



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

Síntesis y evaluación de 1,2,3-triazoles como moduladores de receptores nicotínicos y nuevos neurofármacos. Incorporación de este heterociclo en derivados no esteroideos de Vitamina D

Santiago Armando Stabile

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2021

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 de 2015 y el 17 de febrero de 2021, bajo la dirección del Dr. Cristian Alejandro Vitale.

Santiago Armando Stabile



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en particular a mis padres y mi hermano, por el apoyo incondicional durante todos estos años, y por darme la opción de elegir mis estudios y mi vocación.

A mi director, Dr. Cristian Vitale, conocido universalmente como Pincho, por abrirme las puertas de su laboratorio, y al mundo de la química medicinal. A todo el grupo de investigación, por generar un ambiente de trabajo cálido y lleno de buenos recuerdos.

A mis compañeros de laboratorio, pasados y presentes, por los momentos compartidos, por sus consejos, y por el apoyo prestado durante la escritura de esta memoria.

A mis amigos del instituto, a quienes tuve la suerte de conocer durante estos años de trabajo, y a mis amigos de siempre, que me acompañan desde hace mucho tiempo. También a mis compañeros de trabajo durante mi estancia predoctoral, por hacerme sentir bienvenido en su grupo.

A quienes colaboraron con el desarrollo de este trabajo de tesis, en particular a los grupos de investigación de la Dra. Cecilia Bouzat (INIBIBB-CONICET) y de la Dra. María Isabel Rodríguez-Franco (IQM-CSIC).

Finalmente, agradecer a CONICET, y a la Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la UNS, por las becas otorgadas, y al Departamento de Química.

Lista de abreviaturas

1,25-D-MARSS	<i>Membrane Associated Rapid Response Esteroid-binding</i>
1-25D	1 α ,25-dihidroxitamina D ₃ (Calcitriol)
26L	2,6-Lutidina
5-HI	5-hidroxiindol
5-HT₃	5-hidroxitriptamina-3
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterasa
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALDH	Enzima aldehído deshidrogenasa
ARE	<i>Antioxidant Response Elements</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
BuChE	Enzima butirilcolinesterasa
C	Carbón activado
CAN	Nitrato de amonio cérico
Cbz	Carboxibencilo
CuAAC	Cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (I)
CuNPs	Nanopartículas de cobre
CYP24A1	Enzima 24-hidroxilasa
DCM	Diclorometano
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMAD	Acetilendicarboxilato de metilo

DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTBB	4,4'-di- <i>ter</i> -butilbifenilo
DXP	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato
EA	Enfermedad de Alzheimer
ECD	Dominio extracelular
EDX	Energía dispersiva de Rayos X
EP	Enfermedad de Parkinson
EPSPS	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato <i>sintasa</i>
Et₂O	Dietil éter
EWG	<i>Electron withdrawing groups</i>
FGF23	Factor de crecimiento fibroblástico
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GGDPS	Geranil-geranil difosfato sintasa
H3R	Receptor de Histamina H3
Hh	Vía de señalización Hedgehog
HL-60	<i>Human promyelocytic leukemia cells</i>
<i>h</i>-MAO	Monoaminoxidasa humana
HO-1	Hemoxygenasa-1
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICD	Dominio intracelular
IMAO	Inhibidores de monoaminoxidasa
IVM	Ivermectina
LAH	Hidruro de Litio y Aluminio
LDA	Diisopropilamiduuro de litio
LGIC	Canales iónicos activados por ligando

MAO	Monoaminoxidasa
MCR	Reacciones multicomponente
MPTP	4-fenil-1-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
nAChRs	Receptores nicotínicos de acetilcolina
NaHMDS	Bis(trimetilsilil)amida de sodio
NAMs	Moduladores alostéricos negativos
<i>n</i>-BuLi	<i>n</i> -butil litio
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NPs	Nanopartículas
NQO1	NAD(P)H-quinona oxidoreductasa 1
NRF2	<i>Nuclear erythroid 2-related factor</i>
NTsC	Nanotubos de carbono
PAMs	Moduladores alostéricos positivos
PDC	Dicromato de piridinio
PFA	Paraformaldehído
pLGICs	Canales pentaméricos activados por ligando
PMDTA	Pentametildietilentriamina
POM	Pivaloximetil
PPIs	Interacciones proteína-proteína
PPTS	<i>p</i> -toluensulfonato de piridinio
PTH	Hormona paratiroidea
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
QTOF	Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo
RXR	Receptor retinoico X
SAMs	Moduladores alostéricos silentes
SAR	Relaciones estructura-actividad
S_N2	Sustitución nucleofílica bimolecular

SPR	Resonancia de plasmones superficiales
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBAI	Ioduro de tetrabutilamonio
<i>t</i>-BuOH	<i>ter</i> -Butanol
TEA	Trietilamina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
THP	Tetrahidropapaverolina
TLC	<i>Thin layer chromatography</i> (cromatografía en capa fina)
TMD	Dominio de transmembrana
TMS	Tetrametilsilano
TMSBr	Bromotrimetilsilano
TMSN₃	Trimetilsililazida
VDBP	<i>Vitamin D-binding protein</i>
VDR	Receptor nuclear de vitamina D
VDRE	Elementos de respuesta a la vitamina D
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
XRD	Difracción de Rayos X

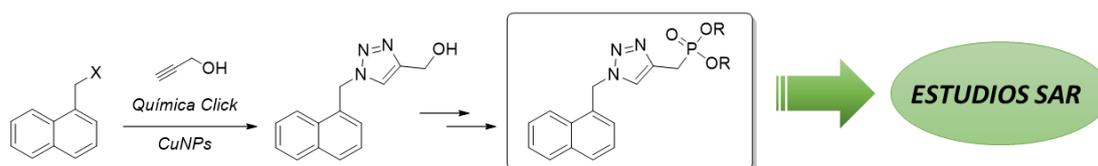
RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se describe la síntesis de nuevos compuestos bioactivos derivados de 1,2,3-triazol. La reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen se llevó a cabo sobre distintos sustratos de interés, empleando nanopartículas de cobre (CuNPs) como catalizador de la reacción. Las mismas fueron obtenidas a través del sistema CuCl₂-Li-DTBB empleado en nuestro grupo de investigación, tanto para la generación de NPs desnudas como soportadas. En todos los casos se obtuvieron los 1,2,3-triazoles 1,4-disustituídos con excelente regioselectividad.

En el **Apartado I** (p.1-33), a modo de introducción general, se detallan antecedentes en la síntesis de 1,2,3-triazoles y las distintas actividades biológicas que poseen este tipo de compuestos. De manera similar se analizan distintos tipos de compuestos fosforados.

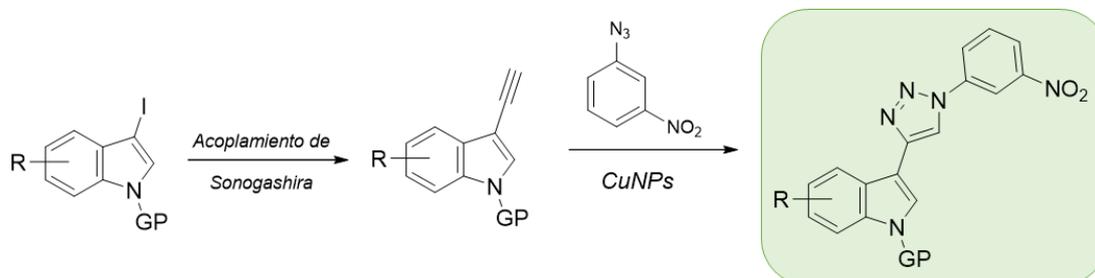
En el **Apartado II** (p.34) se detallan los objetivos generales de esta Tesis Doctoral, que se desarrollarán en los siguientes tres capítulos.

En el **Apartado III** (p.35-126), se desarrollará el **Capítulo I** que explora la síntesis de nuevos moduladores alostéricos del receptor nicotínico $\alpha 7$. Se describe la optimización de las condiciones de reacción para la cicloadición y los estudios de relaciones estructura-actividad realizados.



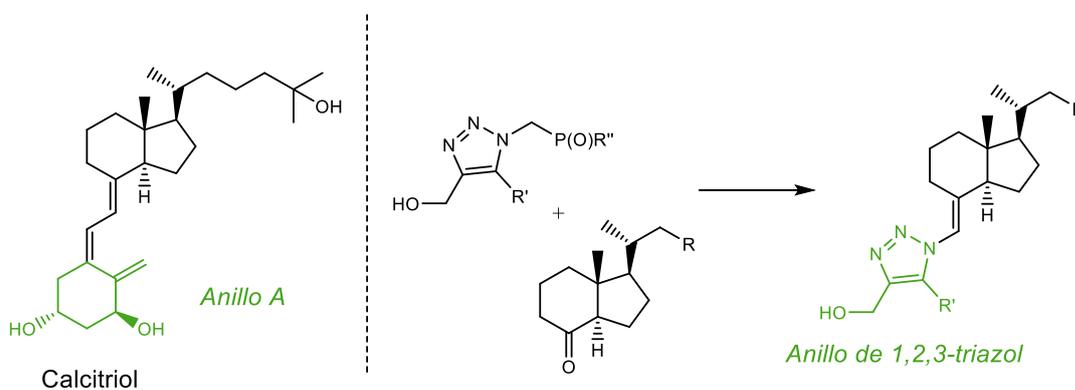
A su vez se detalla la evaluación biológica de estos compuestos, realizada en colaboración con el grupo de la Dra. Cecilia Bouzat (INIBIBB-CONICET).

En el **Apartado IV** (p.127-188) se desarrollará el **Capítulo II**, donde se describe la síntesis de 1,2,3-triazoles conteniendo derivados de indol. Se detalla la síntesis de los precursores, y la optimización de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar para cada tipo de sustrato. Además, se especifican los ensayos biológicos realizados.



Este trabajo se realizó en el marco de una estancia pre doctoral en el grupo de Neurofármacos del Instituto de Química Médica (IQM-CSIC) bajo la dirección de la Dra. Ma. Isabel Rodríguez-Franco.

En el **Apartado V** (p.189-222), se desarrolla el **Capítulo III** donde se expone la síntesis de 1,2,3-triazoles di y trisustituidos, empleados como candidatos para reemplazar el anillo A de la vitamina D. Se discuten también los métodos de acoplamiento empleados para incorporarlos en el biciclo CD de vitamina D.



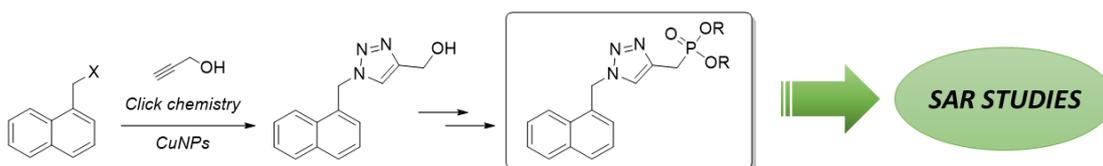
ABSTRACT

In this work, the synthesis of novel bioactive compounds, derived from 1,2,3-triazole moiety, is described. 1,3-dipolar cycloaddition (Huisgen reaction) was carried out with different substrates, using copper nanoparticles (CuNPs) as reaction catalyst. These NPs were obtained by reduction of the corresponding metal salt through the CuCl₂-Li-DTBB reactive system. In this way, supported and unsupported CuNPs were generated. In all cases, the corresponding 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles were obtained with excellent regioselectivity.

In **Section I** (p.1-33), by way of general introduction, synthesis of 1,2,3-triazoles, and their biological activities, are detailed. In the same way, different types of phosphorated compounds are analysed.

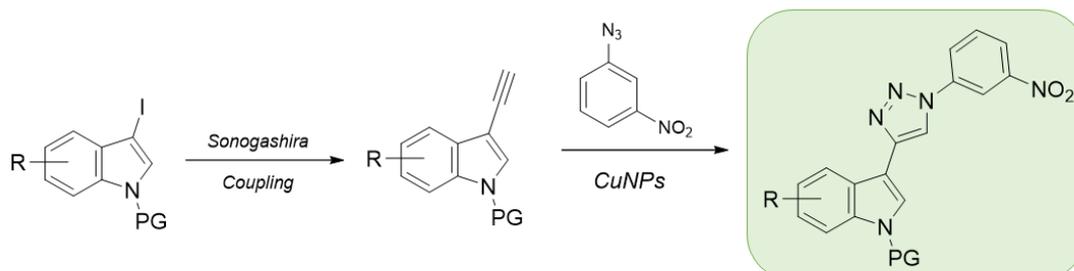
In **Section II** (p.34), the general objectives of this thesis, which will be developed in the next three chapters, are detailed.

In **Section III** (p.35-126), **Chapter I** will be developed, in which the synthesis of novel allosteric modulators of the $\alpha 7$ nicotinic receptor is explored. The optimization of reaction conditions for the 1,3-dipolar cycloaddition, and the structure-activity relationship (SAR) studies conducted, are described.



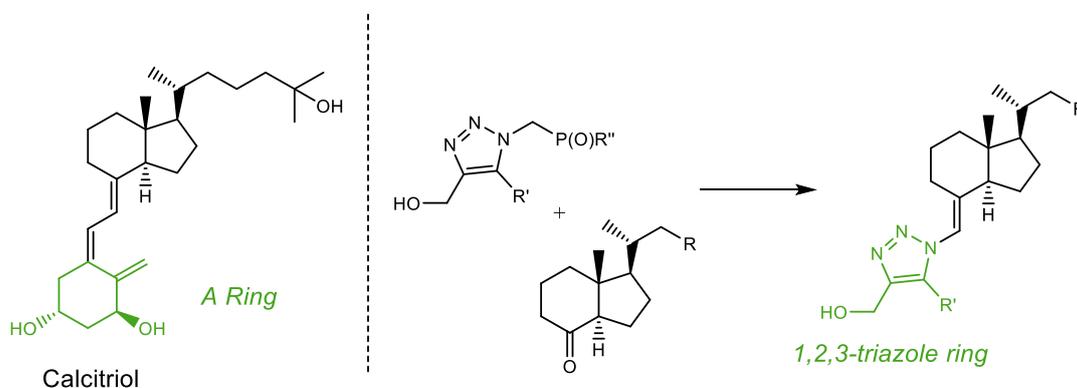
The biological evaluation of these compounds, carried out in collaboration with Dra Cecilia Bouzat research group (INIBIBB-CONICET), it's also described.

