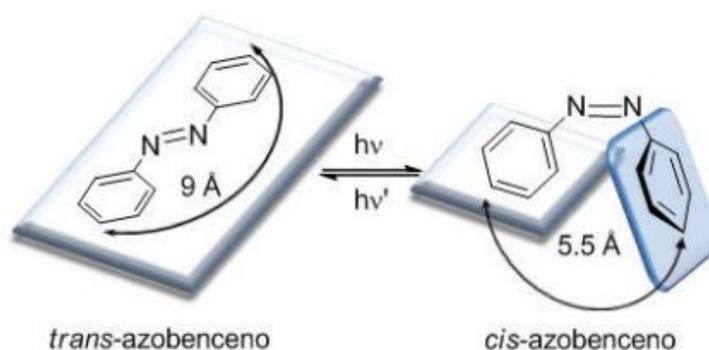


Figura 36. Fotoisomerización del azobenceno [6].

El espectro de absorción de UV de un azobenceno presenta dos bandas de absorción características, correspondientes a las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$. La transición $\pi \rightarrow \pi^*$ se encuentra generalmente en la región UV-cercano y es también común a sistemas carbonados referibles como el estilbena (Figura 37) [12]. La transición electrónica denominada $n \rightarrow \pi^*$ se suele situar en la región del visible, y se debe a la presencia del par de electrones sin compartir de los átomos de nitrógeno. Esta segunda transición electrónica hace que los azobencenos tengan un proceso dinámico de fotoisomerización diferente a los sistemas carbonados [13].

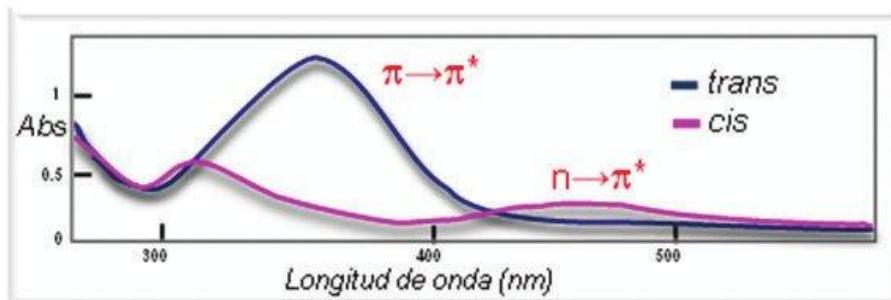
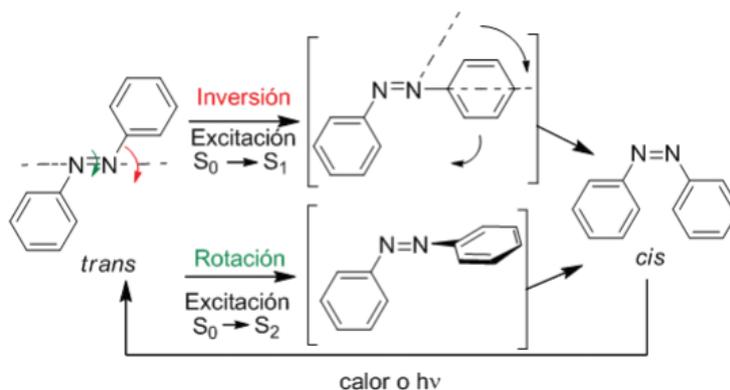


Figura 37. Ejemplo representativo del espectro de UV de azobenceno: línea azul, isómero trans; línea rosa, isómero cis.

El proceso de isomerización *trans*→*cis* suele ir también acompañado de un cambio de color a tonalidades más intensas. Los espectros de absorción de ambos isómeros se diferencian fundamentalmente en los siguientes aspectos:

- Isómero trans: la banda de absorción $\pi \rightarrow \pi^*$ es muy intensa, mientras que la segunda banda ($n \rightarrow \pi^*$) aparece mucho más débil, debido a que esta transición en el isómero trans no está permitida por las reglas de simetría (Figura 37, línea azul).
- Isómero cis: la banda $\pi \rightarrow \pi^*$ se desplaza a longitudes de onda más cortas (efecto hipsocrómico), disminuyendo notablemente en intensidad. Por otro lado, la transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$ (380-520 nm) en el isómero cis está permitida, lo que se traduce en un aumento de su intensidad con respecto al isómero trans (Figura 37, línea rosa).

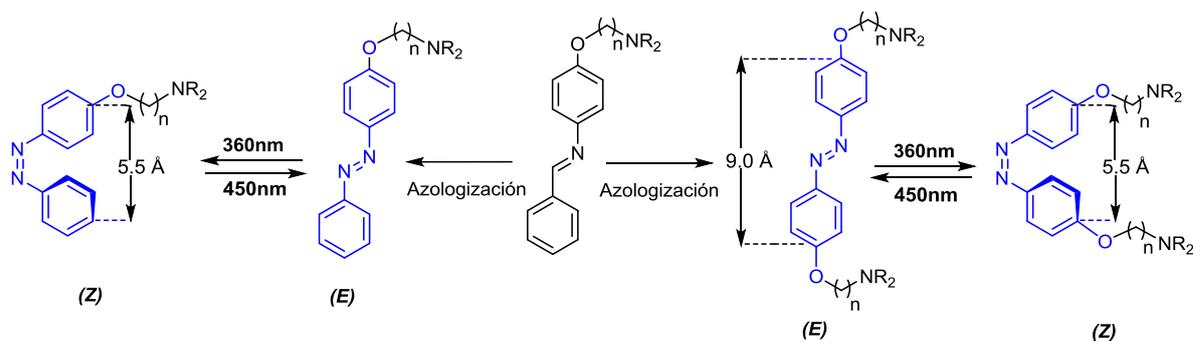
Aunque se han llevado a cabo varios estudios mecanísticos sobre la isomerización cis-trans de los azobenceno y se han estudiado los efectos de la presencia de sustituyentes, así como la influencia de varios parámetros [14], [15], el mecanismo no está perfectamente aclarado. Los datos disponibles hasta ahora sugieren que la isomerización de los azocompuestos puede transcurrir mediante la inversión de uno de los enlaces N-C o por la rotación del doble enlace N=N (**Esquema 8**). El par de electrones no enlazante de cada átomo de nitrógeno, puede dar lugar a una transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$ ($S_0 \rightarrow S_1$) con inversión del átomo de nitrógeno (mecanismo de inversión). Por otro lado, también puede darse la isomerización mediante un mecanismo de rotación, en el que se produce una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ ($S_0 \rightarrow S_2$). Este mecanismo es similar al que se produce en la isomerización del estilbenceno [16].



Esquema 8. Propuestas mecanísticas de la isomerización de azobencenos.

En la actualidad, muchos estudios se basan en la síntesis de derivados de azobenceno que, mediante su isomerización, puedan tener aplicación mediante la terapia de fotofarmacología frente a distintos blancos terapéuticos. Hoy en día, el control de la comunicación sináptica con la luz se ha convertido en un tema principal de investigación debido a su aplicación no invasiva, con una precisión espacial y temporal muy alta [17], [18]. Esto ha llevado a un enfoque de "azologización", término derivado del "azobenceno" combinado con "analogización", cuyo significado respalda que el azobenceno puede imitar motivos estructurales ("azosteres") que se encuentren en fármacos o candidatos a fármacos como los estilbenos, N-aryl benzamidas (heterocíclicas), bencil fenil (tio) éteres, bencil anilinas y 1,2-diaril etanos, ofreciendo la posibilidad de sensibilización a la luz y por lo tanto el control de sus funciones a través de ella [19]. El grupo de Trauner, por ejemplo, demostró la inhibición fotocontrolada de ACE utilizando un híbrido de azobenceno y tacrina [20].

Inspirándonos en este concepto de "azologización", se llevó a cabo el diseño y la síntesis asistida por microondas de nuevos compuestos reemplazando la estructura de azaestilbeno (Ph-C=N-Ph) de los compuestos sintetizados en el capítulo anterior, por la de azobenceno (Ph-N=N-Ph) (**Esquema 9**), teniendo en cuenta que los sustituyentes donadores de electrones en la estructura de azobenceno permitirán una fotoisomerización eficiente en solución acuosa con una lenta reversión térmica posterior [21].

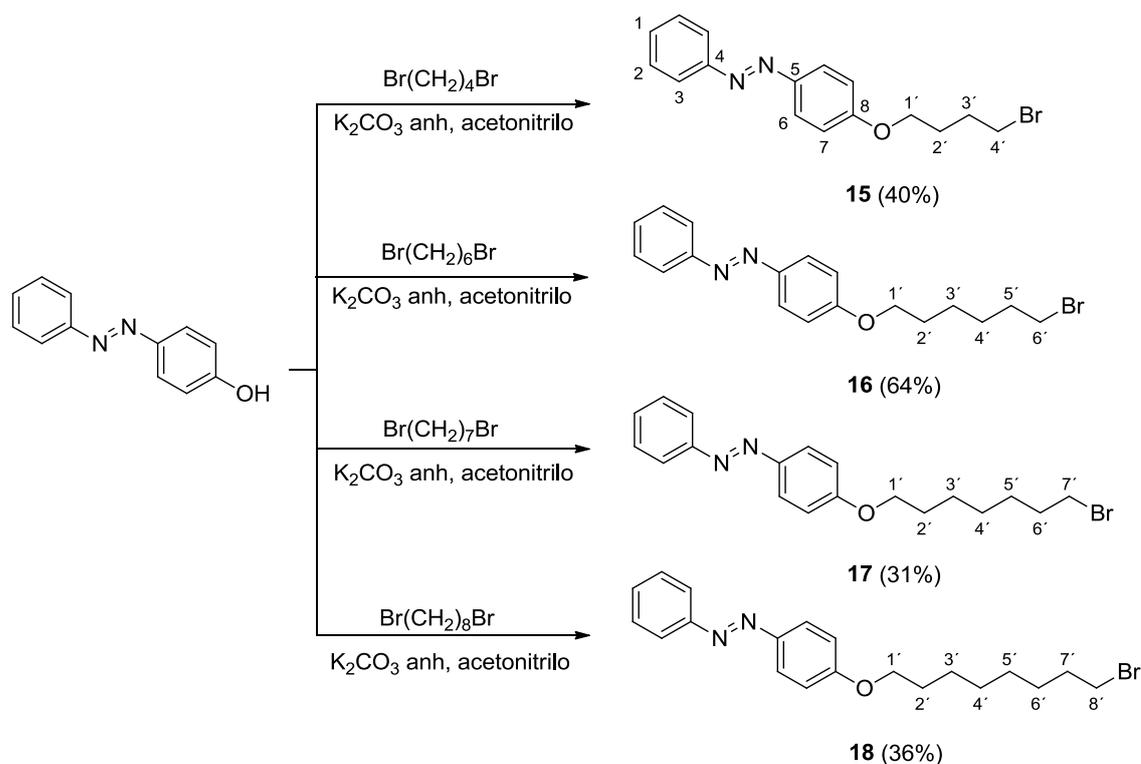


Esquema 9. Diseño de nuevos inhibidores de ACE a partir de la azologización de los derivados de azaetilbeno.

Se diseñó entonces la síntesis de nuevos derivados de azobencenos monosustituidos y disustituidos, con el objetivo de estudiar y comparar la capacidad de estos compuestos de inhibir la enzima ACE con la presencia, por un lado, de un *linker* unido a una amina terciaria y, por el otro, de dos *linkers* unidos a un grupo amino.

IV.1.2 Derivados sintéticos 15 - 22 y evaluación de la actividad biológica

Para la obtención de los derivados monosustituidos se utilizó como sustrato de partida 4-hidroxi-azobenceno y para la obtención de los compuestos disustituidos, 4,4'-dihidroxi-azobenceno. Estos reactivos de partida se hicieron reaccionar con el correspondiente dibromoalcano y posteriormente con una amina secundaria (pirrolidina, piperidina y piperazina) (Esquema 10). Estos dos pasos sintéticos se llevaron a cabo en microondas (CEM Discover) utilizando las mismas condiciones de potencia, tiempo y temperatura optimizadas en el capítulo 3 para la obtención de los azaetilbenos.



Esquema 11. Preparación de intermediarios 15-18.

Las **Tabla 24** y **Tabla 25** muestran los desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C de los intermediarios **15-18**. Los compuestos presentaron las señales correspondientes a los anillos aromáticos del azobenceno sustituido en posición *para* y las adicionales correspondientes a los grupos metileno de las diferentes cadenas alquílicas, que confirmaron la unión de las mismas a la porción aromática. Así, en los espectros de RMN de ^1H de todos los compuestos se presentaron las señales a campo bajo (en la zona de aromáticos) de dos dobletes de H6 e H7, y dos multipletes correspondientes a H3, H2 e H1. En el espectro de RMN de ^1H de **15** se observaron dos tripletes de H1' y H4' y dos multipletes de H2' e H3', en el de **16** las mismas cuatro señales para H1', H2', H3', H4', H5' e H6', en el de **17** las señales indicativas de la cadena de siete carbonos H1'-H7' y las ocho señales de H1'-H8' fueron las adicionales en el espectro de **18** (**Tabla 24**). En el espectro de RMN de ^{13}C de todos los derivados se asignaron las señales en la zona de aromáticos del azobenceno: C1-C8. Además, se identificaron las señales de las posiciones C1', C2', C3' y C4' para **15**, C1'-C6' para **16**, C1'-C7' para **17**, y C1'-C8' para **18** (**Tabla 25**).

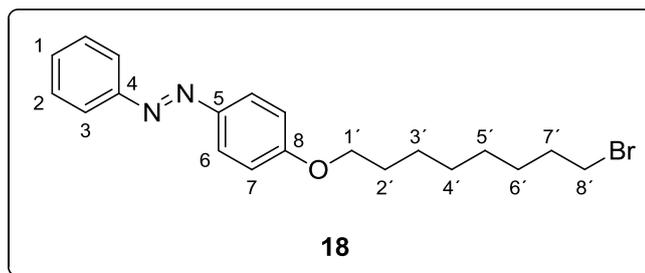


Tabla 24. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **15-18**. En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm (*multiplicidad, J* en Hz).

POSICIÓN	15	16	17	18
1	7,60 – 7,35 (<i>m</i>)	7,54 – 7,39 (<i>m</i>)	7,54 – 7,40 (<i>m</i>)	7,55 – 7,39 (<i>m</i>)
2	7,60 – 7,35 (<i>m</i>)	7,54 – 7,39 (<i>m</i>)	7,54 – 7,40 (<i>m</i>)	7,55 – 7,39 (<i>m</i>)
3	7,93 – 7,83 (<i>m</i>)	7,95 – 7,85 (<i>m</i>)	7,89 – 7,85 (<i>m</i>)	7,96 – 7,83 (<i>m</i>)
4				
5				
6	7,92 (<i>d</i> , 9,0 Hz)	7,95 – 7,85 (<i>m</i>)	7,91 (<i>d</i> , 9,0 Hz)	7,96 – 7,83 (<i>m</i>)
7	7,00 (<i>d</i> , 9,0 Hz)	6,99 (<i>d</i> , 8,9 Hz)	7,00 (<i>d</i> , 9,0 Hz)	7,00 (<i>d</i> , 8,7 Hz)
8				
1'	4,08 (<i>t</i> , 5,9 Hz)	4,03 (<i>t</i> , 6,4 Hz)	4,04 (<i>t</i> , 6,4 Hz)	4,03 (<i>t</i> , 6,4Hz)
2'	2,16 – 2,05 (<i>m</i>)	1,96 – 1,77 (<i>m</i>)	1,94 – 1,77 (<i>m</i>)	1,95 – 1,75 (<i>m</i>)
3'	2,04 – 1,93 (<i>m</i>)	1,58 – 1,48 (<i>m</i>)	1,58 – 1,35 (<i>m</i>)	1,52 – 1,28 (<i>m</i>)
4'	3,51 (<i>t</i> , 6,5 Hz)	1,58 – 1,48 (<i>m</i>)	1,58 – 1,35 (<i>m</i>)	1,54 – 1,30 (<i>m</i>)
5'		1,96 – 1,77 (<i>m</i>)	1,58 – 1,35 (<i>m</i>)	1,54 – 1,30 (<i>m</i>)
6'		3,42 (<i>t</i> , 6,8 Hz)	1,94 – 1,77 (<i>m</i>)	1,54 – 1,30 (<i>m</i>)
7'			3,42 (<i>t</i> , 6,8 Hz)	1,95 – 1,75 (<i>m</i>)
8'				3,41 (<i>t</i> , 6,8 Hz)

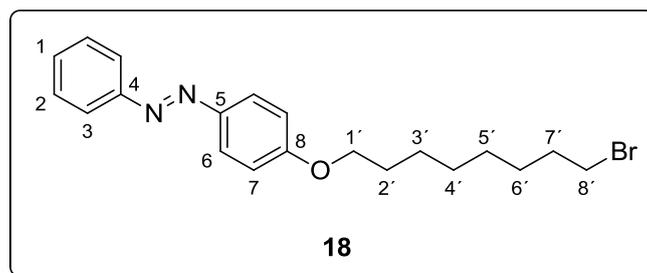
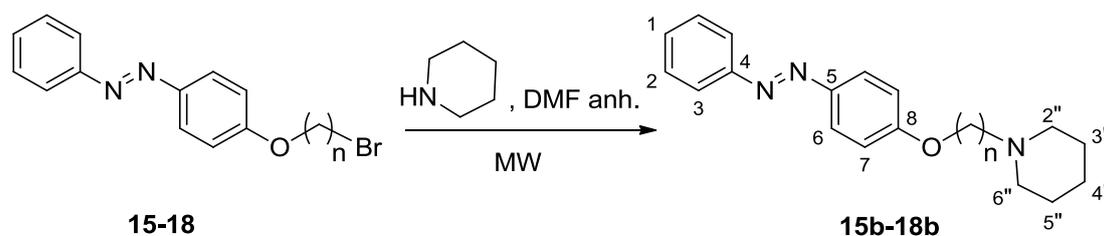


Tabla 25. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **15-18**. En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (*multiplicidad*).

POSICIÓN	15	16	17	18
1	130,5 (<i>d</i>)	130,4 (<i>d</i>)	130,4 (<i>d</i>)	130,4 (<i>d</i>)
2	129,2 (<i>d</i>)	129,1 (<i>d</i>)	129,2 (<i>d</i>)	129,2 (<i>d</i>)
3	122,7 (<i>d</i>)			
4	152,9 (<i>s</i>)			
5	147,2 (<i>s</i>)	147,1 (<i>s</i>)	147,0 (<i>s</i>)	147,0 (<i>s</i>)
6	124,9 (<i>d</i>)			
7	114,8 (<i>d</i>)			
8	161,5(<i>s</i>)	161,7 (<i>s</i>)	161,8 (<i>s</i>)	161,8 (<i>s</i>)
1'	67,3 (<i>t</i>)	68,2 (<i>t</i>)	68,3 (<i>t</i>)	68,4 (<i>t</i>)
2'	29,6 (<i>t</i>)	32,8 (<i>t</i>)	32,8 (<i>t</i>)	32,9 (<i>t</i>)
3'	28,0 (<i>t</i>)	28,0 (<i>t</i>)	28,7 (<i>t</i>)	29,3 (<i>t</i>)
4'	33,5 (<i>t</i>)	25,4 (<i>t</i>)	26,0 (<i>t</i>)	28,2 (<i>t</i>)
5'		29,2 (<i>t</i>)	28,2 (<i>t</i>)	26,1 (<i>t</i>)
6'		33,9 (<i>t</i>)	29,2 (<i>t</i>)	28,8 (<i>t</i>)
7'			34,0 (<i>t</i>)	29,3 (<i>t</i>)
8'				34,1 (<i>t</i>)

IV.1.2.1.2 Derivados con piperidina (15b-18b)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Capítulo 3, donde los compuestos más activos frente a la enzima ACE fueron aquellos que presentaban el grupo amino piperidina, esta fue la amina secundaria elegida para la síntesis de los nuevos derivados de azobenceno. Para obtener los derivados de 4-fenilazafenol con cadenas espaciadoras de 4, 6, 7 y 8 átomos de carbonos y piperidina como amina secundaria, se hicieron reaccionar los intermediarios bromados **15-18** con la mencionada amina (Esquema 12). Los rendimientos de estas reacciones llevadas a cabo en microondas (CEM Discover) fueron muy buenos (87-99%) y los tiempos de reacción no superaron los 10 minutos. La asignación completa de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C se informan en las Tabla 26 y Tabla 27, respectivamente. La unión de la amina a la cadena alquílica se confirmó por la presencia de las señales H2"/H6", H3"/H5" y H4" en los espectros de RMN de ^1H de los derivados, así como el desplazamiento a campo alto de las señales del metileno del espaciador unido a piperidina (Tabla 26). Las tres señales de RMN de ^{13}C de la porción piperidina de los derivados 15b-18b, se observaron a δ_c 54.8 (C2"/C6"), δ_c 26.1 (C3"/C5") y δ_c 24,6 (C4") (Tabla 27). Además, se desplazaron a campo bajo las señales del metileno del espaciador unido al nitrógeno de piperidina (δ_c 59 ppm)



Esquema 12. Obtención de derivados 15b-18b.

Tabla 26. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de los derivados **15b-18b**. En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).

POSICIÓN	15b	16b	17b	18b
1	7,54 – 7,38 (m)	7,54 – 7,39 (m)	7,56 – 7,37 (m)	7,55 – 7,36 (m)
2	7,54 – 7,38 (m)	7,54 – 7,39 (m)	7,56 – 7,37 (m)	7,55 – 7,36 (m)
3	7,95 – 7,83 (m)	7,95 – 7,84 (m)	7,96 – 7,83 (m)	7,95 – 7,84 (m)
4				
5				
6	7,95 – 7,83 (m)	7,95 – 7,85 (m)	7,96 – 7,83 (m)	7,95 – 7,84 (m)
7	6,99 (d, 9,0 Hz)	6,99 (d, 8,9 Hz)	7,00 (d, 9,0 Hz)	7,00 (d, 9,0 Hz)

8				
1'	4,06 (<i>t</i> , 6,3 Hz)	4,03 (<i>t</i> , 6,4 Hz)	4,03 (<i>t</i> , 6,6 Hz)	4,03 (<i>t</i> , 6,5 Hz)
2'	1,83 (<i>q</i> , 6,4 Hz)	1,64 – 1,33 (<i>m</i>)	1,87 – 1,76 (<i>m</i>)	1,81 (<i>q</i> , 6,6 Hz)
3'	1,77 – 1,63 (<i>m</i>)	1,64 – 1,33 (<i>m</i>)	1,54 – 1,29 (<i>m</i>)	1,54 – 1,24 (<i>m</i>)
4'	2,46 – 2,31 (<i>m</i>)	1,64 – 1,33 (<i>m</i>)	1,54 – 1,29 (<i>m</i>)	1,54 – 1,24 (<i>m</i>)
5'		1,64 – 1,33 (<i>m</i>)	1,54 – 1,29 (<i>m</i>)	1,54 – 1,24 (<i>m</i>)
6'		2,45 – 2,25 (<i>m</i>)	1,54 – 1,29 (<i>m</i>)	1,54 – 1,24 (<i>m</i>)
7'			2,45 – 2,23 (<i>m</i>)	1,54 – 1,24 (<i>m</i>)
8'				2,33 – 2,23 (<i>m</i>)
2''/6''	2,46 – 2,31 (<i>m</i>)	2,45 – 2,25 (<i>m</i>)	2,45 – 2,23 (<i>m</i>)	2,44 – 2,33 (<i>m</i>)
3''/5''	1,59 (<i>q</i> , 5,5 Hz)	1,64 – 1,33 (<i>m</i>)	1,66 – 1,54 (<i>m</i>)	1,64 – 1,54 (<i>m</i>)
4''	1,50 – 1,39 (<i>m</i>)	1,64 – 1,33 (<i>m</i>)	1,54 – 1,29 (<i>m</i>)	1,54 – 1,24 (<i>m</i>)

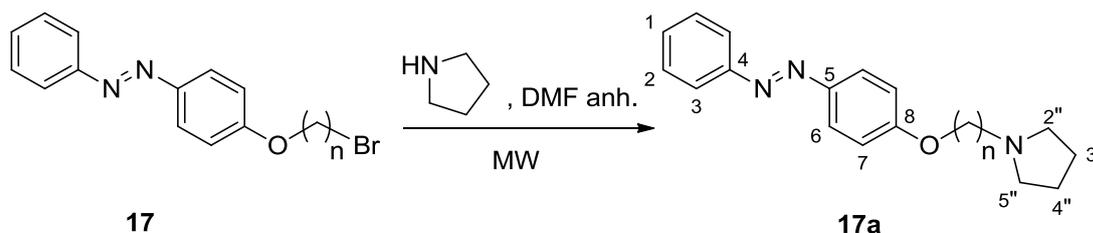
Tabla 27. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **15b-18b**. En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (*multiplicidad*).

POSICIÓN	15b	16b	17b	18b
1	130,4 (<i>d</i>)			
2	129,1 (<i>d</i>)			
3	122,7 (<i>d</i>)			
4	152,9 (<i>s</i>)			
5	147,0 (<i>s</i>)			
6	124,9 (<i>d</i>)			
7	114,8 (<i>d</i>)			
8	161,8 (<i>s</i>)			
1'	68,3 (<i>t</i>)	68,4 (<i>t</i>)	68,4 (<i>t</i>)	68,5 (<i>t</i>)
2'	27,5 (<i>t</i>)	29,3 (<i>t</i>)	29,5 (<i>t</i>)	29,6 (<i>t</i>)
3'	23,6 (<i>t</i>)	29,0 (<i>t</i>)	27,8 (<i>t</i>)	29,3 (<i>t</i>)
4'	59,3 (<i>t</i>)	26,2 (<i>t</i>)	26,1 (<i>t</i>)	27,0 (<i>t</i>)
5'		27,6 (<i>t</i>)	27,0 (<i>t</i>)	26,1 (<i>t</i>)
6'		59,6 (<i>t</i>)	29,3 (<i>t</i>)	27,8 (<i>t</i>)
7'			59,8 (<i>t</i>)	29,4 (<i>t</i>)

8'				59,8 (t)
2''/6''	54,8 (t)	54,8 (t)	54,8 (t)	54,8 (t)
3''/5''	26,1 (t)	26,1 (t)	26,1 (t)	26,1 (t)
4''	24,6 (t)	24,6 (t)	24,6 (t)	24,6 (t)

IV.1.2.1.3 Derivado con pirrolidina (17a)

Con el objetivo de obtener el derivado **17a**, se trató con pirrolidina el intermediario alquibromado **17** con una cadena espaciadora de 7 metilenos (**Esquema 13**). Esta reacción se llevó a cabo en microondas durante 10 minutos, con un rendimiento muy bueno (90%). Las señales de RMN de ^1H y ^{13}C se informan a continuación (**Tabla 28**). En el espectro de ^1H fueron identificadas las señales del anillo de pirrolidina (H2''/H5'' y H3''/H4'') junto con la señal del metileno de la cadena espaciadora unido a la amina (H7'), desplazada a campos altos. El espectros de RMN de ^{13}C del producto **17a** mostró dos señales adicionales más intensas, que fueron asignadas a la porción amino, C2''/C5'' y C3''/C4'' (**Tabla 28**). Asimismo, se observó un desplazamiento a campo bajo de la señal correspondiente al metileno de la cadena alquílica unido al nitrógeno de la amina (C7').



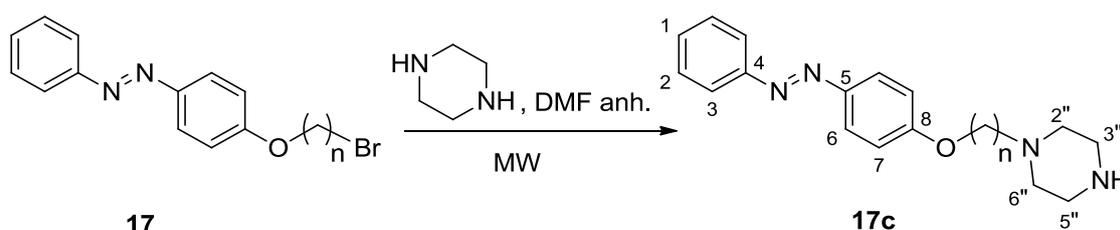
Esquema 13. Obtención del derivado 17a

Tabla 28. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C del derivado **17a**. En CDCl_3 , δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).

COMP. 17a	Desplazamiento químico (δ en ppm)
^1H -RMN (300 MHz)	7,95 – 7,85 (m, H3, H6), 7,56 – 7,37 (m, H2, H1), 7,00 (d, J = 9,0 Hz, H7), 4,03 (t, J = 6,4 Hz, H1'), 3,10 – 3,00 (m, H2''/H5''), 2,88 – 2,79 (m, H7'), 2,08 – 2,00 (m, H2', H6'), 1,87 – 1,75 (m, H3''/H4''), 1,53 – 1,38 (m, H3', H4', H5'),
^{13}C -RMN (75 MHz)	161,7 (C8), 152,9 (C4), 147,0 (C5), 130,4 (C1), 129,1 (C2), 124,8 (C6), 122,6 (C3), 114,8 (C7), 68,2 (C1'), 56,0 (C7'), 53,9 (C2''/C5''), 29,1 (C2'), 29,0 (C6'), 27,1 (C3'), 26,7 (C5'), 25,9 (C4'), 23,5 (C3''/C4''),

IV.1.2.1.4 Derivado con piperazina (17c)

El intermediario alquilbromado **17** también fue tratado con piperazina para obtener el derivado **17c** (Esquema 14) cuyo rendimiento fue muy bueno (92%) y sólo requirió un tiempo de reacción de 8 minutos, en microondas. La unión de la amina a la cadena alquílica se confirmó por el desplazamiento de H7' a campos altos y por la presencia de un triplete (4H) a δ_H 2.90 y un multiplete (4H) entre δ_H 2.48 - 2.37. Además, se observó un singulete (1H) uno propio del N-H en posición 4 de la piperazina. En el espectro de RMN de ^{13}C aparecieron las dos señales propias de la piperazina C2''/C6'' y C3''/C5'' y también un desplazamiento a campos menores de la señal de C7'. Las señales de RMN de 1H y ^{13}C se informan en la **Tabla 29**



Esquema 14. Obtención del derivado **17c**

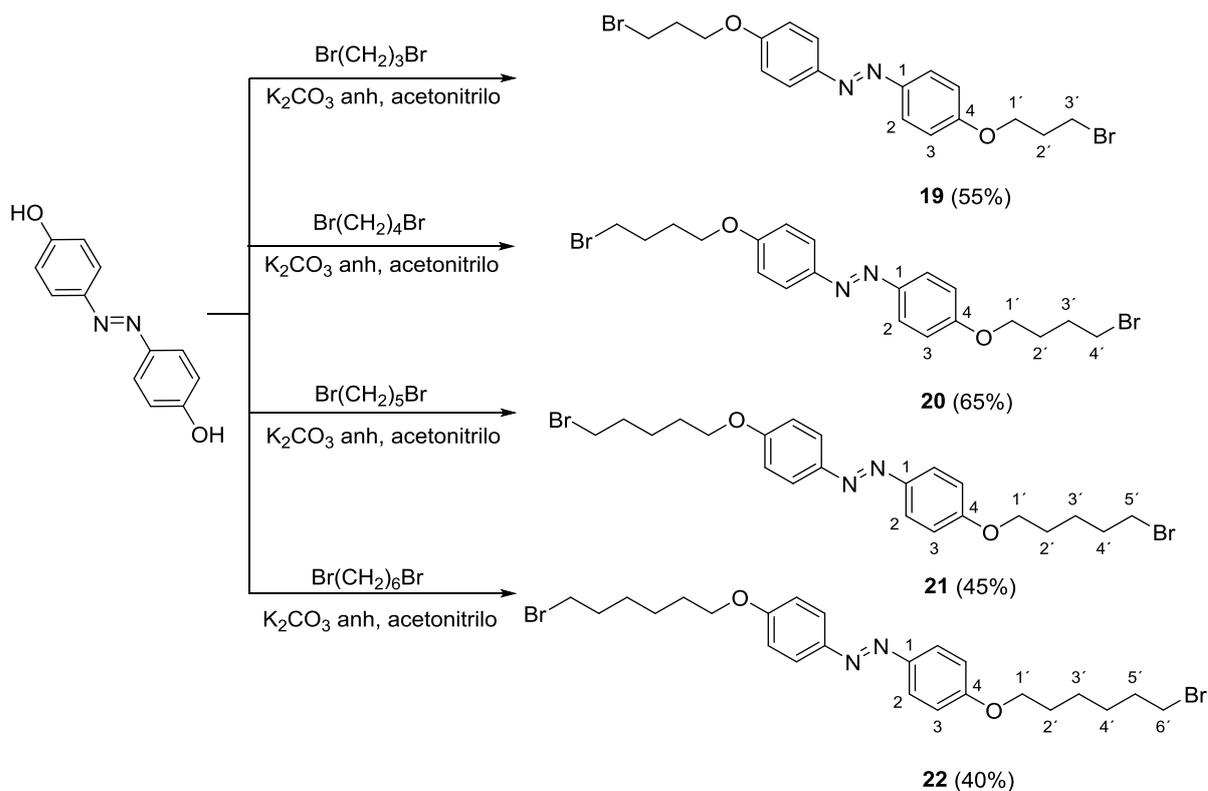
Tabla 29. Datos espectroscópicos de RMN de 1H y de ^{13}C del derivado **17c**. En $CDCl_3$, δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).

COMP. 17c	Desplazamiento químico (δ en ppm)
1H -RMN (300 MHz)	7,96 – 7,84 (<i>m</i> , H3 , H6), 7,55 – 7,37 (<i>m</i> , H2 , H1), 6,99 (<i>d</i> , J = 8,9 Hz, H7), 4,03 (<i>t</i> , J = 6,5 Hz, H1'), 2,90 (<i>t</i> , J = 4,8 Hz H3''/H5''), 2,48 – 2,37 (<i>m</i> , H2''/H6''), 2,35 – 2,28 (<i>m</i> , H7'), 2,10 (<i>s</i> , NH), 1,81 (<i>q</i> , j = 6,5 Hz, H2'), 1,57 – 1,31 (<i>m</i> , H3' , H4' , H5' , H6'),
^{13}C -RMN (75 MHz)	161,8 (C8), 152,9 (C4), 147,0 (C5), 130,4 (C1), 129,1 (C2), 124,8 (C6), 122,6 (C3), 114,8 (C7), 68,4 (C1'), 59,5 (C7'), 54,7 (C2''/C6''), 46,1 (C3''/C5''), 29,4 (C2'), 29,2 (C6'), 27,6 (C3'), 26,7 (C5'), 26,1 (C4'),

IV.1.2.2 Derivados a partir de 4,4'-dihidroxi-azobenceno

IV.1.2.2.1 Intermediarios alquilbromados 19-22

El tratamiento de 4,4'-dihidroxi-azobenceno con los correspondientes α,ω -dibromoalcanos produjo los intermediarios alquilbromados **19-22** con buenos rendimientos (40 a 65 %). El **Esquema 15** detalla la formación de todos los intermediarios disustituídos que poseen dos cadenas alquílicas de 3 a 6 átomos de carbono, unidas a los oxígenos fenólicos de la estructura de azobenceno.



Esquema 15. Preparación de intermediarios **19-22**

La **Tabla 30** y **Tabla 31** muestran los desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C de los intermediarios **19-22**. Los compuestos presentaron las señales por duplicado, debido a la simetría de la molécula, correspondientes al anillo aromático del azobenceno sustituido en posición *para* y las adicionales correspondientes a los grupos metilenos de las diferentes cadenas alquílicas, que confirmaron la unión de las mismas a la porción aromática.

Tabla 30. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **19-22**. En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm (*multiplicidad, J* en Hz).

POSICIÓN	19	20	21	22
1				
2	7,88 (<i>d</i> , 9,0)	7,86 (<i>d</i> , 8,5)	7,86 (<i>d</i> , 8,9)	7,86 (<i>d</i> , 8,9)
3	7,00 (<i>d</i> , 8,9)	6,98 (<i>d</i> , 8,6)	6,98 (<i>d</i> , 8,9)	6,98 (<i>d</i> , 9,0)
4				
1'	4,19 (<i>t</i> , 5,8)	4,07 (<i>t</i> , 5,8)	4,05 (<i>t</i> , 6,3)	4,04 (<i>t</i> , 6,4)
2'	2,36 (<i>q</i> , 6,1)	2,21 – 1,93 (<i>m</i>)	2,07 – 1,77 (<i>m</i>)	2,04 – 1,74 (<i>m</i>)
3'	3,63 (<i>d</i> , 6,4)	2,21 – 1,93 (<i>m</i>)	1,65 (<i>q</i> , 6,7)	1,53 (<i>q</i> , 3,5)
4'		3,50 (<i>t</i> , 6,3)	2,07 – 1,77 (<i>m</i>)	1,53 (<i>q</i> , 3,5)
5'			3,45 (<i>t</i> , 6,7)	2,04 – 1,74 (<i>m</i>)
6'				3,43 (<i>t</i> , 6,7)

Tabla 31 Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **19-22**. En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (*multiplicidad*).

POSICIÓN	19	20	21	22
1	147,3 (<i>s</i>)	147,2 (<i>s</i>)	147,2 (<i>s</i>)	147,1 (<i>s</i>)
2	124,5 (<i>d</i>)			
3	114,8 (<i>d</i>)			
4	160,8 (<i>s</i>)	161,0 (<i>s</i>)	161,1 (<i>s</i>)	161,2 (<i>s</i>)
1'	65,7 (<i>t</i>)	67,3 (<i>t</i>)	68,0 (<i>t</i>)	68,2 (<i>t</i>)
2'	30,0 (<i>t</i>)	29,6 (<i>t</i>)	32,6 (<i>t</i>)	32,8 (<i>t</i>)
3'	32,43 (<i>t</i>)	28,0 (<i>t</i>)	25,0 (<i>t</i>)	28,1 (<i>t</i>)
4'		33,5 (<i>t</i>)	28,6 (<i>t</i>)	25,4 (<i>t</i>)
5'			33,7 (<i>t</i>)	29,2 (<i>t</i>)
6'				33,9 (<i>t</i>)

IV.1.2.2.2 Derivados con pirrolidina (19a-22a)

Para obtener los derivados **19a-22a** se hicieron reaccionar los intermediarios con cadenas hidrocarbonadas de distintas longitudes (**19-22**) con pirrolidina, durante 20 minutos, en microondas (**Esquema 16**). Los rendimientos fueron excelentes (97 a 99%). Los espectros de RMN de ^1H mostraron las dos señales multipletes (4H) características del grupo pirrolidina y el desplazamiento a campos menores de la señal del metileno de la cadena alquímica unido al nitrógeno de la amina (Tabla 32). Asimismo en el espectro de RMN de ^{13}C se observaron dos señales adicionales de mayor intensidad pertenecientes al grupo amino ($\text{C}2''/\text{C}5''$ y $\text{C}3''/\text{C}4''$) y el desplazamiento a campos alto del metileno unido al nitrógeno de la pirrolidina (**Tabla 33**).