In **Section IV** (p.127-188), **Chapter II** will be developed, in which the synthesis of 1,2,3-triazole-Indole derivatives is described. The synthesis of precursors, and the optimization of Huisgen reaction for each type of substrate, is described. The bioassays conducted for these compounds are also detailed.



This work was carried out within the framework of a pre-doctoral stay in the NeuroDrugs group of the Medicinal Chemistry Institute at the Spanish National Research Council (IQM-CSIC), under the supervision of Dra. Ma. Isabel Rodríguez-Franco.

In **Section V** (p.189-222), **Chapter III** will be developed, in which the synthesis of di and trisubstituted 1,2,3-triazoles, used as candidates to replace vitamin D ring A, is described. Coupling methods used to incorporate them into the vitamin D CD bicycle are also discussed.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. Introducción general	1
I.1. Triazoles	1
I.1.1. Reacciones de obtención de triazoles	1
I.1.2. CuAAC promovida por CuNPs	5
I.1.3. Relevancia del anillo de triazol en química medicinal	8
I.1.3.i. Anillo de 1,2,3-triazol como bioisótero de amidas	10
I.1.3.ii. Anillo de 1,2,3-triazol como bioisótero de otros heterociclos	13
I.1.3.iii. CuAAC en química combinatoria: síntesis de dímeros, quimeras y bibliotecas de compuestos bioactivos	14
I.1.4. Derivados de 1,2,3-triazol con actividades biológicas de interés.	16
I.1.4.i. Triazoles como agentes neuroprotectores	16
I.1.4.ii. Compuestos con actividad anticancerígena	17
I.1.4.iii. Derivados triazol-fosfonato con actividad antiviral	19
I.2. Actividad biológica de ácidos fosfónicos y derivados	20
I.2.1. Fosfonatos como bioisósteros de fosfatos y otras funciones orgánicas	20
I.2.1.i. Fosfonatos como bioisósteros de fosfatos	22
I.2.1.ii. Ácidos fosfónicos como bioisósteros de ácidos carboxílicos	24
I.2.1.iii. Bioisosterismo entre aminofosfatos y aminoácidos	25
I.2.1.iv. Incorporación de fosfonatos en fármacos	27
I.2.2. Compuestos organofosforados como inhibidores enzimáticos	29
I.2.3. Reacciones de obtención de fosfonatos y derivados: alcances y limitaciones	30
I.2.3.i. Reacción de Michaelis-Arbuzov	31
I.2.3.ii. Reacción de Michaelis-Becker	33
II. Objetivos	34
III. Capítulo I: Síntesis de 1,2,3-triazoles fósforo funcionalizados con actividad $\alpha 7$-PAM	35
III.1. Introducción	35
III.1.1. Receptores nicotínicos: conceptos fundamentales	35
III.1.1.i. Familias de receptores nicotínicos	36
III.1.1.ii. Importancia biológica del receptor nicotínico $\alpha 7$	37
III.1.2. Clasificación del receptor $\alpha 7$ dentro de la familia de receptores postsinápticos	38
III.1.2.i. Estructura de receptores Cys-loop	39
III.1.3. Respuesta de receptores cys-loop a la unión del agonista	40
III.1.3.i. Respuesta del receptor nicotínico $\alpha 7$	41
III.1.3.ii. Modulación alostérica del receptor nicotínico $\alpha 7$	42
III.1.3.iii. Clasificación de PAMs del receptor $\alpha 7$ según su modo de acción	45
III.1.3.iv. Evolución en el desarrollo de PAMs: estructuras representativas.	46
III.2. Capítulo I: Objetivos específicos	51
III.3. Resultados y discusión	53
III.3.1. CuAAC catalizada por CuNPs	53
III.3.1.i. CuAAC catalizada por CuNPs: selección del catalizador	53
III.3.1.ii. CuAAC catalizada por CuNPs: selección del solvente	56
III.3.2. Síntesis de derivados fosforados de (1-(1-naftalenilmetil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il) metanol (68)	57
III.3.3. Evaluación biológica: actividad $\alpha 7$ -PAM de la serie I	58
III.3.3.i. Obtención del ácido (1-(1-naftalenilmetil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fosfónico (71)	60
III.3.4. Estudios SAR a partir de (1-(1-naftalenilmetil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fosfonato de dimetilo (70a)	62

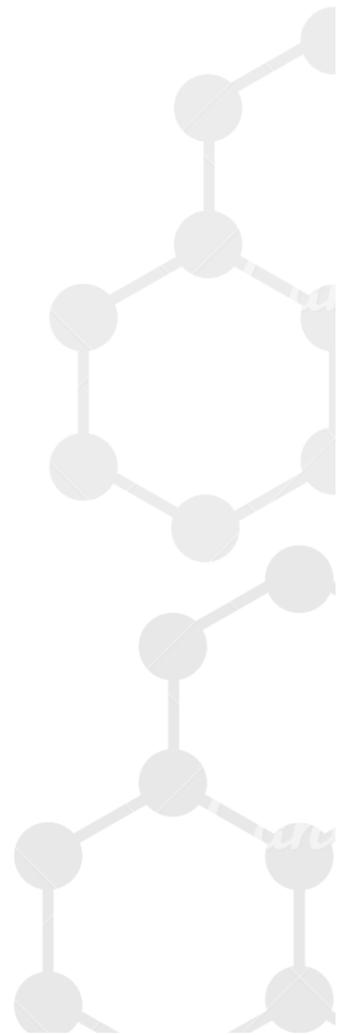
III.3.4.i.	Serie II. Funcionalización sobre el carbono α del fosfonato	62
III.3.4.ii.	Serie III. Inversión de los sustituyentes en el anillo de triazol.	67
III.3.4.iii.	Serie IV. Síntesis de homólogos y vinólogos	75
III.3.4.iv.	Serie V. Variaciones en el grupo arilo	80
III.3.5.	Evaluación detallada de la actividad $\alpha 7$ -PAM de compuestos seleccionados	82
III.3.5.i.	Evaluación de los compuestos 70a-b y 71 a distintas concentraciones	82
III.3.5.ii.	Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ activado por ACh	83
III.3.5.iii.	Caracterización del accionar de (1-(1-naftalenilmetil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il) fosfonato de dimetilo (70a).	85
III.3.5.iv.	Determinantes estructurales de la potenciación	87
III.3.5.v.	Permeabilidad - Barrera hematoencefálica	89
III.4.	Conclusiones	90
III.5.	Sección experimental	92
III.5.1.	Procedimientos generales	92
III.5.1.i.	Solventes y reactivos.	92
III.5.1.ii.	Cromatografía	92
III.5.1.iii.	Instrumentos y equipos	93
III.5.2.	Procedimiento general para la preparación de CuNPs	93
III.5.3.	Síntesis de precursores	94
III.5.3.i.	Síntesis de 1-azidometilnaftaleno (66)	94
III.5.3.ii.	Síntesis de azidometilfosfonato de dimetilo (84)	94
III.5.3.iii.	Síntesis de 1-(2-propinil)naftaleno (87)	96
III.5.3.iv.	Síntesis de 2-azidoetilfosfonato de dietilo (89)	97
III.5.3.v.	Síntesis de 2-azidoetanol (90)	98
III.5.3.vi.	Síntesis de 1-etinilnaftaleno (92)	98
III.5.3.vii.	Síntesis de 1-azidonaftaleno (99)	99
III.5.3.viii.	Síntesis de (<i>E</i>)-2-azidovinil benceno (109)	100
III.5.3.ix.	Síntesis de 1-(2-azido-1-iodoetil)naftaleno (114)	101
III.5.4.	Procedimiento general: cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada por CuNPs/C.	102
III.5.5.	Procedimiento general para la obtención de bromuros. Reacción de Appel	105
III.5.6.	Procedimiento general para la síntesis de fosfonatos	107
III.5.7.	Reacciones adicionales	111
III.5.7.i.	Síntesis de ácido (1-(1-naftalenilmetil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)fosfónico (71)	111
III.5.7.ii.	Síntesis de (1-naftalenilmetil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carbaldehído (72)	111
III.5.7.iii.	Síntesis de (1-(1-naftalenilmetil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)hidroximetil fosfonato de dimetilo (73)	112
III.5.7.iv.	Síntesis de (1-(1-naftalenilmetil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)(aminofenil)metil fosfonato de dimetilo (75)	112
III.5.8.	Anexo: espectros de RMN de compuestos seleccionados	113
IV.	Capítulo II: Síntesis de derivados triazol-indol como inhibidores duales de monoamino oxidasa (MAO) y de la interacción KEAP1-NRF2.	127
IV.1.	Introducción	127
IV.1.1.	Inhibidores de MAOs	129
IV.1.1.i.	Empleo de triazoles e indoles en el desarrollo de inhibidores de MAO	130
IV.1.2.	Inhibición de la interacción KEAP1-NRF2	133
IV.1.2.i.	1,4-diaril triazoles como inhibidores de la interacción KEAP1-NRF2	134
IV.1.	Capítulo II: Objetivos específicos	135
IV.2.	Resultados y discusión	137
IV.2.1.	Obtención de derivados triazol-indol a partir de la azidación de indoles	137

IV.2.1.i.	Descripción de antecedentes en la obtención de azidoindoles	137
IV.2.1.ii.	Síntesis de 3-azidoindoles	138
IV.2.2.	Obtención de derivados triazol-indol a partir de 3-etinilindoles	139
IV.2.2.i.	Obtención de 3-etinilindoles protegidos con Cbz	139
IV.2.2.ii.	CuAAC empleando 3-etinilindoles protegidos con Cbz	140
IV.2.2.iii.	Síntesis de 3-etinilindoles empleando Boc como grupo protector	141
IV.2.2.iv.	CuAAC empleando 3-etinilindoles protegidos con Boc	143
IV.2.3.	Síntesis de derivados triazol-indol vía propargilación de indoles	145
IV.2.4.	Evaluación biológica	146
IV.2.4.i.	Evaluación de la inhibición de MAO de los derivados triazol-indol	146
IV.2.4.ii.	Estudio de unión al dominio Kelch de KEAP1 por SPR	147
IV.3.	Conclusiones	149
IV.4.	Sección experimental	151
IV.4.1.	Instrumentos y equipos	151
IV.4.2.	Ensayos biológicos	151
IV.4.2.i.	Inhibición enzimática de MAO	151
IV.4.2.ii.	Expresión de KEAP1	151
IV.4.2.iii.	Ensayos de resonancia de plasmones superficiales (SPR)	152
IV.4.3.	Síntesis de 3-nitrofenilazida (155)	153
IV.4.4.	Procedimiento general para la síntesis de 3-iodoindoles protegidos con Cbz	154
IV.4.5.	Procedimiento general para la síntesis de 3-iodoindoles protegidos con Boc	156
IV.4.6.	Procedimiento general para el acoplamiento de Sonagashira	157
IV.4.7.	Procedimiento general para la CuAAC empleando 3-etinilindoles.	160
I.1.1.1.	Metilación de indoles – Síntesis del derivado 163d	173
IV.4.8.	Procedimiento general para la propargilación de indoles	177
IV.4.9.	Procedimiento general para la CuAAC empleando indoles propargilados	179
V.	Capítulo III: Incorporación del anillo de 1,2,3-triazol en derivados de Vitamina D no esteroidales	189
V.1.	Introducción	189
V.1.1.	Vitamina D: estructura y funciones clásicas	189
V.1.2.	Mecanismos de acción del Calcitriol	191
V.1.2.i.	Mecanismo genómico	191
V.1.2.ii.	Mecanismo no genómico	192
V.1.3.	Vitamina D y cáncer	192
V.1.3.i.	Análogos de Vitamina D para el tratamiento de cáncer	193
V.1.4.	Derivados aromáticos de calcitriol: arocalciferoles	195
V.1.4.i.	Modificación de la cadena lateral	195
V.1.4.ii.	Modificación del anillo A y el sistema triénico	196
V.1.4.iii.	Modificación del biciclo CD	199
V.1.4.iv.	Análogos no esteroidales completamente aromáticos	199
V.1.4.v.	Análogos de vitamina D ₃	200
V.1.4.vi.	Análogos de calcitriol con heterociclos nitrogenados	201
V.2.	Capítulo III: Objetivos específicos	203
V.3.	Resultados y discusión	204
V.3.1.	Propuesta sintética	204
V.3.1.	Síntesis de triazoles trisustituídos con fosfonatos u óxidos de fosfina	206
V.3.1.i.	Síntesis de triazoles derivados de óxidos de fosfina	207
V.3.1.ii.	Síntesis del fragmento triazol-fosfonato	208
V.3.2.	Síntesis de triazolil fosfonatos vía CuAAC	210

V.3.3.	Estudio de la reacción de Wittig-Horner con triazolil fosfonatos _____	210
V.3.4.	Síntesis de cetonas de Grundmann _____	211
V.3.5.	Acoplamiento de Wittig-Horner con cetonas de Grundmann _____	212
V.4.	Conclusiones _____	214
V.5.	Parte experimental _____	215
V.5.1.	Síntesis de óxido de (azidometil)difenilfosfina (223) _____	215
V.5.2.	Síntesis de 1-((difenilfosfonil)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolil-4,5-dicarboxilato de metilo (226) 216	
V.5.2.i.	Síntesis de Acetilencarboxilato de dimetilo (225) _____	216
V.5.2.ii.	Síntesis de 1-((difenilfosfonil)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolil-4,5-dicarboxilato de dimetilo (226) 216	
V.5.3.	Síntesis de Des-A,B-8 β -(hidroxi)-22-acetoxi-23,24-dinorcolano (238) _____	217
V.5.4.	Síntesis de Des-A,B-8 β -(oxo)-22-acetoxi-23,24-dinorcolano (239) _____	217
V.5.5.	Síntesis de (4-(trietsililoxi(metil))-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolil)metil)fosfonato de dietilo (207a)	218
V.5.5.i.	Síntesis de trietil(2-propinilo)xilano (234) _____	218
V.5.5.ii.	Síntesis de (4-(trietsililoxi(metil))-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolil)metil)fosfonato de dietilo (207a) 219	
V.5.6.	Procedimiento general para el acoplamiento de Wittig-Horner _____	220



INTRODUCCIÓN GENERAL



I. Introducción general

I.1. Triazoles

La química de heterociclos es una de las ramas más estudiadas dentro de la química medicinal, especialmente aquellos ciclos que contienen oxígeno, nitrógeno o azufre. Los heterociclos de 5 miembros conteniendo nitrógeno se denominan azoles, siendo los triazoles aquellos que poseen 3 átomos de nitrógeno. El anillo de triazol se presenta en dos isoformas, 1,2,3-triazoles y 1,2,4-triazoles. Cada uno de ellos presenta dos tautómeros principales, 1*H*-1,2,3-triazol y 2*H*-1,2,3-triazol, y 1*H*-1,2,4-triazol y 4*H*-1,2,4-triazol (**Figura I.1**).¹

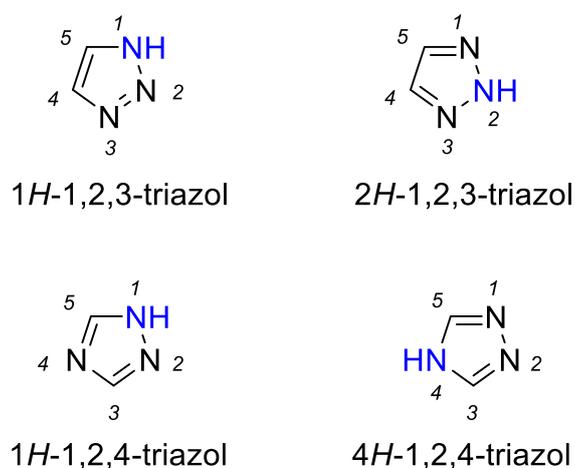


Figura I.1. Isómeros 1,2,3-triazol y 1,2,4-triazol, con sus correspondientes tautómeros.

I.1.1. Reacciones de obtención de triazoles

El anillo de 1,2,3-triazol puede obtenerse a través de la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos terminales. La primer reacción de este tipo fue reportada por Michael en 1893, partiendo de fenilazida y acetilendicarboxilato.² Esta reacción fue descrita en mayor detalle por Rolf Huisgen en 1963³, dentro de un estudio que abarcó distintos dipolos (azidas, nitrilos, nitronas), y dipolarófilos (alquenos y alquinos). En particular, la formación de 1,2,3-triazoles, di y trisustituidos, fue estudiada en detalle.⁴ Es por ello que esta reacción es conocida como cicloadición 1,3 dipolar de Huisgen.

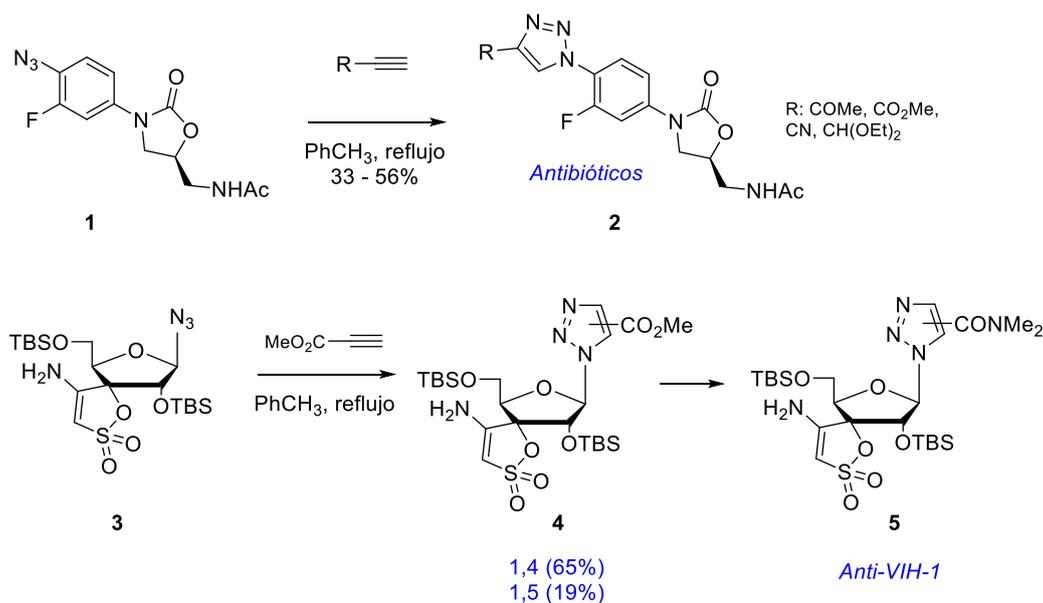
¹ Balabin, R. M. J. *Chem. Phys.* **2009**, 131 (15).

² A. Michael. *J. Pract. Chem./Chem. Ztg.*, **1893**, 48, 94.

³ Huisgen, R. *Angew. Chem.* **1963**, 13 (1938), 604–637.

⁴ Huisgen, R.; Möbius, L. *Chem. Ber.* **1965**, 753 (1963).

Desde su descubrimiento, esta cicloadición fue empleada en la síntesis de compuestos biológicamente activos (por ej. antibióticos, **2**, Esquema I.1).^{5,6} Sin embargo, la reacción presenta limitaciones. La cicloadición térmica carece de regioselectividad, dando lugar a los regioisómeros 1,4 y 1,5 disustituidos en proporción variable, presenta rendimientos que van de bajos a moderados, y requiere de elevadas temperaturas (veáse formación de **4**, Esquema I.1).



Esquema I.1. Cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen, aplicada en la síntesis de compuestos biológicamente activos.

Por estas razones, se estudiaron métodos para la obtención regioselectiva de 1,2,3-triazoles, por ej., empleando trimetilsililazida (TMSN₃) en la cicloadición, se logra obtener selectivamente 2*H*-1,2,3-triazoles 2,4-disustituidos.⁷ No obstante, el mayor logro en la síntesis regioselectiva de 1,2,3-triazoles ocurre a partir de los trabajos de Meldal⁸ y Sharpless⁹, quienes reportan independientemente la catálisis con especies de Cu (I) para la obtención regioespecífica de 1*H*-1,2,3-triazoles 1,4 disustituidos (**Esquema I.2-I**). En el primer caso, se obtuvieron peptidotriazoles, empleando Cu (I) en presencia de *N,N*-Diisopropiletilamina (DIPEA) como base en THF, mientras que Sharpless reporta la reacción en una mezcla *t*-BuOH: H₂O, generando el catalizador de Cu (I) por reducción *in situ* de CuSO₄ con ascorbato de sodio.

⁵ Genin, M. J.; Allwine, D. A.; Anderson, D. J.; Barbachyn, M. R.; Emmert, D. E.; Garmon, S. A.; Graber, D. R.; Grega, K. C.; Hester, J. B.; Hutchinson, D. K.; et al. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (5), 953–970.

⁶ Alvarez, R.; Velázquez, S.; San-felix, A.; Aquaro, S.; De Clercq, E.; Perno, C.-F.; Karlsson, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (24), 4185–4194.

⁷ Moltzen, E. K.; Pedersen, H.; Bages, K. P.; Meier, E.; Frederiksen, K.; Sanchez, C. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4085–4099.

⁸ Tornøe, C. W.; Meldal, M. *Pept. Wave Futur.* **2001**, No. i, 263–264.

⁹ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.

ocurre en la esfera de coordinación de este metal, especialmente en medio acuoso. El resultado neto es que la velocidad de reacción de la CuAAC se incrementa por un factor de 10^7 respecto al proceso térmico.¹⁰

La CuAAC es considerada una reacción *click*, ya que la misma cumple con la mayoría de sus postulados. Este concepto, definido previamente por Sharpless, implica que este tipo de reacciones deben ser modulares, poseer un gran alcance, elevados rendimientos y ser estereoespecíficas. Idealmente, son operacionalmente simples (en este caso, la reacción es insensible al H₂O y al O₂, por lo cual no se requiere de atmósfera inerte), emplean solventes inocuos, como H₂O, y permiten aislar el producto con facilidad.¹²

La única desventaja que presenta la CuAAC empleando catálisis homogénea con especies de Cu (I), son los desechos de este metal al finalizar la reacción, el cual es citotóxico e impide efectuar esta reacción en medios biológicos. En este sentido, para aumentar la reactividad, y poder llevar a cabo la cicloadición sin Cu, el grupo de Bertozzi empleó alquinos cíclicos con gran tensión anular (por ej. **OCT**, compuesto **6**, o **DIFO**, compuesto **8**, Figura I.2).

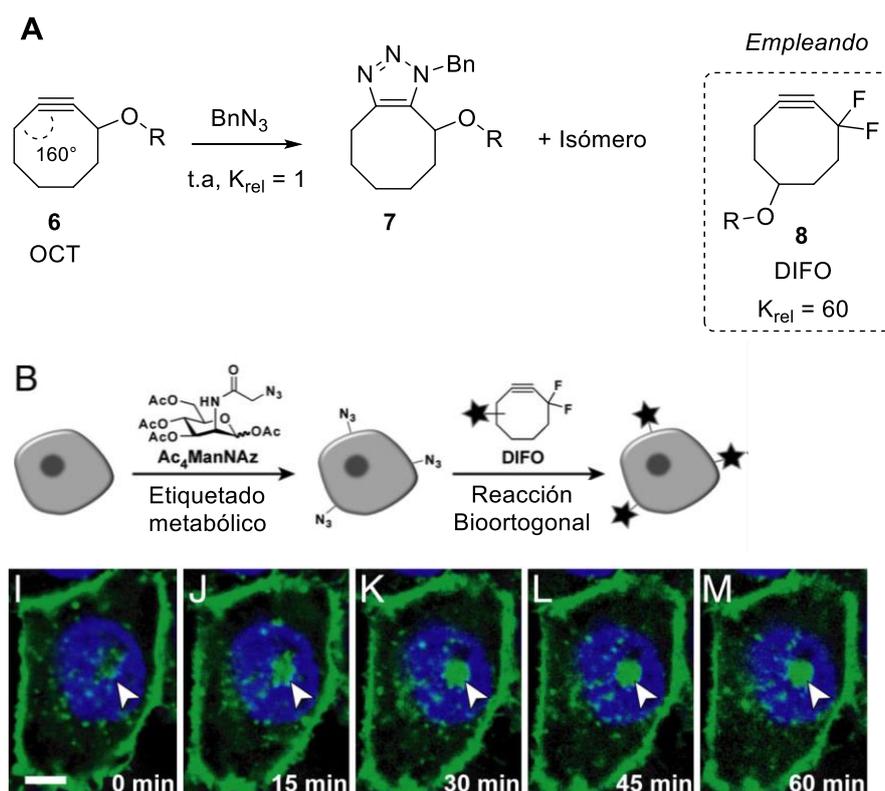


Figura I.2. A. Cicloadición entre azidas y cicloalquinos tensionados, en ausencia de Cu. B. Desarrollo de fluorescencia en células de ovario de hamster, como consecuencia de la reacción de cicloadición con un derivado de DIFO, conteniendo un marcador fluorescente.

¹² Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.

En este tipo de compuestos, los ángulos de enlace de los C sp son cercanos a 160°. Esta distorsión favorece el estado de transición de la cicloadición, aumentando notablemente la velocidad de reacción, por lo cual no se requiere de catalizadores de Cu para efectuar esta transformación.^{13,14}

Por otra parte, se estudiaron distintos catalizadores heterogéneos que presentan especies de Cu (I). De particular interés resultó el empleo de Cu₂O, que permite llevar a cabo la CuAAC en agua con excelentes rendimientos. En este medio, otras sales de Cu (I) presentaron rendimientos significativamente más bajos.¹⁵ Así mismo, CuI y CuBr pueden ser empleadas en solventes orgánicos, y en presencia de bases como DIPEA o pentametildietilentríamina (PMDTA), con mejores resultados.¹⁶ Cu₂O también puede ser empleado para la CuAAC, inmovilizado sobre carbón activado.¹⁷

I.1.2. CuAAC promovida por CuNPs

En trabajos llevados a cabo con el grupo de los Dres. Alonso y Yus, se ha desarrollado una nueva metodología para la obtención de nanopartículas metálicas, que actualmente se emplea en nuestro grupo de investigación. Esta se basa en la reducción rápida de los correspondientes cloruros del metal de interés (**Figura I.3**), empleando litio metálico y una cantidad catalítica de DTBB, en THF seco a temperatura ambiente y atmósfera inerte.

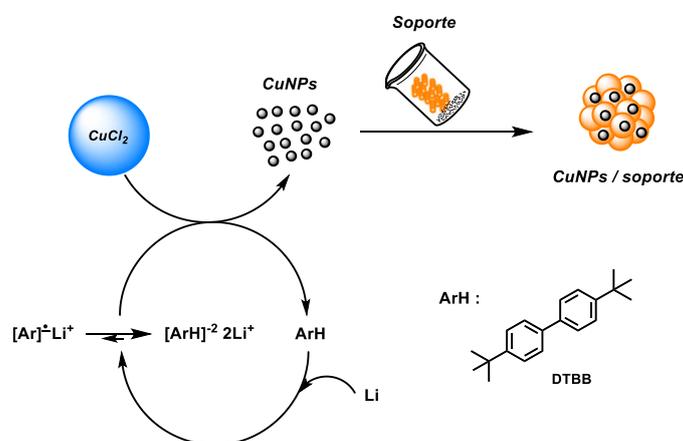


Figura I.3. Formación de CuNPs por reducción rápida con Li-DTBB.

¹³ Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (4), 1272–1279.

¹⁴ Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104 (43), 16793–16797.

¹⁵ Wang, K.; Bi, X.; Xing, S.; Liao, P.; Fang, Z.; Meng, X.; Zhang, Q.; Liu, Q.; Ji, Y. *Green Chem.* **2011**, 13 (3), 562–565.

¹⁶ (a) C. Shao, X. Wang, J. Xu, J. Zhao, Q. Zhang, Y. Hu. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 7002–7005. (b) X. Wang, Q. Zhang, S. Luo, J. Zhao, Y. Hu, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 6832–6836. (c) E. Jubeli, L. Moine, G. Barratt. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2010**, 48, 3178–3187.

¹⁷ Rojas-lima, S.; Santillan, R.; Universitaria, C. *Arkivok* **2013**, 2013 (iii), 139–164.

En el caso particular de las CuNPs, se emplea CuCl_2 anhidro, y cabe destacar que no se requieren agentes anti aglomerantes ni otros aditivos. El THF empleado como solvente resulta ser el más adecuado, y no da lugar a otras alternativas, ya que cumple un rol en la estabilización de las nanoparticulas. Esta metodología ha demostrado una gran versatilidad, ya que permite preparar tanto nanoparticulas desnudas, como nanoparticulas inmovilizadas, por adición de un soporte adecuado.