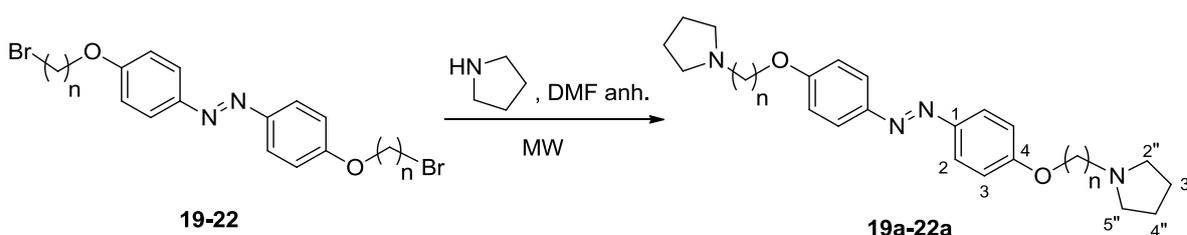
Esquema 16. Obtención de los derivados **19a-22a**.

Tabla 32. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **19a-22a**. En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).

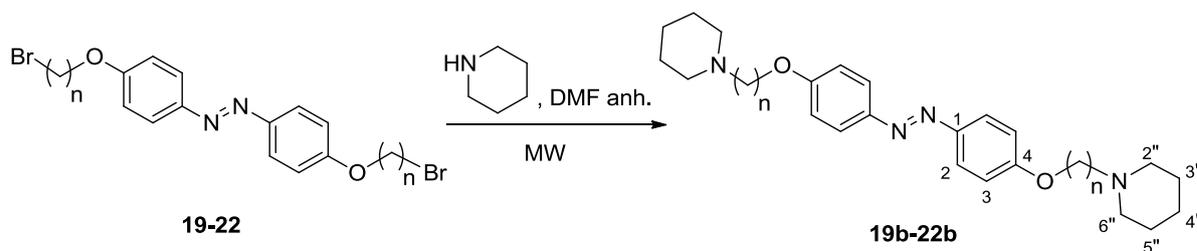
POSICIÓN	19a	20a	21a	22a
1				
2	7,86 (<i>d</i> , 8,9)	7,86 (<i>d</i> , 8,9)	7,85 (<i>d</i> , 8,8)	7,85 (<i>d</i> , 8,9)
3	7,00 (<i>d</i> , 8,9)	6,98 (<i>d</i> , 9,0)	6,97 (<i>d</i> , 8,9)	6,98 (<i>d</i> , 9,0)
4				
1'	4,11 (<i>t</i> , 6,4)	4,06 (<i>t</i> , 6,3)	4,03 (<i>t</i> , 6,5)	4,02 (<i>t</i> , 6,6)
2'	2,04 (<i>q</i> , 6,5)	1,92 – 1,67 (<i>m</i>)	1,90 – 1,73 (<i>m</i>)	1,89 – 1,73 (<i>m</i>)
3'	2,65 (<i>t</i> , 6,4)	1,92 – 1,67 (<i>m</i>)	1,65 – 1,47 (<i>m</i>)	1,63 – 1,35 (<i>m</i>)
4'		2,58 – 2,48 (<i>m</i>)	1,65 – 1,47 (<i>m</i>)	1,63 – 1,35 (<i>m</i>)
5'			2,55 – 2,41 (<i>m</i>)	1,63 – 1,35 (<i>m</i>)
6'				1,63 – 1,35 (<i>m</i>)
2''/5''	2,58 – 2,49 (<i>m</i>)	2,58 – 2,48 (<i>m</i>)	2,55 – 2,41 (<i>m</i>)	2,52 – 2,40 (<i>m</i>)
3''/4''	1,85 – 1,76 (<i>m</i>)	1,92 – 1,67 (<i>m</i>)	1,90 – 1,73 (<i>m</i>)	1,89 – 1,73 (<i>m</i>)

Tabla 33. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **19a-22a**. En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (*multiplicidad*).

POSICIÓN	19a	20a	21a	22a
1	147,1 (<i>s</i>)			
2	124,4 (<i>d</i>)			
3	114,8 (<i>d</i>)			
4	161,2 (<i>s</i>)	161,2 (<i>s</i>)	161,2 (<i>s</i>)	161,3 (<i>s</i>)
1'	66,9 (<i>t</i>)	68,2 (<i>t</i>)	68,3 (<i>t</i>)	68,4 (<i>t</i>)
2'	29,0 (<i>t</i>)	27,5 (<i>t</i>)	29,3 (<i>t</i>)	29,3 (<i>t</i>)
3'	53,25 (<i>t</i>)	25,7 (<i>t</i>)	24,3 (<i>t</i>)	27,6 (<i>t</i>)
4'		56,3 (<i>t</i>)	29,0 (<i>t</i>)	26,2 (<i>t</i>)
5'			56,6 (<i>t</i>)	29,2 (<i>t</i>)
6'				56,7 (<i>t</i>)
2''/5''	54,4 (<i>t</i>)	54,4 (<i>t</i>)	54,41 (<i>t</i>)	54,4 (<i>t</i>)
3''/4''	23,6 (<i>t</i>)	23,6 (<i>t</i>)	23,6 (<i>t</i>)	23,5 (<i>t</i>)

IV.1.2.2.3 Derivados con piperidina (19b-22b)

Con el objetivo de obtener los derivados **19b-22b**, se hizo reaccionar a los intermediarios 19-22 con piperidina (**Esquema 17**), por 20 minutos en microondas. Los rendimientos de estas reacciones fueron excelentes (95 a 99%). La asignación completa de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C se informan en las **Tabla 34** y **Tabla 35**, respectivamente. Se confirmó la unión de la porción piperidina a la cadena alquílica por el desplazamiento de la señal del metileno de la cadena unido al nitrógeno de la amina, además de la aparición de las tres señales características de este heterociclo (tres señales multipletes pertenecientes a H2''/H6'', H3''/H5'' e H4''). En el espectro de ^{13}C se observaron dos nuevas señales de mayor intensidad características de C2''/C6'' y C3''/C5'' y una señal, de C4'', a campos altos. La señal del metileno de la cadena alquílica unido al nitrógeno de la piperidina se desplazó a campos bajos.



Esquema 17. Obtención de los derivados **19b-22b**.

Tabla 34. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **19b-22b**. En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm (multiplicidad, J en Hz).

POSICIÓN	19b	20b	21b	22b
1				
2	7,85 (<i>d</i> , 8,9)	7,86 (<i>d</i> , 9,0)	7,85 (<i>d</i> , 8,9)	7,85 (<i>d</i> , 8,8)
3	6,99 (<i>d</i> , 8,9)	6,98 (<i>d</i> , 9,0)	6,97 (<i>d</i> , 9,0)	6,98 (<i>d</i> , 8,9)
4				
1'	4,08 (<i>t</i> , 6,4)	4,05 (<i>t</i> , 6,1)	4,03 (<i>t</i> , 6,5)	4,02 (<i>t</i> , 6,5)
2'	2,01 (<i>q</i> , 6,5)	1,86 – 1,76 (<i>m</i>)	1,83 (<i>q</i> , 6,6)	1,81 (<i>q</i> , 6,6)
3'	2,54 – 2,45 (<i>m</i>)	1,75 – 1,65 (<i>m</i>)	1,66 – 1,38 (<i>m</i>)	1,64 – 1,32 (<i>m</i>)
4'		2,47 – 2,32 (<i>m</i>)	1,66 – 1,38 (<i>m</i>)	1,64 – 1,32 (<i>m</i>)
5'			2,45 – 2,28 (<i>m</i>)	1,64 – 1,32 (<i>m</i>)
6'				2,44 – 2,24 (<i>m</i>)
2''/6''	2,45 – 2,36 (<i>m</i>)	2,47 – 2,32 (<i>m</i>)	2,45 – 2,28 (<i>m</i>)	2,44 – 2,24 (<i>m</i>)
3''/5''	1,60 (<i>q</i> , 5,5)	1,65 – 1,53 (<i>m</i>)	1,66 – 1,38 (<i>m</i>)	1,64 – 1,32 (<i>m</i>)
4''	1,49 – 1,40 (<i>m</i>)	1,50 – 1,37 (<i>m</i>)	1,66 – 1,38 (<i>m</i>)	1,64 – 1,32 (<i>m</i>)

Tabla 35. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **19b-22b**. En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm (multiplicidad).

POSICIÓN	19a	20a	21a	22a
1	147,1 (<i>s</i>)			
2	124,4 (<i>d</i>)			
3	114,8 (<i>d</i>)			
4	161,2 (<i>s</i>)	161,2 (<i>s</i>)	161,2 (<i>s</i>)	161,3 (<i>s</i>)
1'	67,0 (<i>t</i>)	68,2 (<i>t</i>)	68,3 (<i>t</i>)	68,3 (<i>t</i>)

2'	27,0 (t)	27,5 (t)	29,3 (t)	29,3 (t)
3'	56,1 (t)	23,6 (t)	24,4 (t)	27,0 (t)
4'		59,2 (t)	26,8 (t)	26,2 (t)
5'			59,6 (t)	27,7 (t)
6'				59,7 (t)
2''/6''	54,8 (t)	54,8 (t)	54,8 (t)	54,8 (t)
3''/5''	26,2 (t)	26,1 (t)	26,1 (t)	26,2 (t)
4''	24,6 (t)	24,6 (t)	24,6 (t)	24,7 (t)

IV.1.2.3 Estudio de inhibición in vitro sobre ACE de los derivados 15 – 22

Se evaluó la actividad inhibitoria sobre ACE de los derivados de azobenceno **15-22**. Los valores de IC_{50} para la inhibición de ACE se muestran en la **Tabla 36**

Tabla 36. Actividad inhibitoria sobre ACE de los derivados **15-22**

Comp.	-NR ₂	n	IC ₅₀ (μM)	ACE		(BBB permeation (±) and BBB score) ^a
				log IC ₅₀ ± DS		
4-hidroxiazobenceno			No inhibe a 100 μM			BBB+ (0,085)
	15b	piperidina	4	8,52	0,931 ± 0,086	BBB+ (0,104)
	16b	piperidina	6	5,16	0,713 ± 0,051	BBB+ (0,104)
	17a	pirrolidina	7	4,40	0,649 ± 0,070	BBB+ (0,106)
	17b	piperidina	7	0,96	-0,018 ± 0,12	BBB+ (0,104)
	17c	piperazina	7	> 50	-	BBB+ (0,085)
	18b	piperidina	8	1,89	0,276 ± 0.104	BBB+ (0,104)
	19a	pirrolidina	3	2,49	2,491 ± 0,098	BBB+ (0,118)
	19b	piperidina	3	1,27	0,103 ± 0,046	BBB+ (0,113)
	20a	pirrolidina	4	1,08	0,037 ± 0,030	BBB+ (0,098)
	20b	piperidina	4	0,84	-0.078 ± 0.093	BBB+ (0,119)
	21a	pirrolidina	5	0,97	-0.015 ± 0.025	BBB+ (0,123)
	21b	piperidina	5	0,65	-0.190 ± 0.054	BBB+ (0,119)
	22a	pirrolidina	6	1,60	0,205 ± 0,059	BBB+ (0,091)
	22b	piperidina	6	1,26	0.099 ± 0.044	BBB+ (0,119)
tacrina				0,029	-1,53 ± 0,050	BBB+ (0,120)

Los resultados muestran una tendencia de los compuestos respecto a la longitud de la cadena espaciadora, al igual que ocurrió con los derivados de azaestilbeno (Capítulo 3). Dentro del grupo de los derivados de azobenceno monosustituidos, el inhibidor más potente fue **17b**, con un *linker* de 7 carbonos unido al anillo de piperidina, que mostró un IC_{50} de 0,95 μM. De la serie de los derivados que presentan una molécula de azobenceno 4,4' disustituido, el compuesto **21b** con dos cadenas hidrocarbonadas de 5 metilenos unidas a una molécula de piperidina, fue el más activo con un IC_{50} de 0,65 μM. Los resultados reflejan, que de los compuestos con igual longitud de *linker*, son más activos aquellos que presentan unido el grupo amino de la piperidina (**Figura 38**).

El derivado **16c**, con un *linker* de siete carbonos unido a piperazina, fue el único compuesto de la serie que no mostró actividad inhibitoria frente ACE. Este resultado fue llamativo ya que el compuesto es de estructura similar al derivado más activo (**16b**), con la única diferencia que presenta un átomo de nitrógeno con un hidrógeno (N-H) en posición 4 del grupo amino. Este resultado puede deberse al efecto atractor de electrones del átomo de oxígeno, que podría reducir la densidad electrónica de la amina terciaria, afectando su protonación y así disminuir la interacción entre el amonio y el CAS de ACE. Un efecto similar fue observado anteriormente en nuestro grupo de investigación [22] debido a la presencia de un anillo de morfolina unido mediante una cadena alquílica a una estructura diterpenoide.

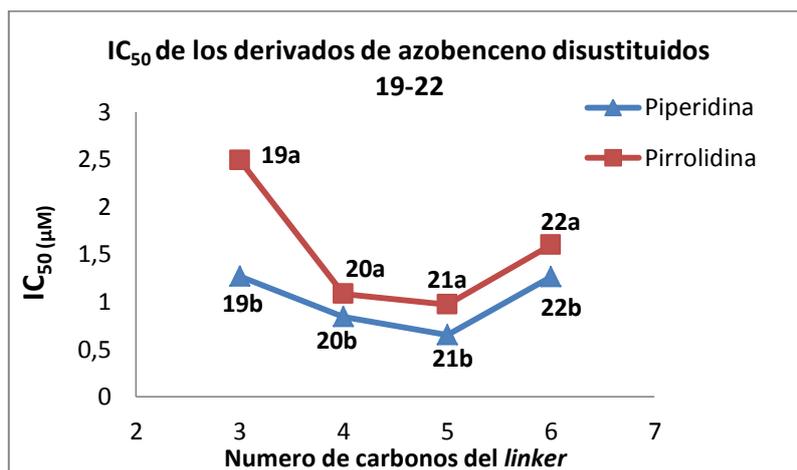


Figura 38. Gráfica de IC₅₀ de los derivados **19-22** en función del número de carbonos del *linker*.

Teniendo en cuenta que los derivados con el grupo amino piperidina fueron los inhibidores más potentes, se eligieron aquellos con *linkers* de número de metilenos pares (**16b**, **18b**, **20b**) e impares (**17b** y **19b**) para estudiar su fotoisomerización y así, evaluar la potencia de inhibición sobre ACE del isómero *Z* de estos compuestos y compararla con la del isómeros *E* ya evaluada.

IV.1.2.4 Predicción de la barrera hematoencefálica

Se llevó a cabo la predicción de la permeación de la BHE utilizando un servidor predictor en línea (<http://www.cbligand.org/BBB/>), perteneciente a la base de conocimiento de quimiogenómica de la enfermedad de Alzheimer: AlzPlatform [23], [24]. Los resultados se incluyen en la **Tabla 36** como valores de BBB (por sus siglas en inglés *blood brain barrier*). Todos los compuestos exhibieron una predicción de permeabilidad de la BHE alta (BBB +) con puntajes que van desde 0,085 a 0,123. Es para resaltar que todos los derivados mostraron

puntajes BBB más altos que los azobenceno de partida que mostraron el puntaje BBB más bajo (0,066 y 0,085). Además, para los compuestos **20b** y **21b** (los inhibidores más activos de la tabla) los puntajes BBB previstos fueron similares al puntaje de tacrina (0,120) e incluso la predicción para **21a** (0,123) mostró un valor de BBB mayor que éste. Este análisis predice que los compuestos serían capaces de atravesar la BHE de una manera eficaz.

IV.1.2.5 Capacidad de fotomodulación de los derivados de azobenceno

IV.1.2.5.1 Fotoisomerización E-Z detectada por Espectroscopía UV-Visible

Se seleccionaron dos derivados de azobenceno monosustituídos (**16b** y **18b**) y dos disustituídos (**19b** y **20b**) para evaluar su capacidad de fotomodulación a través de experimentos de espectroscopia UV-Vis utilizando como solvente MeOH. Los compuestos fueron disueltos en MeOH y expuestos a irradiación con luz UV a un $\lambda = 360$ nm durante 5 minutos.

En el caso de los compuestos **16b** y **18b**, ambos presentaron en solución metanólica, de color amarillo claro, la banda de absorción correspondiente a la transición $\pi-\pi^*$ del grupo azobenceno, observándose el $\lambda_{\text{máx}}$ de 344 nm. Después de la exposición con luz UV (360 nm, 8 watts, 5 min) se alcanza un equilibrio fotoestacionario (PSS) con un porcentaje de E:Z (19:81) para **16b** y de E:Z (16:84) para **18b**, cambiando significativamente el color de las soluciones amarillas a anaranjadas (**Figura 39 A** y **Figura 40 A**). Luego de la fotoisomerización, la banda de absorción de ambos compuestos a 344 nm decrece marcadamente detectándose un desplazamiento del máximo de absorción hacia la zona del azul del espectro ultravioleta, centrado en $\lambda_{\text{máx}}$ 314 nm. También aparece una banda a $\lambda_{\text{máx}}$ 435 nm de **16b** (Z) y a $\lambda_{\text{máx}}$ 438 nm de **18b** (Z), correspondientes a la transición $n-\pi^*$. La relación del PSS de los isómeros E y Z fue correlacionada con experimentos de RMN de ^1H para **18b** (IV.1.2.5.2). La reversión térmica Z-E total, para ambos compuestos, se obtuvo a las 24 horas en oscuridad.

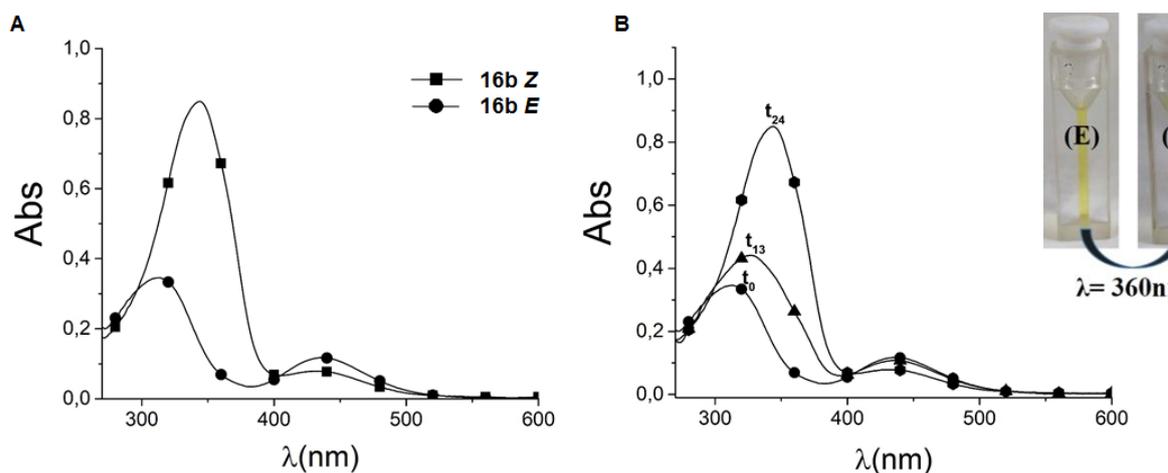


Figura 39. A) Espectro de Absorción UV-Vis de **16b** (45 μ M) antes y después de la irradiación con luz UV (360 nm, 8 watts, 5 min) en metanol. El equilibrio fotoestacionario alcanzado después de la iluminación UV muestra una variación del porcentaje de E:Z (19:81). **B)** Reversión en oscuridad (unidad de tiempo en horas): reversión total Z-E a las 24 h.

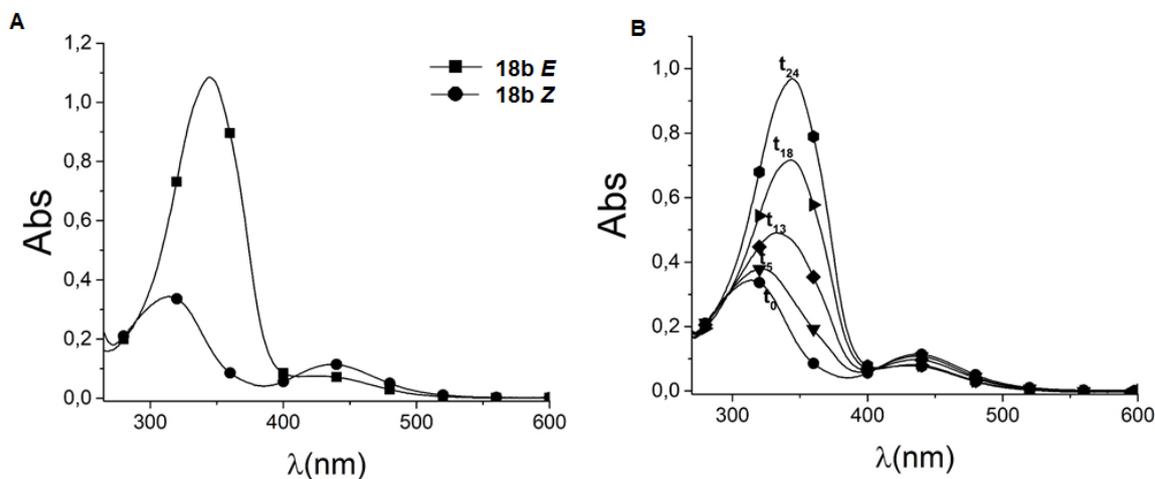


Figura 40. A) Espectro de Absorción UV-Vis de **18b** (45 μ M) antes y después de la irradiación con luz UV (360 nm, 8 watts, 5 min) en metanol. El equilibrio fotoestacionario alcanzado después de la iluminación UV muestra una variación del porcentaje de E:Z (16:84). **B)** Reversión en oscuridad (unidad de tiempo en horas): reversión total Z-E a las 24 h.

La solución metanólica del compuesto **19b** de color amarillo, presentó una banda de absorción correspondiente a la transición π - π^* del grupo azobenceno a una $\lambda_{\text{máx}}$ de 353 nm pertenecientes al isómero *E*. Luego de la iluminación con luz UV (360 nm, 8 watts, 5 min) la solución cambia a color naranja alcanzando un equilibrio fotoestacionario estabilizado (PSS) de *E*:*Z* (11:89). El espectro muestra un desplazamiento del $\lambda_{\text{máx}}$ a 314 nm y la aparición de la banda correspondiente a la transición n - π^* a 446 nm del isómero *Z*. Cuando la irradiación finalizó, el espectro de absorción de **19b** (*E*) fue lentamente recuperado debido a reversión térmica (17 horas en oscuridad) (**Figura 41 B**).

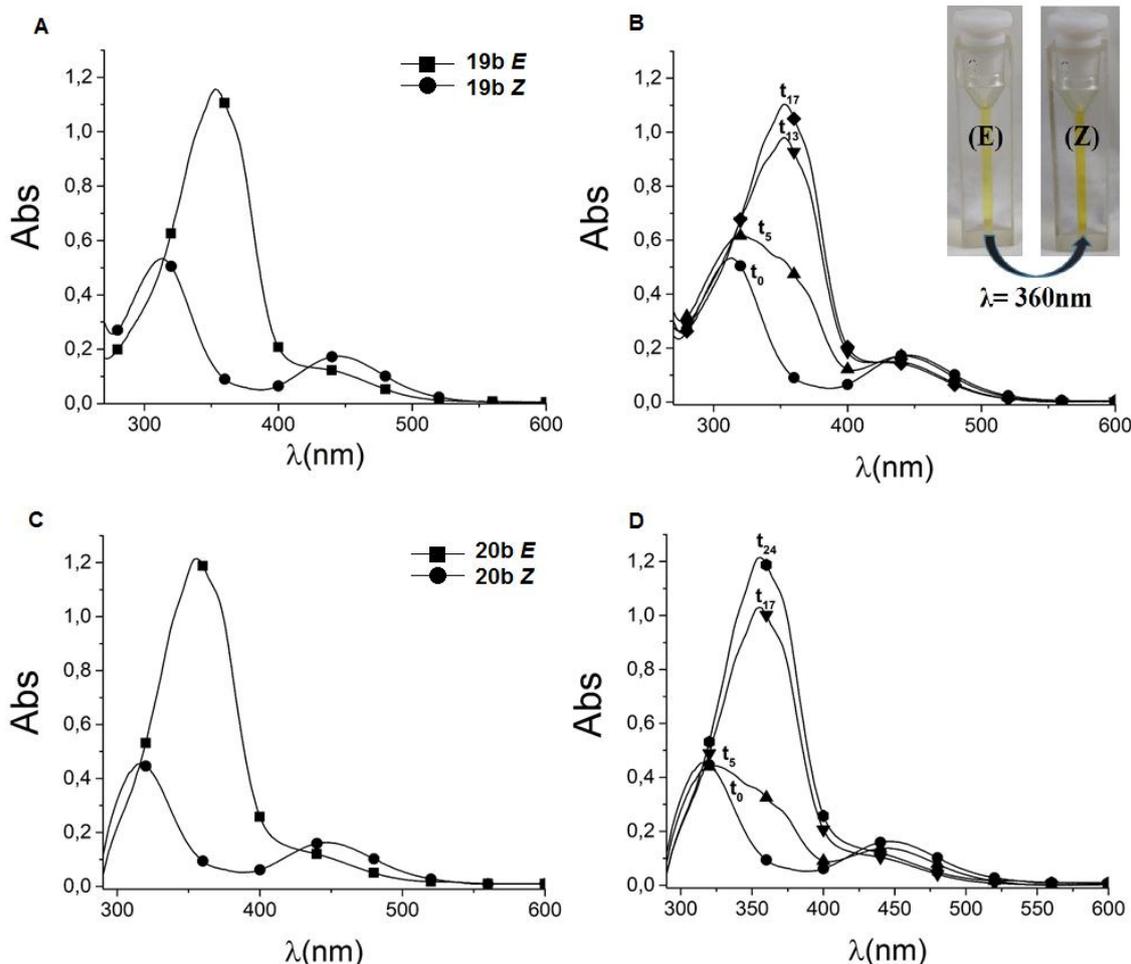


Figura 41. Espectros de absorción UV-Vis antes y después de la irradiación con luz UV (360 nm, 8 watts, 5 min) en metanol. **A)** El equilibrio fotoestacionario de **19b** (45 μM) alcanzado después de la iluminación UV muestra una variación del porcentaje de E:Z (11:89). **B)** Reversión en oscuridad total Z-E a las 17 horas. **C)** Para **20b** (43 μM) la variación del porcentaje de E:Z fue (9:91). **D)** La reversión total Z-E en oscuridad fue a las 24 h.

El compuesto **20b** forma una disolución de color amarillo que, al igual que los derivados anteriores, se torna de color naranja con la exposición de luz ultravioleta. A partir del isómero *E* puro, se observó luego de la irradiación (360 nm, 8 watts, 5 min.) una modificación significativa en la relación de isómeros, a *E*:*Z* (9:91). Las relaciones del equilibrio fotoestacionario antes y después de la fotoconversión, fueron correlacionadas con experimentos de espectroscopia de RMN de ^1H (IV.1.2.5.2). En el espectro de UV-Vis de **20b** se observa la transición π - π^* correspondiente con la aparición de una banda de absorción de $\lambda_{\text{máx.}}$ de 356 nm (**Figura 41 C**) la cual, decrece y se desplaza a longitudes de onda menores, 314 nm, luego de la fotoisomerización *E*/*Z*. A su vez, aparece más acentuada la banda correspondiente a la transición n - π^* a 446 nm. La reversión térmica *Z*-*E* fue lo suficientemente lenta para permitir la evaluación de ambos PSS por separado (**Figura 41 D**).

En la **Tabla 37** se muestra el efecto hipsocrómico como consecuencia de la fotoconversión, en el cual las bandas de absorción correspondientes a la transición $\pi-\pi^*$ se desplazan hacia longitudes de onda menores (zona azul del espectro visible).

Tabla 37. Comparación de los $\lambda_{\text{máx.}}$ de las transiciones $\pi-\pi^*$ y $n-\pi^*$ antes y después de la fotoisomerización indicando el porcentaje de fotoconversión en cada caso.

COMPUESTO	Isómero trans (<i>E</i>)	Isómero cis (<i>Z</i>)	Porcentaje de fotoconversión (%)
	$\lambda_{\text{máx.}}$ en nm ($\pi-\pi^*$)	$\lambda_{\text{máx.}}$ en nm ($\pi-\pi^*$) $\lambda_{\text{máx.}}$ en nm ($n-\pi^*$)	
16b	344	314 435	81
18b	344	314 438	84
19b	353	314 446	89
20b	356	316 446	91

IV.1.2.5.2 Fotoisomerización E-Z detectada por espectroscopia de RMN de ^1H

La capacidad de fotomodulación de los derivados **18b** y **20b** y los porcentajes de fotoisomerización también fueron evaluados a través de experimentos de RMN de ^1H (300 MHz). El procedimiento experimental consistió en disolverlos en cloroformo deuterado en un tubo de RMN, y exponerlos a irradiación con luz UV a un $\lambda = 360$ nm (8 watts) durante 90 minutos para evaluar la fotoisomerización. Los espectros de los compuestos irradiados fueron tomados en condiciones de oscuridad para minimizar la fotorreversión durante las medidas.

La Figura 43 muestra la sección aromática del espectro de RMN de ^1H de **18b** antes y después de la fotoisomerización. Luego de 30 minutos de exposición a la luz UV a 360 nm fue evidente la presencia de un 50% del isómero Z a campos más altos (Figura 43 B). Después de 90 minutos de exposición a la luz UV se produjo una modificación del equilibrio fotoestacionario a E: Z (10:90) (Figura 43 C). Se obtuvo un 90% del isómero Z detectándose el nuevo conjunto de señales de RMN de ^1H con la misma multiplicidad e igual constante de acoplamiento (*J*) que el isómero *E* pero desplazadas hacia campos mayores. Los picos asignados a los protones más próximos al centro de isomerización (H6, H3) se desplazaron significativamente a campos más altos que las señales correspondientes al resto de los protones aromáticos. Estos también sufrieron un efecto de apantallamiento, aunque no tan marcado, siendo menos desprotegidos a causa de la isomerización (H2, H1, H7). Estos cambios espectrales son consistentes con observaciones previas para otros tipos de derivados de

azobencenos [25] y se explica teniendo en cuenta que el isómero *E* es plano, mientras que el *Z* no lo es: los anillos aromáticos están girados entre sí para evitar contactos estrechos entre los átomos de hidrógeno del anillo. En este nuevo microambiente, el apilamiento de anillos aromáticos (π -stacking) u otras interacciones físicas conducen a cambios en las señales de RMN. En la **Figura 44**, en la zona de señales alifáticas, se puede observar también un desplazamiento de la señal triplete de los H1' hacia campos mayores para el isómero *Z*.

La Figura 45 muestra los resultados del espectro de RMN para **20b** en las condiciones de trabajo ya descritas. Previo a la irradiación no había presencia del isómero *Z* según RMN (Figura 45 A). Luego de la misma, a los 5 minutos, se obtuvo un estado estacionario *E:Z* (90:10) (Figura 45 B). Y luego de 90 minutos de irradiación el equilibrio *E:Z* se modificó (90:10), evidenciando la presencia de un 90% de isómero *Z*. En la Figura 45 C se pueden observar las señales de los protones aromáticos del isómero *Z* de **20b**, las cuales resultaron desplazadas respecto al isómero *E* a campos mayores debido a los efectos del apantallamiento por la isomerización, tal como se explicó para **18b**. En la zona de señales alifáticas se encontró para el isómero *Z* un desplazamiento a campos mayores de la señal de los hidrógenos del metileno unido a oxígeno, manteniéndose el resto de los desplazamientos similares a las del isómero *E* (Figura 46).

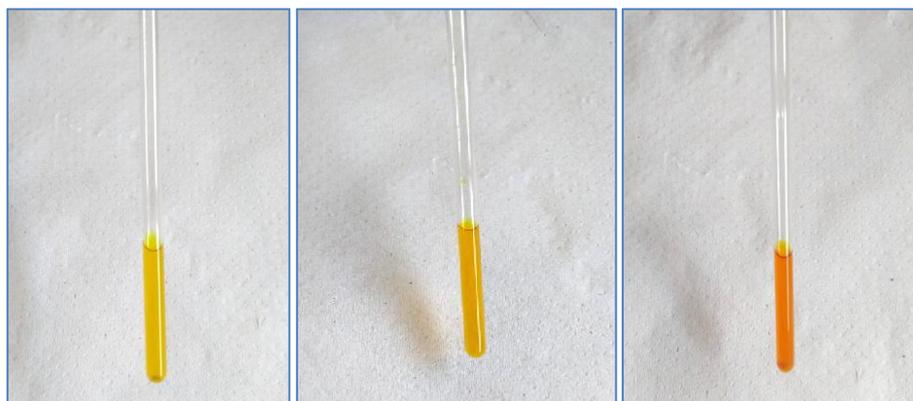


Figura 42. Tubo de RMN con solución de **18b** en cloroformo deuterado A) Antes de exponer a luz ultravioleta, color amarillo claro. B) Luego de exposición con luz UV durante 30 minutos (360 nm, 8 watts), color amarillo fuerte. C) Luego de exposición con luz UV durante 90 minutos (360 nm, 8 watts), color naranja.

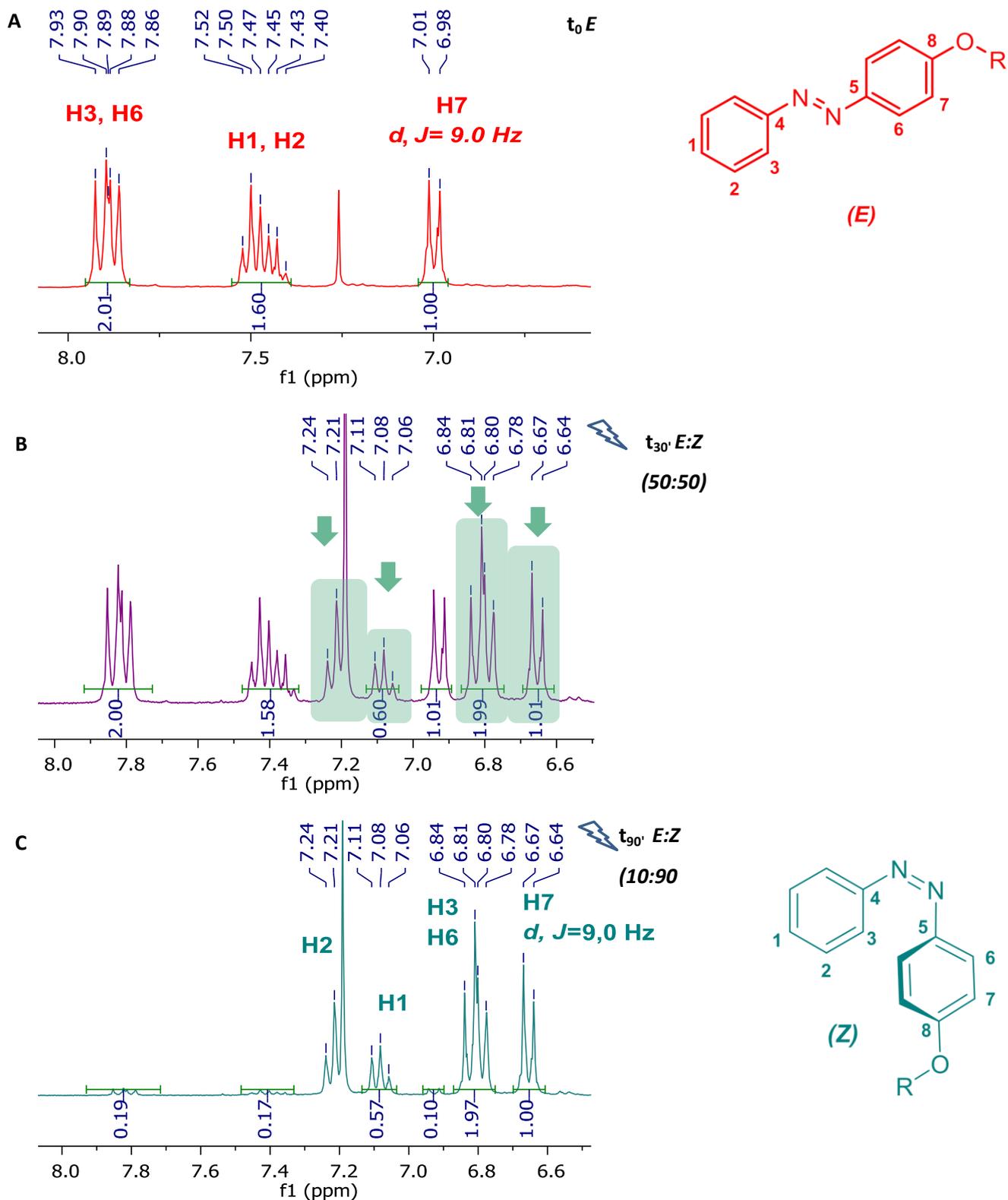


Figura 43. Zona aromática del espectro RMN de ^1H de **18b**. A) Antes de irradiar con luz UV (t_0), asignación de **18b** (E). B) Después de irradiar con luz UV (360 nm, 8 watts, 30 minutos), se observa la presencia del 50% del isómero Z. C) Luego de irradiar con luz UV 90 minutos, asignación de **18b** (Z), 90%.

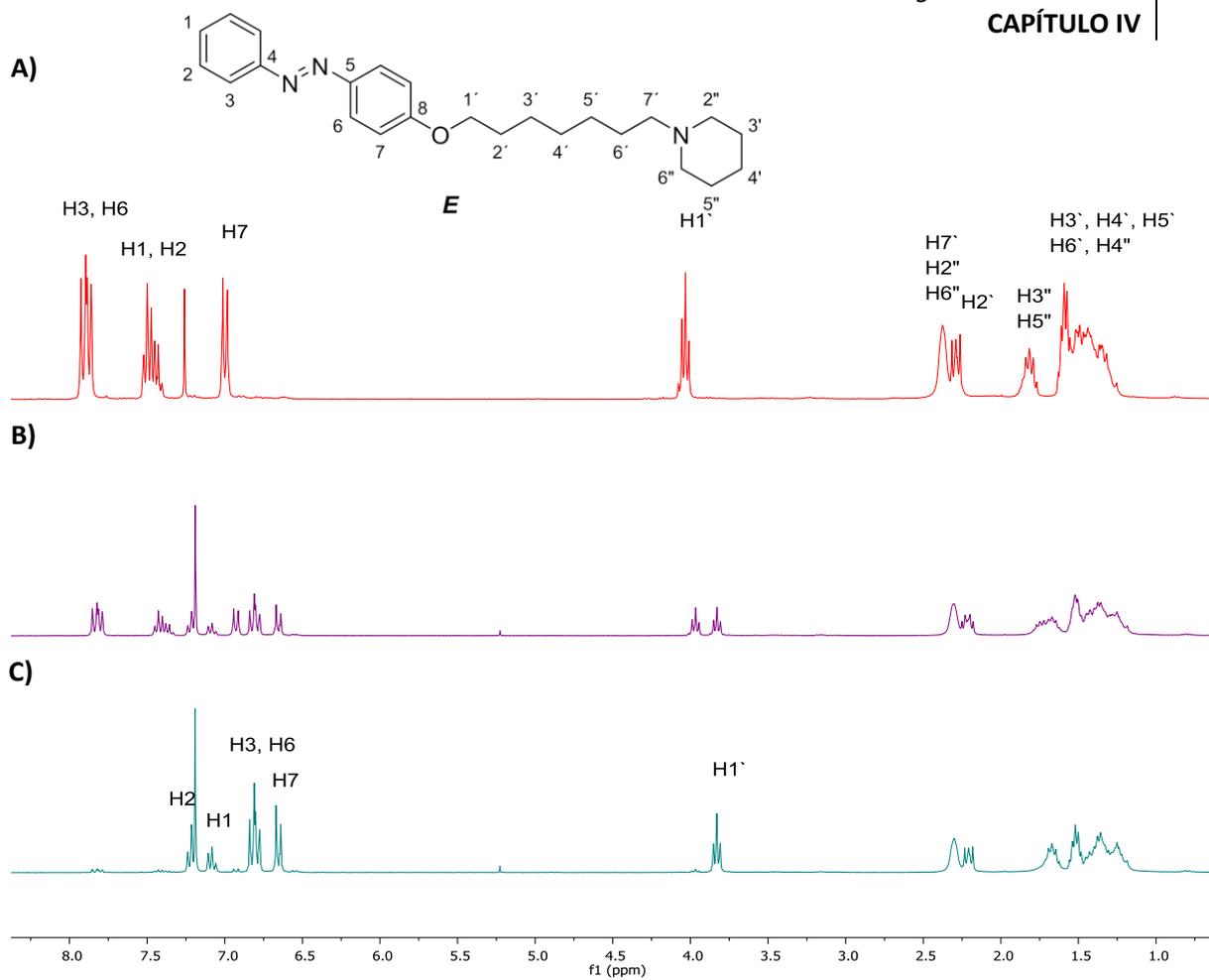


Figura 44. RMN de ^1H de **18b**. **A)** Antes de irradiar con luz UV, asignando **18b** (*E*). **B)** Luego de irradiar 30' con luz UV, aparecen las señales del isómero *Z*. **C)** Luego de irradiar con luz UV 90 minutos, se observan las señales de **18b** (*Z*) en un 90%.