Estos catalizadores fueron caracterizados por microscopía electrónica de transmisión (TEM), determinándose que las nanopartículas presentan simetría esférica, con una distribución de tamaños alrededor de $3,0 \pm 1,5$ nm. La presencia de Cu metálico fue confirmada por energía dispersiva de rayos X (EDX) y difracción de rayos X (XRD). Estas CuNPs (10 mol %, sin soportar) fueron empleadas exitosamente como catalizadores para la CuAAC, con diversas azidas y alquinos terminales, en THF a reflujo, y bajo atmósfera inerte, empleando TEA como base. Cabe destacar la tolerancia a ciertos grupos funcionales, como los alcoholes, en el caso de emplear alcohol propargílico como alquino terminal. Además, debido a la reactividad de las CuNPs, los tiempos de reacción fueron comparables a aquellos reportados empleando calentamiento por microondas.¹⁸

Las CuNPs sin soportar presentan ciertas limitaciones, en particular, la necesidad de trabajar con azidas presintetizadas, y la imposibilidad de reuso del catalizador. Es por ello que en trabajos posteriores, estas CuNPs fueron inmovilizadas sobre distintos soportes inorgánicos, con el objeto de utilizarlas en reacciones multicomponente (MCRs), donde el primer paso involucra la formación de la azida, y el segundo la cicloadición. Las nanoparticulas soportadas sobre carbón activado (CuNPs/C) resultaron ser el catalizador más eficiente, y también fueron caracterizadas por TEM (distribución de tamaños: $6,0 \pm 2,0$ nm), mientras que el análisis por EDX y XRD muestra que las nanoparticulas se encuentran oxidadas, observándose las especies CuO y Cu_2O . Las CuNPs/C (0,5 mol%) fueron aplicadas en la obtención de 1,2,3-triazoles 1,4 disustituídos, a partir de halogenuros y alquinos terminales, en H_2O a 70°C . En comparación con las CuNPs sin soportar, la carga de catalizador fue menor, y el mismo puede ser reutilizado en 5 ciclos sin detectarse pérdidas de cobre (*leaching*). En contraste, los tiempos de reacción fueron más prolongados, y dependientes de los sustratos utilizados (halogenuros de tipo bencílico y alquinos aromáticos fueron la combinación más reactiva).¹⁹ También cabe destacar que, a pesar de tener un amplio alcance en términos de grupos funcionales presentes en los sustratos, no se emplearon azidas u alquinos conteniendo alcoholes en su estructura.

¹⁸ Alonso, F.; Moglie, Y.; Radivoy, G.; Yus, M. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50 (20), 2358–2362.

¹⁹ Alonso, F.; Moglie, Y.; Radivoy, G.; Yus, M. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352 (18), 3208–3214.

Para este tipo de reacción multicomponente también se emplearon CuNPs/MagSilica, en este caso con una mayor carga de catalizador (4,3 mol%). La ventaja que presenta este catalizador es la facilidad con que puede ser separado al final de la reacción, empleando un imán, debido a la naturaleza magnética del soporte.²⁰ La versatilidad de las CuNPs soportadas, en particular, CuNPs/C, queda demostrada al aplicar este catalizador en otras reacciones de tipo multicomponente, como la apertura de epóxidos empleando azidas, y posterior CuAAC empleando alquinos terminales²¹, como así también, la formación *in situ* de azidas aromáticas a partir de anilinas.²²

En la **Tabla I.1** se resumen los aspectos más destacados de las CuNPs, ya sean sin soportar o bien inmovilizadas sobre soportes inorgánicos, como catalizadores para la CuAAC.

CuNPs sin soportar	CuNPs soportadas
Mayor actividad catalítica, tiempos de reacción cortos (10-120 min).	Menor actividad, tiempos de reacción mayores en comparación con CuNPs sin soportar.
Se puede trabajar a t.a, sin alterar significativamente los tiempos de reacción. Esto permite emplear sustratos que contengan grupos lábiles.	Llevar a cabo la reacción a t.a aumenta considerablemente los tiempos de reacción.
Se debe preparar el catalizador al momento de realizar la reacción.	Permite emplear el catalizador almacenado sin ningún tipo de pretratamiento previo.
El solvente utilizado es THF, dado que estabiliza las NPs y evita su aglomeración.	Es compatible con agua y otros solventes, lo cual permite su aplicación en reacciones multicomponente.
Se requiere adicionar 1 eq. de base (TEA).	No se necesita agregar una base.
El catalizador no puede reutilizarse.	Permite el reuso del catalizador sin pérdida de actividad.

Tabla I.1. CuNPs sin soportar, e inmovilizadas sobre soportes, como catalizadores para la CuAAC.

²⁰ Nador, F.; Volpe, M. A.; Alonso, F.; Feldhoff, A.; Kirschning, A.; Radivoy, G. *Appl. Catal. A Gen.* **2013**, *455*, 39–45.

²¹ Alonso, F.; Moglie, Y.; Radivoy, G.; Yus, M. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (20), 8394–8405.

²² Alonso, F.; Moglie, Y.; Radivoy, G.; Yus, M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (18), 6385–6395.

I.1.3. Relevancia del anillo de triazol en química medicinal

El anillo de 1,2,3-triazol es extensamente empleado en química medicinal, debido a que sus propiedades (elevado momento dipolar, capacidad de generar interacciones de tipo puente de hidrógeno y estabilidad metabólica, entre otras) lo convierten en un excelente farmacóforo. A raíz del desarrollo de la CuAAC, la formación del anillo de 1,2,3-triazol, conteniendo fragmentos estructurales de interés, se convirtió en un excelente recurso empleado en química combinatoria. Existen distintos agentes quimioterapéuticos conteniendo 1,2,3-triazoles: anticancerígenos,^{23,24} antimicrobiales,^{25,26} y antivirales,^{27,28} entre otros. Las aplicaciones más relevantes se resumen en la **Figura I.4**.

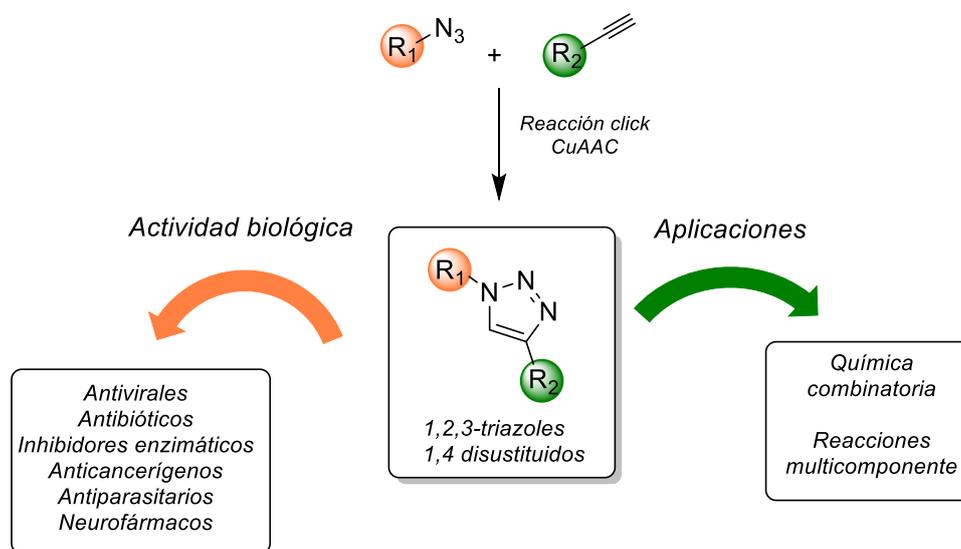


Figura I.4. Aplicaciones de la CuAAC en síntesis orgánica y actividad biológica en moléculas que poseen el anillo 1,2,3-triazol.

Entre las propiedades del anillo de 1,2,3-triazol que podemos mencionar, se destacan su estabilidad frente a la hidrólisis, tanto en condiciones ácidas como básicas, y su resistencia a la degradación metabólica, incluso bajo condiciones redox. También son estables frente a la oxidación, pero son más sensibles en condiciones reductoras. Por otra parte, el anillo 1*H*-1,2,3-

²³ Kommididi, H; Guo, H; Nurili, F, et al. *J Med Chem.* **2018**, *61*, 4256–4262.

²⁴ Duan, Y. C.; Ma, Y. C.; Zhang, E.; Shi, X. J.; Wang, M. M.; Ye, X. W.; Liu, H. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 11–19.

²⁵ Lopes, S. M. M.; Novais, J. S.; Costa, D. C. S.; Castro, H. C.; Figueiredo, A. M. S.; Ferreira, V. F.; Pinho e Melo, T. M. V. D.; da Silva, F. de C. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 1010–1020.

²⁶ Savanur, H. M.; Naik, K. N.; Ganapathi, S. M.; Kim, K. M.; Kalkhambkar, R. G. *ChemistrySelect* **2018**, *3* (19), 5296–5303.

²⁷ Cheng, H.; Wan, J.; Lin, M. I.; Liu, Y.; Lu, X.; Liu, J.; Xu, Y.; Chen, J.; Tu, Z.; Cheng, Y. S. E.; et al. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (5), 2144–2153.

²⁸ Mohan, S.; McAtamney, S.; Haselhorst, T.; Von Itzstein, M.; Pinto, B. M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (20), 7377–7391.

triazol, sin sustituyentes, puede tautomerizar a 2*H*-1,2,3-triazol en soluciones acuosas (véase **Figura I.1**, p.1).²⁹

Respecto a la interacción con dianas biológicas, el anillo de 1,2,3-triazol puede dar lugar a interacciones de π -stacking y de puente de hidrógeno. Además, posee un momento dipolar elevado, que depende del patrón de sustitución. Experimentalmente, la mezcla tautomérica de 1*H* y 2*H*-1,2,3-triazol presenta un momento dipolar de 1,85 D a 25°C, y de 2,08 D a 45°C (**Figura I.5-I**).³⁰ Estos valores coinciden en gran medida con los calculados, por lo cual, para los triazoles sustituidos, el momento dipolar se estima mediante métodos computacionales. Puede observarse que los triazoles de tipo **9** presentan mayor momento dipolar que amidas de estructura similar, **10** (**Figura I.5-II**).³¹

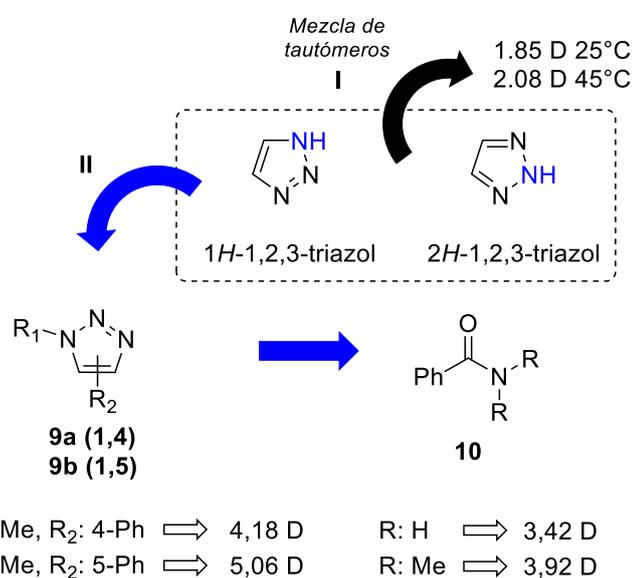


Figura I.5. Momentos dipolares de 1,2,3-triazoles. I. Valores experimentales de la mezcla tautomérica de 1,2,3-triazoles. II. Valores calculados para triazoles 1,4-disustituídos, en comparación con amidas de estructura similar.

En cuanto a las interacciones de π -stacking, es importante destacar el gran carácter aromático que presenta el anillo de 1*H*-1,2,3-triazol. Entre distintos azoles, su índice de aromaticidad es similar al de pirrol y pirazol, y a su vez superior a los de los anillos de imidazol y tetrazol.³² Además, resulta relevante el carácter “ácido” del H en posición 5 del 1,2,3-triazol, que puede comportarse como donador de puente de H. Esto puede ocurrir en general para los

²⁹ Albert, A.; Taylor, P. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. **1989**, 11, 1903–1905.

³⁰ W.-Q. Fan, A. R. Katritzky. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II: Five-Membered Rings with More than Two Heteroatoms and Fused Carbocyclic Derivatives*, Vol. 4. Washington DC, **1996**.

³¹ Abboud, J. L. M.; Foces-Foces, C.; Notario, R.; Trifonov, R. E.; Volovodenko, A. P.; Ostrovskii, V. A.; Alkorta, I.; Elguero, J. *European J. Org. Chem.* **2001**, No. 16, 3013–3024.

³² Kotelevskii, S. I.; Prezhdo, O. V. *Tetrahedron* **2001**, 57 (27), 5715–5729.

grupos CH unidos a N u O en heterociclos.³³ Aunque este enlace es considerado débil, se encuentra ampliamente distribuido en estructuras de proteínas (particularmente en tirosina, fenilalanina y triptófano), representando hasta un 25% del total de puentes de H, y podría tener un rol fundamental en química medicinal. El enlace C-H \cdots O presenta una energía promedio de 1-2 kcal/mol, que se corresponde con energías asociadas a cambios conformacionales en moléculas pequeñas, o de fuerzas responsables de la estructura terciaria en macromoléculas.

En el caso particular de 1,2,3-triazoles, este tipo de enlace se encontró en diversas moléculas cristalizadas junto a proteínas, con mayor ocurrencia en derivados 1,4-disustituidos.³⁴ Además del H en C5, que puede actuar como donador de puente de H al igual que el grupo NH en amidas, el C4 se encuentra polarizado y se asemeja electrónicamente al grupo carbonilo en amidas (**Figura I.6**).³⁵

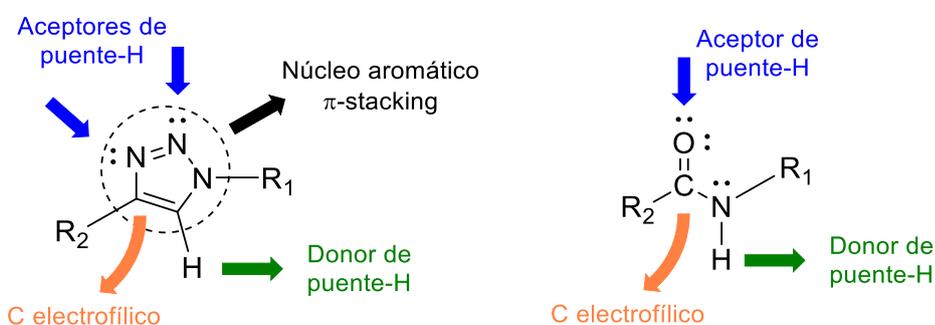


Figura I.6. Tipos de interacciones que puede presentar el anillo de 1,2,3-triazol, en comparación con amidas *N*-sustituidas.