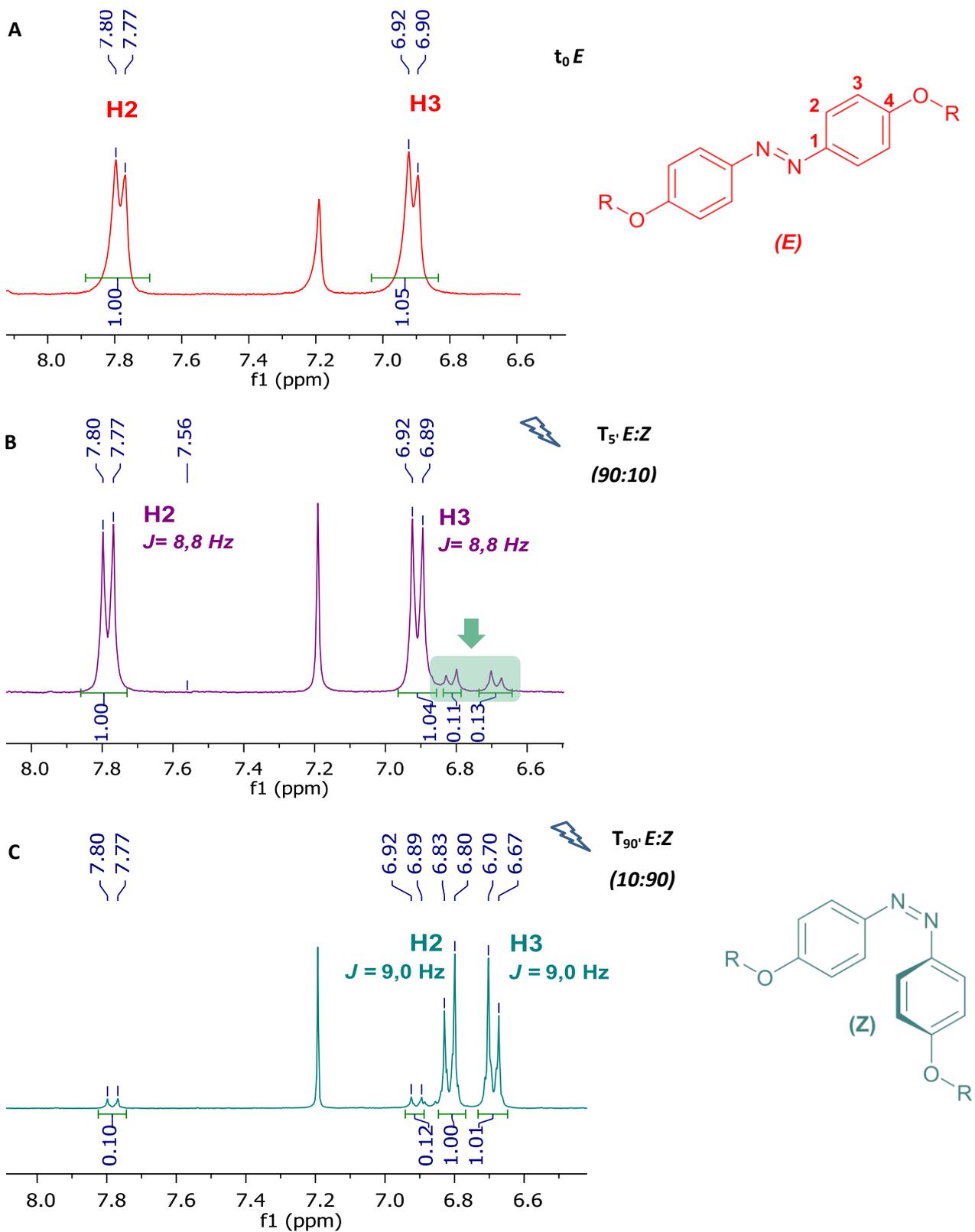


Figura 45. Zona aromática del espectro RMN de ^1H de **20b**. A) Antes de irradiar con luz UV (t_0), asignando **20b** (E). B) Después de irradiar con luz UV (360 nm, 8 watts, 5 minutos), mostrando la presencia de 10% del isómero Z. C) Luego de irradiar con luz UV 90 minutos, asignando a **20b** (Z).

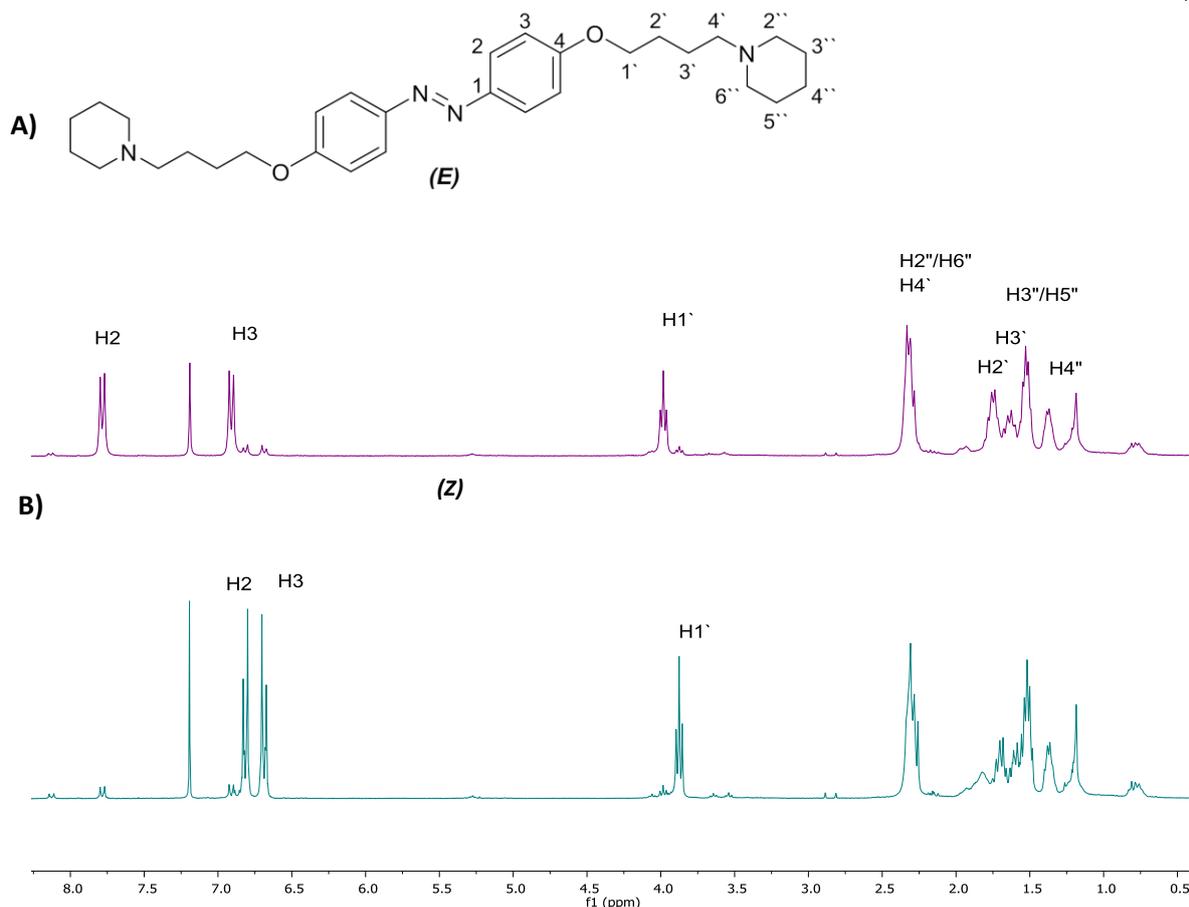
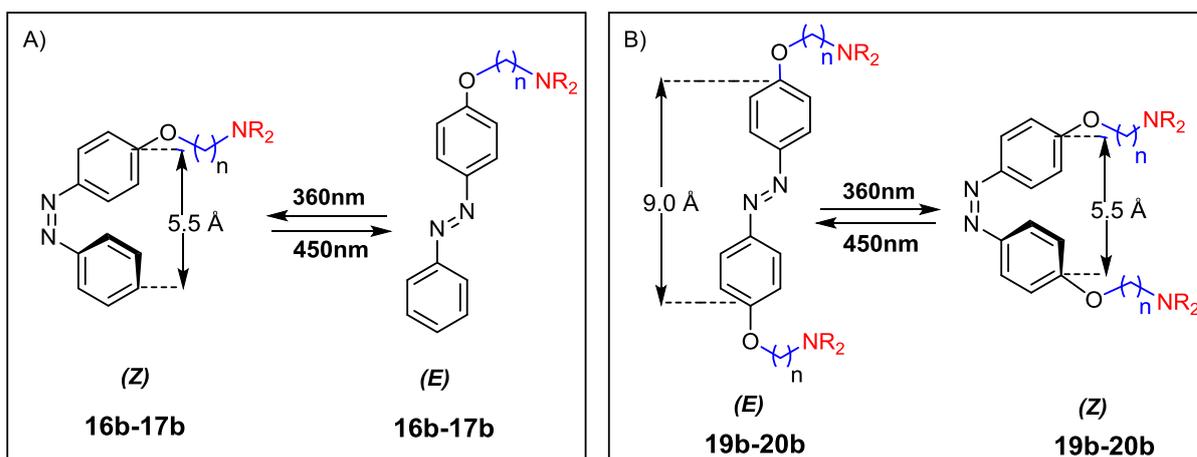


Figura 46. RMN de ^1H de **20b**. **A)** Después de irradiar con luz UV (360 nm, 8 watts, 5 minutos), mostrando la presencia de 10% del isómero Z, asignando **20b** (E). **B)** Luego de irradiar con luz UV 90 minutos, asignando las señales de H2, H3 e H1' de **20b** (Z) que se hallaron con desplazamientos menores, respecto al isómero E.

IV.1.2.6 Estudio de inhibición *in vitro* sobre ACE de **16b** (Z) – **20b** (Z) y **17c** (Z)

Luego de estudiar y comprobar la capacidad de estos derivados de azobenceno de fotoisomerizar mediante la exposición con luz UV se llevó a cabo el ensayo de inhibición *in vitro* sobre ACE de los compuestos **16b**, **17b**, **17c**, **18b**, **19b**, **20b** mediante el método espectrofotométrico de Ellman luego de irradiarlos con luz UV (360 nm, 8 watts, 10 min) en solución metanólica para evaluar la potencia de inhibición enzimática del isómero Z de estos compuestos. Los valores de IC_{50} para la inhibición de ACE se muestran en la **Tabla 38**.



Esquema 18. Fotoisomerización mediante exposición con luz UV (360 nm, 8 watts, 10 min) en metanol.
A) Derivados **16b – 18b y 17c**. B) Derivados **19b y 20b**.

Tabla 38. Actividad inhibitoria sobre ACE de los isómeros *E* y *Z* de los derivados **16b-20b** y **17c**.

Inhibición de ACE						
Compuesto	NR ₂	n	Isómero (<i>E</i>)		Isómero (<i>Z</i>)	
			IC ₅₀ (μM)	log IC ₅₀ ± DS	IC ₅₀ (μM)	log IC ₅₀ ± DS
16b	piperidina	6	5,16	0,7127 ± 0,05059	4,02	0,6039 ± 0,01276
17b	piperidina	7	0,96	-0,01852 ± 0,1199	2,30	0,3613 ± 0,03804
17c	piperazina	7	>50	-	>50	-
18b	piperidina	8	1,89	0,2765 ± 0.1039	0,85	-0,07229 ± 0,01859
19b	piperidina	3	1,27	0,1033 ± 0,04552	2,46	0,3908 ± 0,1461
20b	piperidina	4	0,84	-0.07785 ± 0.09310	0,43	-0,3688 ± 0,05269

Los valores de IC₅₀ comprendidos en la **Tabla 38** muestran que, de los derivados que tienen cadenas espaciadoras con número de metilenos pares: **16b**, **18b** y **20b** el isómero *Z* resultó ser un inhibidor más potente que el isómero *E*. Mientras que, el isómero *Z* de **17b**, **17c** y **19b** (derivados con *linkers* impares) mostró menor potencia inhibitoria sobre ACE que el correspondiente isómero *E*.

El derivado **17c** fue seleccionado para fotoisomerizar y evaluar la actividad inhibitoria del isómero *Z* ya que, el isómero *E* no había mostrado actividad, pero de igual manera este derivado no mostró capacidad de inhibir a la enzima tampoco en su configuración *Z*.

Observando detenidamente los valores de IC_{50} de la **Tabla 38**, se puede observar que para el derivado **20b** ($n= 4$), el isómero Z resultó un inhibidor 49% más potente que el isómero E. Mientras que, para **19b** ($n= 3$), el isómero Z disminuyó 48% la potencia de inhibición respecto al isómero E.

Por otro lado, el isómero Z del derivado **18b** ($n= 8$) aumentó la potencia de inhibición un 55% respecto del isómero E, y el isómero Z del derivado **17b** ($n= 7$) disminuyó 58% respecto al isómero E.

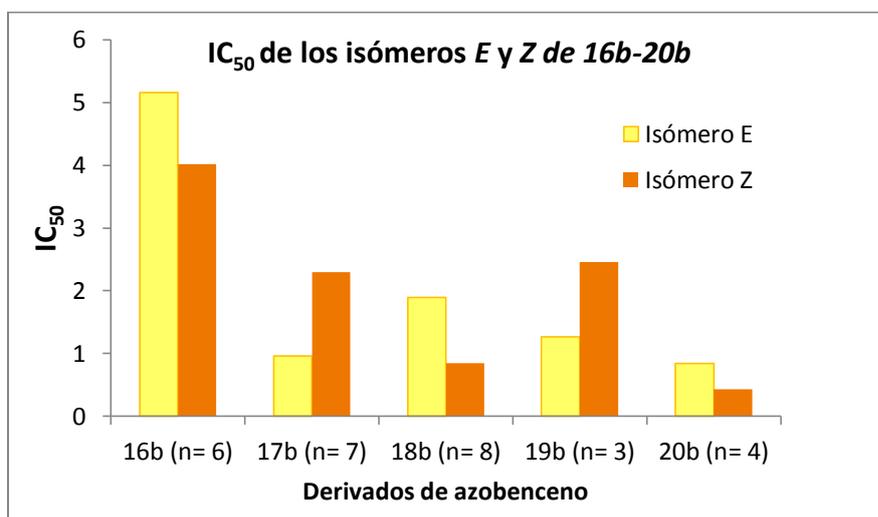


Figura 47. Gráfica de IC_{50} de los isómero E y Z de los derivados **16b-20b**. Se refleja mediante barras que el isómero Z de aquellos compuestos con linkers impares incrementó su potencia de inhibición de ACE en comparación al isómero E.

El estudio de la fotomodulación de estos compuestos nos permitió mejorar la potencia de inhibición de la enzima ACE para algunos de ellos y así, obtener el derivado más activo de la serie con un valor de $IC_{50}= 0,43 \mu\text{M}$ perteneciente al isómero Z de **20b**.

IV.2 Conclusiones

Se llevó a cabo la síntesis asistida por microondas, según las optimizaciones de reacción obtenidas en el capítulo 3, de 14 nuevos compuestos derivados de azobenceno monosustituídos y disustituídos que mostraron importante actividad inhibitoria frente ACE. Los derivados **17b**, **20b**, **21a** y **21b** fueron los inhibidores más potentes con valores de IC_{50} por debajo de 1 μ M.

Se evaluó la capacidad de fotoisomerizar de este tipo de compuestos mediante el seguimiento de espectroscopía UV-visible y RMN de 1H . Los derivados monosustituídos **16b** y **18b**, en solución metanólica, fotoisomerizaron a los 5 minutos alcanzando un equilibrio fotoestacionario con un porcentajes *E:Z* de 19:81 para **16b** y 16:84 para **18b**. Ambos compuestos mostraron una reversión total en oscuridad a las 24 hs. Los derivados disustituídos **19b** y **20b** también fueron fotoconvertidos a los 5 minutos de irradiación, en solución metanólica, consiguiendo un porcentaje *E:Z* de 11:89 para el primero y 9:91 para el segundo. La reversión total en oscuridad se obtuvo a las 17 hs para **19b** y a las 24 hs para **20b**. Mediante el seguimiento por RMN de 1H , se pudo observar para los isómeros *Z* el desplazamiento de las señales aromáticas y del metileno unido a oxígeno, a campos mayores.

Una vez estudiada y comprobada la propiedad de fotomodulación de estos derivados de azobenceno, se evaluó la actividad inhibitoria sobre ACE del isómero *Z* de los derivados **16b**, **17b**, **17c**, **18b**, **19b** y **20b**. Los valores de IC_{50} mostraron que los derivados con cadenas espaciadoras de número de carbonos pares (**16b**, **18b** y **20b**) fueron inhibidores más potentes en su configuración *Z*. Por el contrario, aquellos derivados con cadenas de metilenos impares, como **17b**, **17c** y **19b**, mostraron menor potencia inhibitoria que su correspondiente isómero *E*. A futuro se propone realizar estudios de modelado molecular para intentar explicar la diferencia de comportamiento entre los derivados de cadenas pares e impares.

Referencias bibliográficas

- [1] S. F. McHardy, H. Y. L. Wang, S. V. McCowen, and M. C. Valdez, "Recent advances in acetylcholinesterase Inhibitors and Reactivators: an update on the patent literature (2012-2015)," *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 27, no. 4, pp. 455–476, 2017.
- [2] X. Chen *et al.*, "Acetylcholinesterase inhibitors with photoswitchable inhibition of β -amyloid aggregation," *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 5, no. 5, pp. 377–389, 2014.
- [3] P. Calvé and P. Gorostiza, "Estrategias optogenéticas y fotofarmacológicas para restablecer la visión," *Revista VISION de la Federación de Asociaciones de Distrofias Hereditarias de Retina de España (FARPE)*, vol. 51, pp. 6–13, 2017.
- [4] J. H. Harvey and D. Trauner, "Regulating enzymatic activity with a photoswitchable affinity label," *ChemBioChem*, vol. 9, no. 2, pp. 191–193, 2008.
- [5] M. Izquierdo-Serra *et al.*, "Optical control of endogenous receptors and cellular excitability using targeted covalent photoswitches," *Nat. Commun.*, vol. 7, 2016.
- [6] M. Ribagorda and E. Merino, "Anales de química," *An. la Real Soc. Española Química, ISSN 1575-3417, N.º. 4, 2009, págs. 290-299*, vol. 105, no. 4, pp. 290–299, 2009.
- [7] M. Biswas and I. Burghardt, "Azobenzene photoisomerization-induced destabilization of B-DNA," *Biophys. J.*, vol. 107, no. 4, pp. 932–940, 2014.
- [8] M. R. Banghart, M. Volgraf, and D. Trauner, "<Banghart_2006.pdf>," vol. 45, no. 51, 2006.
- [9] H. Koshima, N. Ojima, and H. Uchimoto, "Mechanical motion of azobenzene crystals upon photoirradiation," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 20, pp. 6890–6891, 2009.
- [10] G. S. Kumar and D. C. Neckers, "Photochemistry of Azobenzene-Containing Polymers," *Chem. Rev.*, vol. 89, no. 8, pp. 1915–1925, 1989.
- [11] S. Peris, B. Tylokowski, J. carles Ronda, R. Garcia-Valls, J. A. Reina, and M. Giamberini, "Synthesis, Characterization, and Photoresponsive Behavior of New Azobenzene-Containing Polyethers," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 47, pp. 5426–5436, 2009.
- [12] R. J. Sension, S. T. Repinec, A. Z. Szarka, and R. M. Hochstrasser, "Femtosecond laser studies of the cis-stilbene photoisomerization reactions," *J. Chem. Phys.*, vol. 98, no. 8, pp. 6291–6315, 1993.
- [13] T. Nägele, R. Hoche, W. Zinth, and J. Wachtveitl, "Femtosecond photoisomerization of cis-azobenzene," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 272, no. 5–6, pp. 489–495, 1997.
- [14] T. Schultz *et al.*, "Mechanism and dynamics of azobenzene photoisomerization," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 27, pp. 8098–8099, 2003.
- [15] A. Cembran, F. Bernardi, M. Garavelli, L. Gagliardi, and G. Orlandi, "On the Mechanism of the cis-trans Isomerization in the Lowest Electronic States of Azobenzene: S0, S1, and T1," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 10, pp. 3234–3243, 2004.
- [16] N. Tamai and H. Miyasaka, "Ultrafast Dynamics of Photochromic Systems," *Chem. Rev.*, vol. 100, pp. 1875–1890, 2000.
- [17] B. Reisinger, N. Kuzmanovic, P. Löffler, R. Merkl, B. König, and R. Sterner, "Exploiting

- protein symmetry to design light-controllable enzyme inhibitors,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 53, no. 2, pp. 595–598, 2014.
- [18] J. Broichhagen, J. A. Frank, and D. Trauner, “A Roadmap to Success in Photopharmacology,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 48, no. 7, pp. 1947–1960, 2015.
- [19] M. Decker, *Design of Hybrid Molecules for Drug Development*. Elsevier Inc., Amsterdam, 2017.
- [20] J. Broichhagen, I. Jurastow, K. Iwan, W. Kummer, and D. Trauner, “Optical control of acetylcholinesterase with a tacrine switch,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 53, no. 29, pp. 7657–7660, 2014.
- [21] M. A. Sequeira, M. G. Herrera, Z. B. Quirolo, and V. I. Dodero, “Easy directed assembly of only nonionic azoamphiphile builds up functional azovesicles,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 109, pp. 108132–108135, 2016.
- [22] N. P. Alza, V. Richmond, C. J. Baier, E. Freire, R. Baggio, and A. P. Murray, “Synthesis and cholinesterase inhibition of cativic acid derivatives,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 22, no. 15, pp. 3838–3849, 2014.
- [23] J. Jeřábek *et al.*, “Tacrine-resveratrol fused hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer’s disease,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 127, pp. 250–262, 2017.
- [24] H. Liu *et al.*, “AlzPlatform: An Alzheimer’s disease domain-specific chemogenomics knowledgebase for polypharmacology and target identification research,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 54, no. 4, pp. 1050–1060, 2014.
- [25] L. A. Benedini, M. A. Sequeira, M. L. Fanani, B. Maggio, and V. I. Dodero, “Development of a nonionic azobenzene amphiphile for remote photocontrol of a model biomembrane,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, no. 17, pp. 4053–4063, 2016.

CAPÍTULO V

Análogos de cafeína

V ANÁLOGOS DE CAFEÍNA

V.1 Síntesis de análogos de cafeína y su evaluación como inhibidores de ACE y potenciadores del receptor nicotínico de acetilcolina

V.1.1 Descripción general y objetivos

Entre los compuestos naturales a base de purina, las xantinas y sus derivados han logrado un gran reconocimiento, ya que son los responsables de mostrar efectos medicinales únicos. Entre las metilxantinas ampliamente distribuidas en la naturaleza como teofilina, cafeína y teobromina, la cafeína ha recibido un gran interés, ya que es un alcaloide que genera un efecto estimulante en el cuerpo, de amplio perfil biológico y que actúa como un inhibidor de ACE. La cafeína se encuentra en los granos de café de *Coffea arabica*, *C. canephora* y algunas otras plantas de *Coffea* además de encontrarse en las hojas de té de *Camellia sinensis* [1], [2].

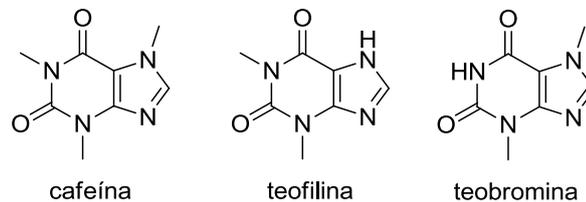


Figura 48. Estructuras químicas de las metilxantinas.

Algunos estudios han sugerido un papel protector e incluso terapéutico de la cafeína en los trastornos neurodegenerativos, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. Hasta ahora, el único mecanismo conocido que se ve afectado por la cafeína en concentraciones cercanas al nivel fisiológico normal, en el rango micromolar, es la modulación de los receptores de adenosina [3], [4]. Estudios recientes han demostrado que además, la cafeína tiene un efecto doble sobre los receptores $\alpha 7$ nicotínicos de acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR), comportándose como un agonista a bajas concentraciones y un bloqueador de canales iónicos a concentraciones elevadas [5]. En la enfermedad de Alzheimer existe una reducción significativa de $\alpha 7$ en el cerebro, particularmente en el hipocampo [6], [7], como también en pacientes con esquizofrenia [8], [9]. Es por esto que actualmente $\alpha 7$ se ha transformado en un blanco farmacológico emergente muy importante [10]. Los estudios sobre plasticidad neuronal *in vitro* y sobre efectos cognitivos *in vivo* soportan la idea de que la potenciación de $\alpha 7$ podría resultar una forma efectiva de terapia contra la declinación cognitiva [11].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, podríamos decir que la cafeína o sus derivados pueden considerarse un blanco importante para el diseño de nuevos fármacos *multitarget* de aplicación para el tratamiento de la EA.

Teniendo en cuenta el amplio perfil de actividades biológicas que presenta la cafeína y continuando con nuestra investigación sobre diferentes híbridos a partir de productos naturales de potencial aplicación en la enfermedad de Alzheimer, hemos diseñado y sintetizado análogos de cafeína con el objetivo de obtener derivados más potentes con un doble efecto sobre el sistema colinérgico al inhibir la ACE y potenciar los nAChR.

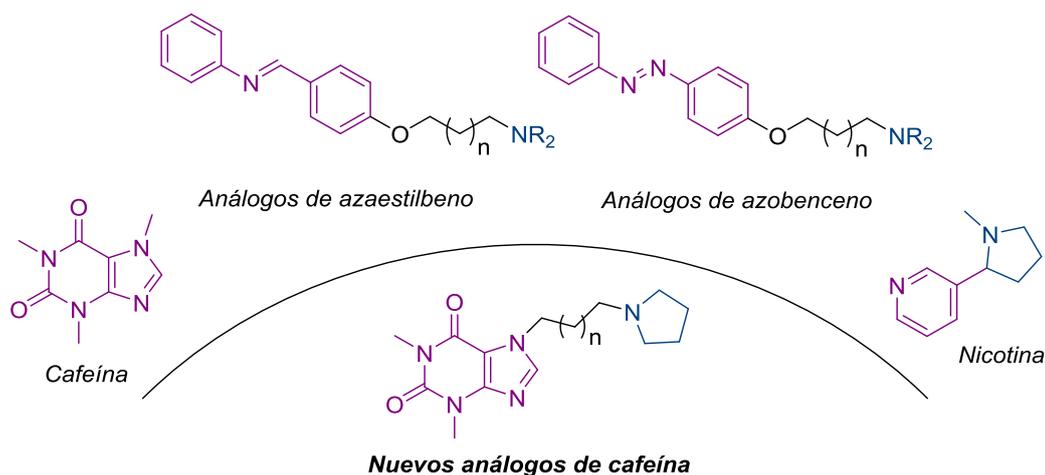
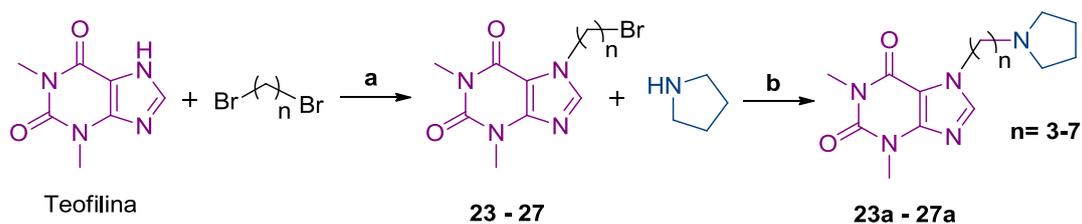


Figura 49. Inhibidores de ACE y agonista del nAChR (nicotina), estructuras base para el diseño de nuevos análogos de cafeína como inhibidores de ACE y moduladores del nAChR.

V.1.2 Derivados semisintéticos 23 - 27 y evaluación de la actividad biológica

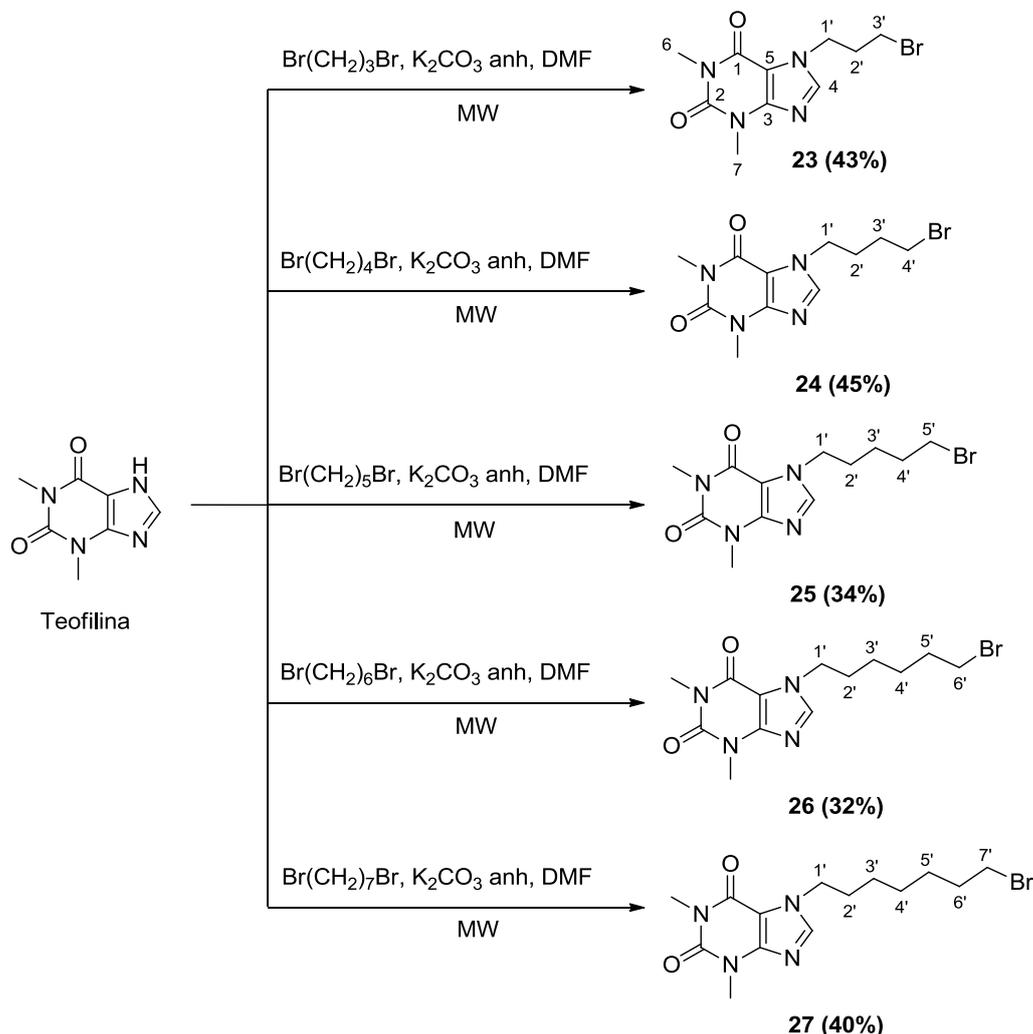
Siguiendo con la misma metodología sintética, un fragmento de teofilina, de estructura química similar a la cafeína, se conectó con un fragmento de pirrolidina (que está presente en la estructura química de la nicotina) a través de la homologación de 3 a 7 átomos de carbono. A pH fisiológico, el grupo amino protonado podría interactuar con el CAS de la enzima, mientras que la estructura de la metilxantina podría interactuar con el PAS de la ACE. La preparación de los derivados se realizó utilizando los procedimientos mostrados en el Esquema 19.



Esquema 19. Síntesis de derivados 23a-27a. (a) K_2CO_3 anh, DMF anh, MW; (b) DMF anh, MW.

V.1.2.1 Intermediarios alquilbromados 23 - 27

El tratamiento de teofilina con los correspondientes α,ω -dibromoalcanos produjo los intermediarios alquilbromados necesarios para la síntesis de los compuestos de interés **23-27**, con rendimientos de 31 a 42%. En el siguiente esquema se detalla la síntesis de todos los intermediarios, que poseen una cadena alquílica bromada unida al nitrógeno de la teofilina de tres a siete átomos de carbono.

Esquema 20. Preparación de intermediarios **23-27**.

Las Tabla 39 y **Tabla 40** muestran los desplazamientos químicos de RMN de ^1H y de ^{13}C de los intermediarios **23-27** respectivamente. Los compuestos presentaron las señales características de la teofilina más las adicionales correspondientes a los grupos metilenos de las diferentes cadenas alquílicas, que confirmaron la unión de las mismas al nitrógeno del alcaloide. En todos los espectros de RMN de ^1H se observaron tres señales singulete, una de ellas en la zona de aromáticos correspondiente al H1 y las otras dos, de área tres,

correspondientes al H6 e H7 de los metilos unidos a nitrógeno de la estructura de la teofilina. Además, en el espectro de RMN de ^1H de **23** se observaron dos tripletes de H1' y H3' y un quintuplete de H2'; en el de **24** dos tripletes correspondientes a H1' e H4' y dos quintupletes correspondientes a H2' e H3'; en el de **25** las señales indicativas de la cadena de cinco carbonos de H1'-H5'; las seis señales de H1'-H6' fueron las adicionales para **26** y las de H1'-H7' para **27** (Tabla 39). En los espectros de RMN de ^{13}C las señales más desplazadas fueron las correspondientes a los carbonos carbonílicos C4 y C5 de la estructura de la teofilina, luego se observaron las señales de C2 y C1, a campos mayores la del carbono cuaternario C3 y en la zona de alifáticos la de los metilos C6 y C7. Las señales adicionales en la zona de alifáticos para **23** fueron las de C1', C2' y C3', para **24** las de C1', C2', C3' y C4', para **25** C1'-C5', C1'-C6' para **26** y C1'-C7' para **27** (Tabla 40).

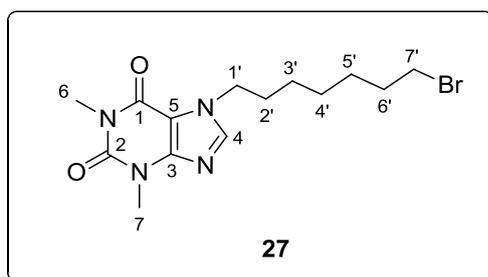


Tabla 39. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **23-27**. En CDCl_3 a 300 MHz; δ en ppm; J en Hz.

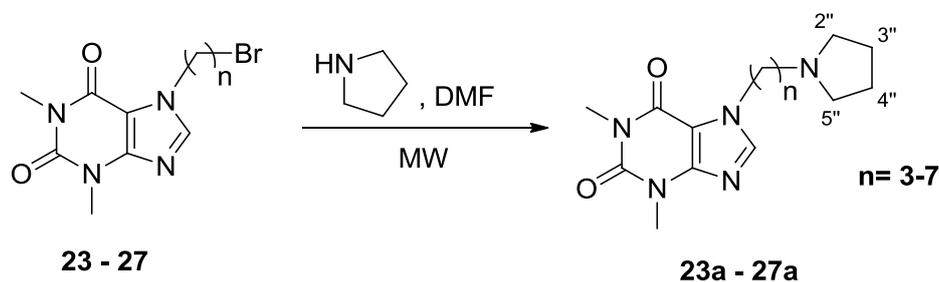
POSICIÓN	23	24	25	26	27
4	7,64 (s)	7,65 (s)	7,56 (s)	7,54 (s)	7,55 (s)
6	3,41 (s)	3,41 (s)	3,41 (s)	3,41 (s)	3,41 (s)
7	3,60 (s)	3,59 (s)	3,59 (s)	3,59 (s)	3,59 (s)
1'	4,47 (t, 6,5)	4,36 (t, 7,1)	4,30 (t, 7,2)	4,29 (t, 7,2)	4,29 (t, 7,2)
2'	2,46 (q, 6,3)	2,08 (q, 6,9)	2,02 – 1,83 (m)	196 – 1,80 (m)	196 – 1,78 (m)
3'	3,33 (t, 6,0)	1,90 (q, 6,4)	1,49 (q, 6,4)	1,58 – 1,42 (m)	1,49 – 1,30 (m)
4'		3,44 (os)	2,02 – 1,83 (m)	1,43 – 1,27 (m)	1,49 – 1,30 (m)
5'			3,41 (os)	196 – 1,80 (m)	1,49 – 1,30 (m)
6'				3,38 (os)	196 – 1,78 (m)
7'					3,38 (os)

*os= señal superpuesta

Tabla 40. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **23-27**. En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm.