I.1.3.i. Anillo de 1,2,3-triazol como bioisómero de amidas

Considerando las similitudes descritas previamente entre el anillo de 1,2,3-triazol, y las amidas, no es de extrañar que el anillo de 1,2,3-triazol pueda emular enlaces de tipo peptídico. La diferencia principal es que el anillo de triazol no es susceptible a hidrolizarse, como ocurre con las amidas. No obstante, existen diferencias entre ambas especies, por ejemplo, el átomo de carbono extra en el triazol **12**, respecto a la amida **11**, genera una distancia adicional de aproximadamente 1,2 Å entre los grupos unidos a este heterociclo (**Figura I.7**, p.11). Además, presentan un momento dipolar mayor que las amidas, cuyos valores oscilan entre 3 y 4 D³⁶

³³ Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5061–5084.

³⁴ Massarotti, A.; Aprile, S.; Mercalli, V.; Del Grosso, E.; Grosa, G.; Sorba, G.; Tron, G. C. *ChemMedChem* **2014**, *9* (11), 2497–2508.

³⁵ Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28* (2), 278–308.

³⁶ Purcell, W. P.; Singer, J. A., *J. Phys. Chem.* **1967**, *71*, 4316–4319.

(véase también compuesto **9a**, **Figura I.5-II**) lo cual aumenta la capacidad del anillo de 1,2,3-triazol de actuar como donador y aceptor de puente de H.

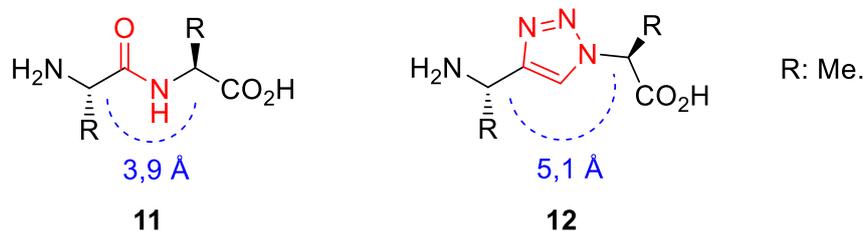


Figura I.7. Anillo de 1,2,3-triazol como bioisótero del enlace amida.³⁷

Como ejemplo concreto del reemplazo amida-triazol podemos mencionar la síntesis de análogos de Amprenavir, un inhibidor de la proteasa del virus de inmunodeficiencia humana VIH-1. Empleando la *reacción click* como herramienta en química combinatoria, se sintetizó una familia de derivados, de los cuales los compuestos AB2 y AB3, presentaron la mayor actividad inhibitoria de esta proteasa (**Figura I.8**).³⁸

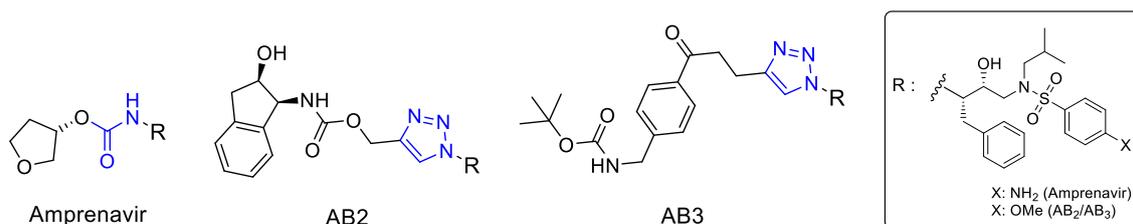


Figura I.8. Derivados de Amprenavir que presentan un anillo de triazol en reemplazo del enlace amida.

Resulta de interés mencionar que la determinación cristalográfica de los complejos entre los inhibidores y la proteasa VIH-1 mostraron que todos los compuestos se unen de la misma forma, y en posiciones idénticas. Esto confirma que, para este caso particular, los triazoles pueden actuar como miméticos del enlace amida.

Otro caso representativo de bioisosterismo entre triazoles y amidas es el estudio de oligómeros conteniendo 1,2,3-triazoles (**13**, **Figura I.9-I**, p.12), emulando el enlace peptídico, en los cuales se observa que los mismos adoptan una conformación similar a las láminas β observadas en péptidos, debido a las interacciones dipolo-dipolo entre anillos de triazol (**Figura I.9-II**, p.12).³⁹

³⁷ Angell, Y. L.; Burgess, K. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36 (10), 1674–1689.

³⁸ Brik, A.; Alexandratos, J.; Lin, Y. C.; Elder, J. H.; Olson, A. J.; Wlodawer, A.; Goodsell, D. S.; Wong, C. H. *ChemBioChem* **2005**, 6 (7), 1167–1169.

³⁹ Angelo, N. G.; Arora, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (49), 17134–17135.

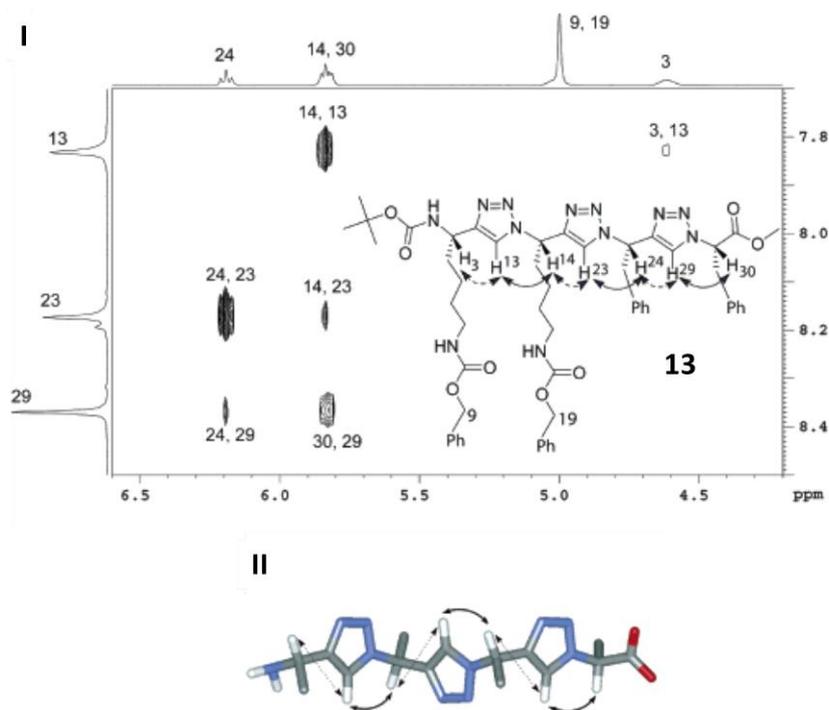


Figura I.9. Oligómeros que presentan triazoles emulando enlaces amida. I. Espectro de RMN ROESY, mostrando las correlaciones entre los H aromáticos del triazol y protones adyacentes. II. Estructura en zig-zag propuesta teniendo en cuenta esas interacciones.³⁹

El reemplazo isostérico amida-triazol también fue aplicado en el campo de estudio del cáncer. El Imatinib (**Figura I.10**) es una droga comercial empleada en el tratamiento de leucemia mieloide crónica, y su enlace amida fue sustituido por el anillo de 1,2,3-triazol para dar lugar a un nuevo fármaco. El compuesto resultante, FA030, presentó potencias similares, y en algunos casos mayores, frente a distintas líneas de cáncer.⁴⁰

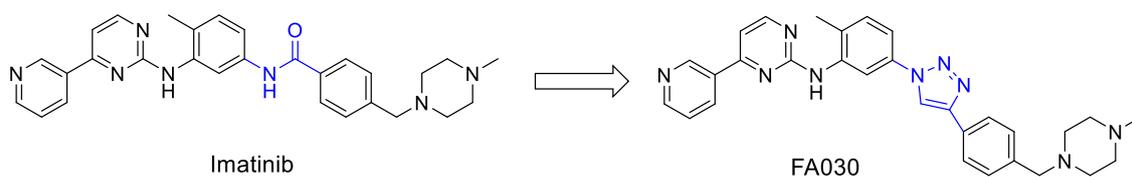


Figura I.10. Anticancerígeno FA030, derivado de Imatinib conteniendo el anillo de 1,2,3-triazol.

⁴⁰ Arioli, F.; Borrelli, S.; Colombo, F.; Falchi, F.; Filippi, I.; Crespan, E.; Naldini, A.; Scalia, G.; Silvani, A.; Maga, G.; et al. *ChemMedChem* **2011**, 6 (11), 2009–2018.

I.1.3.ii. Anillo de 1,2,3-triazol como bioisótero de otros heterociclos

La síntesis de análogos de drogas conocidas es uno de los enfoques más importantes en química medicinal, y en particular en el descubrimiento de nuevos fármacos. Mediante esta aproximación se buscan resolver distintas problemáticas: el desarrollo de resistencia al fármaco original, la necesidad de mejorar la selectividad, disminuir la toxicidad, o mejorar la farmacocinética del agente quimioterapéutico. La obtención de bioisómeros de moléculas activas es una de las técnicas más empleadas en la síntesis de nuevos análogos, y el anillo de 1,2,3-triazol es uno de los bioisómeros más empleados para sustituir enlaces amida, como así también distintos heterociclos (compuestos **14-16**, **Figura I.11**). También se emplean para sustituir ácidos carboxílicos u ésteres, pero con menor frecuencia.⁴¹

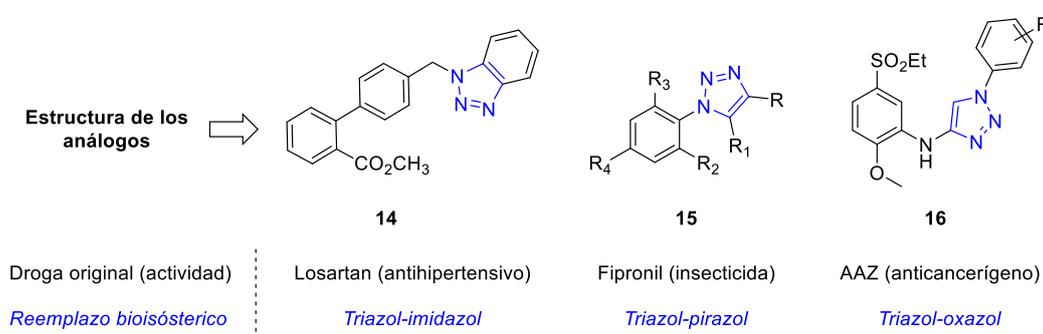


Figura I.11. Reemplazo bioisostérico, empleando 1,2,3-triazoles, sobre distintos heterociclos que forman parte de drogas conocidas.

Además de ser mimético de heterociclos, el anillo de 1,2,3-triazol puede actuar como bioisótero de alquenos, a modo de análogo rígido, dado que emula las restricciones conformacionales generadas por el doble enlace. La principal ventaja es que el anillo de triazol no está sujeto a isomerizaciones o degradaciones *in vivo*, las cuales pueden ocurrir en alquenos. En análogos de resveratrol, se emplearon triazoles para mimetizar el enlace *trans*-olefínico (compuestos tipo **17**, **Figura I.12**), y se encontró que algunos de los triazoles presentaron actividad antiproliferativa en las líneas de cáncer evaluadas.

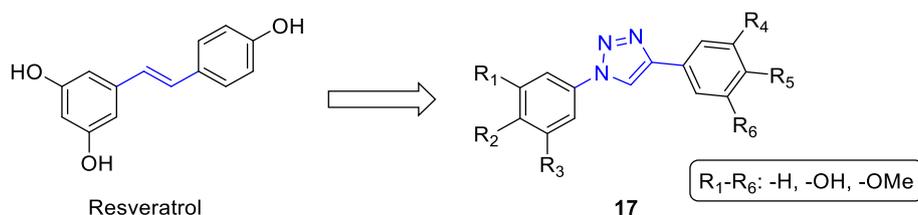


Figura I.12. Análogos rígidos de Resveratrol conteniendo 1,2,3-triazoles.

⁴¹ Bonandi, E.; Christodoulou, M. S.; Fumagalli, G.; Perdicchia, D.; Rastelli, G.; Passarella, D. *Drug Discov. Today* **2017**, 22 (10), 1572–1581.

I.1.3.iii. CuAAC en química combinatoria: síntesis de dímeros, quimeras y bibliotecas de compuestos bioactivos

Dado que el anillo de 1,2,3-triazol es relativamente inerte, desde el punto de vista químico, también puede ser empleado como conector (o *linker*) en la formación de dímeros, quimeras o fármacos multidiana. Uno de los primeros usos de la *química click* en la formación de homodímeros se realizó en el campo de la vitamina D, sintetizando el dímero **18** a través de la formación del triazol sobre la cadena lateral (**Figura I.13**). Sin embargo, este compuesto resultó inactivo, ya que no se observaron efectos antiproliferativos en líneas celulares de cáncer.⁴² La síntesis de análogos triazol-vitamina D se abordará con mayor detalle en el [Capítulo III](#) de la presente memoria.

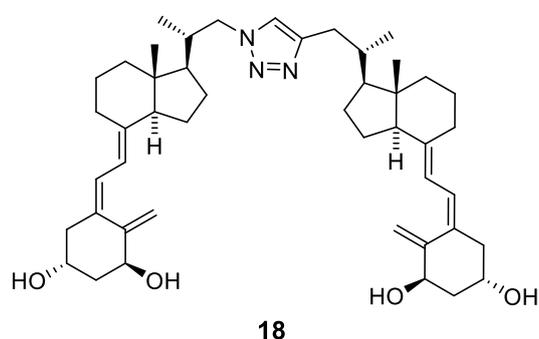


Figura I.13. Dímero de vitamina D₃, generado a través del anillo de 1,2,3-triazol.

En el campo de antibióticos, se empleó al anillo de triazol para formar quimeras, también denominados heterodímeros, de distintos antibióticos, por ej., vancomicina, un macrólido, y cefalosporina (**19**, **Figura I.14**), observándose efectos sinérgicos en su acción sobre distintos tipos de bacterias.

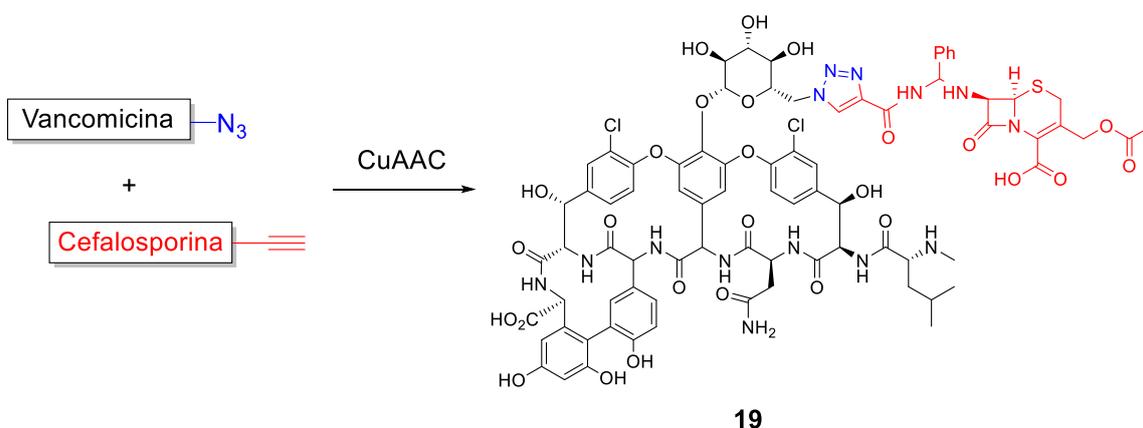


Figura I.14. Heterodímero Vancomicina-Cefalosporina, sintetizado empleando química combinatoria.

⁴² Suh, B. C.; Jeon, H. B.; Posner, G. H.; Silverman, S. M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45 (24), 4623–4625.

Otro ejemplo del empleo de la reacción click en química combinatoria se da en inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa, donde la formación del triazol permite ensamblar distintos fragmentos de interés (Triazoles del tipo **21**, **Figura I.15**).⁴³ Esto es particularmente útil en el caso de enzimas, u otras proteínas, que presentan sitios activos muy amplios, o distintos bolsillos de unión. La rápida obtención de esta familia de compuestos permitió identificar un inhibidor más potente, **21a**, que el compuesto de referencia **20**.

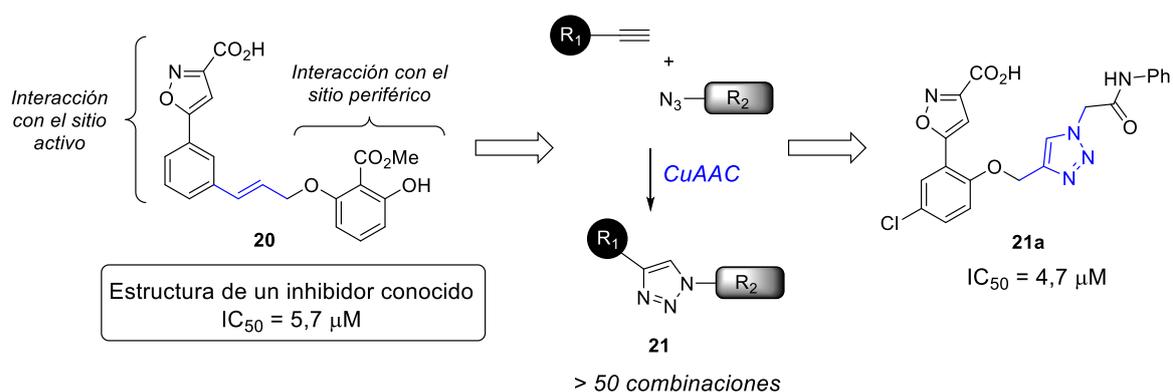


Figura I.15. Química click aplicada al desarrollo de inhibidores de tirosina-fosfatasa.

Otra aplicación interesante consiste en acoplar reacciones multicomponente con la CuAAC, para generar rápidamente librerías extensas de compuestos de interés. Por ejemplo, se sintetizaron triazoles derivados de dihidropirimidonas a partir de la reacción de Biginelli.⁴⁴ Para ello, una vez efectuada la MCR, se procedió a generar una azida en posición C6 de estos derivados (compuestos tipo **22**, **Figura I.16**), para luego llevar a cabo la CuAAC con distintos alquinos, **23**, dando lugar a la familia de compuestos **24**.

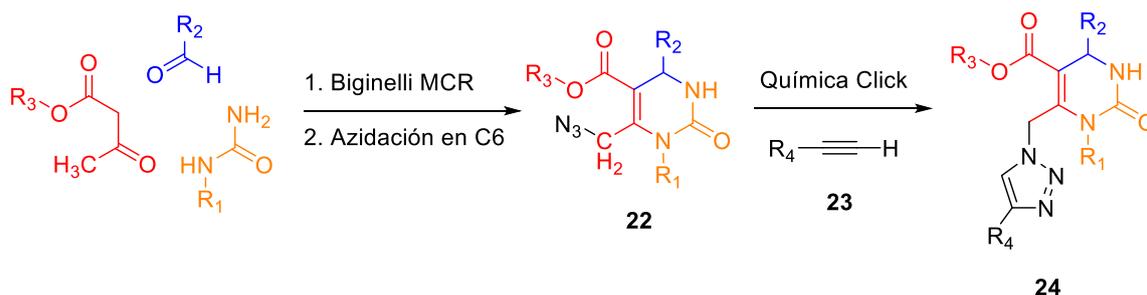


Figura I.16. Reacción de Biginelli seguida de CuAAC aplicada a la síntesis de dihidropirimidonas sustituidas con 1,2,3-triazoles.

⁴³ Srinivasan, R.; Uttamchandani, M.; Yao, S. Q. *Org. Lett.* **2006**, 8 (4), 713–716.

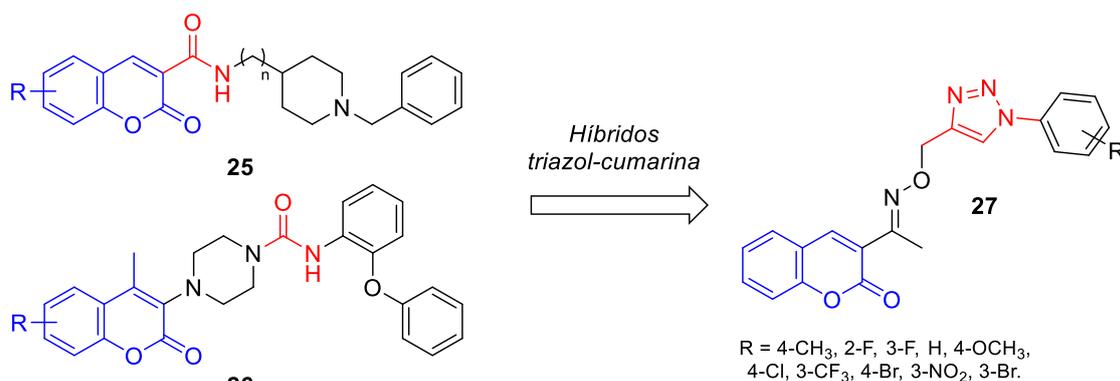
⁴⁴ Khanetsky, B.; Dallinger, D.; Kappe, C. O. *J. Comb. Chem.* **2004**, 6 (6), 884–892.

I.1.4. Derivados de 1,2,3-triazol con actividades biológicas de interés.

Dado el extenso número de compuestos biológicamente activos que presentan en su estructura al anillo de 1,2,3-triazol, nos enfocaremos en ejemplos concretos de derivados que presentan actividades biológicas de interés, principalmente anticancerígenos y neurofármacos. En función de su estructura, también haremos hincapié en derivados de triazol que presenten esteroides o funciones fosforadas, que también fueron objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

I.1.4.i. Triazoles como agentes neuroprotectores

El diseño, síntesis y modificaciones de agentes neuroprotectores empleando el anillo de 1,2,3-triazol para formar híbridos ha sido objeto de estudio durante los últimos años. Por ejemplo, tomando como base cumarinas con actividad neuroprotectora (compuestos **25** y **26**, **Figura I.17**) se sintetizaron derivados triazol-cumarina, **27**, que presentan actividad neuroprotectora frente al estrés oxidativo.⁴⁵



Cumarinas con actividad neuroprotectora

Figura I.17. Derivados triazol-cumarina con actividad antioxidante.

Otro caso es el de los derivados cumarina-triazol-ácido lipoico (**28**, **Figura I.18**) que además de presentar actividad neuroprotectora, a través de la inhibición de radicales libres, actúan como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). También se encontró que evitan la agregación de péptidos β -amiloides, siendo buenos candidatos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA).⁴⁶ Híbridos triazol-tacrina, **29**, también presentan actividad inhibitoria de AChE.⁴⁷

⁴⁵ Kumari, M. A.; Rao, C. V.; Triloknadh, S.; Harikrishna, N.; Venkataramaiah, C.; Rajendra, W.; Trinath, D.; Suneetha, Y. *Res. Chem. Intermed.* **2018**, *44* (3), 1989–2008.

⁴⁶ Jalili-Baleh, L.; Forootanfar, H.; Küçükılınç, T.T., et al. *Eur J Med Chem.* **2018**, *152*, 600–614.

⁴⁷ Wu G, Gao Y, Kang D, et al. *MedChemComm.* **2018**, *9*, 149–159.

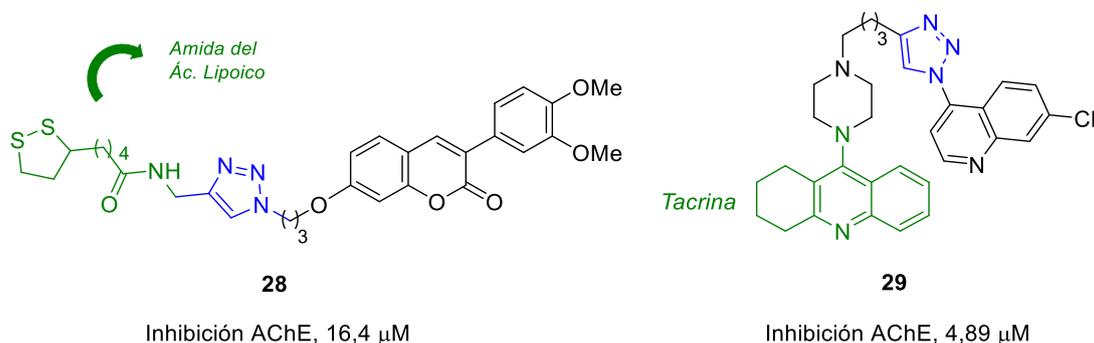


Figura I.18. Fármacos híbridos conteniendo triazoles, que presentan acción inhibitoria de AChE.

Los ejemplos previamente descritos demuestran la utilidad del anillo de 1,2,3-triazol en la síntesis de fármacos híbridos, que resultan de la unión de dos fragmentos estructurales de interés.

I.1.4.ii. Compuestos con actividad anticancerígena

Aunque el anillo de 1,2,3-triazol no existe en la naturaleza, sus excelentes propiedades como farmacóforo promovieron el estudio de este tipo de compuestos para el desarrollo de drogas con actividad anti-cáncer.⁴⁸ En particular, se destacan los compuestos derivados de productos naturales. La incorporación de un anillo de 1,2,3-triazol en el anillo A del ácido betulínico (**Figura I.19**), pentaciclo de origen triterpenoide que presenta actividad antitumoral, dio lugar a derivados (compuestos tipo **30**) con una potencia de 5 a 7 veces mayor que el producto natural, dependiendo del sustituyente contenido en la azida.⁴⁹

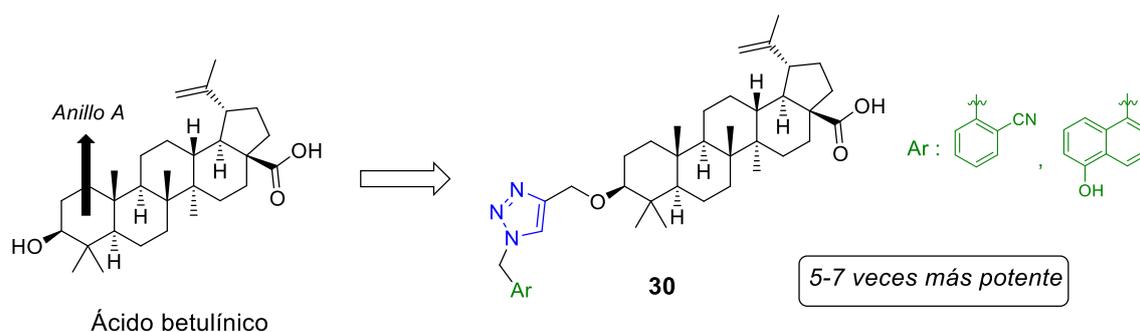


Figura I.19. Derivados de ácido betulínico conteniendo 1,2,3-triazoles.

También se sintetizaron triazoles derivados de esteroides, como la pregnenolona, un metabolito del colesterol (**Figura I.20**, p.18). Se creó una biblioteca de 21 compuestos (triazoles tipo **31**), de los cuales varios presentaron una excelente actividad en líneas de cáncer de

⁴⁸ Lal, K.; Yadav, P. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2016**, *18* (1), 21–37.

⁴⁹ R. Majeed, R.; Sangwan, P.L.; Chinthakindi, P.K.; Khan, I.; Dangroo, N.A.; Thota, N. Hamid, A.; Sharma, P.R.; Saxena, A.K.; Koul, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 782–792.

próstata.⁵⁰ Por otra parte, otros derivados triazol-pregnenolona, **32**, presentan actividad antiparasitaria frente a la leishmaniasis.⁵¹

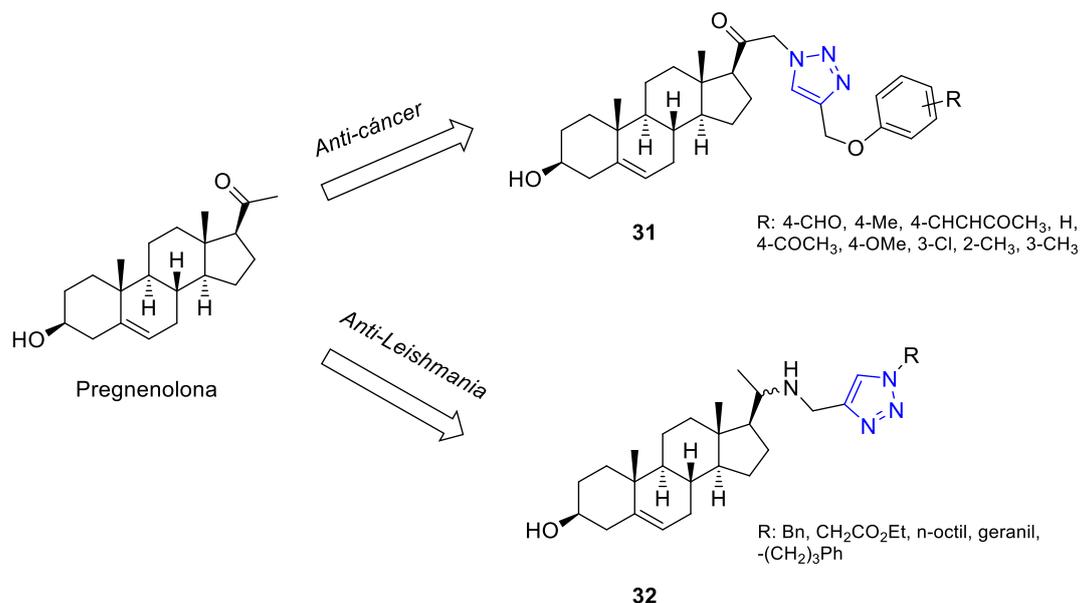


Figura I.20. Derivados triazol-pregnenolona con actividad anticancerígena y antiparasitaria.