POSICIÓN	23	24	25	26	27
1	155,2 (s)	155,0 (s)	155,2 (s)	155,2 (s)	155,2 (s)
2	151,8 (s)	151,5 (s)	151,8 (s)	151,8 (s)	151,8 (s)
3	149,4 (s)	148,8 (s)	149,1 (s)	149,1 (s)	149,0 (s)
4	141,6 (d)	140,7 (d)	140,9 (d)	140,9 (d)	140,9 (d)
5	106,8 (s)	106,8 (s)	106,8 (s)	107,1 (s)	107,1 (s)
6	29,9 (c)	29,8 (c)	29,9 (c)	29,9 (c)	29,9 (c)
7	28,1 (c)	28,0 (c)	28,1 (c)	28,1 (c)	28,1 (c)
1'	45,4 (t)	46,3 (t)	47,1 (t)	47,2 (t)	47,3 (t)
2'	29,6 (t)	29,6 (t)	32,0 (t)	32,5 (t)	32,5 (t)
3'	32,7 (t)	29,3 (t)	25,0 (t)	27,6 (t)	28,2 (t)
4'		32,4 (t)	30,1 (t)	25,6 (t)	26,3 (t)
5'			33,3 (t)	30,8 (t)	28,0 (t)
6'				33,6 (t)	30,9 (t)
7'					33,8 (t)

V.1.2.2 Derivados con pirrolidina **23a - 27a**



Esquema 21. Obtención de los derivados **23a-27a**.

Para obtener los derivados con espaciadores de tres a siete átomos de carbono unidas a pirrolidina, se hicieron reaccionar los compuestos **23 - 27** con la mencionada amina (**Esquema 21**). Se llevó a cabo la síntesis asistida por microondas de los correspondientes derivados en un tiempo de 10 minutos con rendimientos de moderados a muy buenos (50-75%). La asignación completa de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C se informan en las **Tabla 41** y **Tabla 42**, respectivamente.

3'	2,40 (t, 6,8)	1,54 (q, 7,6)	1,36 (q, 7,6)	1,44 – 1,29 (m)	1,39 – 1,27 (m)
4'		2,47 (q, 7,5)	1,58 (q, 7,5)	1,44 – 1,29 (m)	1,39 – 1,27 (m)
5'			2,48 – 2,41 (m)	1,53 (q, 7,4)	1,39 – 1,27 (m)
6'				2,45 (t, 7,5)	1,53 (q, 6,6)
7'					2,44(t, 7,5)
2"/5"	2,52 - 2,44 (m)	2,47 (q, 7,5)	2,55 – 2,48 (m)	2,59 – 2,49 (m)	2,58 – 2,48 (m)
3"/4"	1,78 (q, 3,1)	1,77 (q, 3,1)	1,79 (q, 3,1)	1,80 (q, 3,1)	1,79 (os)

*os= señal superpuesta

Tabla 42. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **23a** - **27a**. En CDCl_3 a 75 MHz; δ en ppm.

POSICIÓN	23a	24a	25a	26a	27a
1	155,1 (s)	155,2 (s)	155,2 (s)	155,2 (s)	155,2 (s)
2	151,7 (s)	151,8 (s)	151,8 (s)	151,8 (s)	151,8 (s)
3	148,9 (s)	149,0 (s)	149,0 (s)	149,1 (s)	149,0 (s)
4	141,6 (d)	140,9 (d)	140,9 (d)	140,9 (d)	140,9 (d)
5	106,9 (s)	107,1 (s)	107,1 (s)	107,1 (s)	107,1 (s)
6	29,7 (c)	29,8 (c)	29,8 (c)	29,9 (c)	29,9 (c)
7	28,0 (c)	28,1 (c)	28,1 (c)	28,1 (c)	28,1 (c)
1'	45,1 (t)	47,2 (t)	47,3 (t)	47,3 (t)	47,4 (t)
2'	29,4 (t)	25,9 (t)	28,4 (t)	28,7 (t)	29,0 (t)
3'	52,1 (t)	29,2 (t)	24,5 (t)	26,4 (t)	27,6 (t)
4'		55,8 (t)	30,9 (t)	27,1 (t)	26,4 (t)
5'			56,3 (t)	30,9 (t)	28,8 (t)
6'				56,4 (t)	30,9 (t)
7'					56,5 (t)
2"/5"	53,9 (t)	54,3 (t)	54,3 (t)	54,3 (t)	54,3 (t)
3"/4"	23,5 (t)				

V.1.2.3 Estudio de inhibición *in vitro* de ACE de los derivados 23a - 27a

La actividad inhibidora de los compuestos **23a-27a** sobre ACE fue evaluada *in vitro* mediante el método espectrofotométrico de Ellman. Los valores de IC_{50} para la inhibición de ACE se resumen en la Tabla 43. Los resultados muestran que los nuevos derivados sintetizados aumentaron ampliamente la potencia de inhibición de la enzima ACE respecto a la cafeína y a la teofilina de partida, acorde al aumento de número de carbonos de la cadena espaciadora. El compuesto **27a**, con $n=7$ mostró la inhibición más potente de la serie frente a ACE con un valor IC_{50} de 0,22 μ M.

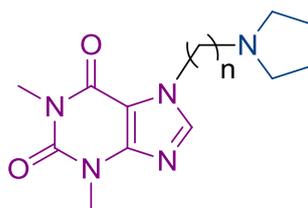


Figura 51. Estructura general de los derivados de cafeína.

Tabla 43. Actividad inhibitoria de ACE de los derivados 23a - 27a.

Compuesto	n	ACE		(BBB permeation (\pm) and BBB score) ^a
		IC_{50} (μ M)	$\log IC_{50} \pm DS$	
teofilina		473,0	$2,675 \pm 0,0787$	0,054
cafeína [2]		87,0		0,049
23a	3	56,2	$1,750 \pm 0,0310$	0,105
24a	4	21,8	$1,337 \pm 0,0442$	0,105
25a	5	13,5	$1,130 \pm 0,0259$	0,105
26a	6	6,1	$0,7849 \pm 0,0447$	0,105
27a	7	0,22	$-0,6655 \pm 0,0593$	0,105
tacrina		0,029	$-1,53 \pm 0,05$	0,120

^aLa permeabilidad de (BBB) se predijo utilizando el servidor de predicción BBB en línea (<http://www.cbligand.org/BBB/>).

V.1.2.4 Predicción de la barrera hematoencefálica

Las propiedades de permeación de la BHE de los compuestos **23a-27a** fueron calculadas utilizando un servidor predictor en línea (<http://www.cbligand.org/BBB/>), perteneciente a la base de conocimiento de quimiogenómica de la enfermedad de Alzheimer: AlzPlatform [12], [13]. Los resultados se incluyen en la **Tabla 43** como valores de BBB, por sus siglas en inglés *blood brain barrier*. Todos los compuestos exhibieron una predicción de permeabilidad de la BHE alta (BBB +) con un puntaje de 0,105, siendo este mayor que el obtenido para los compuestos de partida cafeína (0,049) y teofilina (0,054).

V.1.3 Estudio de la modulación del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) de los derivados 23a - 27a.

Los receptores de la familia cys-loop, que incluye al receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR, nicotinic acetylcholine receptor), son miembros de la superfamilia de los canales pentaméricos activados por ligando (pLGICs, pentameric ligand-gated ion channels). Están formados por cinco subunidades iguales - receptores homoméricos - o diferentes - receptores heteroméricos -. Los receptores poseen un dominio extracelular, que contiene los sitios de unión al agonista localizados entre dos subunidades adyacentes; un dominio transmembrana, que forma el canal y contiene sitios alostéricos para la acción de moduladores; y un dominio intracelular, de importancia en la conductancia del canal y en su modulación intracelular.

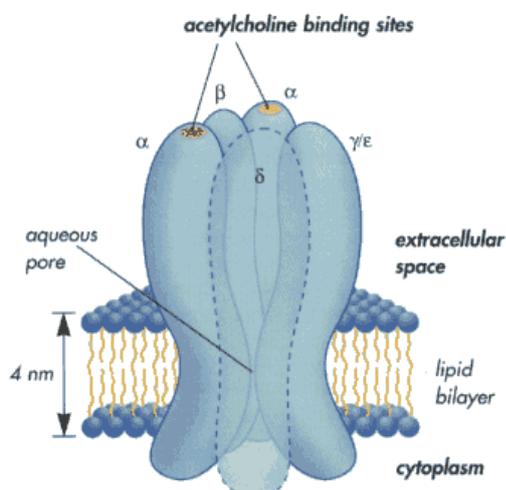


Figura 52. Estructura general del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).

El receptor $\alpha 7$ es el prototipo de receptor homopentamérico de la familia de los nAChRs. Es uno de los nAChRs más abundantes en el sistema nervioso, aunque también se encuentra presente en otros tejidos. En neuronas modula la liberación de neurotransmisores e induce respuestas estimuladoras, contribuyendo a la cognición, el procesamiento de la información sensorial y la memoria. En tejidos no neuronales está involucrado en inmunidad, inflamación y neuroprotección. Debido a sus múltiples funciones, emerge actualmente como nuevo blanco terapéutico para desórdenes neurológicos e inflamatorios.

Los nAChRs se encuentran ampliamente distribuidos en el reino animal, desde nematodos hasta humanos. Pueden, a su vez, ser divididos en dos grupos: el tipo muscular y el neuronal. El nAChR muscular se encuentra en los órganos eléctricos de los peces como los del género Torpedo; y en el músculo esquelético de los vertebrados, donde media la transmisión neuromuscular en la placa motora. El tipo neuronal se encuentra principalmente en el sistema nervioso central y periférico, aunque también está presente en tejidos no neuronales. Los nAChRs en el cerebro representan una familia amplia y heterogénea de receptores expresados ubicuamente, cuyas respuestas a AC y colina endógenas, y nicotina exógena, se encuentran involucradas en numerosos procesos fisiológicos y efectos farmacológicos [10].

Los receptores cys-loop en estado cerrado se abren de manera transitoria luego de la unión de agonista. En la presencia continua del agonista, se vuelven refractarios al estímulo y la respuesta de la célula disminuye. Este proceso se denomina desensibilización, en el cual los iones no pueden atravesar el poro del canal, a pesar de que el receptor posee alta afinidad por el agonista [14].

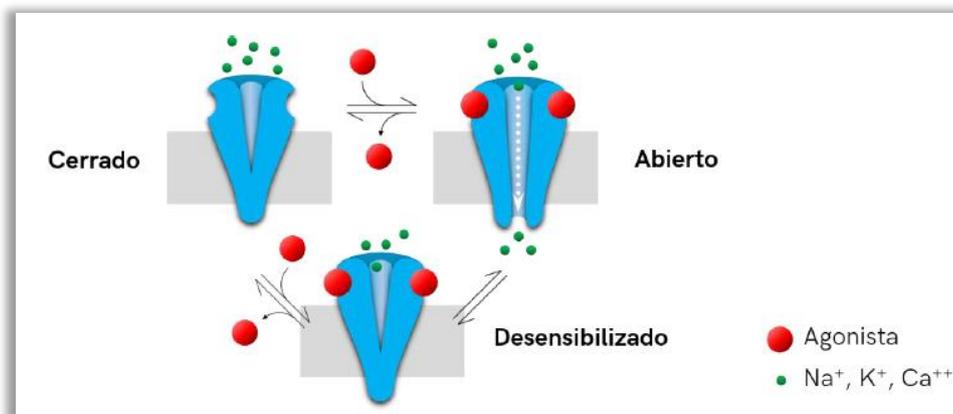


Figura 53. Esquema básico de activación y desensibilización de los pLGICs.

En colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Silvia Antollini, en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), se llevó a cabo el estudio de la

capacidad de la teofilina, pirrolidina y de los derivados **22a** - **27a** de modificar el estado conformacional del nAChR, utilizando la sonda de fluorescencia conformacional cristal violeta (CrV) sensible a los cambios conformacionales del nAChR y membranas ricas en AChR de *T. californica*.

Se encontró que la pirrolidina inducía cambios en los valores de la constante de disociación (K_D) de CrV llevando al nAChR a un estado cercano al desensibilizado a concentraciones 200 y 400 μM , mientras que la teofilina no mostraba cambios significativos en el valor de K_D . Los análogos **23a** - **27a** también produjeron cambios en los valores de K_D de CrV, sin embargo, este efecto dependía de la homologación siendo los análogos más potentes **25a** y **26a** con *linkers* de 5 y 6 carbonos respectivamente a concentraciones inferiores a 50 nM.

Para comprender el mecanismo molecular que subyace a los cambios conformacionales del nAChR, se expresó nAChR muscular en células HEK293 (línea celular que proviene de células de riñón de embrión humano) y mediante estudios de electrofisiología, se realizaron grabaciones de un solo canal en la configuración *cell-attached* a concentraciones de entre 0,001 pM y 30 μM de **23a** - **27a**. Como control de expresión se utilizó ACE 30 μM , cuyo registro muestra la activación del receptor en forma de *clusters*, los cuales fueron identificados como una serie de aperturas sucesivas separadas por cierres breves, precedidos y seguidos por cierres más largos.

Los registros obtenidos a partir de los análogos semisintéticos de cafeína mostraron eventos aislados a concentraciones iguales o menores a 0,1 pM para todos los compuestos testeados, indicando que todos los análogos se comportan como agonistas del nAChR muscular.

La **ilustración 1** muestra los registros de canal único del derivado **25a**, que activó nAChR muscular a concentraciones muy bajas (de 0,01 pM). A la concentración más alta probada (30 μM) en el histograma de estado abierto se observó una disminución en la duración media de apertura (el histograma muestra solo una componente, a diferencia del resto de los histogramas formados por dos componentes), lo que sugiere que **25a**, a concentraciones elevadas, también podría actuar como un bloqueador de canal abierto.

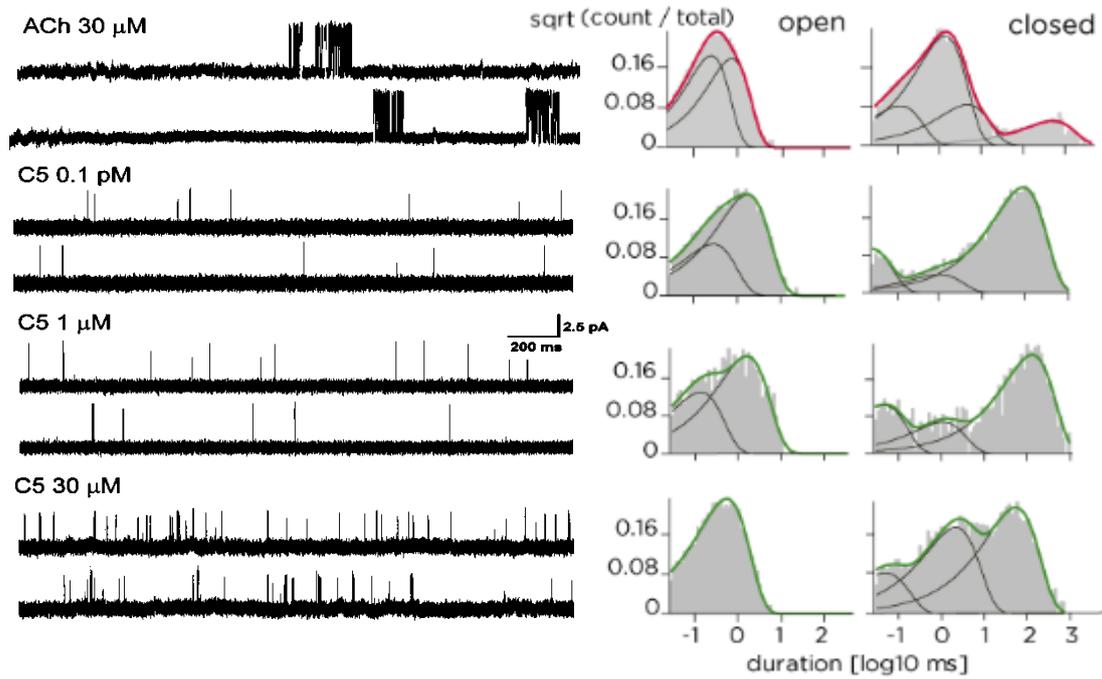


Ilustración 1. Izquierda: registros de canal único para ACE a 30 μM (control positivo) y para el derivado **25a** a distintas concentraciones. Derecha: Histogramas de estado abierto y estado cerrado.

V.2 Conclusiones

Se obtuvieron seis nuevos derivados de cafeína mediante la síntesis asistida por microondas comprendida en dos etapas, cuya optimización se estudió en el capítulo 3 y se aplicó también en el capítulo 4 de esta tesis.

Los derivados fueron evaluados como inhibidores de ACE, resultando todos ellos inhibidores más potentes que la cafeína y teofilina. El derivado que mostró mayor potencia inhibitoria fue el compuesto **27a** con un IC_{50} de 0,22 μ M.

Se estudió la capacidad de estos compuestos de modular el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR). Se encontró que **25a**, que presenta un linker de cinco carbonos, activó nAChR muscular a concentraciones muy bajas (de 0,01 μ M) y a la concentración más alta probada (30 μ M) se observó una disminución en la duración media de apertura, lo que sugiere que **25a** actúa como un agonista del receptor y también un bloqueador de canal abierto.

El efecto de estos híbridos sintetizados sobre ambos blancos terapéuticos (ACE y nAChR) sugieren un perfil multifuncional para un farmacóforo que puede ser prometedor para el diseño de nuevas terapias para enfermedades neurológicas.

Referencias bibliográficas

- [1] M. Pohanka and P. Dobes, "Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 5, pp. 9873–9882, 2013.
- [2] N. Karadsheh, P. Kussie, and D. S. Linthicum, "Inhibition of acetylcholinesterase by caffeine, anabasine, methyl pyrrolidine and their derivatives," *Toxicol. Lett.*, vol. 55, no. 3, pp. 335–342, 1991.
- [3] K. Xu, Y. H. Xu, J. F. Chen, and M. A. Schwarzschild, "Neuroprotection by caffeine: Time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease," *Neuroscience*, vol. 167, no. 2, pp. 475–481, 2010.
- [4] K. Xu, D. G. Di Luca, M. Orrú, Y. Xu, J. F. Chen, and M. A. Schwarzschild, "Neuroprotection by caffeine in the MPTP model of parkinson's disease and its dependence on adenosine A2A receptors," *Neuroscience*, vol. 322, no. February, pp. 129–137, 2016.
- [5] C. Fabiani, A. P. Murray, J. Corradi, and S. S. Antollini, "A novel pharmacological activity of caffeine in the cholinergic system," *Neuropharmacology*, vol. 135, pp. 464–473, 2018.
- [6] Z. Z. Guan, X. Zhang, R. Ravid, and A. Nordberg, "Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease," *J. Neurochem.*, vol. 74, no. 1, pp. 237–243, 2000.
- [7] A. Kadir, O. Almkvist, A. Wall, B. Långström, and A. Nordberg, "PET imaging of cortical 11C-nicotine binding correlates with the cognitive function of attention in Alzheimer's disease," *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 188, no. 4, pp. 509–520, 2006.
- [8] C. P. Schaaf, "Nicotinic acetylcholine receptors in human genetic disease," *Genet. Med.*, vol. 16, no. 9, pp. 649–656, 2014.
- [9] K. T. Dineley, A. A. Pandya, and J. L. Yakel, "Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 36, no. 2, pp. 96–108, 2015.
- [10] J. Corradi and C. Bouzat, "Understanding the bases of function and modulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors: implications for drug discovery," *Mol. Pharmacol.*, vol. 90, no. 3, pp. 288–299, 2016.
- [11] B. Lendvai, F. Kassai, Ágota Szájli, and Z. Némethy, " $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition," *Brain Res. Bull.*, vol. 93, pp. 86–96, 2013.
- [12] J. Jeřábek *et al.*, "Tacrine-resveratrol fused hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 127, pp. 250–262, 2017.
- [13] H. Liu *et al.*, "AlzPlatform: An Alzheimer's disease domain-specific chemogenomics knowledgebase for polypharmacology and target identification research," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 54, no. 4, pp. 1050–1060, 2014.
- [14] J. Zhang, F. Xue, Y. Liu, H. Yang, and X. Wang, "The structural mechanism of the cys-loop receptor desensitization," *Mol. Neurobiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 97–108, 2013.

CAPÍTULO VI

Bis(n)-lofinas sustiuidas

Este trabajo se llevó a cabo en el marco de una beca del Programa ESCALA de Estudiantes de Posgrado de AUGM (Asociación de Universidades del Grupo Montevideo) durante seis meses, en el instituto de Química Orgánica de la Universidad Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil; en el grupo de investigación del profesor Marco Antonio Ceschi.

VI BIS(n)-LOFINAS SUSTITUIDAS

VI.1 Síntesis de dímeros bis(n)-lofinas sustituidos

VI.1.1 Descripción general y objetivos

El imidazol es un compuesto heteroaromático de cinco miembros que contiene dos átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 3. El núcleo imidazólico forma parte de la estructura principal de algunos compuestos imprescindibles para el organismo humano tales como el aminoácido histidina, la vitamina B12, las bases nitrogenadas del ADN purinas, histamina y biotina. Además, se incorpora en muchas moléculas bioactivas que juegan un papel vital en el tratamiento de varios tipos de enfermedades [1]. Un derivado importante del imidazol es 2,4,5-trifenil-1H-imidazol, también conocido como lofina (**Figura 54**) que posee actividad antioxidante y antibacteriana [2].

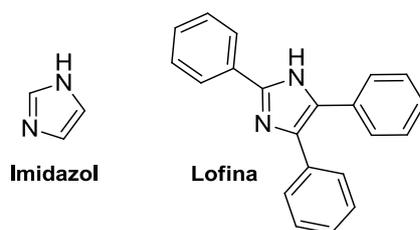


Figura 54. Estructura del imidazol y su derivado, lofina.

El núcleo imidazólico se ha mostrado efectivo en el bloqueo de los canales β -amiloide, que son poros formados en membranas celulares por el cúmulo del péptido A β (característico en paciente con enfermedad de Alzheimer) y que permiten la entrada de calcio extracelular [3]. Tal proceso induce a un aumento en la concentración intracelular de iones calcio, causando disturbios en la homeostasis de este metal. El bloqueo de estos canales previene la apoptosis celular inducida por A β . También, se ha revelado recientemente mediante estudios *in vivo*, que el imidazol mejora la cognición y equilibra la homeostasis del calcio intracelular con similar eficacia que la memantina (fármaco utilizado para el tratamiento de la EA) [4].

El grupo de investigación del profesor Marco A. Ceschi cuenta con experiencia en la síntesis de híbridos tacrina-lofina y dímeros de bis-lofinas [5]. Estos híbridos, homologados mediante átomos de carbono (n) fueron evaluados como inhibidores de ACE y BuCE. La mayoría de los híbridos tacrina-lofina que fueron sintetizado resultaron potentes inhibidores de colinesterasas con valores de IC_{50} a escala nanomolar. Por otro lado, dentro de la serie de los compuestos de tipo bis(n)-lofinas, el homodímero bis(8)-lofina mostró una potente inhibición selectiva para ACE con un $IC_{50} = 42,55$ nM (Figura 55).

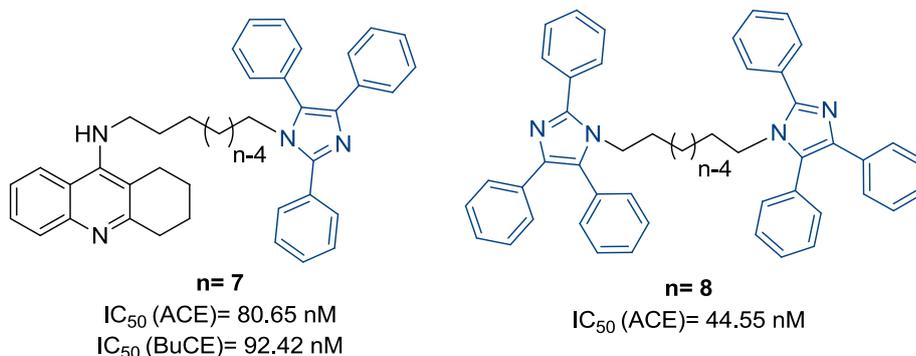


Figura 55. Izquierda: Híbrido de tacrina-lofina, potente inhibidor de ACE y BuCE. Derecha: bis(8)-lofina, potente inhibidor selectivo de ACE.

Para la síntesis de los dímeros de bis(n)-lofina se llevó a cabo una reacción *one-pot* tetracomponente a partir de 1,n-alcanodiamina, benzil (1,2-difenil-1,2-etanodiona), acetato de amonio y benzaldehído, en etanol a reflujo por 24 horas, utilizando tricloruro de Indio ($InCl_3$) como catalizador (Figura 56)[5].

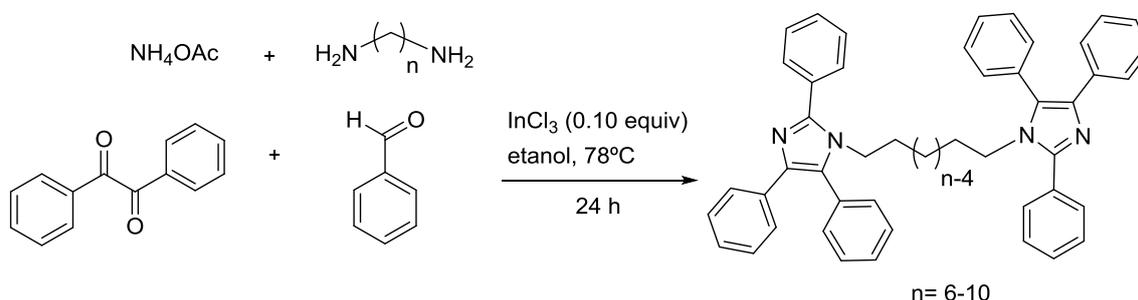
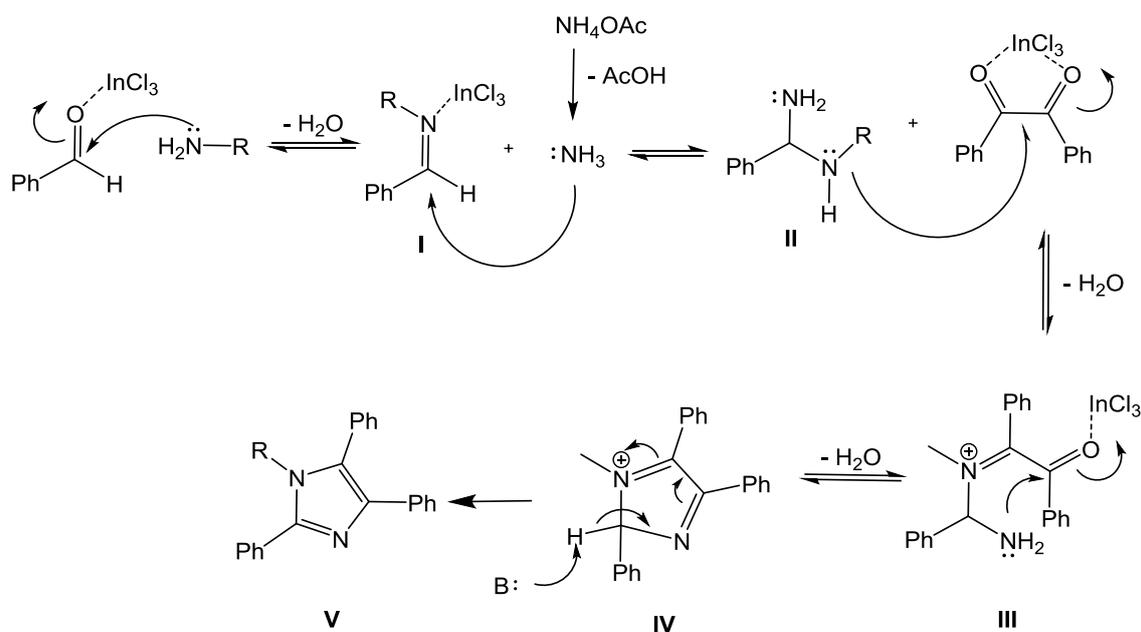


Figura 56. Síntesis de bis(n)-lofinas.

VI.1.2 Propuesta de mecanismo de formación de imidazoles tetrasustituídos

Das Sharma y colaboradores [6] propusieron un mecanismo para la formación de imidazoles tetrasustituídos en presencia de $InCl_3 \cdot 3H_2O$ como catalizador. Basándose en este

trabajo, Da Costa y Ceschi [7] proponen el siguiente mecanismo para la formación de imidazoles tetrasustituídos



Esquema 22. Propuesta de mecanismo para la síntesis de imidazoles tetrasustituídos

Conforme a lo explicado en el **Esquema 22**, el ácido de Lewis aumenta la electrofilicidad del carbonilo del aldehído, favoreciendo el ataque nucleofílico de la amina primaria y llevando a la formación del iminio (**I**), posterior a la eliminación de una molécula de agua. Luego, la sustitución nucleofílica entre la amina activada (**II**) y el amonio (producido en el medio de reacción a partir del acetato de amonio) forma la diamina (**II**). El grupo amino secundario de **II** promueve un ataque nucleofílico a uno de los carbonilos del benzil, que está activado por el ácido de Lewis, dando lugar al iminio **III**, luego de la eliminación de una molécula de agua. A continuación, un ataque nucleofílico intramolecular en **III** por parte del grupo amino sobre el carbonilo activado genera el intermediario cíclico **IV** y la pérdida de una molécula de agua. Finalmente, la abstracción de un protón del intermediario **IV** permite la aromatización del anillo formando el imidazol tetrasustituído.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, durante el tiempo de mi estancia en la UFRGS bajo la supervisión del profesor M. A. Ceschi, se llevó a cabo el diseño y la síntesis de nuevos compuestos homodiméricos de tipo bis(n)-lofinas sustituidas con el objetivo de mejorar la actividad inhibitoria de los compuestos obtenidos hasta el momento.

VI.1.3 Optimización de la síntesis de dímeros bis(n)-lofinas sustituidos

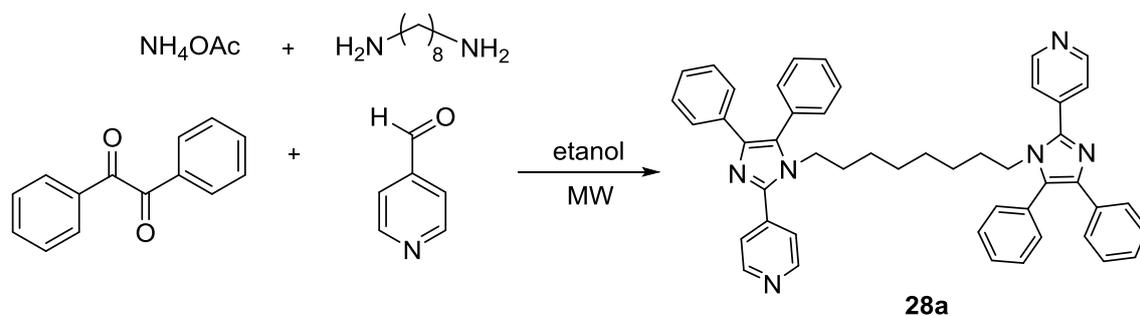
En un primer momento, se llevó a cabo la síntesis convencional para la obtención de la bis(8)-lofina sustituida, mediante la reacción de 1,8-octanodiamina, benzil, acetato de amonio y pirina-4-carboxaldehído en etanol a reflujo por 48 horas, utilizando tricloruro de Indio (InCl_3) como catalizador [5]. Luego de la purificación por cromatografía en columna, se obtuvo el compuesto **28a**, con un rendimiento del 19%.

Considerando que el compuesto **28a** fue obtenido con muy bajo rendimiento mediante la síntesis convencional, y teniendo en cuenta la experiencia previa (Capítulos III, IV y V) en reacciones asistidas por microondas, se optó por el estudio de las condiciones de reacción de esta síntesis utilizando el equipo de microondas: *Digestor MARS 6*, con el objetivo de disminuir el tiempo de reacción y mejorar el rendimiento



Figura 57. Equipo de microondas *Digestor MARS 6*

Se llevó a cabo entonces la síntesis asistida por microondas para la obtención del compuesto **28a**, variando las condiciones de reacción. Se trabajó en tiempos de 1 a 4 horas, en presencia y en ausencia del catalizador, y variando la temperatura entre 100 y 110°C. En la **Tabla 44** se resumen los rendimientos para esta reacción frente a las diferentes condiciones estudiadas.

Esquema 23. Síntesis asistida por microondas del dímero **28a**.Tabla 44. Reacción de condensación tetracomponente para la obtención del dímero **28a** en diferentes condiciones de reacción.

Entrada	Solvente	Catalizador (InCl ₃)	Temp. (°C)	Tempo de reacción (h)		Rendimiento (%)
				Conv.	MW	
1	Etanol	0,30 equiv.	78	48		19 ^a
2	Etanol	0,30 equiv.	100		1	20 ^a
3	Etanol	0,15 equiv.	100		1	19 ^a
4	Etanol	-	100		2	25 ^a
5	Etanol	-	110		2	20 ^b
6	Etanol	-	110		4	35 ^a

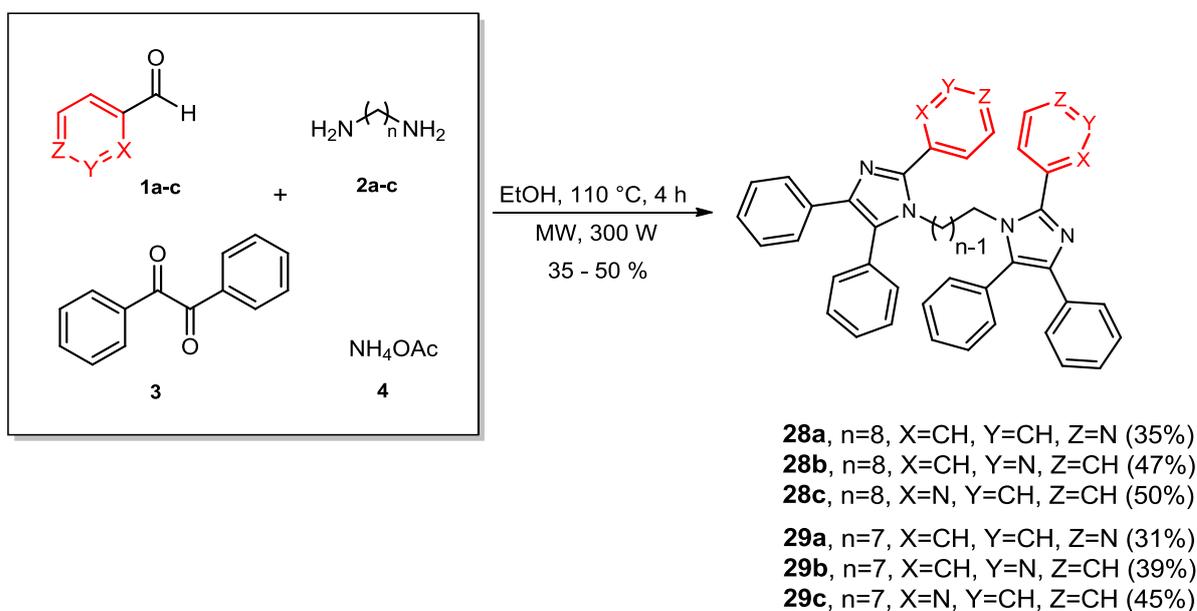
^a Las reacciones fueron realizadas con 1,0 equiv. de 1,8-octanodiamina y 2,0 equiv. de piridina-4-carboxaldehído, benzil y NH₄OAc; ^b La reacción fue realizada con 1,0 equiv. de 1,8-octanodiamina y 3,0 equiv. de piridina-4-carboxaldehído, benzil y NH₄OAc.

Conforme lo mostrado en la **Tabla 44**, la reacción mediante calentamiento convencional en etanol a reflujo durante 48 h con 0.30 equivalentes de catalizador, 1.0 equivalentes de 1,8-octanodiamina y 2.0 equivalentes de piridina-4-carboxaldehído, benzil y NH₄OAc, llevó a la formación del dímero **28a** con un rendimiento del 19%, luego de la purificación por cromatografía en columna (entrada 1). El rendimiento de la reacción fue del 20% cuando se llevó a cabo en microondas, a 100 °C durante 1h (entrada 2). La reacción realizada en microondas, con 0.15 equivalentes del catalizador (entrada 3) dio un rendimiento similar (19%). Esto nos condujo a realizar la síntesis en microondas por un tiempo mayor, 2 h, y en ausencia del ácido de Lewis (Entrada 4). Así, se obtuvo un 25% de rendimiento. La reacción realizada con 1,0 equivalente de 1,8-octanodiamina e 3,0 equivalentes de piridina-4-carboxaldehído, benzil y NH₄OA, en microondas a 110°C y 2 h, llevó a la formación de una mayor cantidad de subproductos lo que dificultó la purificación, y el compuesto **28a** se obtuvo

con un 20% de rendimiento (entrada 5). Finalmente, cuando la reacción se realizó en microondas, sin catalizador y a 110°C durante 4 h, se obtuvo un 35 % de rendimiento (entrada 6) siendo este el mejor resultado de la tabla.

Estas condiciones de reacción (entrada 6), fueron las elegidas para llevar a cabo la síntesis de los dímeros **28a-c** y **29a-c** (Esquema 24).

La síntesis de estos dímeros fue realizada empleándose la reacción tetracomponente entre 1,n-alcanodiaminas, benzil (1,2-difenil-1,2-etanodiona), acetato de amonio y distintos piridinacarboxaldehídos, en etanol por 4 horas, en un equipo digestor de microondas (MARS 6) a 110 °C. Los productos fueron obtenidos con rendimientos de 35 a 50%, después de ser purificados por cromatografía en columna (Esquema 24).



Esquema 24. Esquema general de reacción para la obtención de los dímeros **28a-c** y **29a-c**

VI.1.4 Síntesis del dímero 28a

Se obtuvo el compuesto **28a** de acuerdo a lo descrito en el punto anterior, con un rendimiento de 35%. Los datos de RMN de ^1H y ^{13}C se informan en las **Tabla 45** y **Tabla 46**, respectivamente. La asignación de las señales se realizó a partir de los espectros de ^1H , ^{13}C (APT) y de los espectros bidimensionales (**Figura 58-Figura 62**).

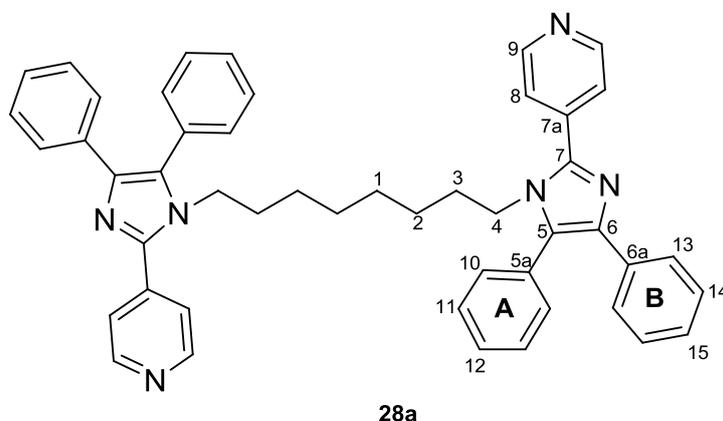


Tabla 45. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **28a**. En CDCl_3 a 400 MHz.

DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (PPM)	MULTIPLICIDAD	CONSTANTE DE ACOPLAMIENTO (HZ)	ASIGNACIÓN
8,71	<i>doblete</i>	6.0	H9
7,64	<i>doble doblete</i>	4.5, 1.6	H8
7,52-7,42	<i>multiplete</i>	-	Fenilo A o B
7,39-7,34	<i>multiplete</i>	-	H10 o H13
7,24-7,13	<i>multiplete</i>	-	Parte de fenilo A o B
3,91	<i>triplete</i>	7.6	H4
1,34-1,24	<i>multiplete</i>	-	H3
0,87-0,72	<i>multiplete</i>	-	H1 y H2

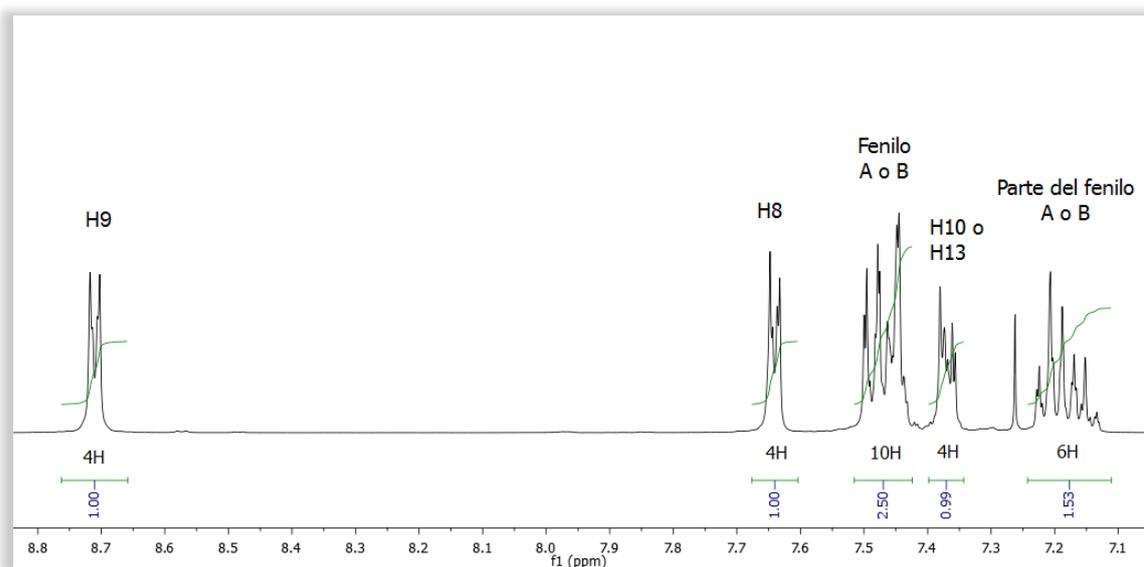


Figura 58. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **28a** – región de los aromáticos.

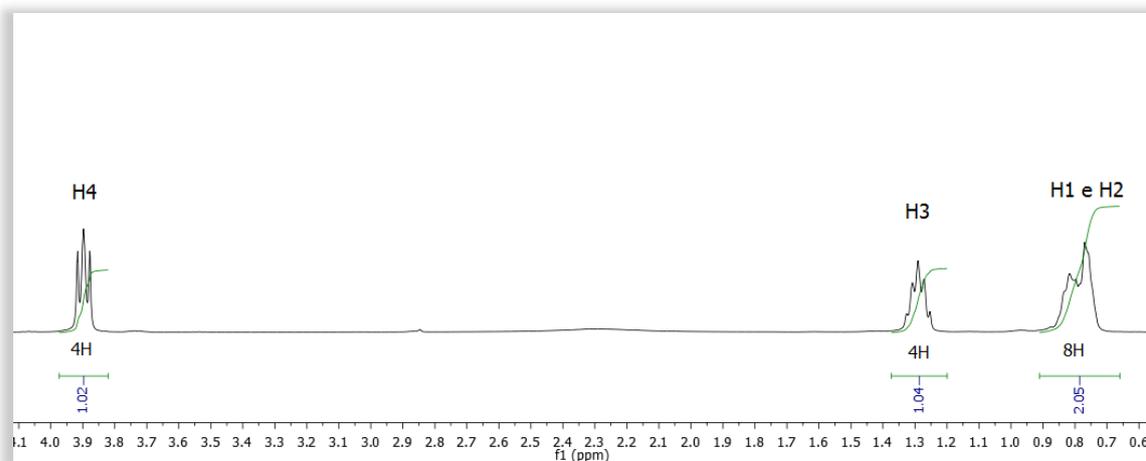


Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **28a** – región de los alifáticos

Tabla 46. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **28a**. En CDCl_3 a 100 MHz.

COMP. 28a	Desplazamiento químico (δ en ppm)
^{13}C -RMN (APT)	150.4 (C9); 144.6 (7); 139.2 y 139.0 (C5 y C6); 134.2 (7a); 131.3 y 131.0 (C5a y C6a); 131.1 (C10 o C13); 128.4 y 126.9 (parte del fenilo A o B); 129.3, 129.2 y 127.0 (fenilo A o B); 123.1 (C8); 45.04(C4); 30.6 (C3), 28.4 y 26.2 (C1 y C2).

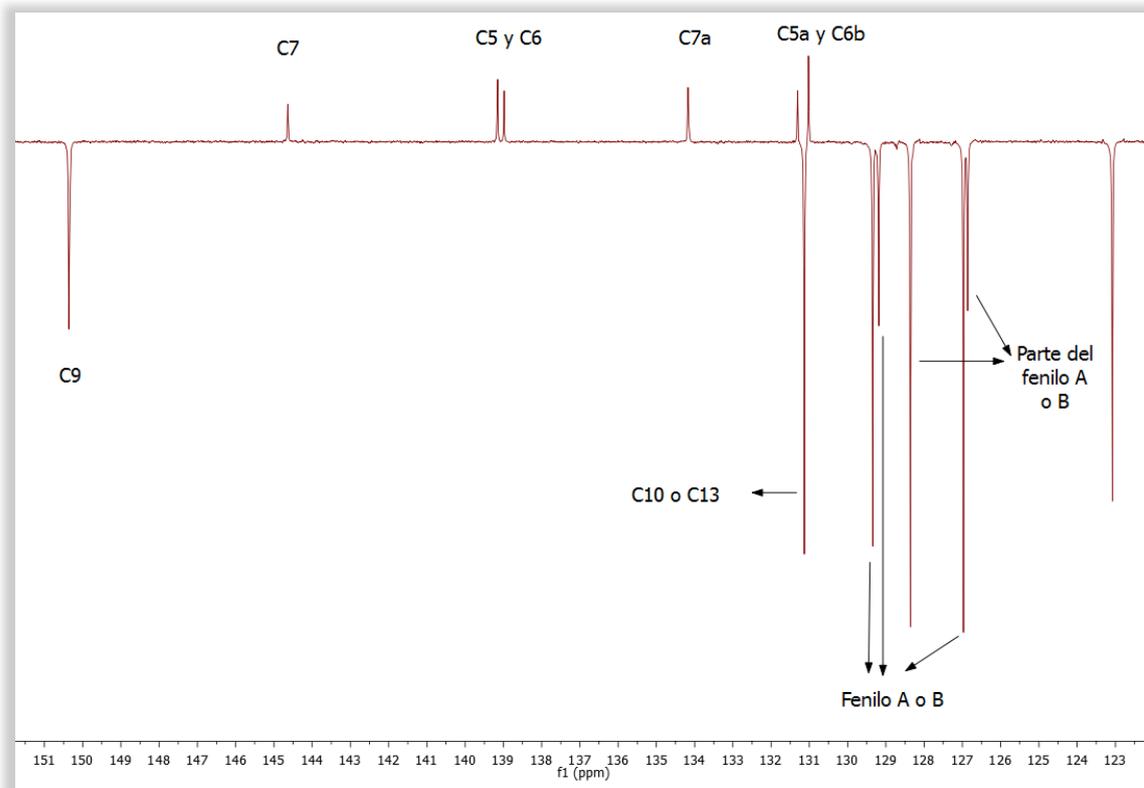


Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **28a** – región de los aromáticos. Hacia arriba, las señales singulete (carbonos cuaternarios). Hacia abajo, las señales doblete (-CH).

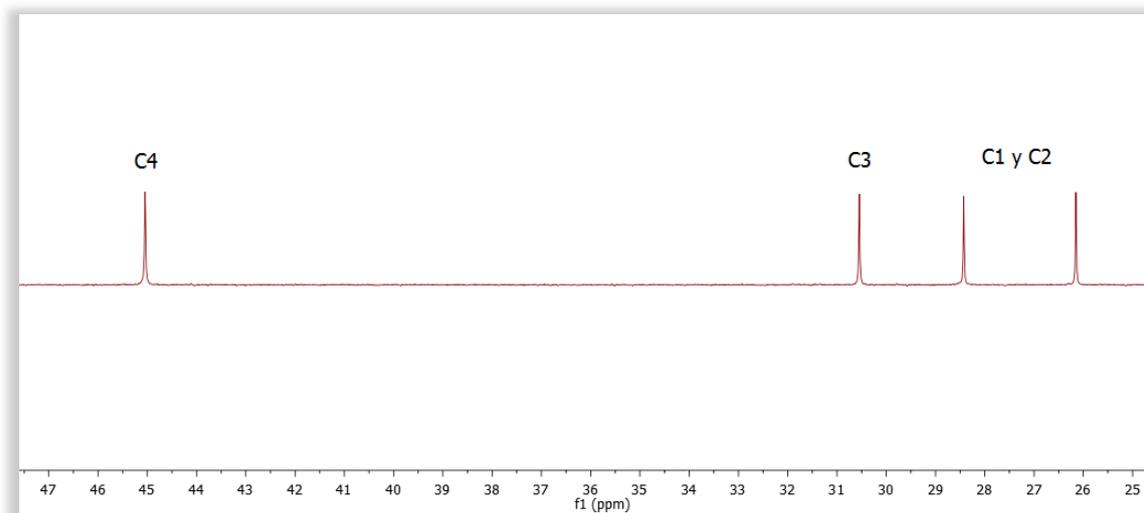


Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **28a** – región de los alifáticos. Hacia arriba, señales triplete (-CH₂).

En la figura siguiente se presentan los espectros de RMN bidimensional heteronuclear ^1H - ^{13}C -HSQC del Compuesto **28a**.

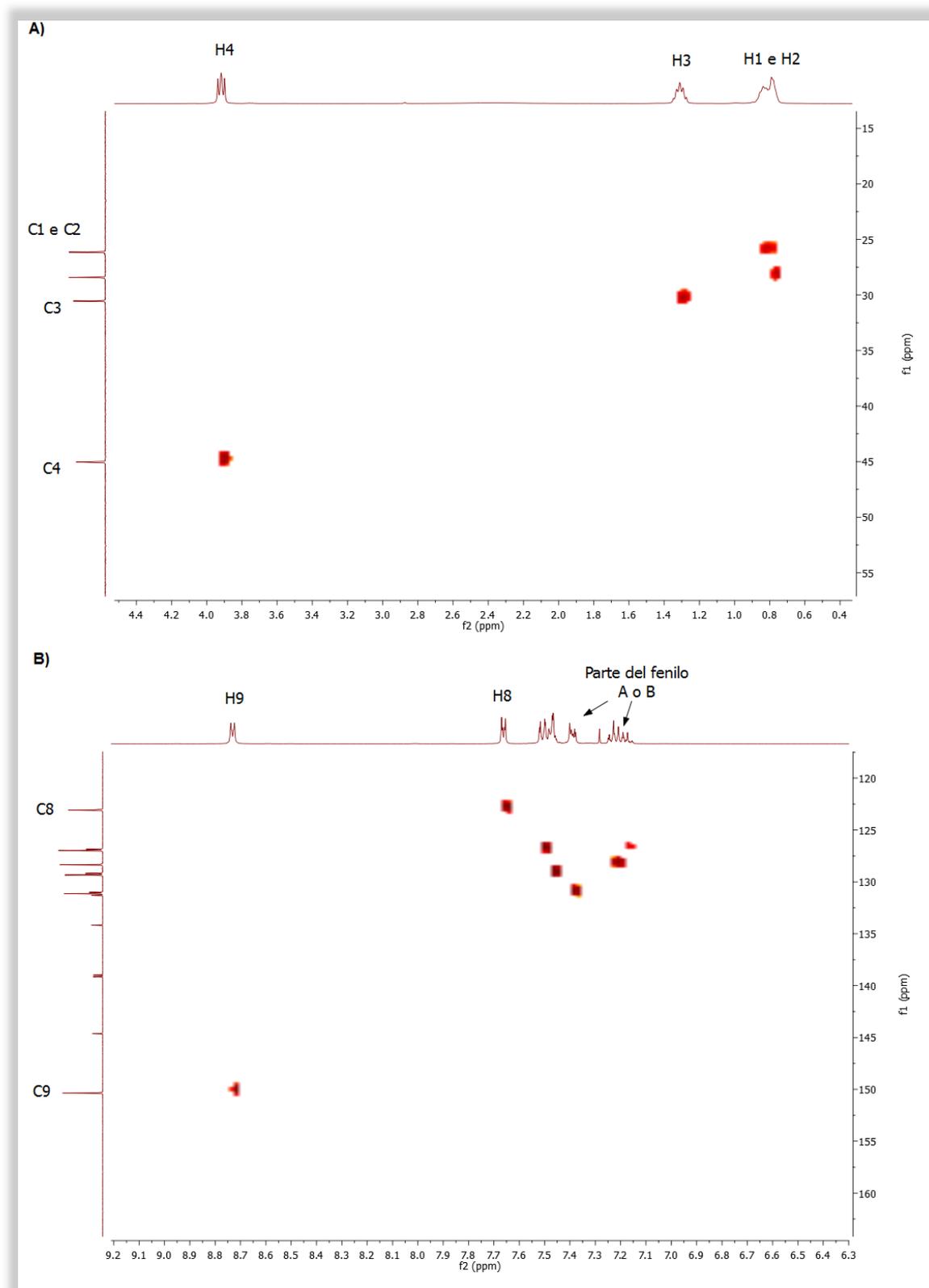


Figura 62. Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C -HSQC (CDCl_3) del compuesto **28a** – A) región de los alifáticos; B) región de los aromáticos.

VI.1.5 Síntesis del dímero **28b**

El compuesto **28b** se obtuvo siguiendo el procedimiento explicado en el punto VI.1.3, con un rendimiento de 47%. Los datos de RMN de ^1H y ^{13}C se informan en las **Tabla 47** y **Tabla 48**, respectivamente. La asignación de las señales se realizó a partir de los espectros de ^1H , ^{13}C (APT) y de los espectros bidimensionales (**Figura 63-Figura 67**).

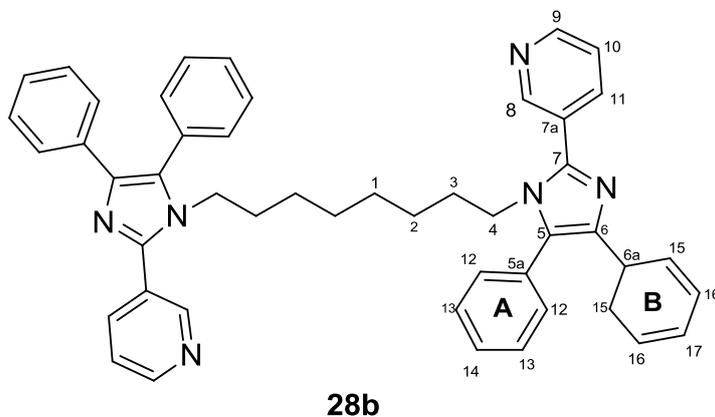


Tabla 47. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **28b**. En CDCl_3 a 400 MHz.

DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (PPM)	MULTIPLICIDAD	CONSTANTE DE ACOPLAMIENTO (HZ)	ASIGNACIÓN
8,91	<i>doblete</i>	1.5	H8
8,65	<i>doble doblete</i>	4.8, 1.4	H9
8,04	<i>doble triplete</i>	7.9, 1.9	H11
7,49	<i>doble doblete</i>	8.3, 1.3	H12 o H15
7,47-7,36	<i>multiplete</i>	-	Fenilo A o B e H10
7,23 -7,11	<i>multiplete</i>	-	Parte del fenilo A o B
3,82	<i>triplete</i>	7.8	H4
1,34-1,16	<i>multiplete</i>	-	H3
0,86-0,63	<i>multiplete</i>	-	H1 e H2

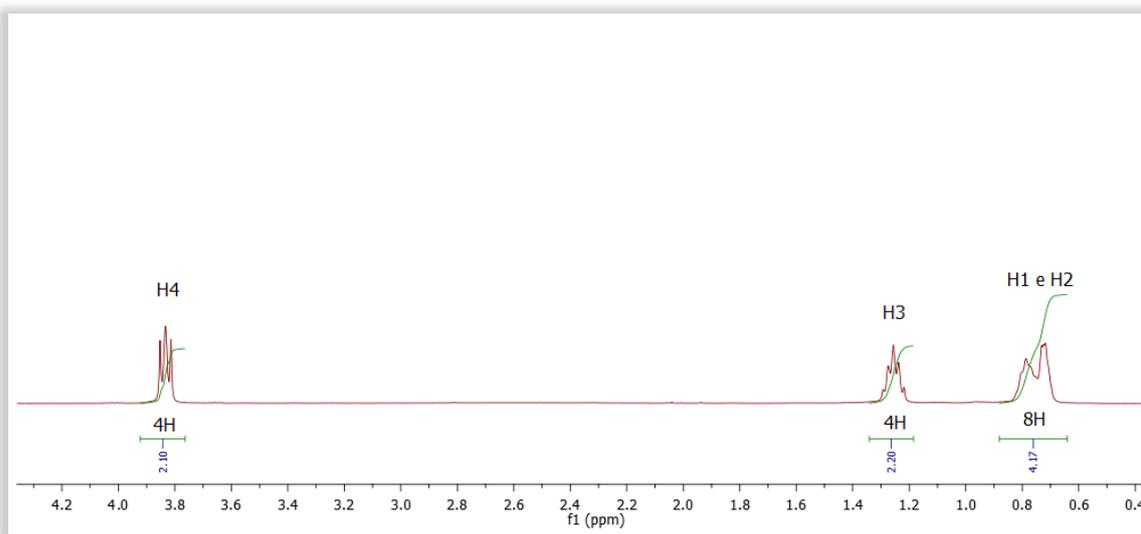


Figura 63. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **28b** – región de los alifáticos.

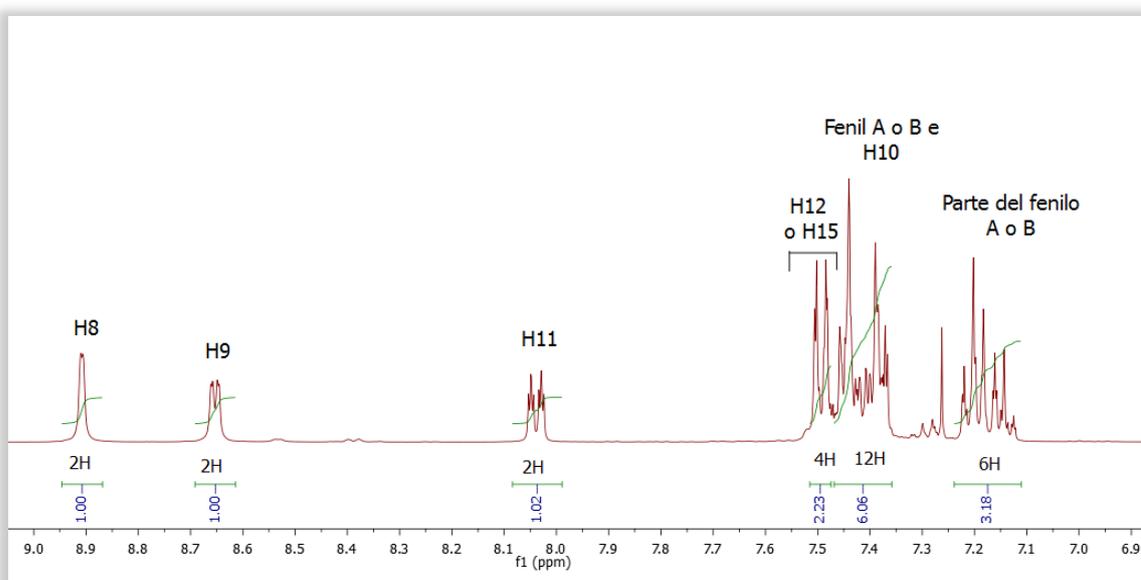


Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **28b** – región de los aromáticos.

Tabla 48. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **28b**. En CDCl_3 a 100 MHz.

COMP. 28a	Desplazamiento químico (δ en ppm)
^{13}C -RMN (APT)	149.9 (C9), 149.6 (C8), 144.5 (C7), 138.6 y 134.4 (C5 y C6), 136.8 (C11), 131.24 y 130.4 (C5a y C6a), 131.1, 129.3, 123.7, y 129.0 (fenilo A o B y C10), 128.3 y 126.7 (parte del fenilo A o B), 127.9 (C7a), 126.9 (C12 o C15), 44.9 (C4), 30.5 (C3), 28.4 y 26.1 (C1 y C2)

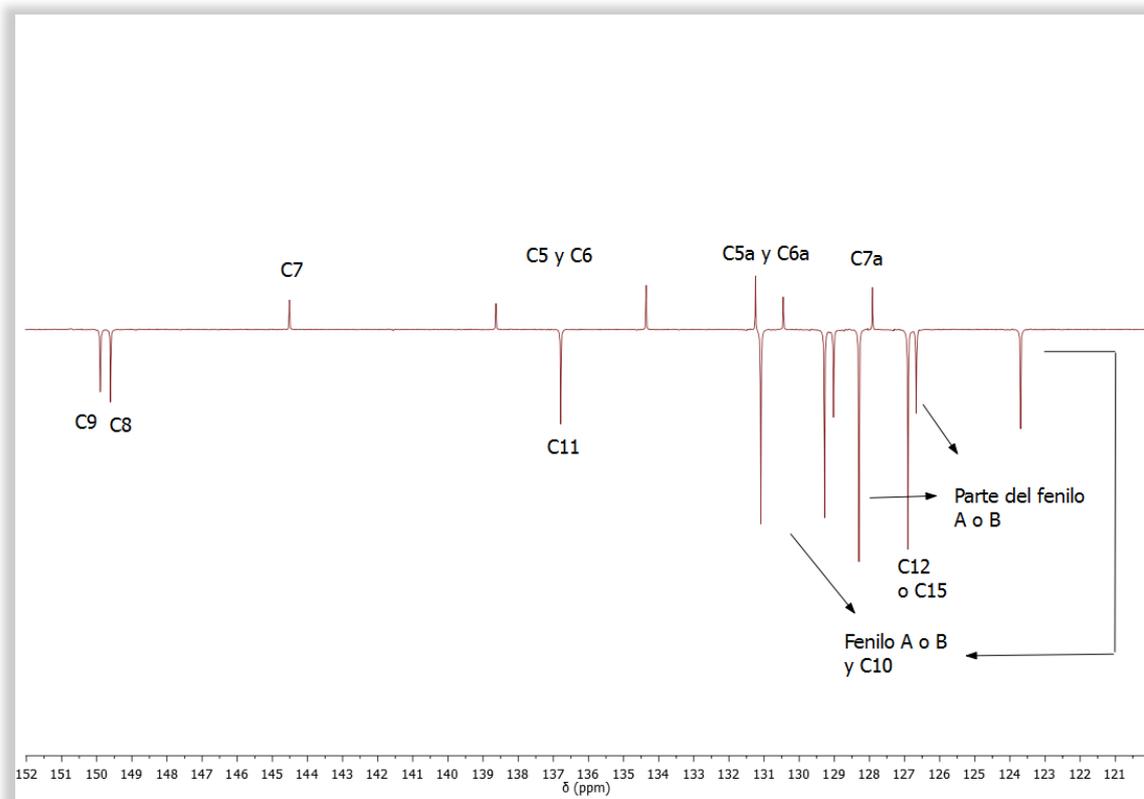


Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **28b** – región de los aromáticos. Hacia arriba, las señales singlete (carbonos cuaternarios). Hacia abajo, las señales doblete ($-\text{CH}$).

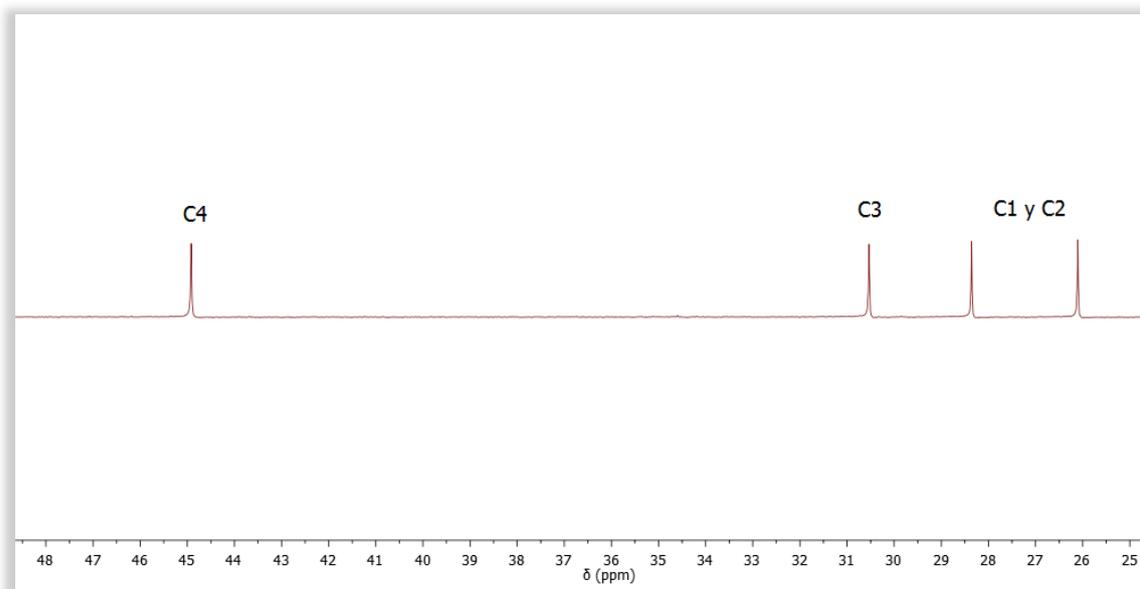


Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **28b** – región de los alifáticos. Hacia arriba, señales triplete ($-\text{CH}_2$).

En la siguiente figura se presentan los espectros de RMN bidimensional heteronuclear ^1H - ^{13}C -HSQC del compuesto **28b**.

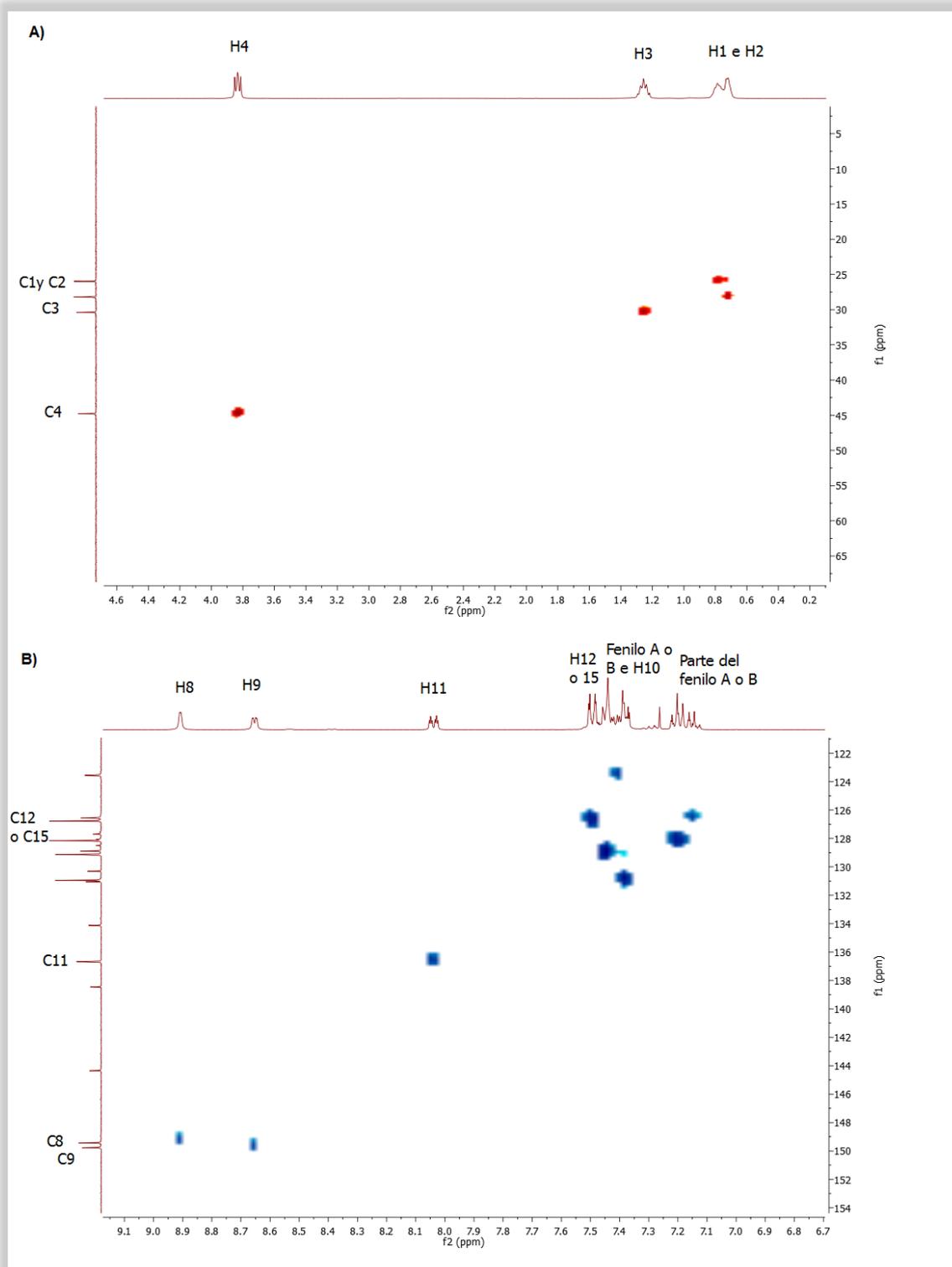


Figura 67. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HSQC (CDCl_3) del compuesto **28b** – a) región de los alifáticos; b) región de los aromáticos.

VI.1.6 Síntesis del dímero **28c**

El compuesto **28c** se obtuvo siguiendo el procedimiento explicado en el punto VI.1.3, con un rendimiento de 55%. La asignación completa de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C se informan en las **Tabla 49** y **Tabla 50**, respectivamente. La atribución de las señales se realizó a partir de los espectros de ^1H , ^{13}C (APT) y de los espectros bidimensionales (**Figura 68-Figura 72**).

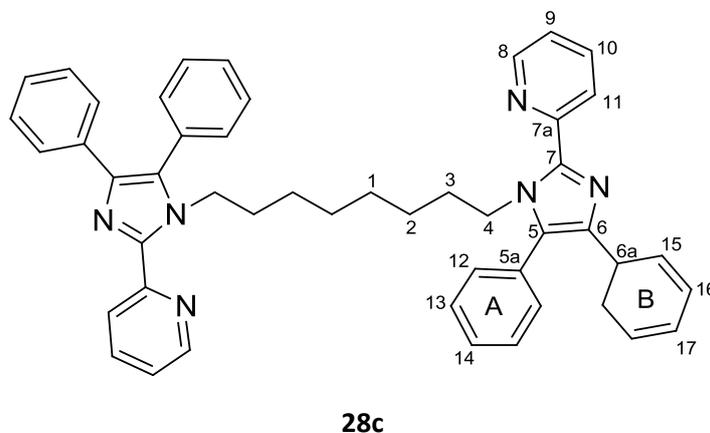


Tabla 49. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **28c**. En CDCl_3 a 400 MHz.

DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (PPM)	MULTIPLICIDAD	CONSTANTE DE ACOPLAMIENTO (HZ)	ASIGNACION
8,54	<i>doble doblete</i>	4,8 – 0,9	H8
8,35	<i>doblete</i>	8,0	H11
7,77	<i>triplete doblete</i>	7,8 – 1,8	H10
7,52	<i>doblete</i>	7,1	H12 o H15
7,48-7,34	<i>multiplete</i>	-	Fenilo A o B
7,24-7,17	<i>multiplete</i>	-	Parte del fenilo A o B
7,16-7,11	<i>multiplete</i>	-	H9
4,39	<i>triplete</i>	8,0	H4
1,52-1,40	<i>multiplete</i>	-	H3
1,02-0,85	<i>multiplete</i>	-	H1 e H2

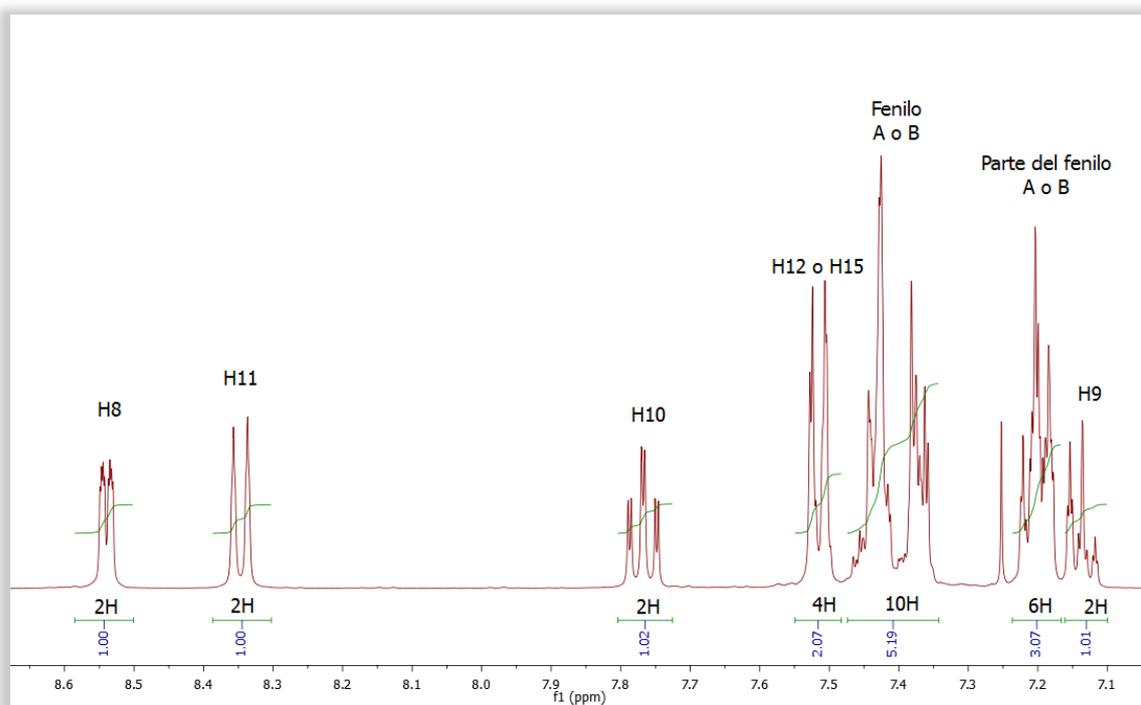


Figura 68. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **28c** – región de los alifáticos.

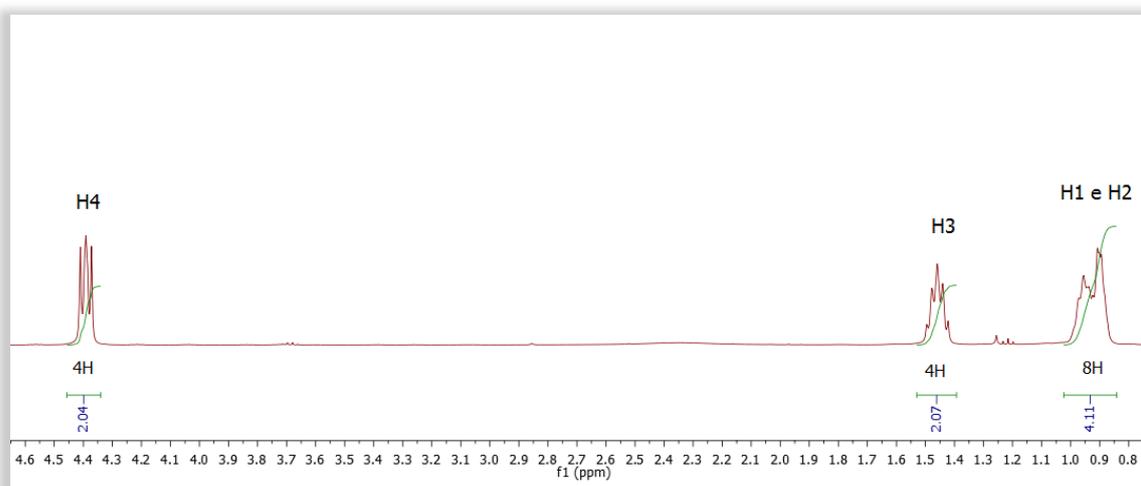


Figura 69. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **28c** – región de los aromáticos.

Tabla 50. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **28c**. En CDCl_3 a 75 MHz.

COMP. 28c	Desplazamiento químico (δ en ppm)
^{13}C -RMN (APT)	151.25 (C7a), 148.45 (C8), 144.32 (C7), 138.03 y 134.76 (C5 y C6), 136.74 (C10), 131.88 y 131.43 (C5a y C6a), 131.43, 129.13 y 128.89 (fenilo A o B), 128.26 y 122.60 (parte de fenilo A o B), 126.93 (C12 o C15), 126.48 (C9), 123.65 (C11), 45.45 (C4), 30.96 (C3), 28.59 y 26.39 (C1 y C2).

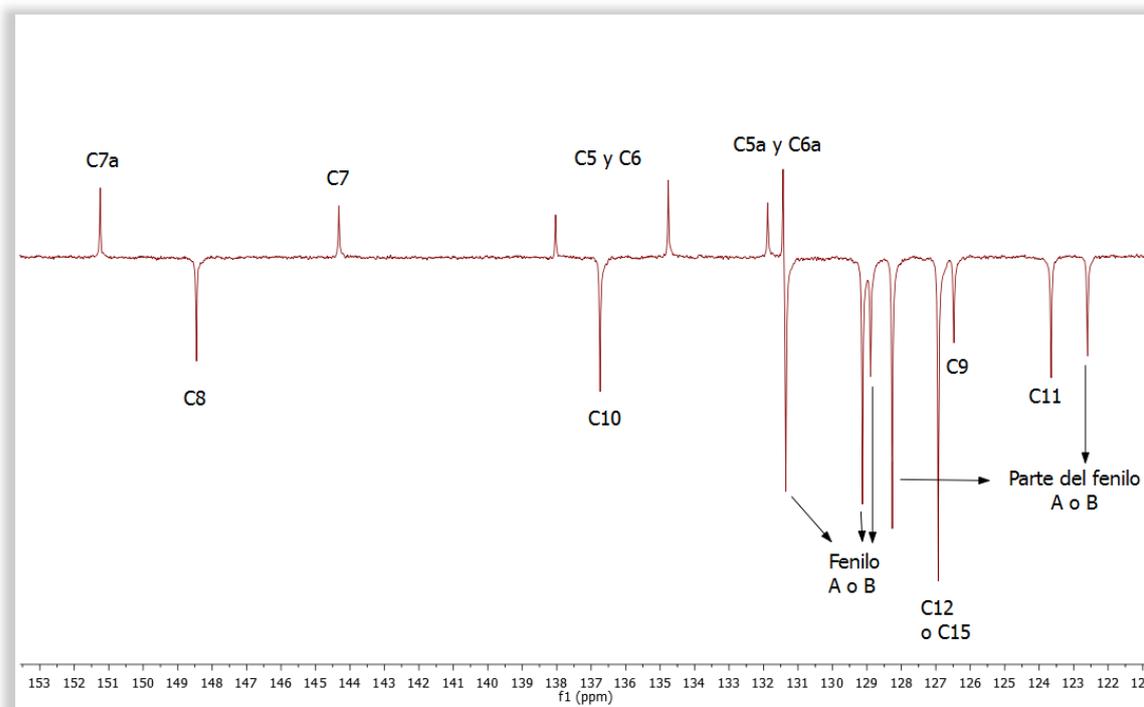


Figura 70. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **28c** – región de los aromáticos.