Otros triazoles derivados de productos naturales, con estructura tipo terpenoide, y que incorporan bisfosfonatos como funcionalidades de fósforo, presentan actividad anticancerígena (**33** y **34**, **Figura I.21**). Su mecanismo de acción implica la inhibición de la enzima geranil-geranil difosfato sintasa (GGDPS).⁵²

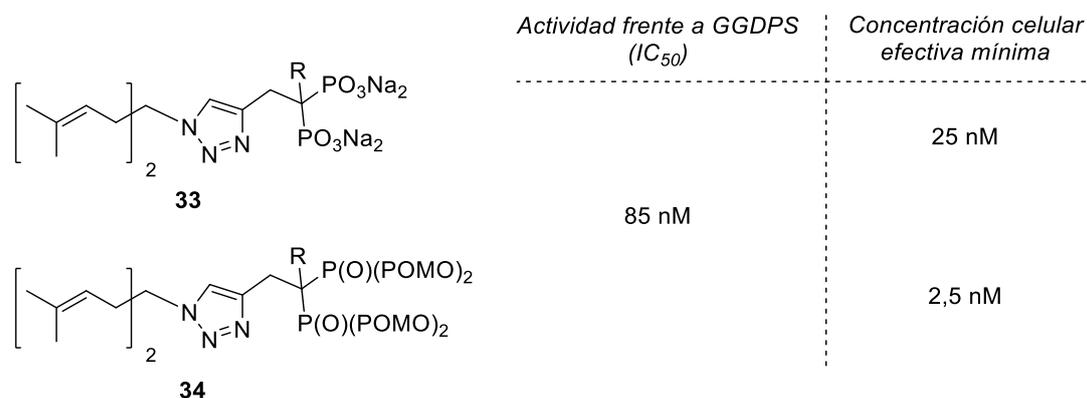


Figura I.21. Derivados triazol-bisfosfonato con acción anticancerígena.

El grupo pivaloximetil (POM) actúa como profármaco del ácido fosfónico, debido a su elevada polaridad. Estos casos se analizarán en la [Sección I.2.1.iv](#).

⁵⁰ Banday, A.H.; Shameem, S.A.; Gupta, B.D.; Kumar, H.M. *Steroids*. **2010**, *75*, 801-804.

⁵¹ Porta, E. O. J.; Carvalho, P. B.; Avery, M. A.; Tekwani, B. L.; Labadie, G. R. *Steroids* **2014**, *79*, 28-36.

⁵² Matthiesen, R.A.; Varney, M.L.; Xu, P.C.; Rier, A.S.; Wiemer, D.F.; Holstein, S.A. *Bioorg Med Chem*. **2018**; *26*, 376-385.

I.1.4.iii. Derivados triazol-fosfonato con actividad antiviral

Derivados de bases nitrogenadas y nucleósidos se emplean como antivirales, sin embargo, en la mayoría de los casos se presentan problemas de toxicidad y/o resistencia a la droga. La estrategia sintética empleada para obtener nuevos compuestos involucra el reemplazo de la pentosa y el grupo fosfato, presentes en los productos naturales, por cadenas acíclicas y ácidos fosfónicos, los cuales son menos lábiles (Adefovir, Tenofovir, Cidofovir, **Figura I.22-I**). El reemplazo de las bases nitrogenadas por otros heterociclos, o la combinación de ambos, también se utilizó para obtener nuevos compuestos con esta actividad. El anillo de 1,2,3-triazol, en combinación con grupos fosfonato, se encuentra presente en distintos compuestos con actividad antiviral (compuestos **35-37**, **Figura I.22-II**).^{53,54}

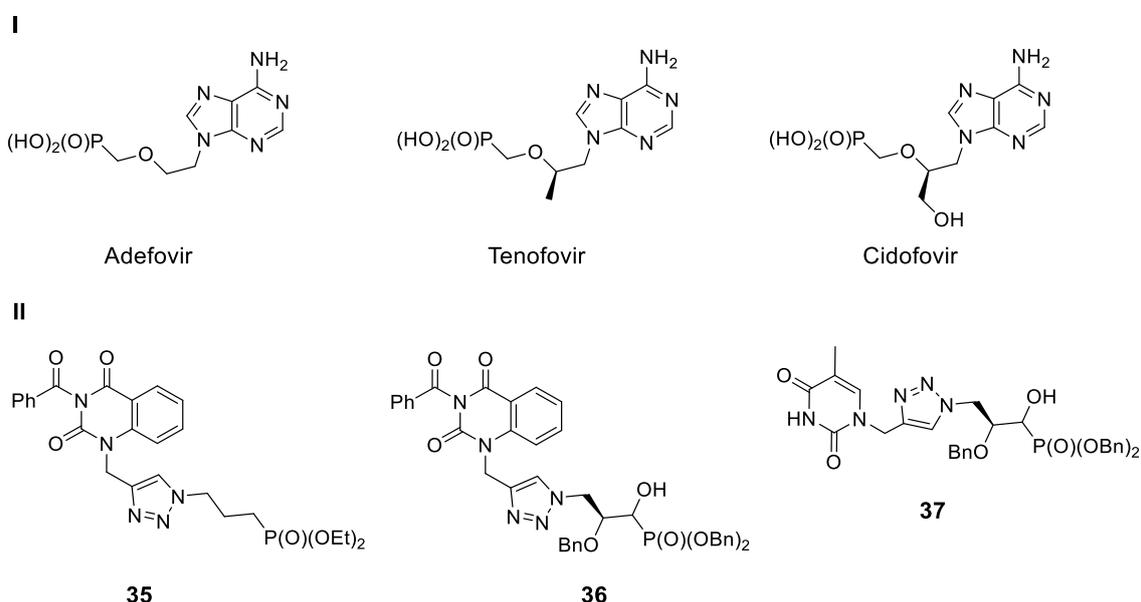


Figura I.22. Antivirales derivados de bases nitrogenadas que incorporan ácidos fosfónicos (**I**), o al anillo de 1,2,3-triazol y grupos fosfonato (**II**).

Existe un gran número de moléculas que presentan actividad biológica debido a la incorporación de grupos fosfonatos, ácidos fosfónicos o derivados. Los distintos tipos de funciones fosforadas, como así también los casos de bioisosterismo involucrados, se estudiarán en detalle en la siguiente sección.

⁵³ Głowacka, I. E.; Balzarini, J.; Wróblewski, A. E. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 703–722.

⁵⁴ Głowacka, I. E.; Balzarini, J.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Schols, D.; Piotrowska, D. G. *Bioorganic Med. Chem.* **2014**, *22* (14), 3629–3641.

I.2. Actividad biológica de ácidos fosfónicos y derivados

Existe un gran número de compuestos naturales que presentan al grupo ácido fosfónico en su estructura, los cuales participan en numerosas funciones biológicas. Este grupo presenta interacciones únicas con sus dianas biológicas, debido a su geometría trigonal piramidal, su capacidad de actuar como quelante y su función dual como aceptor y donador de puente de hidrógeno a pH fisiológico.⁵⁵ El empleo del grupo ácido fosfónico en procesos de descubrimiento de fármacos ha sido exitoso en numerosos casos, detectándose en los últimos años nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades como diabetes⁵⁶, asma⁵⁷, inflamación⁵⁸, fallas cardíacas⁵⁹, cáncer⁶⁰, malaria⁶¹ y VIH.⁶²

Este amplio espectro de actividades biológicas, ejercidas por el grupo fosfonato u ácido fosfónico, puede explicarse teniendo en cuenta que los mismos pueden actuar como bioisómeros del grupo fosfato, el cual presenta gran importancia en procesos biológicos.

I.2.1. Fosfonatos como bioisómeros de fosfatos y otras funciones orgánicas

El grupo fosfato se encuentra involucrado en un gran número de procesos biológicos. A modo de ejemplo, puede mencionarse que están presentes en el ADN y ARN como fosfodiésteres, que la principal reserva energética, adenosin trifosfato (ATP), está compuesta de grupos fosfatos, y que este grupo se encuentra también en muchos metabolitos intermediarios, que resultan esenciales en procesos bioquímicos de síntesis o degradación.⁶³

Sin embargo, la incorporación de grupos fosfato en un fármaco no resulta atractiva, debido a dos razones. Por una parte, la elevada polaridad de este grupo cargado produce que moléculas que contengan al mismo no sean capaces de atravesar membranas celulares. Esto es

⁵⁵ Demmer, C. S.; Krogsgaard-Larsen, N.; Bunch, L. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (12), 7981–8006.

⁵⁶ (a) Van Huijsduijnen, R. H.; Sauer, W. H. B.; Bombrun, A.; Swinnen, D. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4142-4146. (b) Dang, Q.; Kasibhatla, S. R.; Xiao, W.; Liu, Y.; DaRe, J.; Taplin, F.; Reddy, K. R.; Scarlato, G. R.; Gibson, T.; van Poelje, P. D.; Potter, S. C.; Erion, M. D. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 441-451.

⁵⁷ Maryanoff, B. E. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 769-787.

⁵⁸ Greco, M. N.; Hawkins, M. J.; Powell, E. T.; Almond, J.; H. R.; de Garavilla, L.; Hall, J.; Minor, L. K.; Wang, Y.; Corcoran, T. W.; Di Cera, E.; Cantwell, A. M.; Savvides, S. N.; Damiano, B. P.; Maryanoff, B. E. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1727-1730.

⁵⁹ Kumar, T. S.; Zhou, S.-Y.; Joshi, B. V.; Balasubramanian, R.; Yang, T.; Liang, B. T.; Jacobson, K. A. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2562-2576.

⁶⁰ (a) Kang, S.-U.; Shi, Z.-D.; Worthy, K. M.; Bindu, L. K.; Dharmawardana, P. G.; Choyke, S. J.; Bottaro, D. P.; Fisher, R. J.; Burke, T. R., Jr. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3945-3948. (b) Lee, M.; Fong, E. M.; Singer, F. R.; Guenett, R. S. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 2602-2608.

⁶¹ Haemers, T.; Wiesner, J.; Van Poecke, S.; Goeman, J.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1888-1891.

⁶² Balzarini, J.; Holy, A.; Jindrich, J.; Naesens, L.; Snoeck, R.; Schols, D.; De Clercq, E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 332-338.

⁶³ Westheimer, F. H. *Science* **1987**, *235* (1), 1173–1178.

útil en el caso de mensajeros celulares, que deben permanecer dentro de la célula, pero no en fármacos que sean aplicados de manera exógena, dado que solo podrían actuar sobre receptores de membrana y no sobre proteínas intracelulares.⁶⁴

Por otro lado, el grupo fosfato presenta poca estabilidad en células, dado que será rápidamente degradado por la acción de enzimas fosfatasas. En consecuencia, se ha buscado identificar grupos funcionales que puedan actuar como bioisómeros de grupos fosfato. El principal desafío a la hora de desarrollar fármacos de este tipo puede resumirse de la siguiente manera: un bioisómero funcional del grupo fosfato debería unirse a las regiones de proteínas que interaccionan con grupos fosfatos cargados, pero aun así no ser demasiado polar, de modo que sea permeable a membranas celulares.

En la **Figura I.23** se muestran los principales reemplazos isostéricos llevados a cabo a la hora de desarrollar nuevos fármacos.

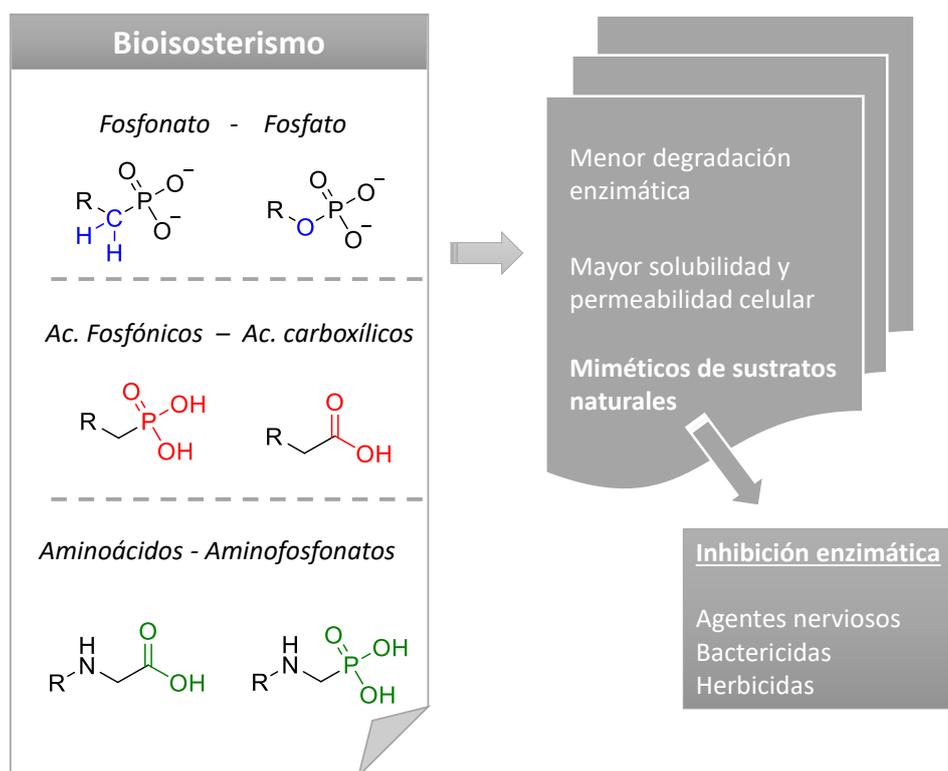


Figura I.23. Principales reemplazos isostéricos que involucran a los grupos fosfato y fosfonato.