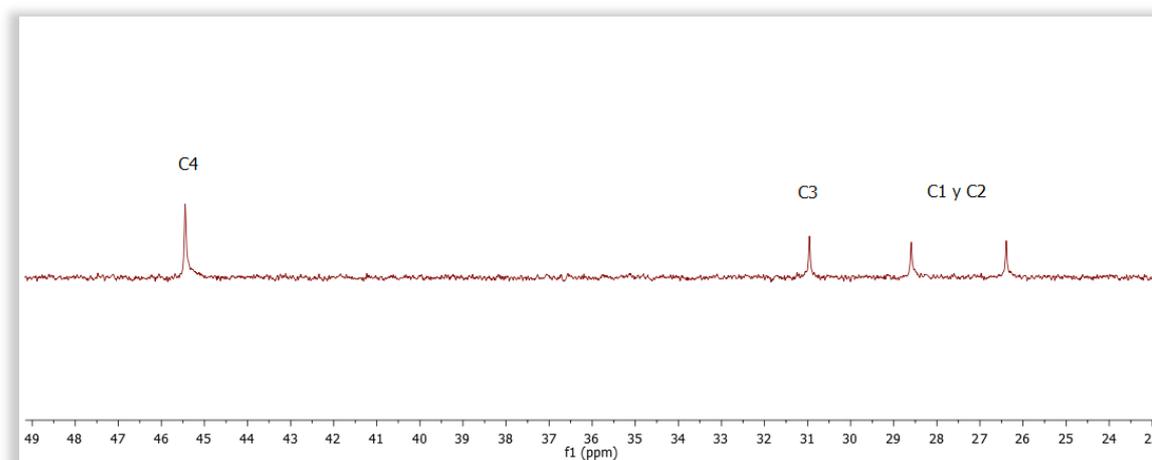


Figura 71. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) del Compuesto **28c** – región de los alifáticos.

En la siguiente figura se presentan los espectros de RMN bidimensional heteronuclear ^1H - ^{13}C -HSQC del compuesto **28c**.

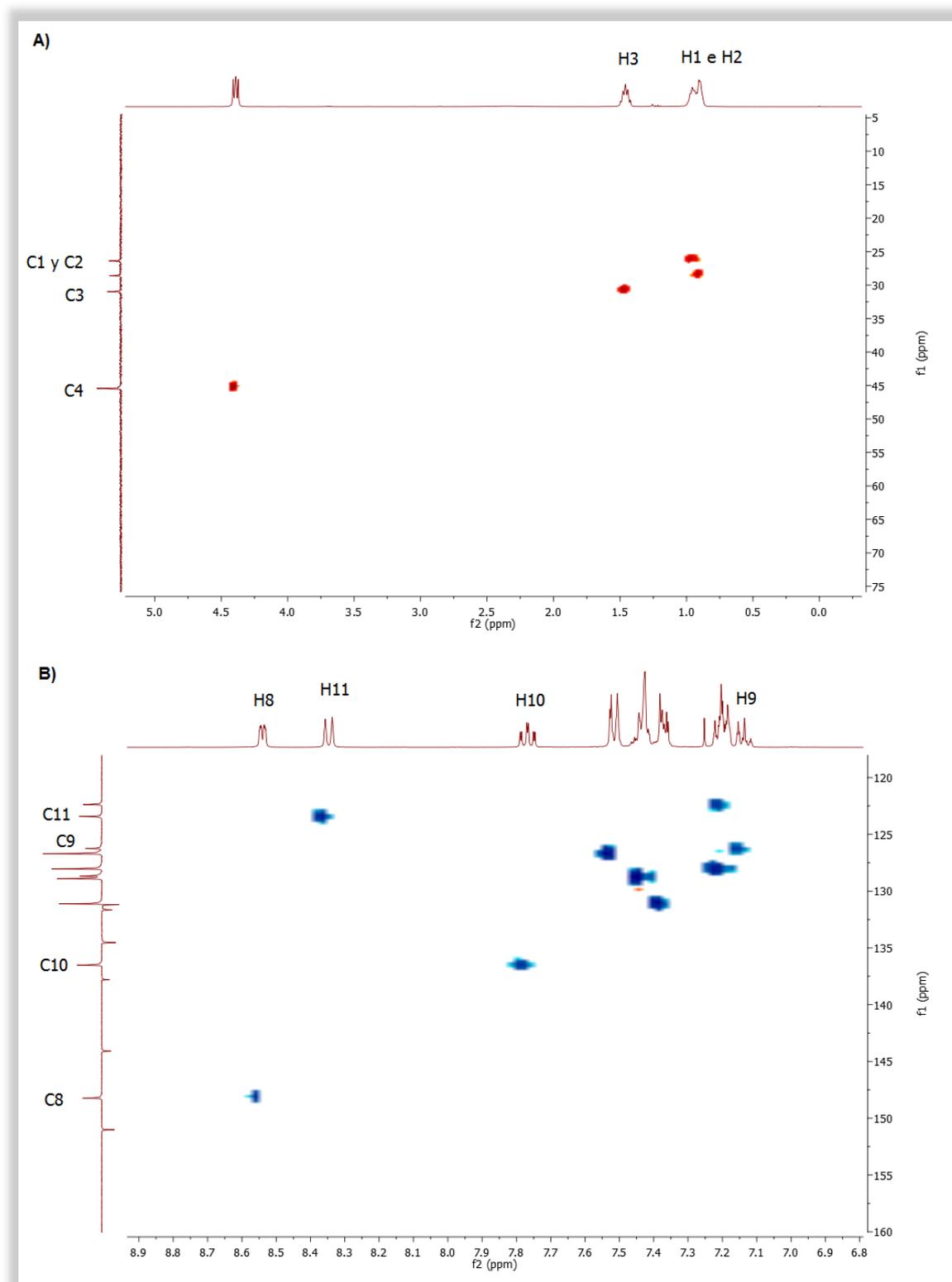


Figura 72. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HSQC (CDCl_3) del compuesto **28c** – A) región dos alifáticos; B) región de los aromáticos.

VI.1.7 Síntesis del dímero **29a**

Se obtuvo el compuesto **29a** siguiendo el procedimiento explicado en el punto VI.1.3, con un rendimiento de 31%. La asignación completa de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C se informan en las **Tabla 51** y **Tabla 52**, respectivamente y en las **Figura 73** y **Figura 74**.

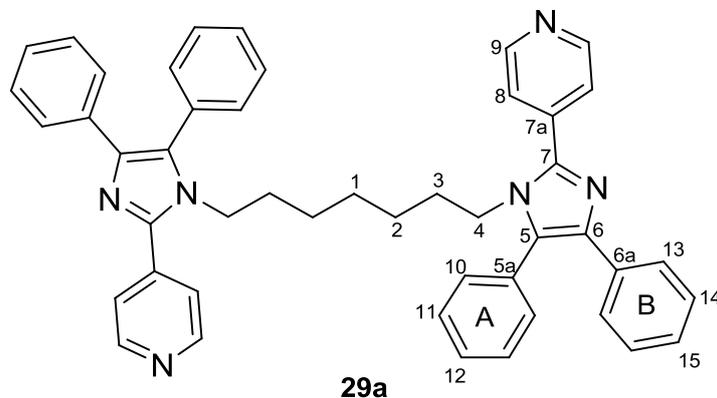


Tabla 51. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **29a**. En CDCl_3 a 400 MHz.

DESPLAZAMIENTO QUÍMICO ^1H (PPM)	MULTIPLICIDAD	CONSTANTE DE ACOPLAMIENTO (HZ)	ASIGNACIÓN
8,71	<i>Doblete</i>	6.9	H9
7,62	<i>Doble Doblete</i>	4.5, 1.6	H8
7,51-7,41	<i>Multiplete</i>	-	Fenilo A o B
7,39-7,32	<i>Multiplete</i>	-	H10 o H13
7,24-7,12	<i>Multiplete</i>	-	Parte del fenilo A o B
3,88	<i>Triplete</i>	7.6	H4
1,29-1,18	<i>Multiplete</i>	-	H3
0,81-0,63	<i>Multiplete</i>	-	H1 e H2

Tabla 52. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **29a**. En CDCl_3 a 75 MHz.

COMP. 29a	Desplazamiento químico (δ en ppm)
^{13}C -RMN (APT)	150.3 (C9); 144.6 (7); 139.0 y 138.9 (C5 y C6); 134.1 (7a); 131.2 y 130.9 (C5a y C6a); 131.0 (C10 o C13); 128.3 y 126.9 (parte del fenilo A o B); 129.3, 129.1 y 126.8 (fenilo A o B); 123.0 (C8); 44.9 (C4); 30.4 (C3), 27.9 y 26.0 (C1 y C2).

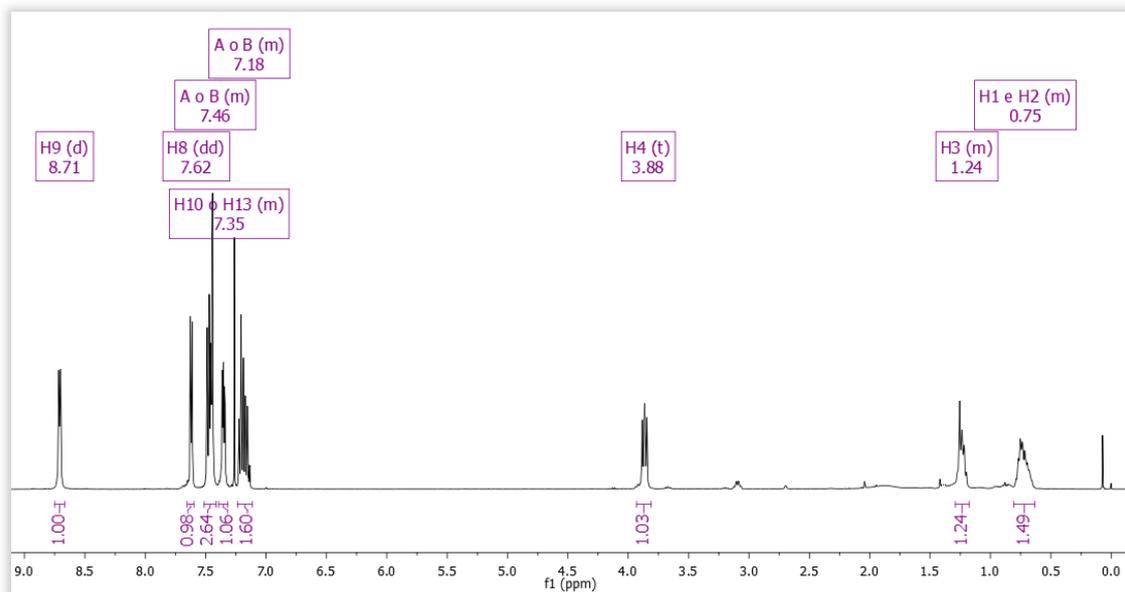


Figura 73. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **29a**.

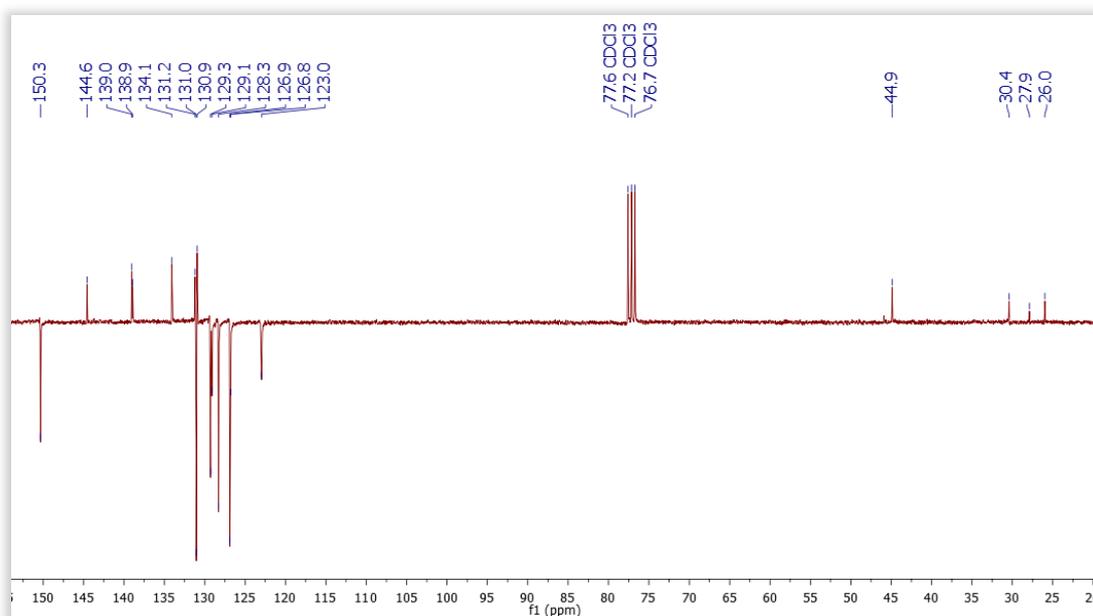


Figura 74. Espectro de RMN de ^{13}C (APT) del compuesto **29a**. Hacia arriba, las señales singlete y triplete ($-\text{CH}_2$). Hacia abajo, las señales doblete ($-\text{CH}$).

VI.1.8 Síntesis del dímero 29b

El compuesto **29b** se obtuvo siguiendo el procedimiento explicado en el punto VI.1.3, con un rendimiento de 39%. La asignación completa de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C se informan en la **Tabla 53** y **Tabla 54**, respectivamente y en las **Figura 75** y **Figura 76**.

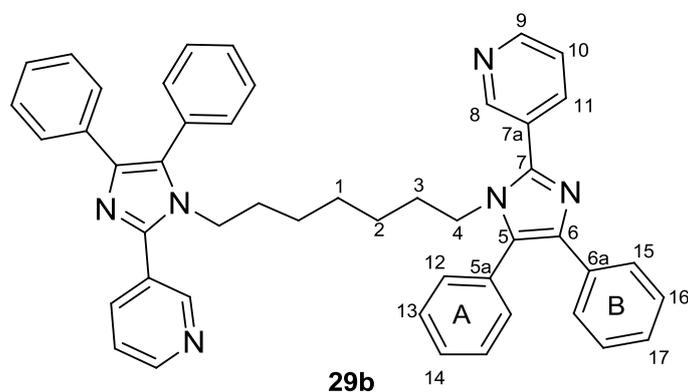


Tabla 53. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **29b**. En CDCl_3 a 400 MHz.

DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (PPM)	MULTIPLICIDAD	CONSTANTE DE ACOPLAMIENTO (HZ)	ASIGNACIÓN
8,90	Doblete	1.3	H8
8,67	Doblete	3.6	H9
8,04	Doble triplete	7.9, 1.8	H11
7,53-7,32	Multiplete	-	Fenilo A o B, H10, H12 o H15
7,25 -7,12	Multiplete	-	Parte del fenilo A o B
3,81	Triplete	7.6	H4
1,28-1,14	Multiplete	-	H3
0,79-0,56	Multiplete	-	H1 e H2

Tabla 54. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **29b**. En CDCl_3 a 100 MHz.

COMP. 29a	Desplazamiento químico (δ en ppm)
^{13}C -RMN (APT)	149.9 (C9), 149.6 (C8), 144.5 (C7), 138.6 y 134.3 (C5 y C6), 136.8 (C11), 131.2 y 130.4 (C5a y C6a), 131.2, 129.3, 123.7, y 129.1 (fenilo A o B y C10), 128.3 y 126.7 (parte del fenilo A o B), 127.8 (C7a), 126.9 (C12 o C15), 44.8 (C4), 30.4 (C3), 27.9 y 26.0 (C1 y C2).

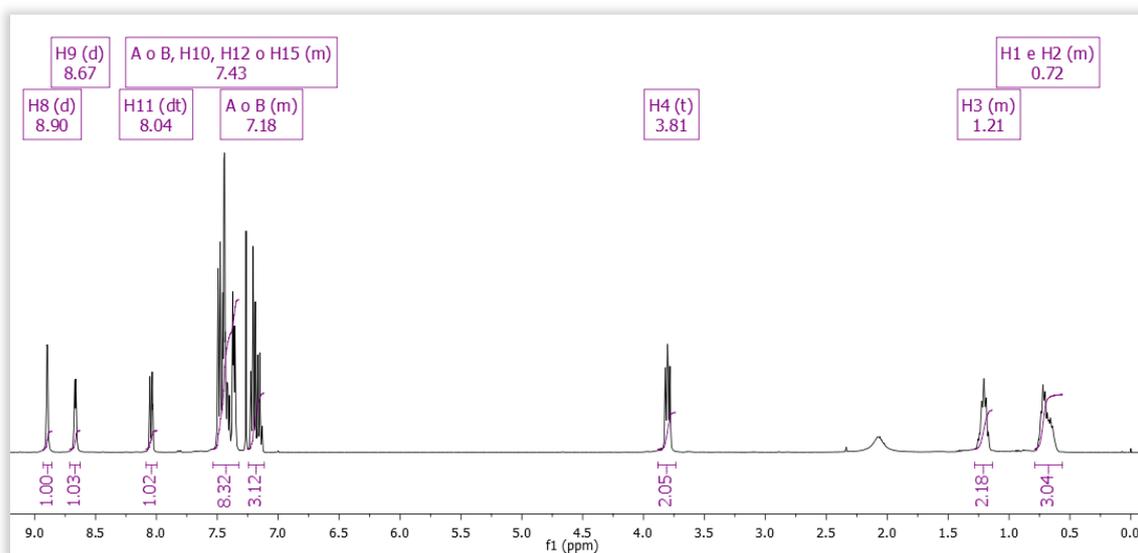


Figura 75. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **29b**.

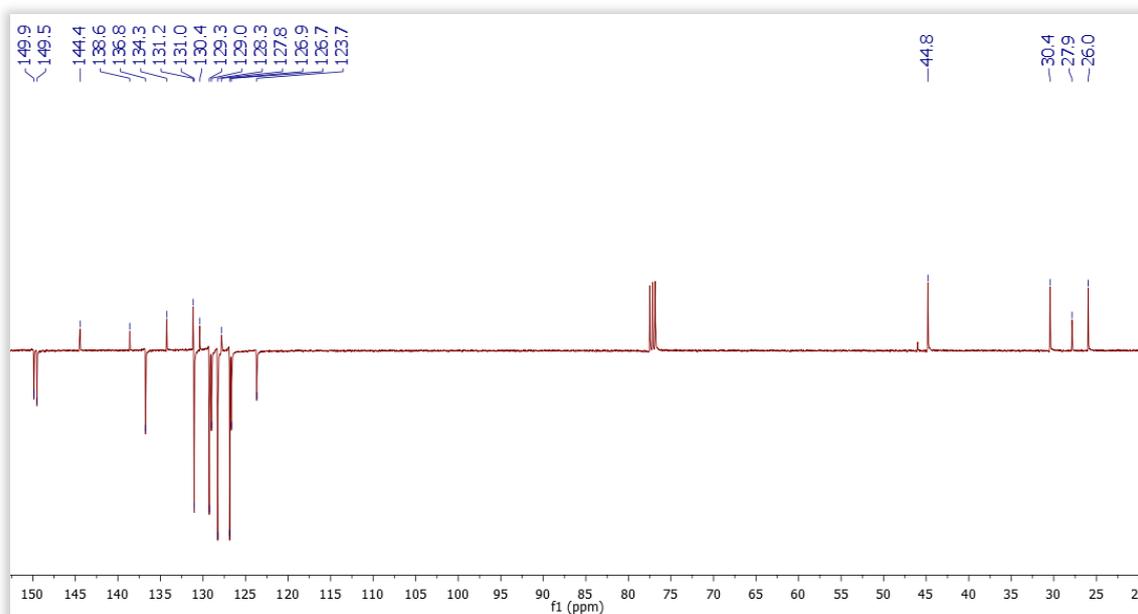
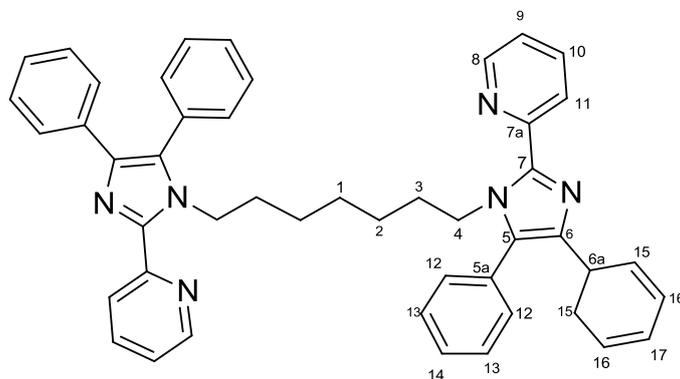


Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C (APT) del compuesto **29b**. Hacia arriba, las señales singlete y triplete ($-\text{CH}_2$). Hacia abajo, las señales doblete ($-\text{CH}$).

VI.1.9 Síntesis del dímero 29c

El compuesto **29c** se obtuvo siguiendo el procedimiento explicado en el punto VI.1.3, con un rendimiento de 45%. La asignación completa de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C se informan en las **Tabla 55** y **Tabla 56** en las **Figura 77** y **Figura 78**.



29c

Tabla 55. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de **29c**. En CDCl_3 a 400 MHz.

DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (PPM)	MULTIPLICIDAD	CONSTANTE DE ACOPLAMIENTO (HZ)	ASIGNACIÓN
8,52	Doblete	4,8	H8
8,32	Doblete	8,0	H11
7,76	Triplete doblete	7,8 – 1,8	H10
7,50	Doblete	7,1	H12 o H15
7,46-7,32	Multiplete	-	Fenilo A o B
7,23-7,16	Multiplete	-	Parte del fenilo A o B
7,16-7,11	Multiplete	-	H9
4,37	Triplete	7,6	H4
1,51-1,35	Multiplete	-	H3
1,00-0,81	Multiplete	-	H1 e H2

Tabla 56. Datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de **29c**. En CDCl_3 a 75 MHz.

COMP. 29a	Desplazamiento químico (δ en ppm)
^{13}C -RMN (APT)	^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 151.2 (C7a), 148.4 (C8), 144.2 (C7), 138.0 y 134.7 (C5 y C6), 136.6 (C10), 131.8 y 131.4 (C5a y C6a), 131.3, 129.0 y 128.8 (fenilo A o B), 128.2 y 122.5 (parte del fenilo A o B), 126.8 (C12 o C15), 126.4 (C9), 123.6 (C11), 45.4 (C4), 30.9 (C3), 28.1 y 26.3 (C1 y C2).

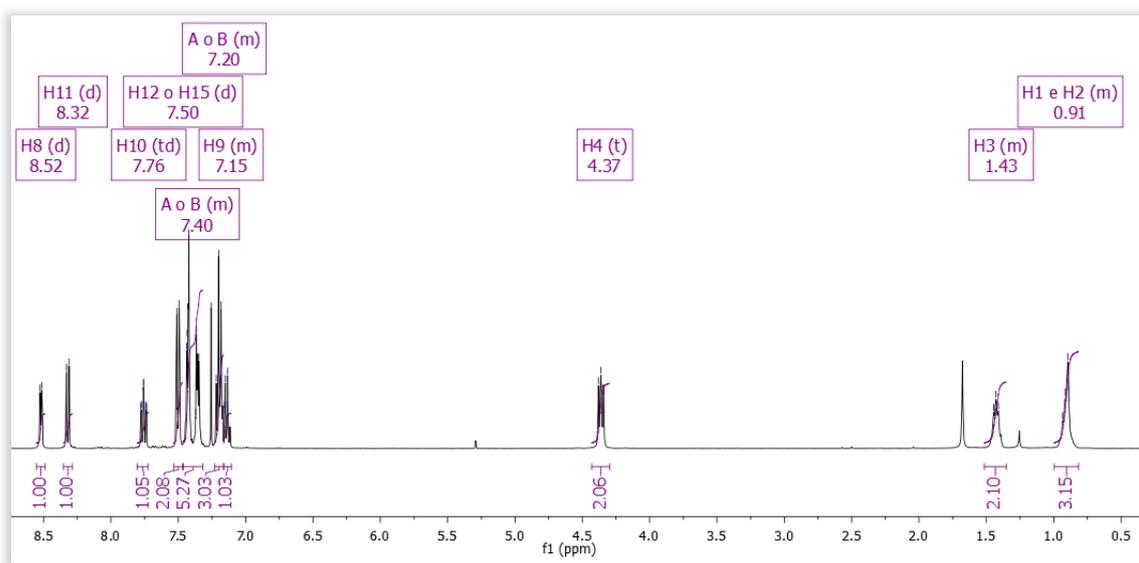


Figura 77. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **29c**.

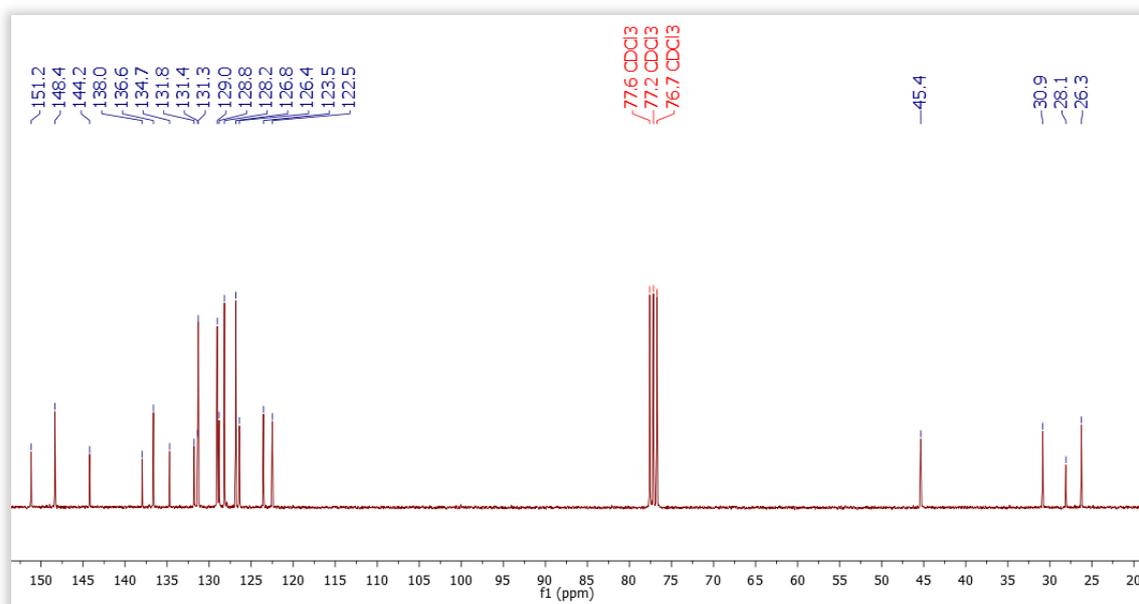


Figura 78. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **29c**.

VI.1.10 Estudio de inhibición *in vitro* de ACE y BuCE de los derivados 28a-c y 29a-c.

Se evaluó la actividad inhibitoria de ACE y BuCE de los derivados de bis(n)-lofina **28a-c** y **29a-c** utilizando el método espectrofotométrico de Ellman con algunas modificaciones [8]. Debido a que los compuestos no eran solubles en el buffer de trabajo y tampoco lo fueron en metanol ni en DMSO (co-solventes empleados normalmente para este estudio), se optimizó el ensayo hasta conseguir una mezcla de solventes que permitía disolver los compuestos en el buffer de trabajo utilizado para el ensayo, esto fue corroborado mediante un seguimiento por espectroscopia UV. El co-solvente óptimo fue una mezcla de 1,25% de cloroformo y 13,75% de metanol. Los valores de IC₅₀ para la inhibición de ACE y BuCE se muestran en la **Tabla 57**.

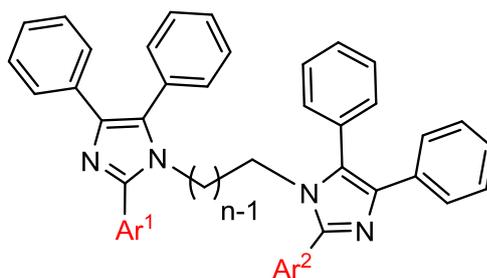


Tabla 57 . Actividad inhibitoria sobre ACE y BuCE de **28a-c** y **19a-c**.

COMP.	ACE					BUCE	
	-Ar ¹	-Ar ²	n	IC ₅₀ (μM)	log IC ₅₀ ± DS	IC ₅₀ (μM)	log IC ₅₀ ± DS
28a	4-Py	4-Py	8	n.a	-	n.a	-
28b	3-Py	3-Py	8	n.a	-	n.a	-
28c	2-Py	2-Py	8	n.a	-	n.a	-
29a	4-Py	4-Py	7	n.a	-	23,27	1,3668 ± 0,125
29b	3-Py	3-Py	7	n.a	-	12,04	1,0806 ± 0,091
29c	2-Py	2-Py	7	n.a	-	32,25	1,5085 ± 0,111
Tacrina				0,029	-1,53 ± 0,05	0,004	-2,35 ± 0,07

n.a= no activo.

Los compuestos con valores de IC₅₀ superiores a 50 μM se consideraron inactivos, por lo tanto, los derivados sintetizados no resultaron inhibidores de ACE, pero **29a**, **29b** y **29c** sí mostraron capacidad inhibitoria sobre BuCE, lo que los convierte en inhibidores selectivos para esta enzima.

El hecho de que los derivados con interesante actividad inhibitoria selectiva frente a BuCE fueron aquellos con $n=7$, nos motivó a continuar trabajando en la obtención de nuevos derivados, variando la longitud de la cadena espaciadora con $n=6$.

Este trabajo fue continuado y concluido, una vez finalizada mi estancia, por el grupo de investigación del prof. Marco A. Ceschi, quienes llevaron a cabo la síntesis de nuevos homodímeros de bis-lofina con $n=6$ y además, sintetizaron heterodímeros entre el núcleo de lofina y el de lofina sustituida (2, 3 y 4 piridina) con $n=6, 7$ y 8 .

Obtuvieron 12 nuevos derivados que fueron enviados a nuestro laboratorio para ser evaluados como inhibidores de ACE y BuCE. Los valores de IC_{50} para la inhibición de ACE y BuCE se muestran en la **Tabla 58**.

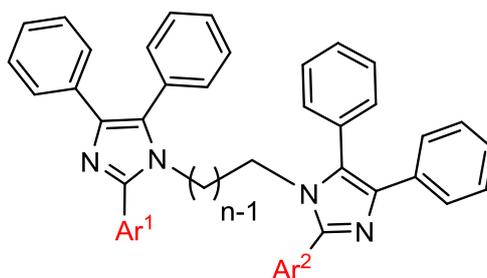


Tabla 58. Actividad inhibitoria de **28a-c – 29a-c** y de los derivados posteriormente sintetizados por el grupo de investigación del Prof. Ceschi.

COMP.	ACE					BUCE	
	-Ar ¹	-Ar ²	n	IC ₅₀ (μM)	log IC ₅₀ ± DS	IC ₅₀ (μM)	log IC ₅₀ ± DS
IA	2-Py	2-Py	6	n.a	-	0,246	-0,609 ± 0,062
IB	3-Py	3-Py	6	n.a	-	0,204	-0,691 ± 0,198
IC	4-Py	4-Py	6	n.a	-	25,84	1,412 ± 0,053
IIA	Ph	2-Py	6	n.a	-	0,155	-0,809 ± 0,058
IIB	Ph	3-Py	6	n.a	-	0,134	-0,873 ± 0,075
IIC	Ph	4-Py	6	n.a	-	0,164	-0,784 ± 0,109
IIIA	Ph	2-Py	7	n.a	-	0,091	-1,041 ± 0,039
IIIB	Ph	3-Py	7	n.a	-	0,034	-1,463 ± 0,063
IIIC	Ph	4-Py	7	n.a	-	1,294	0,112 ± 0,164
IVA	Ph	2-Py	8	n.a	-	0,578	-0,238 ± 0,070
IVB	Ph	3-Py	8	n.a	-	0,071	-1,151 ± 0,101
IVC	Ph	4-Py	8	n.a	-	1,586	0,200 ± 0,044
Tacrina				0,029	-1,53 ± 0,05	0,004	-2,35 ± 0,07

n.a= no activo.

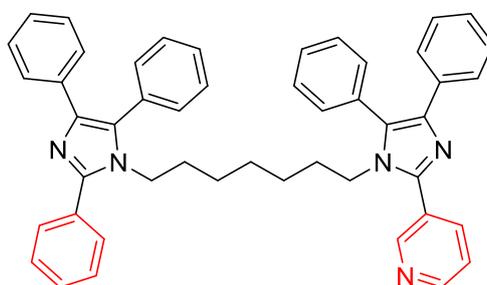
Los resultados fueron muy alentadores, ya que se obtuvieron potentes inhibidores selectivos de BuCE con valores de IC₅₀ a escala nanomolar. El compuesto más activo (**IIIB**) fue seleccionado para el estudio cinético de inhibición enzimática y para el estudio de modelado molecular.

Los valores de IC₅₀ indican que la inhibición de BuCE está influenciada principalmente por dos características: la naturaleza del sustituyente Ar y la longitud de la cadena hidrocarbonada. Entre todos los compuestos probados, los análogos asimétricos de bis(n)-

lofina con la porción 2-piridina y 3-piridina fueron mejores inhibidores de BuCE que los que contienen el resto 4-piridina. El compuesto **IIIB**, caracterizado por un anillo de fenilo no sustituido, un separador de siete carbonos y un resto 3-piridina mostró la inhibición enzimática más potente con un valor de IC_{50} de 34 nM. En el caso de los análogos asimétricos de bis(n)-lofina con un conector de ocho carbonos, el compuesto más activo fue **IVB** ($IC_{50} = 70$ nM) y para aquellos con un espaciador de seis metilenos, el compuesto **IIB** resultó ser el más activo. ($IC_{50} = 134$ nM). Ambos derivados **IVB** y **IIB** comparten con **IIIB** la presencia de un fenilo y 3-piridina como Ar^1 y Ar^2 .

Como el compuesto **IIIB** era el inhibidor de BuCE más eficaz de la serie, se seleccionó para el estudio cinético de la inhibición enzimática y para el modelado molecular.

VI.1.11 Derivado IIIB



VI.1.11.1 Caracterización cinética de inhibición de BuCE del compuesto IIIB

Con el objetivo de determinar el mecanismo de inhibición enzimática de **IIIB**, se realizó el estudio cinético de inhibición de BuCE. Se midió la velocidad inicial de la reacción enzimática a concentraciones variables del sustrato, manteniendo fija la concentración del inhibidor (0; 0,015 y 0,025 μ M de **IIIB**). Los resultados se presentan en forma de gráfico de *Lineweaver-Burk*, con los valores $1/V$ vs $1/[S]$. El gráfico de doble-recíproca mostró un patrón de líneas con una pendiente en aumento (disminución de V_{max}) a concentraciones mayores de **IIIB** y una intersección conjunta en el eje x (igual K_m), lo cual indicó una inhibición de tipo no competitivo. El mismo resultado se obtuvo por regresión no lineal de los datos empleando el programa GraphPad Prism 5, la cual se ajustó a un modelo no competitivo ($R^2 = 0,9830$) y permitió estimar un valor de constante de inhibición K_i de **21,29 nM**.

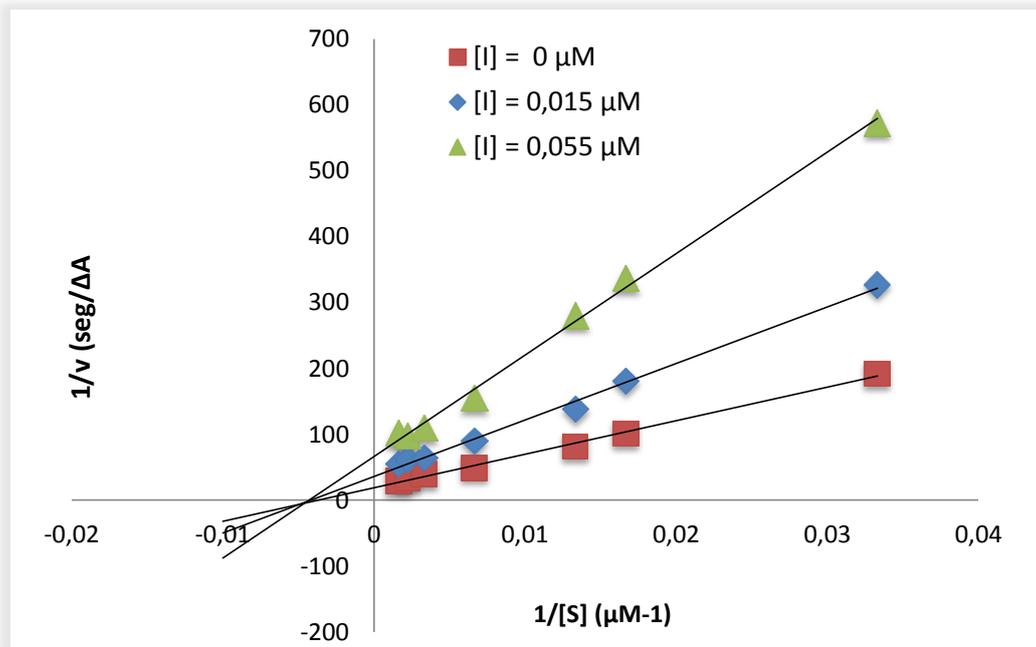


Figura 79. Gráfica de Lineweaver-Burk para la inhibición de BuCE del compuesto IIIB

VI.2 Conclusiones

Mediante este trabajo, realizado durante seis meses bajo la dirección del profesor Marco A. Ceschi en la UFRGS de Porto Alegre (Brasil), se obtuvieron 6 nuevos compuestos del tipo bis(n)-lofinas sustituidas. Aprovechando la experiencia adquirida en el desarrollo del capítulo 3 de esta tesis, se optimizó la síntesis *one-pot* de este tipo de compuestos mediante el uso de microondas, consiguiendo una importante reducción del tiempo de reacción (de 48 a 4 hs) y evitando el uso de catalizador.

La batería de compuestos del tipo de bis(n)-lofinas sustituidas fue completada por el grupo de trabajo del prof. Marco A. Ceschi sintetizando 12 nuevos derivados.

Un total de 18 compuestos fueron evaluados como inhibidores de CE_s, resultando 15 de ellos inhibidores selectivos de BuCE, algunos alcanzando la escala nanomolar. El inhibidor más potente de la serie fue el compuesto **IIIB**, caracterizado por dos núcleos lofina, uno de ellos con un resto de 3-piridina y separados por una cadena de siete carbonos, que mostró un IC₅₀= 34 nM. Le siguieron **IVB** (IC₅₀= 71 nM), de estructura similar a **IIIB** pero con un linker de 8 carbonos, y **IIIa** (IC₅₀= 91 nM) con un resto de 2-piridina en uno de sus núcleos lofina y un linker de n= 8.

El estudio cinético enzimático indicó que **IIIB** inhibe a la enzima BuCE a través de un mecanismo no competitivo, siendo su constante de inhibición *K_i* de 21,29 nM.

Referencias bibliográficas

- [1] A. Verma, S. Joshi, and D. Singh, "Imidazole: Having versatile biological activities," *J. Chem.*, vol. 2013, no. i, 2013.
- [2] V. S. V. Satyanarayana and A. Sivakumar, "An efficient and novel one-pot synthesis of 2,4,5-triaryl-1H-imidazoles catalyzed by UO₂(NO₃)₂·6H₂O under heterogeneous conditions," *Chem. Pap.*, vol. 65, no. 4, pp. 519–526, 2011.
- [3] N. Arispe, J. C. Diaz, and M. Flora, "Efficiency of histidine-associating compounds for blocking the Alzheimer's A β channel activity and cytotoxicity," *Biophys. J.*, vol. 95, no. 10, pp. 4879–4889, 2008.
- [4] M. Li *et al.*, "Imidazole improves cognition and balances Alzheimer's-like intracellular calcium homeostasis in transgenic *Drosophila* model," *Neurobiol. Aging*, vol. 37, no. 4, pp. 1250–1257, 2018.
- [5] J. S. da Costa *et al.*, "Synthesis of tacrine-lophine hybrids via one-pot four component reaction and biological evaluation as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 62, pp. 556–563, 2013.
- [6] S. Das Sharma, P. Hazarika, and D. Konwar, "An efficient and one-pot synthesis of 2,4,5-trisubstituted and 1,2,4,5-tetrasubstituted imidazoles catalyzed by InCl₃·3H₂O," *Tetrahedron Lett.*, vol. 49, no. 14, pp. 2216–2220, 2008.
- [7] J. S. da Costa and M. A. Ceschi, "Síntese de compostos híbridos tacrina-lofina, tacrina-tianeptina e dímeros bis(n)-lofinas com potencial aplicação no tratamento da doença de Alzheimer," Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pp. 49-50, 2014.
- [8] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 7, no. 2, pp. 88–95, Jul. 1961.

CAPÍTULO VII

Experimental

VII EXPERIMENTAL

VII.1 General

VII.1.1 Materiales

Las cromatografías en columna (CC) se realizaron utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck) mientras que las cromatografías tipo flash se llevaron a cabo empleando sílica gel 60 (425-600 mesh, Merck). Para las cromatografías analíticas en capa fina (TLC) se usaron cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ (20 cm x 20 cm, 0.2 mm de espesor, Merck) y de sílica gel 60 RP-18 F_{254s} (20 cm x 20 cm, 0.2 mm de espesor, Merck). En las CC, para muestras solubles en el solvente de elución se preparó una solución concentrada y luego se agregó a la columna. Para muestras no solubles y muestras sólidas, se utilizó la técnica de preadsorción (pastilla): se agregó sílica gel a una solución concentrada de muestra en otro solvente, luego se evaporó el solvente y el polvo resultante se agregó a la columna. Para la detección de compuestos y revelado de cromatofolios se utilizó luz UV (254 nm y 366 nm) y los reactivos reveladores *p*-anisaldehído (5 ml de *p*-anisaldehído, 5 ml de H₂SO₄ concentrado, 1 ml de ácido acético glacial y 90 ml de EtOH) y óleum (4 ml de H₂SO₄ concentrado, 16 ml de H₂O y 80 ml de ácido acético glacial).

Para realizar extracciones y CC se emplearon solventes puros destilados. Para las reacciones en DMF anhidra se utilizó el solvente secado sobre molecular-sieves.

VII.1.2 Equipos

Los espectros de RMN fueron registrados en un espectrómetro Bruker ARX 300 operado a 300 y 75 MHz para los núcleos ¹H y ¹³C respectivamente. Los productos fueron registrados en solventes deuterados tales como cloroformo deuterado (CDCl₃, 99,8% D) (Aldrich), metanol deuterado (MeOD-d₄, 99,8% D) (Aldrich), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆, 99,9% D) (Aldrich), con TMS como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresaron en ppm y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz. En los experimentos de RMN ¹H, la multiplicidad de las señales se indicó por las abreviaturas: (*s*) singulete, (*d*) doblete, (*c*) cuarteto, (*q*) quintuplete y (*m*) multiplete.

Los espectros UV y las mediciones de actividad enzimática se registraron en un espectrofotómetro JASCO V-630BIO, equipado con controlador de temperatura Peltier, trabajando a 25 °C

Los experimentos de fotoirradiación *E-Z* fueron realizados con una lámpara de arco de mercurio de 8 watts con filtro de 360 nm de Pleuger Antwerp Brussels. Los experimentos de irradiación *Z-E* se llevaron a cabo con luz blanca proveniente de un foco de 60 watts. Para realizar las determinaciones espectroscópicas las muestras fueron disueltas en MeOH grado HPLC. En todos los experimentos se utilizaron cubetas de cuarzo con tapa de cierre hermético. Se hicieron barridos espectrales de 200 a 500 nm.

Las reacciones asistidas por microondas se hicieron en un CEM Discover Benchmate programable hasta 300 Watts de potencia

Las reacciones asistidas por microondas fueron llevadas a cabo en un reactor CEM Discover Benchmate programable hasta 300 Watts de potencia. Los recipientes utilizados fueron viales cerrados de 10 ml de capacidad, con agitador magnético. La temperatura del equipo es monitoreada y controlada por un sensor infrarrojo (programable entre 25 y 250 °C).



La evaporación de los solventes de extractos o fracciones de cromatografía se realizó en evaporador rotatorio marca Heidolph modelo Laborota 4000, a presión reducida, conectado a una bomba de vacío por cascada de agua marca Oakton modelo WP-15-1, manteniendo la temperatura del baño de agua entre 30 y 40°C.

Los puntos de fusión (pf) fueron determinados por un equipo de Reichert.

La nomenclatura de los compuestos fue escrita en base al *ChemDraw Ultra 14.0* (ChemBioOffice 2014), con la correspondiente traducción del inglés.

En la **Univerdade do Rio Grande do Sul (UFRGS)**, las reacciones asistidas por microondas se llevaron a cabo utilizando un horno microondas CEM, modelo *MARS6*, utilizando los recipientes *MARSXPress* con una capacidad de 10 ml y el programa de temperatura utilizado consistió en una rampa de calentamiento de 15 minutos para alcanzar 110 ° C, seguido de 1 hora de reacción, con agitación magnética. Los puntos de fusión se determinaron en capilares abiertos de vidrio utilizando un aparato Büchi M-565 y los espectros de IR se registraron en un espectrómetro Varian 640-IR en discos de KBr. Los espectros de RMN fueron registrados con un espectrómetro Bruker Ascend 400 operado a 400 y 100 MHz para los núcleos ^1H y ^{13}C respectivamente. Los productos fueron registrados en cloroformo deuterado (CDCl_3 , 99,8% D) (Aldrich), con TMS como estándar interno. Los datos de espectrometría de masas de alta resolución con ionización *Eletrospray (High Resolution Mass Spectrometry with Eletrospray Ionization - HRMS-ESI)*, en modo positivo, fueron obtenidos en un equipo Micromass Q-ToF de Waters (Manchester, UK). Las muestras se infundieron con una jeringa Hamilton de 100 μl a un rango de velocidad de flujo de 5 a 10 ml/min, dependiendo de la muestra, se usó nitrógeno como gas de desolvatación y metanol (grado HPLC, de Tedia) como disolvente para las muestras analizadas que se filtraron antes de la inyección. La purificación por cromatografía en columna (CC) se realizó en gel sílica 60 Å (70 – 230 mesh, Acros). La cromatografía analítica en capa fina (TLC) se realizó en placas de aluminio con 0,2 mm de gel de sílice 60F-254 (*MachereyNagel*).

VII.2 Obtención de los análogos de aza resveratrol 8a-c – 13a-c

VII.2.1 Procedimiento general para la síntesis de los intermediarios 2-7

A una solución del compuesto 1 (61 mg, 0.5 mmol) y K_2CO_3 anhidro (207 mg, 1.5 mmol) en acetonitrilo (2,5 mL), se agregó el α,ω -dibromoalcano correspondiente (1 mmol). La solución fue colocada en un vial de vidrio cerrado especial para reacción en microondas, con agitador magnético. La síntesis asistida por microondas se llevó a cabo en las siguientes condiciones: modo estándar; rampa de calentamiento de 5 minutos para alcanzar una temperatura de 80 °C; potencia de 150 W; agitación media; *max. power off*. La solución fue irradiada a 80 °C (150W) durante 10 minutos. Luego, fue filtrada y el solvente fue eliminado a presión reducida. Posteriormente se llevó a cabo la purificación mediante Cromatografía en columna flash (200-425 mesh) eluyendo con hexano - AcOEt (85:15)

VII.2.1.1 4-(3-bromopropoxi)benzaldehído (2)

El compuesto 1 fue tratado con 1,3-dibromopropano (102 μL) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **2** como un sólido blanco (40 %). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 9 y Tabla 10.

VII.2.1.2 4-(4-bromobutoxi)benzaldehído (3)

El compuesto 1 fue tratado con 1,4-dibromobutano (118 μL) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **3** como un sólido blanco (45 %). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 9 y Tabla 10.

VII.2.1.3 4-(5-bromopentiloxi)benzaldehído (4)

El compuesto 1 fue tratado con 1,5-dibromopentano (135.1 μL) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **4** como un sólido blanco (50 %). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 9 y Tabla 10.

VII.2.1.4 4-(6-bromohexiloxi)benzaldehído (5)

El compuesto 1 fue tratado con 1,6-dibromohexano (152 μL) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **5** como un sólido blanco (55 %). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 9 y Tabla 10.

VII.2.1.5 4-(7-bromoheptiloxi)benzaldehído (6)

El compuesto 1 fue tratado con 1,7-dibromoheptano (171 μL) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **6** como un sólido blanco (65 %). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 9 y Tabla 10.

VII.2.1.6 4-(8-bromooctiloxi)benzaldehído (7)

El compuesto 1 fue tratado con 1,7-dibromoheptano (184 μL) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **7** como un sólido blanco (35 %). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 9 y Tabla 10.

VII.2.2 Procedimiento general para la síntesis de los intermediarios de *p*-(ω -aminoalcoxi)-benzaldehydos **2a-c** - **7a-c**

A una solución de los compuestos **2-7** (0,1 mmol) en DMF anhidra (1 ml) se agregó la correspondiente amina (0,3 mmol) y se colocó en un tubo de vidrio cerrado especial para reacción en microondas con agitador magnético. La síntesis asistida por microondas se llevó a cabo en las siguientes condiciones: modo estándar; rampa de calentamiento de 5 minutos para alcanzar una temperatura de 100 °C; potencia de 150 W; agitación media; *max. power off*. La solución fue irradiada a 100 °C (150W) durante 5-40 minutos hasta verificar por TLC la desaparición del compuesto de partida. Se eliminó el solvente agregando H₂O destilada (4 ml) y se retomó el compuesto deseado con AcOEt (3x2ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, posteriormente se filtró y se eliminó el AcOEt a presión reducida.

VII.2.2.1 4-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)benzaldehido (**2a**)

El intermediario bromado **2** (24,3 mg) se hizo reaccionar con pirrolidina (24,6 μ l) a 130 °C durante 5 minutos en microondas con una potencia de 150 watts siguiendo el protocolo general para dar el compuesto **2a** como un aceite amarillo (85%). **RMN de ¹H y ¹³C**: Tabla 11 y Tabla 12.

VII.2.2.2 4-(4-(pirrolidin-1-il)butoxi)benzaldehido (**3a**)

El intermediario bromado **3** (19,4 mg) se hizo reaccionar con pirrolidina (18,7 μ l) a 100 °C durante 5 minutos en microondas con una potencia de 150 watts siguiendo el protocolo general para dar el compuesto **3a** como un aceite amarillo (90%). **RMN de ¹H y ¹³C**: Tabla 11 y Tabla 12.

VII.2.2.3 4-(5-(pirrolidin-1-il)pentiloxi)benzaldehido (**4a**)

El intermediario bromado **4** (10,9 mg) se hizo reaccionar con pirrolidina (9,8 μ l) a 80 °C durante 5 minutos en microondas con una potencia de 150 watts siguiendo el procedimiento general, para dar el compuesto **4a** como un aceite amarillo (95%). **RMN de ¹H y ¹³C**: Tabla 11 y Tabla 12.

VII.2.2.4 4-(6-(pirrolidin-1-il)hexiloxi)benzaldehido (**5a**)

El intermediario bromado **5** (14,3 mg) se hizo reaccionar con pirrolidina (12 μ l) a 80 °C durante 5 minutos en microondas con una potencia de 150 watts siguiendo el procedimiento

general, para dar el compuesto **5a** como un aceite amarillo (95%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 11 y Tabla 12.

VII.2.2.5 4-(7-(pirrolidin-1-il)heptiloxi)benzaldehido (**6a**)

El intermediario bromado **6** (15 mg) se hizo reaccionar con pirrolidina (12,5 μl) a 80 °C durante 8 minutos en microondas con una potencia de 150 watts siguiendo el procedimiento general, para dar el compuesto **6a** como un aceite amarillo (95%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 11 y Tabla 12.

VII.2.2.6 4-(8-(pirrolidin-1-il)octiloxi)benzaldehido (**7a**)

El intermediario bromado **7** (47 mg) se hizo reaccionar con pirrolidina (37 μl) a 80 °C durante 8 minutos en microondas con una potencia de 150 watts siguiendo el procedimiento general, para dar el compuesto **7a** como un aceite amarillo (93,5%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 11 y Tabla 12.

VII.2.2.7 4-(3-(piperidin-1-il)propoxi)benzaldehido (**2b**)

El intermediario bromado **2** se hizo reaccionar con piperidina (29,6 μl) a 130 °C durante 10 minutos en microondas con una potencia de 150 watts, el residuo oleoso se retomó con H_2O destilada (5 ml) y se extrajo el producto deseado con AcOEt (3x2ml) para dar el compuesto **2b** como un aceite amarillo (87%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 13 y Tabla 14.

VII.2.2.8 4-(4-(piperidin-1-il)butoxi)benzaldehido (**3b**)

El intermediario bromado **2** se hizo reaccionar con piperidina (15 μl) a 80 °C durante 10 minutos en microondas con una potencia de 150 watts, el residuo oleoso se retomó con H_2O destilada (5 ml) y se extrajo el producto deseado con AcOEt (3x2ml) para dar el compuesto **3b** como un aceite amarillo (84%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 13 y Tabla 14.

VII.2.2.9 4-(5-(piperidin-1-il)pentiloxi)benzaldehido (**4b**)

El compuesto **4** (13 mg) se hizo reaccionar con piperidina (14,8 μl) a 80 °C durante 5 minutos en microondas con una potencia de 150 watts, el residuo oleoso se retomó con H_2O destilada (5 ml) y se extrajo el producto deseado con AcOEt (3x2ml) para dar el compuesto **4b** como un aceite amarillo (86%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 13 y Tabla 14.

VII.2.2.10 4-(6-(piperidin-1-il)hexiloxi)benzaldehido (5b)

El compuesto **5** se hizo reaccionar con piperidina (15 μ l) a 80 °C durante 10 minutos en microondas con una potencia de 150 watts, el residuo oleoso se retomó con H₂O destilada (5 ml) y se extrajo el producto deseado con AcOEt (3x2ml) para dar el compuesto **5b** como un aceite amarillo (92%). **RMN de ¹H y ¹³C**: Tabla 13 y Tabla 14.

VII.2.2.11 4-(7-(piperidin-1-il)heptiloxi)benzaldehido (6b)

El compuesto **6** (15 mg) se hizo reaccionar con piperidina (14,8 μ l) a 80 °C durante 10 minutos en microondas con una potencia de 150 watts, el residuo oleoso se retomó con H₂O destilada (3 ml) y se extrajo el producto deseado con AcOEt (3x4ml) para dar el compuesto **6b** como un aceite amarillo (96%). **RMN de ¹H y ¹³C**: Tabla 13 y Tabla 14.

VII.2.2.12 4-(8-(piperidin-1-il)octiloxi)benzaldehido (7b)

El compuesto **7** se hizo reaccionar con piperidina (11,8 μ l) a 80 °C durante 11 minutos en microondas con una potencia de 150 watts, el residuo oleoso se retomó con H₂O destilada (3 ml) y se extrajo el producto deseado con AcOEt (3x4ml) para dar el compuesto **7b** como un aceite amarillo (97%). **RMN de ¹H y ¹³C**: Tabla 13 y Tabla 14.

VII.2.2.13 4-(3-(dietilamino)propoxi)benzaldehido (2c)

El compuesto **2** (24,3 mg) fue tratado con dietilamina (31 μ L) a 100 °C durante 30 minutos en microondas con una potencia de 150 watts, el residuo oleoso se retomó con H₂O destilada (3 ml) y se extrajo el producto deseado con AcOEt (3x4ml) para dar el compuesto **2c** como un aceite amarillo (96,5 %). **RMN de ¹H y ¹³C**: Tabla 15 y Tabla 16.

VII.2.2.14 4-(4-(dietilamino)butoxi)benzaldehido (3c)

El compuesto **3** (16 mg) fue tratado con dietilamina (19.3 μ L) a 80 °C durante 40 minutos en microondas con una potencia de 150 watts, el residuo oleoso se retomó con H₂O destilada (3 ml) y se extrajo el producto deseado con AcOEt (3x4ml) para dar el compuesto **3c** como un aceite amarillo (98%). **RMN de ¹H y ¹³C**: Tabla 15 y Tabla 16.

VII.2.2.15 4-(5-(dietilamino)pentiloxi)benzaldehido (4c)

El compuesto **4** (10,8 mg) fue tratado con dietilamina (12.4 μ L) a 80 °C durante 25 minutos en microondas con una potencia de 150 watts, el residuo oleoso se retomó con H₂O

destilada (3 ml) y se extrajo el producto deseado con AcOEt (3x4ml) para dar el compuesto **4c** como un aceite amarillo (98%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 15 y Tabla 16.

VII.2.2.16 4-(6-(dietilamino)hexiloxi)benzaldehido (5c)

El compuesto **5** (16,2 mg) fue tratado con dietilamina (17.6 μL) a 80 °C durante 40 minutos en microondas con una potencia de 150 watts, el residuo oleoso se retomó con H_2O destilada (3 ml) y se extrajo el producto deseado con AcOEt (3x4ml) para dar el compuesto **5c** como un aceite amarillo (98%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 15 y Tabla 16.

VII.2.2.17 4-(7-(dietilamino)heptiloxi)benzaldehido (6c)

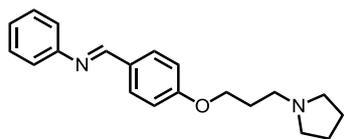
El compuesto **6** (44,9 mg) fue tratado con dietilamina (46 μL) a 80 °C durante 40 minutos en microondas con una potencia de 150 watts, el residuo oleoso se retomó con H_2O destilada (3 ml) y se extrajo el producto deseado con AcOEt (3x4ml) para dar el compuesto **6c** como un aceite amarillo (98%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 15 y Tabla 16.

VII.2.2.18 4-(7-(dietilamino)heptiloxi)benzaldehido (7c)

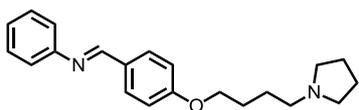
El compuesto **7** (31,3 mg) fue tratado con dietilamina (31 μL) a 80 °C durante 40 minutos en microondas con una potencia de 150 watts, el residuo oleoso se retomó con H_2O destilada (3 ml) y se extrajo el producto deseado con AcOEt (3x4ml) para dar el compuesto **7c** como un aceite amarillo (74%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 15 y Tabla 16.

VII.2.3 Procedimiento general para la síntesis de los derivados azaestilbeno **8a-c** – **13a-c**

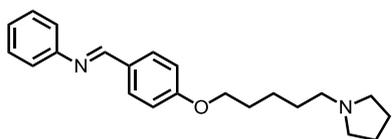
A una solución de los compuestos **2a-c -7a-c** (0,1 mmol) en etanol (1 ml) se agregó una cantidad equimolar de anilina (0,1 mmol) y se colocó en un tubo de vidrio cerrado especial para reacción en microondas con agitador magnético. La síntesis asistida por microondas se llevó a cabo en las siguientes condiciones: modo estándar; rampa de calentamiento de 5 minutos para alcanzar una temperatura de 100 °C; potencia de 150 W; agitación media; *max. power off*. La solución fue irradiada a 100 °C con una potencia de 150 W durante ciclos de 30 a 40 minutos hasta verificar por RMN de ^1H la desaparición de la señal singulete a δ 9.88 característica del compuesto de partida.

VII.2.3.1 (E)-4-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)azaestilbeno (8a)

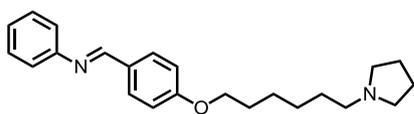
El intermediario **2a** se hizo reaccionar con anilina (9,5 μ l) siguiendo el procedimiento general (40 min, 90°C, 150 W), para dar el compuesto **8a** como un aceite marrón (95%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 17 y Tabla 18. Análisis calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$: C 77.89; H 7.84; N 9.08. Found: C 77.84; H 7.82; N 9.05.

VII.2.3.2 (E)-4-(4-(pirrolidin-1-il)butoxi)azaestilbeno (9a)

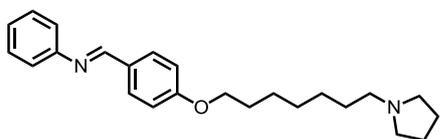
El intermediario bromado **3a** (17.4 mg) se hizo reaccionar con anilina (7 μ l) siguiendo el procedimiento general (40 min, 90°C, 150 W), para dar el compuesto **9a** como un aceite marrón (87%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 17 y Tabla 18. Análisis calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$: C 78.22; H 8.13; N 8.69. Encontrado: C 78.15; H 8.11; N 8.70.

VII.2.3.3 (E)-4-(5-(pirrolidin-1-il)pentiloxi)azaestilbeno (10a)

El intermediario bromado **4a** (10 mg) se hizo reaccionar con anilina (4 μ l) siguiendo el procedimiento general (dos ciclos de 30 min, 90°C, 150 W), para dar el compuesto **10a** como un aceite marrón (94%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 17 y Tabla 18. Análisis calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$: C 78.53; H 8.39; N 8.33. Encontrado: C 78.48; H 8.37; N 8.35.

VII.2.3.4 (E)-4-(6-(pirrolidin-1-il)hexiloxi)azaestilbeno (11a)

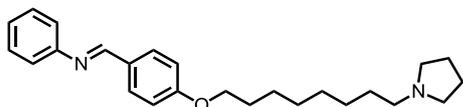
El intermediario bromado **5a** (13,3) se hizo reaccionar con anilina (5 μ l) siguiendo el procedimiento general (tres ciclos de 30 min, 90°C, 150 W), para dar el compuesto **11a** como un aceite marrón (92%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tablas 17 y 18. Análisis calculado por $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$: C 78.82; H 8.63; N 7.99. Encontrado: C 78.75; H 8.62; N 8.01.

VII.2.3.5 (E)-4-(7-(pirrolidin-1-il)heptiloxi)azaestilbeno (12a)

El intermediario bromado **6a** (14,3) se hizo reaccionar con anilina (5 μ l) siguiendo el procedimiento general (tres ciclos de 40 min, 90°C, 150 W), para dar el

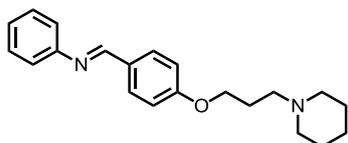
compuesto **12a** como un aceite marrón (95%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 17 y Tabla 18. Análisis calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}$: C 79.08; H 8.85; N 7.68. Encontrado: C 78.99; H 8.84; N 7.67.

VII.2.3.6 (E)-4-(8-(pirrolidin-1-il)octiloxi)azaestilbeno (13a)



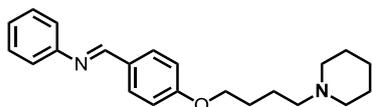
El intermediario bromado **7a** (18 mg) se hizo reaccionar con anilina (6 μl) siguiendo el procedimiento general (tres ciclos de 40 min, 90°C, 150 W), para dar el compuesto **13a** como un aceite marrón (95%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 17 y Tabla 18. Análisis calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}$: C 79.32; H 9.05; N 7.40. Encontrado: C 79.30; H 9.02; N 7.41.

VII.2.3.7 (E)-4-(3-(piperidin-1-il)propoxi)azaestilbeno (8b)



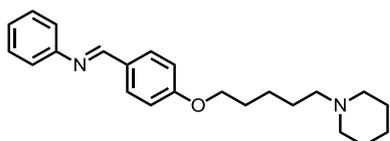
El intermediario bromado **2b** (15,5 mg) se hizo reaccionar con anilina (9,5 μl) siguiendo el procedimiento general (dos ciclos de 30 min, 90°C, 150 W), para dar el compuesto **18b** como un aceite marrón (94%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 19 y Tabla 20. Análisis calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$: C 78.22; H 8.13; N 8.69. Encontrado: C 78.19; H 8.12; N 8.70.

VII.2.3.8 (E)-4-(4-(piperidin-1-il)butoxi)azaestilbeno (9b)



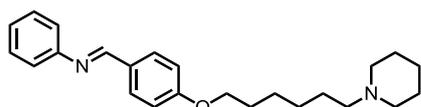
El intermediario bromado **3b** (13 mg) se hizo reaccionar con anilina (5 μl) siguiendo el procedimiento general (dos ciclos de 30 min, 90°C, 150 W), para dar el compuesto **9b** como un aceite marrón (95%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 19 y Tabla 20. Análisis calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$: C 78.53; H 8.39; N 8.32. Encontrado: C 78.50; H 8.37; N 8.31.

VII.2.3.9 (E)-4-(5-(piperidin-1-il)pentoxi)azaestilbeno (10b)



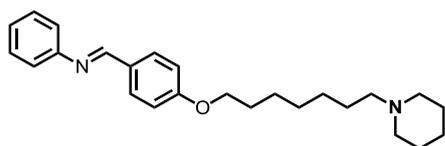
El compuesto **4b** (14 mg) se hizo reaccionar con anilina (5 μl) siguiendo el procedimiento general (dos ciclos de 40 min, 90 °C, 150 W), para dar el compuesto **10b** como un aceite marrón (93%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 19 y Tabla 20. Análisis calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$: C 78.82; H 8.63; N 7.99. Encontrado: C 78.80; H 8.62; N 7.98.

VII.2.3.10 (E)-4-(6-(piperidin-1-il)hexyloxi)azaestilbeno (11b)



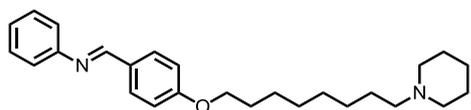
El compuesto **5b** (14,5 mg) se hizo reaccionar con anilina (5,5 μ l) siguiendo el procedimiento general (dos ciclos de 40 min, 90 °C, 150 W), para dar el compuesto **11b** como un aceite marrón (94%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 19 y Tabla 20. Análisis calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}$: C 79.08; H 8.85; N 7.68. Encontrado: C 79.05; H 8.84; N 7.67.

VII.2.3.11 (E)-4-(7-(piperidin-1-il)heptyloxi)azaestilbeno (12b)



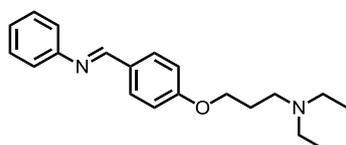
El compuesto **6b** (15 mg) se hizo reaccionar con anilina (9 μ l) siguiendo el procedimiento general (dos ciclos de 40 min, 90 °C, 150 W), para dar el compuesto **12b** como un aceite marrón (84%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 19 y Tabla 20. Análisis calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}$: C 79.32; H 9.05; N 7.40. Encontrado: C 79.36; H 8.96; N 7.43.

VII.2.3.12 (E)-4-(8-(piperidin-1-il)octyloxi)azaestilbeno (13b)



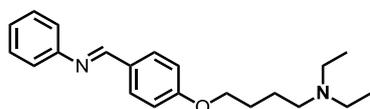
El compuesto **7b** (12 mg) se hizo reaccionar con anilina (4.4 μ l) siguiendo el procedimiento general (tres ciclos de 40 min, 90 °C, 150 W), para dar el compuesto **13b** como un aceite marrón (82%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 19 y Tabla 20. Análisis calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}$: C 79.55; H 9.24; N 7.14. Calculado: C 79.53; H 9.20; N 7.17.

VII.2.3.13 (E)-4-(3-(dietilamino)propoxi)azaestilbeno (8c)



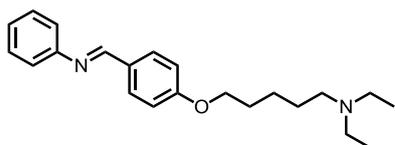
El compuesto **2c** (12.6 mg) fue tratado con anilina (5 μ l) siguiendo el procedimiento general (30 min, 100 °C, 150 W), para dar el compuesto **8c** como un aceite marrón (96%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 21 y Tabla 22. Análisis calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$: C 77.38; H 8.44; N 9.02. Encontrado: C 77.34; H 8.42; N 9.01.

VII.2.3.14 (E)-4-(4-(dietilamino)butoxi)azaestilbeno (9c)



El compuesto **3c** (12,5 mg) fue tratado con anilina (6 μ l) siguiendo el procedimiento general (40 min, 100°C, 150 W), para dar el compuesto **9c** como un aceite marrón (94%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 21 y Tabla 22. Análisis calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$: C 77.74; H 8.70; N 8.63. Encontrado: C 77.720; H 8.69; N 8.61.

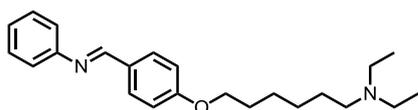
VII.2.3.15 (E)-4-(5-(dietilamino)pentoxi)azaestilbeno (10c)



El compuesto **4c** (10,5 mg) fue tratado con anilina (4 μ L) siguiendo el procedimiento general (dos ciclos de 40 min, 100°C, 150 W), para dar el compuesto **10c** como un aceite marrón (95%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 21 y Tabla 22.

Análisis calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$: C 78.06; H 8.93; N 8.28. Encontrado: C 78.03; H 8.92; N 8.29.

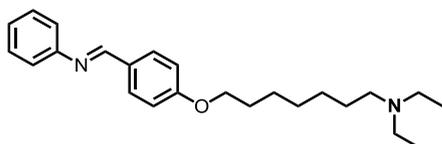
VII.2.3.16 (E)-4-(6-(dietilamino)hexiloxi)azaestilbeno (11c)



El compuesto **5c** (13,8 mg) fue tratado con anilina (4,5 μ L) siguiendo el procedimiento general (dos ciclos de 40 min, 100°C, 150 W), para dar el compuesto **11c** como un

aceite marrón (91%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 21 y Tabla 22. Análisis calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}$: C 78.36; H 9.15; N 7.95. Encontrado: C 78.35; H 9.13; N 7.95.

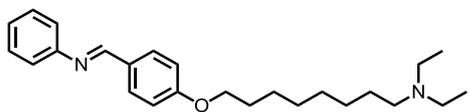
VII.2.3.17 (E)-4-(7-(dietilamino)heptiloxi)azaestilbeno (12c)



El compuesto **6c** (21.1 mg) fue tratado con anilina (9.6 μ L) siguiendo el procedimiento general (tres ciclos de 30 min, 90°C, 150 W), para dar el compuesto **12c** como

un aceite marrón (91%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 21 y Tabla 22. Análisis calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}$: C 78.64; H 9.35; N 7.64. Encontrado: C 78.60; H 9.33; N 7.63.

VII.2.3.18 (E)-4-(8-(dietilamino)octiloxi)azaestilbeno (13c)



El compuesto **7c** (25.5 mg) fue tratado con anilina (10 μ L) siguiendo el procedimiento general (tres ciclos de 40 min, 90°C, 150 W), para dar el compuesto **13c**

como un aceite marrón (80%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 21 y Tabla 22. Análisis calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}$: C 78.90; H 9.54; N 7.36. Encontrado: C 78.85; H 9.53; N 7.35.

VII.3 Procedimiento para la síntesis del derivado 14'b

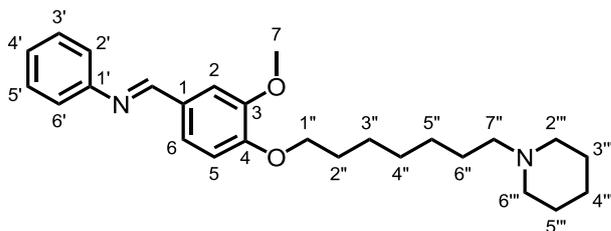
VII.3.1 Procedimiento para obtener el intermediario 6'

Una solución del compuesto 1' (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) (76 mg, 0.5 mmol) y K_2CO_3 anhidro (207 mg, 1.5 mmol) en acetonitrilo (1 mL), fue tratado con 1,7-dibromoheptano (171 μ L, 1 mmol). La solución fue colocada en un tubo de vidrio cerrado especial para reacción en microondas y fue irradiada a 150 W por 10 minutos a una temperatura de 80 °C. Luego, fue filtrada la solución y el solvente fue eliminado a presión reducida. Posteriormente se llevó a cabo la purificación mediante Cromatografía en columna flash (200-425 mesh) eluyendo con hexano - AcOEt (70:30) para dar el compuesto 6' como un sólido blanco (34 %). **RMN de 1H** (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 9.85 (s, 1H), 7.48 – 7.38 (m, 2H), 6.97 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.10 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.42 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.97 – 1.81 (m, 4H), 1.59 – 1.35 (m, 6H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 191.04, 154.25, 149.97, 130.04, 126.92, 111.50, 109.39, 77.16, 69.16, 56.18, 34.00, 32.80, 28.95, 28.61, 28.16, 25.90.

VII.3.2 Procedimiento para obtener el intermediario 6'b

A una solución del compuesto 6' (0,2 mmol, 66 mg) en DMF anhidra (1 ml) se agregó piperidina (0,6 mmol, 60 μ l) y se colocó en un tubo de vidrio cerrado especial para reacción en microondas. La solución fue irradiada a 100 °C con una potencia de 150 W durante 5 minutos, tiempo al cual se verificó por TLC la desaparición del compuesto de partida. Se eliminó el solvente por arrastre con H_2O destilada (4 ml) y se retomó el compuesto deseado con AcOEt (3x2ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, posteriormente se filtró y se eliminó el AcOEt a presión reducida para dar el compuesto 6'b como un aceite amarillo (96%). **RMN de 1H** (300 MHz, $CDCl_3$, ppm); δ 9.84 (s, 1H), 7.48 – 7.38 (m, 2H), 6.96 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.09 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 2.38 (sa, 4H), 2.33 – 2.23 (m, 2H), 1.88 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.60 (p, $J = 5.5$ Hz, 4H), 1.58 – 1.28 (m, 10H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 190.89, 154.18, 149.83, 129.86, 126.81, 111.37, 109.23, 69.12, 59.55, 56.03, 54.64, 29.29, 28.88, 27.62, 26.80, 25.91, 25.84, 24.46.

VII.3.3 Procedimiento para obtener el intermediario 14'b



A una solución del compuesto **6'b** (22,3 mg, 0,07 mmol) en etanol (1 ml) se agregó una cantidad equimolar de anilina (6,4 μ l, 0,07 mmol) y se colocó en un tubo de vidrio cerrado especial para reacción en microondas. La solución fue

irradiada a 90 °C con una potencia de 200 W durante tres ciclos de 20 minutos hasta verificar por RMN de ^1H la desaparición de la señal singulete a δ 9.88 característica del compuesto de partida. Se obtuvo el compuesto **14'b** como un aceite marrón (82%). **RMN de ^1H** (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.35 (s, 1H, CNH), 7.60 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-2), 7.38 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.30 – 7.26 (m, 1H, H-6), 7.23 – 7.15 (m, $J = 7.4$ Hz, 3H, H-2', H-6', H-4'), 6.91 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-5), 4.06 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-1''), 3.96 (s, 3H, H-7), 2.40 (s, 4H, H-2''', H-6'''), 2.35 – 2.27 (m, 2H, H-7''), 1.86 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-2''), 1.61 (q, $J = 5.5$ Hz, 4H, H-3''', H-5'''), 1.53 – 1.31 (os, 10H, H-3'', H-4'', H-5'', H-6'', H-4'''). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 160.02 (CNH), 152.39 (C-4), 151.71 (C-1'), 149.81 (C-3), 129.40 (C-1), 129.16 (C-3', C-5'), 125.60 (C-4'), 124.42 (C-6), 120.93 (C-2', C-6'), 111.80 (C-5), 109.34 (C-2), 69.02 (C-1''), 59.55 (C-7''), 56.13 (C-7), 54.64 (C-2''', C-6'''), 29.37 (C-3''), 29.05 (C-2''), 27.67 (C-4''), 26.74 (C-6''), 25.93 (C-5''), 25.85 (C-3''', C-5'''), 24.44 (C-4''').

VII.4 Obtención de los derivados 15 - 22

VII.4.1 Procedimiento general para la síntesis de los derivados de azobenceno alquilbromados 15-22

VII.4.1.1 Intermediarios alquilbromados 15-18

En un vial de vidrio de reacción de microondas se colocó 0,5 mmol de 4-fenilazofenol (0,099 g) disuelto en 2 mL de acetonitrilo, se agregó 1,5 mmol de K_2CO_3 y luego 1 mmol de α,ω -dibromoalcano. El tubo cerrado y con agitador magnético fue colocado en el equipo de microondas por 10 minutos a 150W y 80°C (modo estándar; rampa de calentamiento de 5 minutos para alcanzar la temperatura de trabajo; agitación media; *max. power off*). La obtención del producto fue confirmado por TLC. La solución fue filtrada en caliente para eliminar el K_2CO_3 . La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía en columna utilizando

sílica gel 60 (70-230 mesh) como fase estacionaria y eluyendo con mezclas hexano – AcOEt (85:15).

VII.4.1.1.1 (E)-1-(4-(4-bromobutoxi)fenil)-2-fenildiazeno (15)

0,099 g de 4-fenilazofenol fueron tratados con 1,4-dibromobutano (118 μL) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **15** como un sólido naranja (40 %). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 24 y Tabla 25.

VII.4.1.1.2 (E)-1-(4-((6-bromohexil)oxi)fenil)-2-fenildiazeno (16)

0,099 g de 4-fenilazofenol fueron tratados con 1,6-dibromohexano (152 μL) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **16** como un sólido naranja (64 %). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 24 y Tabla 25.

VII.4.1.1.3 (E)-1-(4-((7-bromoheptil)oxi)fenil)-2-fenildiazeno (17)

0,099 g de 4-fenilazofenol fueron tratados con 1,7-dibromoheptano (171 μL) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **17** como un sólido naranja (31 %). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 24 y Tabla 25.

VII.4.1.1.4 (E)-1-(4-((8-bromooctil)oxi)fenil)-2-fenildiazeno (18)

0,099 g de 4-fenilazofenol fueron tratados con 1,8-dibromooctano (184 μL) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **18** como un sólido naranja (36 %). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 24 y Tabla 25.

VII.4.1.2 Intermediarios alquilbromados 19-22

En un vial de vidrio de reacción de microondas se colocó 0,1 mmol de 4,4'-dihidroxiazobenceno (0,0214 g) disuelto en 4 mL de acetonitrilo, se agregaron 0,35 mmol de K_2CO_3 y luego 0,4 mmol de α,ω -dibromoalcano. El tubo cerrado y con agitador magnético fue colocado en el equipo de microondas a 150W, 80°C por 20 minutos (modo estándar; rampa de calentamiento de 5 minutos para alcanzar la temperatura de trabajo; agitación media; *max. power off*). La obtención del producto fue confirmado por TLC. La solución fue filtrada en caliente para eliminar el K_2CO_3 . La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh) como fase estacionaria y eluyendo con mezclas hexano – AcOEt (85:15).

VII.4.1.2.1 (E)-1,2-bis(4-(3-bromopropoxi)fenil)diazeno (19)

0,0214 g de 4,4'-dihidroxiazobenceno fueron tratados con 1,3-dibromopropano (41 μ L) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **19** como un sólido amarillo (55 %).

RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 30 y Tabla 31.

VII.4.1.2.2 (E)-1,2-bis(4-(4-bromobutoxi)fenil)diazeno (20)

0,0214 g de 4,4'-dihidroxiazobenceno fueron tratados con 1,4-dibromobutano (47 μ L) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **20** como un sólido amarillo (65 %).

RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 30 y Tabla 31.

VII.4.1.2.3 (E)-1,2-bis(4-((5-bromopentil)oxi)fenil)diazeno (21)

0,0214 g de 4,4'-dihidroxiazobenceno fueron tratados con 1,5-dibromopentano (54 μ L) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **21** como un sólido amarillo (45 %).

RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 30 y Tabla 31.

VII.4.1.2.4 (E)-1,2-bis(4-((6-bromohexil)oxi)fenil)diazeno (22)

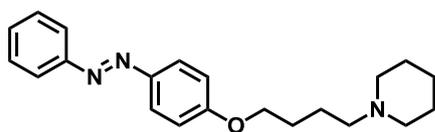
0,0214 g de 4,4'-dihidroxiazobenceno fueron tratados con 1,6-dibromohexano (61 μ L) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **22** como un sólido amarillo (40 %).

RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 30 y Tabla 31.

VII.4.2 Procedimiento general para la síntesis de los derivados 15b – 18b, 17a, 17c.

A una solución de los compuestos 15-18 (0,1 mmol) en DMF anhidra (1 ml) se agregó la correspondiente amina (0,3 mmol) y se colocó en un vial de vidrio cerrado especial para reacción en microondas. La solución fue irradiada a 100 °C con una potencia de 150 W durante 8-10 minutos (modo estándar; rampa de calentamiento de 5 minutos para alcanzar la temperatura de trabajo; agitación media; *max. power off*) hasta verificar por TLC la desaparición del compuesto de partida. Se eliminó el solvente agregando H₂O destilada (5 ml) y se retomó el compuesto deseado con AcOEt (3x2ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, posteriormente se filtró y se eliminó el AcOEt a presión reducida.

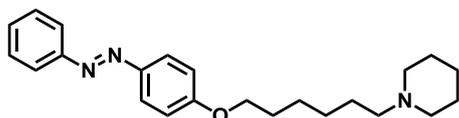
VII.4.2.1 (E)-1-(4-(4-(fenildiazenil)fenoxi)butil)piperidina (15b)



El intermediario bromado **15** (0,033 g) se hizo reaccionar con piperidina (30 μ l) a 80 °C durante 10 minutos en microondas con una potencia de 150 watts.

Siguiendo el procedimiento general, se obtuvo el compuesto **15b** como un sólido naranja (95%); pf: 60-61 °C. **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 26 y Tabla 27.

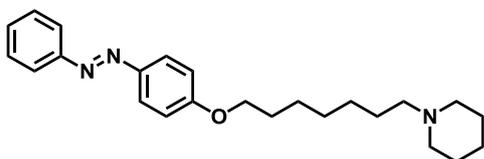
VII.4.2.2 (E)-1-(6-(4-(fenildiazenil)fenoxi)hexil)piperidina (16b)



El intermediario bromado **16** (0,036 g) se hizo reaccionar con piperidina (30 μ l) a 80 °C durante 10 minutos en microondas con una potencia de 150

watts. Siguiendo el procedimiento general, se obtuvo el compuesto **16b** como un sólido amarillo (99%); pf: 82-83 °C. **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 26 y Tabla 27.

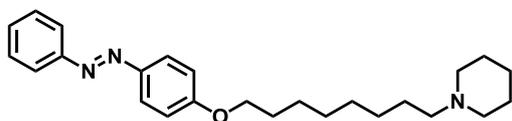
VII.4.2.3 (E)-1-(7-(4-(fenildiazenil)fenoxi)heptil)piperidina (17b)



El intermediario bromado **17** (0,0375 g) se hizo reaccionar con piperidina (30 μ l) a 80 °C durante 10 minutos en microondas con una potencia de 150 watts. Siguiendo el procedimiento general, se

obtuvo el compuesto **17b** como un sólido amarillo (99%); pf: 74-76 °C. **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 26 y Tabla 27.

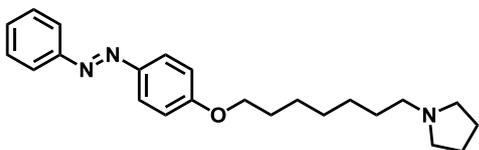
VII.4.2.4 (E)-1-(8-(4-(fenildiazenil)fenoxi)octil)piperidina (18b)



El intermediario bromado **18** (0,05 mmol, 0,0195 g) se hizo reaccionar con piperidina (15 μ l) a 80 °C durante 10 minutos en microondas con una

potencia de 150 watts. Siguiendo el procedimiento general, se obtuvo el compuesto **18b** como un sólido naranja (87%); pf: 55-56 °C. **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 26 y Tabla 27.

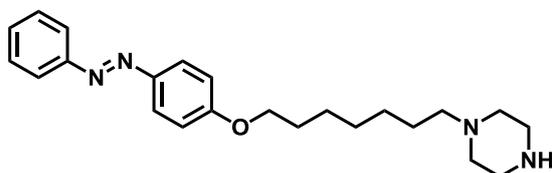
VII.4.2.5 (E)-1-(7-(4-(fenildiazenil)fenoxi)heptil)pirrolidina (17a)



El intermediario bromado **17** (0,046 mmol, 0,0171 g) se hizo reaccionar con pirrolidina (11,5 μ l) a 80 °C durante 10 minutos en microondas con una potencia de 150 watts. Siguiendo el procedimiento

general, se obtuvo el compuesto **17a** como un sólido amarillo (90%); pf: 79-80 °C. RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 28.

VII.4.2.6 (E)-1-(7-(4-(fenildiazenil)fenoxi)heptil)piperidina (17c)

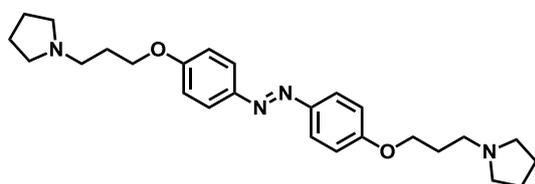


El intermediario bromado **17** (0,0375 g) se hizo reaccionar con piperazina (0,026 g) a 80 °C durante 10 minutos en microondas con una potencia de 150 watts. Siguiendo el procedimiento general, se obtuvo el compuesto **17b** como un sólido amarillo (92%); pf: 78-79 °C. RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 29.

VII.4.3 Procedimiento general para la síntesis de los derivados 19a-b – 22a-b.

A una solución de los compuestos 19-22 (0,1 mmol) en DMF anhidra (4 ml) se agregó 0,5 mmol de K_2CO_3 , la correspondiente amina (0,4 mmol) y se colocó en un tubo de vidrio cerrado especial para reacción en microondas con agitador magnético. La solución fue irradiada a 80 °C con una potencia de 150 W durante 20 minutos (modo estándar; rampa de calentamiento de 5 minutos para alcanzar la temperatura de trabajo; agitación media; *max. power off*) hasta verificar por TLC la desaparición del compuesto de partida. Se eliminó el solvente bajo presión reducida utilizando SpeedVac (SPD111V, Thermo Savant) dando lugar al producto deseado sin más purificación.

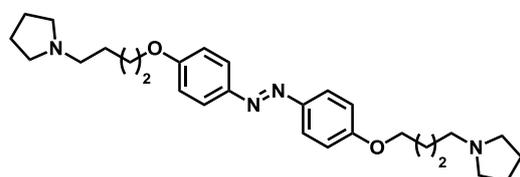
VII.4.3.1 (E)-1,2-bis(4-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)fenil)diazeno (19a)



El intermediario bromado **19** (0,0456 g) se hizo reaccionar con pirrolidina (32 μl) siguiendo el procedimiento general, para dar el compuesto **19a** como un sólido amarillo (99%); pf: 95-96 °C.

RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 32 y Tabla 33.

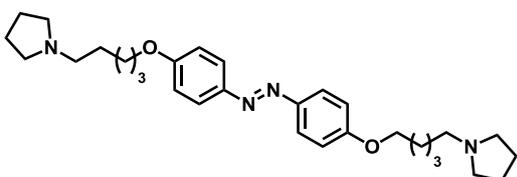
VII.4.3.2 (E)-1,2-bis(4-(4-(pirrolidin-1-il)butoxi)fenil)diazeno (20a)



El intermediario bromado **20** (0,0484 g) se hizo reaccionar con pirrolidina (32 μl) siguiendo el procedimiento general, para dar el compuesto

20a como un sólido amarillo (99%); pf: 89-90 °C. RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 32 y Tabla 33.

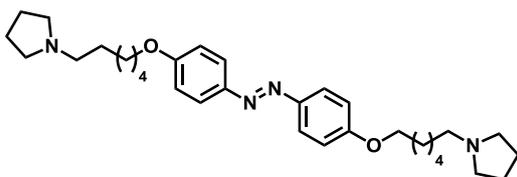
VII.4.3.3 (E)-1,2-bis(4-((5-(pirrolidin-1-il)pentil)oxi)fenil)diazeno (21a)



El intermediario bromado **21** (0,0512 g) se hizo reaccionar con pirrolidina (32 μl) siguiendo el procedimiento general, para dar el compuesto **21a** como un sólido amarillo (95%); pf: 99-100 °C.

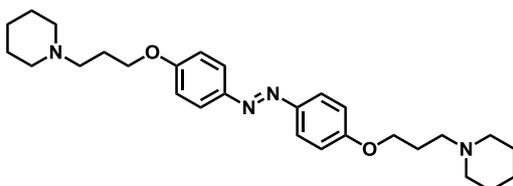
RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 32 y Tabla 33.

VII.4.3.4 (E)-1,2-bis(4-((6-(pirrolidin-1-il)hexil)oxi)fenil)diazeno (22a)



El intermediario bromado **22** (0,054 g) se hizo reaccionar con pirrolidina (32 μl) siguiendo el procedimiento general, para dar el compuesto **22a** como un sólido amarillo (97%); pf: 100-101 °C. RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 32 y Tabla 33.

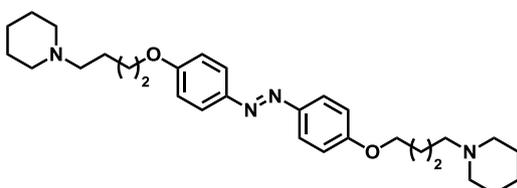
VII.4.3.5 (E)-1,2-bis(4-(3-(piperidin-1-il)propoxi)fenil)diazeno (19b)



El intermediario bromado **19** (0,0456 g) se hizo reaccionar con piperidina (40 μl) siguiendo el procedimiento general, para dar el compuesto **19b** como un sólido amarillo (99%); pf: 95-96 °C.

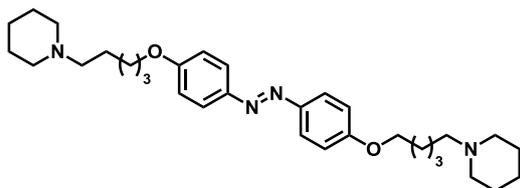
RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 34 y Tabla 35.

VII.4.3.6 (E)-1,2-bis(4-(4-(piperidin-1-il)butoxi)fenil)diazeno (20b)



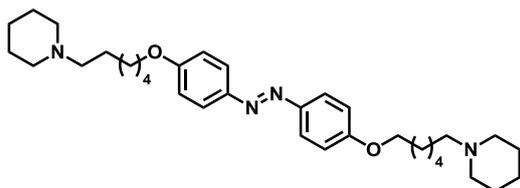
El intermediario bromado **20** (0,0484 g) se hizo reaccionar con piperidina (40 μl) siguiendo el procedimiento general, para dar el compuesto **20b** como un sólido amarillo (98%); pf: 86-87 °C.

RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 34 y Tabla 35..

VII.4.3.7 (E)-1,2-bis(4-((5-(piperidin-1-il)pentil)oxi)fenil)diazeno (21b)

El intermediario bromado **21** (0,0512 g) se hizo reaccionar con piperidina (40 μ l) siguiendo el procedimiento general, para dar el compuesto **21b** como un sólido amarillo (95%); 104-106 °C.

RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 34 y Tabla 35.

VII.4.3.8 (E)-1,2-bis(4-((6-(piperidin-1-il)hexil)oxi)fenil)diazeno (22b)

El intermediario bromado **22** (0,054 g) se hizo reaccionar con piperidina (40 μ l) siguiendo el procedimiento general, para dar el compuesto **22b** como un sólido amarillo (99%); 100-102 °C.

RMN de ^1H y ^{13}C : Tabla 34 y Tabla 35.

VII.5 Obtención de los derivados 23-27**VII.5.1 Procedimiento general para la síntesis de los derivados de teofilina alquilbromados 23-27**

En un vial de vidrio de reacción de microondas se colocó 1 mmol de teofilina (0,1802g) disuelto en 1 mL de dimetilformamida (DMF) seca, se agregaron 3 mmol de K_2CO_3 y luego 2 mmol de α,ω -dibromoalcano. El tubo cerrado y con agitador magnético fue colocado en el equipo de microondas por 10 minutos, calentando a 80°C con una potencia de 150W (modo estándar; rampa de calentamiento de 5 minutos para alcanzar la temperatura de trabajo; agitación media; *max. power off*). La obtención del producto fue confirmado por TLC. La solución fue filtrada en caliente para eliminar el K_2CO_3 . El solvente fue arrastrado con agua (3 ml) y el bruto de reacción extraído con AcOEt (3x2 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y la purificación se llevó a cabo mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh) como fase estacionaria y eluyendo con mezclas CH_2Cl_2 - Metanol (85:15).

VII.5.1.1 7-(3-bromopropil)-1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (23)

0,1802g de teofilina fueron tratados con 204 μ l de 1,3-dibromopropano de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **21** como un sólido blanco que eluyó con DCM:MeOH 90:10 (43%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 39 y Tabla 40.

VII.5.1.2 7-(4-bromobutil)-1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (24)

0,1802g de teofilina fueron tratados con 1,4-dibromobutano (280 μ l) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **21** como un sólido blanco que eluyó con DCM:MeOH 95:5 (32%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 39 y Tabla 40.

VII.5.1.3 7-(5-bromopentil)-1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (25)

0,1802g de teofilina fueron tratados con 1,5-dibromopentano (275 μ l) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **21** como un sólido blanco que eluyó con DCM:MeOH 95:5 (34%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 39 y Tabla 40.

VII.5.1.4 7-(6-bromoheptil)-1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (26)

0,1802g de teofilina fueron tratados con 1,6-dibromohexano (310 μ l) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **21** como un sólido blanco que eluyó con DCM:MeOH 95:5 (32%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 39 y Tabla 40.

VII.5.1.5 7-(7-bromoheptil)-1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (27)

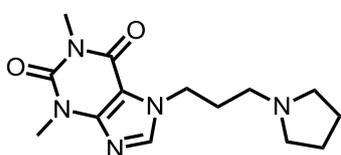
0,1802g de teofilina fueron tratados con 1,7-dibromoheptano (342 μ l) de acuerdo al procedimiento general para dar el compuesto **21** como un sólido blanco que eluyó con DCM:MeOH 97:3 (40%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 39 y Tabla 40.

VII.5.2 Procedimiento general para la síntesis de los derivados de teofilina 23a-27a

En un vial de vidrio de reacción de microondas se agregó una solución de los compuestos **23-27** (0,1 mmol) en DMF anhidra (1 ml) y luego se adicionó pirrolidina (0,3 mmol). El vial cerrado y con un agitador magnético se colocó en un equipo de microondas bajo las siguientes condiciones: modo estándar; rampa de calentamiento de 5 minutos para alcanzar una temperatura de 100 °C; potencia de 150 W, agitación media; *max. power off*. La solución se calentó a 100 °C con una potencia de 150W por 5 a 13 minutos hasta verificar por

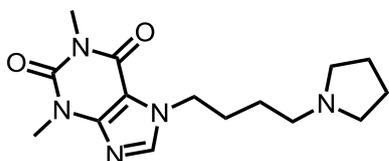
TLC la desaparición del compuesto de partida. Luego, se eliminó el solvente de reacción por arrastre con agua (2 ml) junto al exceso de la amina y se extrajo el producto deseado con AcOEt (3x2ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, luego se filtró y el solvente se eliminó a presión reducida en rotavapor.

VII.5.2.1 1,3-dimetil-7-(3-(pirrolidin-1-il)propil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (23a)



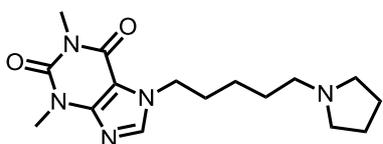
El intermediario **21** (0,239 mmol, 0,0723g) se hizo reaccionar con pirrolidina (0,76 mmol, 62,8 μ l) siguiendo el procedimiento general (5 minutos, 100 °C, 150W), para dar el producto deseado **21a** como un sólido amarillo pálido (70%; pf: 55-56 °C. **RMN de ¹H y ¹³C**: Tabla 41 y Tabla 42.

VII.5.2.2 1,3-dimetil-7-(4-(pirrolidin-1-il)butil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (24a)



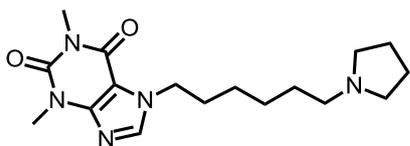
El intermediario **22** (0,25 mmol, 0,0803g) se hizo reaccionar con pirrolidina (0,76 mmol, 62,8 μ l) siguiendo el procedimiento general (10 minutos, 100 °C, 150W), para dar el producto deseado **22a** como un aceite marrón (65%). **RMN de ¹H y ¹³C**: Tabla 41 y Tabla 42.

VII.5.2.3 1,3-dimetil-7-(5-(pirrolidin-1-il)pentil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (25a)



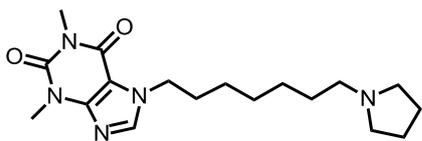
El intermediario **23** (0,0317g) se hizo reaccionar con pirrolidina (24,6 μ l) siguiendo el procedimiento general (10 minutos, 100 °C, 150W), para dar el producto deseado **23a** como un aceite marrón (47%). **RMN de ¹H y ¹³C**: Tabla 41 y Tabla 42.

VII.5.2.4 1,3-dimetil-7-(6-(pirrolidin-1-il)hexil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (26a)



El intermediario **24** (0,067 mmol, 0,023g) se hizo reaccionar con pirrolidina (0,2 mmol, 16,5 μ l) siguiendo el procedimiento general (10 minutos, 100 °C, 150W), para dar el producto deseado **24a** como un aceite marrón (72%). **RMN de ¹H y ¹³C**: Tabla 41 y Tabla 42.

VII.5.2.5 1,3-dimetil-7-(7-(pirrolidin-1-il)heptil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (27a)



El intermediario 25 (0,036g) se hizo reaccionar con pirrolidina (24,6μl) siguiendo el procedimiento general (12 minutos, 80 °C, 150W), para dar el producto deseado

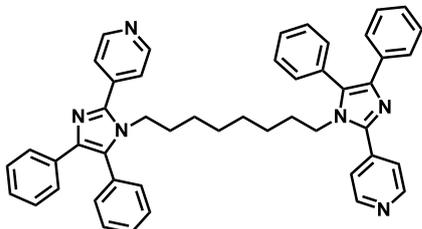
25a como un aceite marrón (45%). **RMN de ^1H y ^{13}C** : Tabla 41 y Tabla 42.

VII.6 Obtención de los dímeros de bis(n)-lofina sustituidos 28a-c – 29a-c

VII.6.1 Procedimiento general para la síntesis de los dímeros de bis(n)-lofina sustituidos (28a-c – 29a-c)

La mezcla de 1,n-alcanodiamina (1 mmol), 1,2-difeniletano-1,2-diona (2 mmol), piridinacarboxaldehído (2 mmol), acetato de amonio (2 mmol) y etanol absoluto (1,5 ml), en un vaso para digestión xpress de 10 ml, se hizo reaccionar por 4 horas, con agitación a 110°C en un horno de microondas *Mars-6 – One Touch*. El solvente fue removido a presión reducida y el producto fue purificado por cromatografía en columna en sílica gel empleando como mezcla eluyente primeramente hexano:AcOEt:triethylamina (proporción inicial 90:9:1 hasta una proporción final de 0:99:1) y luego AcOEt :MeOH con una proporción 90:10 a 50:50.

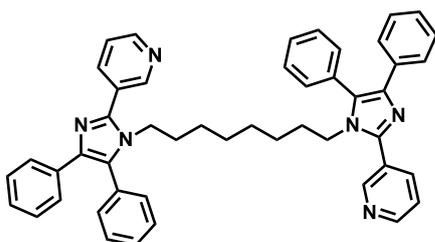
VII.6.1.1 1,8-bis(4,5-diphenyl-2-(piridin-4-il)-1H-imidazol-1-il)octano (28a)



A partir de las fracciones que eluyeron con hexano:AcOEt:triethylamina 0:99:1 cristalizó luego de dos días el compuesto **29a**. Cristal blanco, rendimiento: 35%, pf: 170 - 171 °C, IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3032, 2931, 2854, 1597, 1420, 964, 833, 702. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ

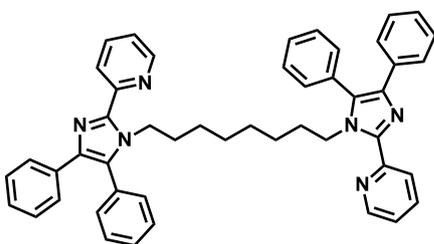
8.71 (*d*, $J = 6.0$ Hz, 2H), 7.64 (*dd*, $J = 4.5, 1.6$ Hz, 2H), 7.52 – 7.42 (*m*, 5H), 7.39 – 7.34 (*m*, 2H), 7.24 – 7.13 (*m*, $J = 29.3$ Hz, 3H), 3.91 (*t*, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.34 – 1.24 (*m*, 2H), 0.87 – 0.72 (*m*, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 150.4, 144.6, 139.1, 134.2, 131.3, 131.1, 131.0, 129.3, 128.4, 126.9, 123.1, 77.2, 45.0, 30.6, 28.4, 26.2. **HRMS-ESI**: valor calculado $[\text{M-H}]^+$ 705,3700; encontrado 705,3702.

VII.6.1.2 1,8-bis(4,5-diphenyl-2-(piridin-3-il)-1H-imidazol-1-il)octano (28b)



A partir de las fracciones que eluyeron con hexano:AcOEt:triethylamina 0:99:1 se obtuvo el compuesto **28b** luego de eliminar bajo presión reducida el solvente. Sólido amarillo claro, rendimiento: 47%, pf: 170 - 171 °C, IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3055, 2931, 2860, 1500, 1314, 715. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.91 (*d*, $J = 1.5$ Hz, 1H), 8.65 (*dd*, $J = 4.8, 1.4$ Hz, 1H), 8.04 (*dt*, $J = 7.9, 1.9$ Hz, 1H), 7.49 (*dd*, $J = 8.3, 1.3$ Hz, 1H), 7.47 – 7.36 (*m*, 1H), 7.23 – 7.11 (*m*, 1H), 3.82 (*t*, $J = 7.8$ Hz, 1H), 1.34 – 1.16 (*m*, 1H), 0.86 – 0.63 (*m*, $J = 27.4$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 149.9, 149.6, 144.5, 138.6, 136.79, 134.4, 131.2, 131.1, 130.4, 129.3, 129.0, 128.3, 127.9, 126.9, 126.7, 123.7, 44.9, 30.5, 28.4, 26.1. HRMS-ESI: valor calculado $[M-H]^+$ 705,3700; encontrado 705,3709.

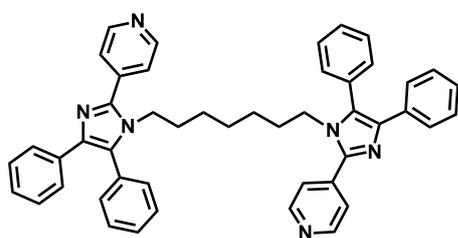
VII.6.1.3 1,8-bis(4,5-diphenyl-2-(piridin-2-il)-1H-imidazol-1-il)octano (28c)



El compuesto **28c** cristaliza en el bruto de reacción (etanol). Luego de 24 horas, se obtuvo por filtración y se lavó con pequeñas porciones de etanol frío. Fue recristalizado en etanol, obteniendo un sólido amarillo pálido, casi blanco. Rendimiento: 55%, pf: 147 – 148 °C, IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3031, 2931, 2845, 1578, 1477, 700.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.54 (*dd*, $J = 4.8, 0.9$ Hz, 1H), 8.35 (*d*, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.77 (*td*, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H), 7.52 (*d*, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.48 – 7.34 (*m*, 5H), 7.24 – 7.17 (*m*, 3H), 7.16 – 7.11 (*m*, 1H), 4.39 (*t*, $J = 8.0$ Hz, 2H), 1.52 – 1.40 (*m*, 2H), 1.02 – 0.85 (*m*, 4H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 151.2, 148.4, 144.3, 138.0, 136.7, 134.8, 131.9, 131.4, 131.4, 129.1, 128.9, 128.3, 126.9, 126.5, 123.6, 122.6, 45.4, 31.0, 28.6, 26.4. HRMS-ESI: valor calculado $[M-H]^+$ 705,3700; encontrado 705,3701.

VII.6.1.4 1,7-bis(4,5-difenil-2-(piridin-4-il)-1H-imidazol-1-il)heptano (29a)

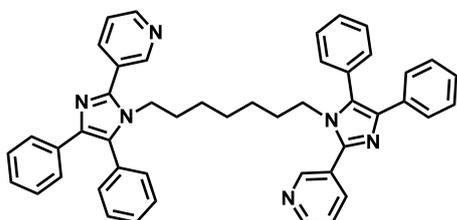


A partir de las fracciones que eluyeron con hexano:AcOEt:triethylamina 0:99:1 y luego de eliminar el solvente a presión reducida se obtuvo el compuesto **29a** como un sólido blanco, rendimiento: 31%, pf: 164 - 165 °C, IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3055, 2922, 2853, 1601, 1415, 972.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.71 (*d*, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.62 (*dd*, $J = 4.5,$

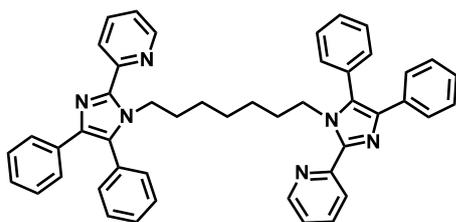
1.6 Hz, 1H), 7.51 – 7.41 (*m*, 3H), 7.39 – 7.32 (*m*, 1H), 7.24 – 7.12 (*m*, 2H), 3.88 (*t*, $J = 7.6$ Hz, 1H), 1.29 – 1.18 (*m*, 1H), 0.81 – 0.63 (*m*, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 150.3, 144.6, 139.0, 138.9, 134.09, 131.2, 131.0, 130.9, 129.3, 129.1, 128.3, 126.9, 126.8, 123.0, 44.9, 30.4, 27.9, 26.0. **HRMS-ESI**: valor calculado $[\text{M-H}]^+$ 691,3544; encontrado 691,3544.

VII.6.1.5 1,7-bis(4,5-difenil-2-(piridin-3-il)-1H-imidazol-1-il)heptano (29b)



A partir de las fracciones que eluyeron con hexano:AcOEt:triethylamina 0:99:1 y luego de eliminar el solvente a presión reducida se obtuvo el compuesto **29b** como un sólido amarillo pálido, rendimiento: 39%, pf: 76 – 77 °C, **IR** (*KBr*) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3070, 2931, 2853, 1484, 1026, 770. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.90 (*d*, $J = 1.3$ Hz, 1H), 8.67 (*d*, $J = 3.6$ Hz, 1H), 8.04 (*dt*, $J = 7.9, 1.8$ Hz, 1H), 7.53 – 7.32 (*m*, 8H), 7.25 – 7.12 (*m*, 3H), 3.81 (*t*, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.28 – 1.14 (*m*, 2H), 0.79 – 0.56 (*m*, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 149.9 (*s*), 149.6 (*s*), 144.5 (*s*), 138.7 (*s*), 136.8 (*s*), 134.3 (*s*), 131.2 (*s*), 131.2 (*s*), 130.4 (*s*), 129.3 (*s*), 129.1 (*s*), 128.3 (*s*), 127.9 (*s*), 126.9 (*s*), 126.7 (*s*), 123.8 (*s*), 44.9 (*s*), 30.5 (*s*), 27.9 (*s*), 26.0 (*s*). **HRMS-ESI**: valor calculado $[\text{M-H}]^+$ 691,3544; encontrado 691,3543.

VII.6.1.6 1,7-bis(4,5-difenil-2-(piridin-2-il)-1H-imidazol-1-il)heptano (29c)



El compuesto **29c** se obtuvo a partir de las fracciones que eluyeron con la mezcla hexano:AcOEt:triethylamina 70:29:1 como un sólido amarillo traslúcido, rendimiento: 45%, pf: 149 - 150 °C, **IR** (*KBr*) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3055, 2946, 2860, 1586, 1469, 693. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.52 (*d*, $J = 4.8$ Hz, 1H), 8.32 (*d*, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.76 (*td*, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H), 7.50 (*d*, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.46 – 7.32 (*m*, 5H), 7.23 – 7.16 (*m*, 3H), 7.16 – 7.11 (*m*, 1H), 4.37 (*t*, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.51 – 1.35 (*m*, 2H), 1.00 – 0.81 (*m*, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 151.2, 148.4, 144.2, 138.0, 136.6, 134.7, 131.8, 131.4, 131.3, 129.0, 128.8, 128.2, 126.8, 126.4, 123.6, 122.5, 45.4, 30.9, 28.1, 26.2. **HRMS-ESI**: valor calculado $[\text{M-H}]^+$ 691,3544; encontrado 691,3543.

VII.7 Determinaciones del modelado molecular

ACE cristalina de torpedo californica (Raves et al., 1997) se utilizó para las simulaciones de docking de los compuestos 11b, 12b y 13b. La optimización de la geometría de los

compuestos se realizó, como una primera aproximación, con cálculos semiempíricos (AM1) y en segundo lugar con el método Hartree-Fock 6-31G (d, p) incorporado en el programa Gaussian 03 (Dewar, Zoebisch, Healy, & Stewart, 1985). Los estudios de acoplamiento se realizaron con la versión 4.2.5.1 del programa AutoDock, utilizando la función empírica de energía libre implementada. El programa de interfaz gráfica de usuario AutoDock Tools se utilizó para preparar, ejecutar y analizar las simulaciones de acoplamiento. El espacio de simulación se definió como una caja que incluía el sitio activo y el sitio periférico. La energía de interacción atómica en una cuadrícula de 0,375 Å se calculó con el programa auxiliar Autogrid 4 usando sondas correspondientes a cada tipo de mapa encontrado en el inhibidor. Todos los dihedros rotativos en ambos compuestos podrían rotar libremente. La posición inicial de los derivados de azaestilbeno estaba fuera de la cuadrícula en una posición aleatoria.

Las iminas fueron acopladas por el protocolo del algoritmo genético lamarckiano. Se realizaron un total de 256 simulaciones independientes con un tamaño de población de 150 miembros para cada compuesto usando AutoDock 4.2.5.1 con parámetros predeterminados (posición de inicio aleatorio y conformación, paso de traducción de 2,0 Å, tasa de mutación de 0,02, tasa de cruce de 0,8, local tasa de búsqueda 0,06 y 2500000 evaluaciones de energía). Después del acoplamiento, los 256 conformadores generados para los inhibidores se asignaron a grupos basados en una tolerancia de 2,0 Å, todas las desviaciones de la raíz cuadrática media del átomo (rmsd) en posición desde la solución de energía más baja. Los grupos también se clasificaron de acuerdo con las energías de sus conformaciones representativas, que eran las soluciones de menor energía dentro de cada grupo.

VII.8 Actividades biológicas

VII.8.1 Ensayo cuantitativo de inhibición de colinesterasas

ACE de anguila eléctrica (500 U, Sigma) y BuCE de suero equino (300 U, MP Biomedicals) se utilizaron como fuente de colinesterasas. La actividad inhibitoria de ACE y BuCE fue determinada in vitro mediante el método espectrofotométrico desarrollado por Ellman con pequeñas modificaciones. Cada enzima liofilizada fue disuelta en buffer A (8 mM K_2HPO_4 , 2,3 mM NaH_2PO_4), obteniendo una solución stock de 5 U/ml y 3 U/ml respectivamente. Se realizó una dilución posterior de las soluciones con buffer B (8 mM K_2HPO_4 , 2,3 mM NaH_2PO_4 , 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6) alcanzando concentraciones de 0,126 U/ml y 0,06 U/ml respectivamente. Las muestras se disolvieron en buffer B, en

algunos casos con 2,5 % de MeOH como cosolvente. 300 μ l de la solución de la enzima y 300 μ l de la muestra se mezclaron en un tubo de ensayo y se incubaron por 60 (para ACE) o 120 minutos (BuCE) a temperatura ambiente. Se inició la reacción adicionando 600 μ l de la solución del sustrato y reactivo de color (0,5 mM DTNB, 0,6 mM ATCI o ioduro de butirilticolina (BTCl), 0,1 M Na_2HPO_4 , pH 7,5). La absorbancia se registró a 405 nm por 120 s a 27°C. La actividad enzimática se calculó por comparación de las velocidades de reacción entre la muestra y el blanco. La concentración de muestra que determina el 50% de inhibición (IC_{50}) se calculó por regresión no lineal de la curva respuesta vs log (concentración) utilizando GraphPadPrism 5. Todas las reacciones se midieron por triplicado. Tacrina se utilizó como inhibidor de referencia. DTNB, ATCI, BTCl y tacrina fueron adquiridos de Sigma.

Ensayo de inhibición enzimática del isómero Z

Para llevar a cabo el ensayo cuantitativo de la actividad inhibitoria del isómero Z de los derivados de azobenceno sobre ACE (Capítulo IV), trabajando en oscuridad, se irradiaron 30 μ l de la solución de la muestra en MeOH con lámpara de luz UV a 360 nm por 10 minutos. Al resguardo de la luz, luego se adicionaron 270 μ l de buffer B, 300 μ l de la solución de ACE y se incubó por 60 minutos. Luego, continuó con el ensayo tal cual se indica en el punto anterior.

VII.8.2 Estudio cinético de inhibición de ACE y BuCE

Los estudios cinéticos para la inhibición de ACE se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de incubación descritas anteriormente, usando nueve concentraciones de sustrato (desde 0,015 mM a 0,6 mM) en presencia o ausencia de dos concentraciones de inhibidor (0,25 y 0,5 μ M para el compuesto **12b** para ACE; 0,015 y 0,025 μ M para el compuesto **IIIB** para BuCE). La constante de inhibición aparente y los parámetros cinéticos fueron calculados mediante el módulo de “Enzyme kinetics” de GraphPad Prism. El tipo de inhibición se determinó mediante la gráfica doble recíproca de Lineweaver – Burk, así como también evaluando el modelo que mejor se ajustaba a los datos obtenidos empleando el mismo programa.

VII.8.3 Actividad inhibitoria de ACE en células vivas

VII.8.3.1 SH-SY5Y human neuroblastoma cells

Como condiciones de crecimiento de las células SH-SY5Y se empleó un medio que consiste en DMEM/Ham F12 (Gibco) en una mezcla (1:1) suplementado con suero bovino fetal

10% (Gibco), 100 U/ml de penicilina (Gibco), 100 µg/ml de estreptomina (Gibco) a 37°C en CO₂ 5%. Para las determinaciones bioquímicas, 1x10⁵ células SH-SY5Y fueron sembradas en pocillos de 35 mm y mantenidas en las condiciones arriba descritas.

VII.8.3.2 Determinación de la actividad de ACE

La determinación de la actividad de ACE se realizó de acuerdo al método de Ellman (Alza et al., 2014) con pequeñas modificaciones (Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961). Las células SH-SY5Y desarrolladas por 72 h en pocillos de 35 mm fueron lavadas tres veces con PBS (150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM, NaH₂PO₄, pH 7,4) y preincubadas por 15 minutos con 12a (0,56 µM), 12b (0,43 µM), 14'b (0,53 µM) o 13c (0,62 µM). Luego, las células se mantuvieron en la incubadora por 1 h en presencia de DTNB (concentración final de 0,31 mM en PBS) y ATCI (concentración final de 0,9 mM en PBS) Se empleó DMSO como vehículo y se mantuvo por debajo de 0,1% en todos los casos. Las células control fueron incubadas en presencia del vehículo. Luego de 1 h, se tomó 0,9 ml del sobrenadante de cada condición empleada y se midió la absorbancia a 412 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje del control.

VII.8.3.3 Ensayo de citotoxicidad y medición de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH)

La muerte celular fue medida espectrofotométricamente evaluando la actividad de la enzima citoplasmática LDH (lactato deshidrogenasa) liberada por las células con membrana plasmática dañada. Estos datos fueron comparados con los obtenidos luego de la lisis completa de las células. Las células SH-SY5Y fueron desarrolladas como se describe arriba por 72 h y tratadas con 12a (5,6 µM), 12b (4,3 µM), 14'b (5,3 µM) o 13c (6,2 µM) en el medio de crecimiento. Luego de 24 h de tratamiento con las drogas, se tomó 100 µL de medio y la actividad LDH fue determinada usando un ensayo cinético de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Wiener LDH-P UV). La liberación de LDH fue cuantificada por comparación del 100% de liberación, obtenido con células tratadas con Triton X-100 0,1% en PBS.

VII.8.3.4 Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como la media \pm SEM (error estándar de la media) de al menos tres experimentos independientes. La actividad de ACE y la citotoxicidad en el ensayo de LDH fueron analizadas usando ANOVA seguido de test de Turkey para comparaciones múltiples. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.