⁶⁴ Elliott, T. S.; Slowey, A.; Ye, Y.; Conway, S. J. *Medchemcomm* **2012**, 3 (7), 735–751.

I.2.1.i. Fosfonatos como bioisómeros de fosfatos

El grupo fosfonato puede actuar como bioisómero del grupo monoéster fosfato. Para ello, debemos considerar el reemplazo isostérico de un átomo de oxígeno por un grupo metileno, tal como se muestra en la **Figura I.24**.



Figura I.24. Bioisosterismo entre grupos fosfato y fosfonato.

El enlace C-P presente en los fosfonatos presenta mayor estabilidad térmica, y mayor resistencia a la degradación enzimática, respecto al enlace O-P en fosfatos.⁶⁵

I.2.1.i.a. Consideraciones estructurales

Para que este reemplazo isostérico conduzca a miméticos biológicamente activos, es necesario mantener las distancias entre la función fosforada y otros grupos funcionales presentes en la molécula, imprescindibles a la hora de ejercer la actividad biológica.⁶⁶ Teniendo esto en consideración, se estudiaron las diferencias en los ángulos y distancias de enlace para ambas funciones fosforadas. A partir de datos cristalográficos de fosfonatos y fosfatos de estructura simple, se determinó que existen diferencias significativas entre:

- Ángulos de enlace C-O-P en comparación con C-C-P.
- Ángulos de enlace C-P-O en comparación con O-P-O.
- Distancias de enlace C-C en comparación con C-O.
- Distancias de enlace O-P en comparación con C-P.

A pesar de esto, solo se encontraron pequeñas variaciones en las distancias entre los grupos fosfato, o fosfonato, y otras funcionalidades de interés, por ejemplo, en la comparación entre las estructuras cristalinas del 2-aminoetanolfosfato y el ácido 2-aminoetilfosfónico.^{67,68} Esto implica que es factible realizar este reemplazo isostérico, pudiendo mantener la actividad biológica deseada.

⁶⁵ Horsman, G. P.; Zechel, D. L. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (8), 5704–5783.

⁶⁶ Engel, R. Phosphonic Acids and Phosphonates as Antimetabolites. In *The Role of Phosphonates in Living Systems*, 1era Edición; Hilderbrand, R. L.; CRC Press: Florida, **2017**.

⁶⁷ Kraut, J. *Acta Crystallogr.* **1961**, *14*, 146.

⁶⁸ Okaya, Y., *Acta Crystallogr.* **1966**, *20*, 712.

I.2.1.i.b. Acidez relativa de ambas especies

Otro factor a considerar a la hora de plantear a los ácidos fosfónicos como bioisómeros de fosfatos es la acidez de cada una de estas especies. Como puede observarse en la **Figura I.25**, el reemplazo isostérico fosfato-fosfonato conduce a una reducción en la acidez, es decir, los ácidos alquilfosfónicos, como **39**, presentan un pKa mayor que los correspondientes monoésteres del ácido fosfórico, **38**.

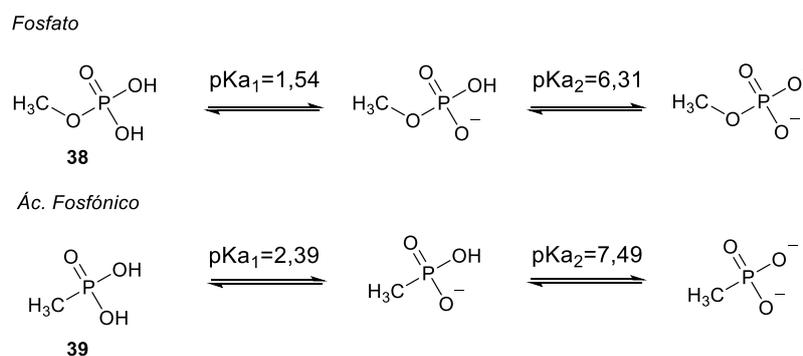


Figura I.25. Acidez de las especies metildihidrógeno fosfato **38**⁶⁹ y ácido metilfosfónico **39**.⁷⁰

Las diferencias respecto al primer valor de pKa (véase pKa₁, **Figura I.25**) no son relevantes biológicamente, ya que ambas especies estarán desprotonadas a pH fisiológico. En cambio, la diferencia en el segundo valor de pKa sí es importante, ya que estos valores determinan que, a pH fisiológico, el grupo fosfato existirá en su forma dianiónica, mientras que el ácido fosfónico se encontrará solo parcialmente desprotonado (véase pKa₂, **Figura I.25**). Dado que eso puede tener severas implicaciones en la actividad biológica, se estudiaron modificaciones sobre ácidos fosfónicos para aumentar su acidez, por ejemplo, adicionando grupos electronegativos sobre el C α al grupo fosfonato. En la **Tabla I.2** se observa el efecto de estos sustituyentes sobre el pKa de derivados de ATP del tipo **40**.

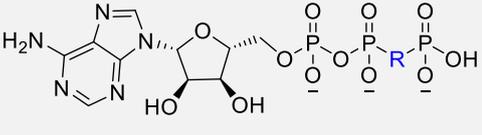
R	pKa	Estructura
O (ATP)	7,1	 <p style="text-align: center;">40</p>
CH ₂	8,4	
NH	7,7	
CHF	7,4	
CF ₂	6,7	
CCl ₂	7	

Tabla I.2. pKa de análogos de ATP con distintos reemplazos isostéricos.⁶⁴

⁶⁹ Kumler, W.; Eiler, J. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1943**, *65*, 2355–2361.

⁷⁰ Freedman, L.D.; Doak, G.O. *Chem. Rev.*, **1957**, *57*, 479–523.

I.2.1.ii. Ácidos fosfónicos como bioisómeros de ácidos carboxílicos

La geometría trigonal del grupo carboxilato difiere de la forma tetraédrica que adopta el grupo fosfonato. Sin embargo, el grupo carboxilato puede presentar las mismas interacciones iónicas con residuos de lisina o arginina, característicos de algunos dominios de unión a fosfato.⁶⁴ Por ende, los ácidos fosfónicos también pueden emplearse como bioisómeros de ácidos carboxílicos. En cuanto a la acidez relativa de estas especies, en la **Tabla I.3** se muestran los valores de pKa asociados a distintos ácidos carboxílicos y fosfónicos de cadena alquílica.⁷¹

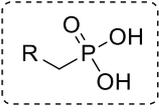
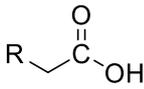
			
R	pKa ₁	pKa ₂	pKa
Me	2,38	7,74	3,745
Et	2,43	8,05	4,757
Pr	2,49	8,18	4,874
Bu	2,59	8,19	4,819

Tabla I.3. Valores de pKa para distintos ácidos fosfónicos y carboxílicos.

Estos valores indican que a pH fisiológico las especies predominantes serán carboxilatos, mientras que los ácidos fosfónicos estarán parcialmente desprotonados (véase pKa₂, **Tabla I.3**), en ambos casos las especies presentan una carga neta negativa. Este reemplazo isostérico se llevó a cabo exitosamente en el desarrollo de inhibidores la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), trabajo en el cual se evaluaron distintos ácidos fosfónicos y carboxílicos (**41**, **Figura I.27**).⁷² Se encontró que el compuesto más activo corresponde al uso del grupo difluorometil fosfonato (CF₂PO₃H₂) en R₁, en comparación con otros ácidos carboxílicos.

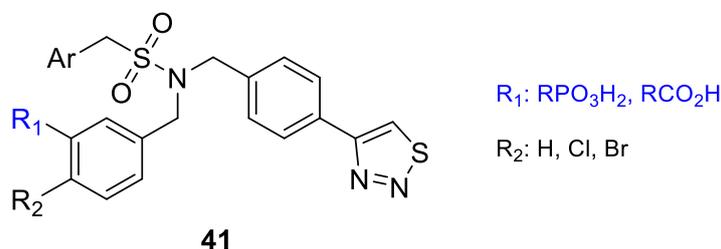


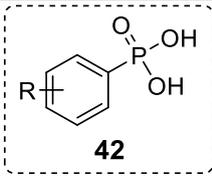
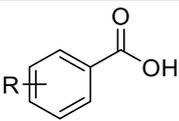
Figura I.27. Inhibidores de PTP1B que incorporan ácidos fosfónicos o carboxílicos.

⁷¹ Kabachnik, M. *Doklady Akad. Nauk.* **1956**, 3, 393.

⁷² C. P. Holmes, X. Li, Y. Pan, C. Xu, A. Bhandari, C. M. Moody, J. A. Miguel, S. W. Ferla, M. N. de Francisco, B. T. Frederick and S. Zhou. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 2719–2724.

Otra propiedad a destacar de los ácidos fosfónicos es su mayor solubilidad en agua, en comparación con sus respectivos ácidos carboxílicos. La solubilidad en agua, usualmente expresada en términos del logaritmo del coeficiente de reparto ($\log P$).⁷³ Este representa una medida de la solubilidad diferencial de un compuesto en una mezcla octanol/agua, donde un menor $\log P$ implica una mayor solubilidad en agua, siendo una propiedad importante en fármacos, dado que afecta su biodisponibilidad en el organismo. Drogas que presentan una baja solubilidad en agua requieren de dosis más altas para alcanzar las concentraciones adecuadas en plasma sanguíneo. Más de un 40% de las nuevas entidades químicas desarrolladas en la industria farmacéutica son prácticamente insolubles en agua, lo cual conlleva una baja absorción y posible toxicidad a nivel gastrointestinal.⁷⁴

Este incremento en la solubilidad en agua se ejemplifica en el siguiente caso: comparando una serie de ácidos arilfosfónicos, **42**, con sus correspondientes ácidos arilcarboxílicos, **43**, se puede observar que los primeros presentan menores valores de $\log P$ (Tabla I.4).⁷⁵

		
	42	43
	Log P	Log P
R = H	0,88	2,04
R ≠ H	0,88-1,70	1,57-2,62
Tabla I.4. Solubilidad de ácidos arilfosfónicos y carboxílicos.		

I.2.1.iii. Bioisosterismo entre aminofosfatos y aminoácidos

Dado que los ácidos fosfónicos pueden considerarse bioisómeros de ácidos carboxílicos, es natural pensar que los aminofosfonatos tengan la misma relación con sus correspondientes aminoácidos. Este caso de bioisosterismo fue reportado en el desarrollo de análogos fosforados de los aminoácidos ácido aspártico y glutámico (**44** y **45**, Figura I.28, p.26), compuestos neuroactivos evaluados como antagonistas de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), los

⁷³ Log P: medida de la solubilidad diferencial del compuesto en octanol y agua.

⁷⁴ Savjani, K. T.; Gajjar, A. K.; Savjani, J. K. *ISRN Pharm.* **2012**, 2012 (100 mL), 1–10.

⁷⁵ Franz, R. D. *AAPS PharmSci.*, **2001**, 3, E10.

cuales presentan mayor selectividad y potencia⁷⁶, o bien como agonistas de receptores metabotrópicos de glutamato (L-AP4 y derivados cíclicos).⁷⁷

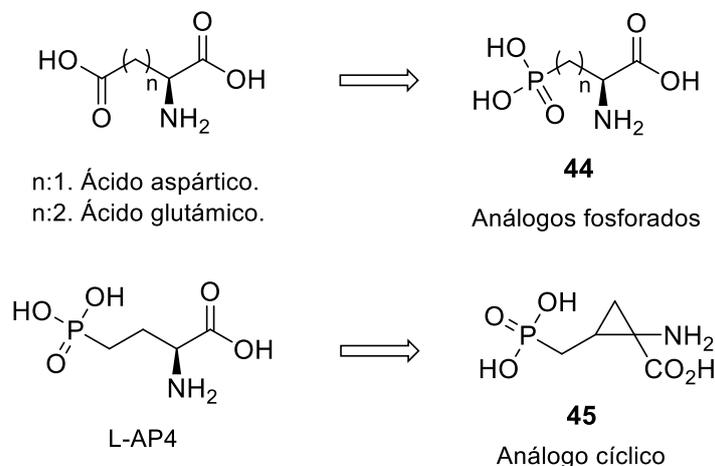


Figura I.28. Derivados fosforados de aminoácidos como compuestos neuroactivos.

Otro caso de interés son los peptidomiméticos, en los cuales se realiza el reemplazo de ciertos aminoácidos por análogos de los mismos. En particular, los fosfonopéptidos son análogos estructurales de péptidos que pueden competir con ellos por sitios activos de enzimas y receptores celulares. La utilidad de estos compuestos proviene de su uso como antibióticos e inhibidores de proteasas. Por ejemplo, se encontró que ciertos fosfonopéptidos son inhibidores irreversibles de serina proteasas (compuestos del tipo **46**, **Figura I.29**).⁷⁸

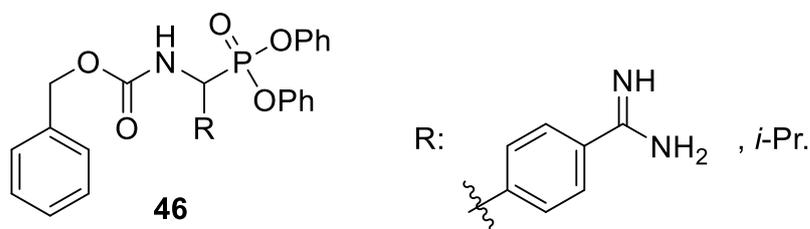


Figura I.29. Fosfonopéptidos inhibidores de serina proteasas.

⁷⁶ Kukhar, V. P.; Hudson, H. R. *Aminophosphonic and Aminophosphinic acids*; John Wiley & Sons, Inc: Londres, **2000**.

⁷⁷ Johnson, L. R.; Rao, S.S.P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 57-60.

⁷⁸ D.; Oleksyszyn, J.; Powers, J. C. *Biochemistry* **1991**, *30*, 2, 485-493.

I.2.1.iv. Incorporación de fosfonatos en fármacos

Además de los reemplazos bioisostéricos descritos previamente, la incorporación del grupo fosfonato en moléculas con actividad conocida, por ej. el compuesto **47**, derivado de Resveratrol (**Figura I.30**), puede incrementar su potencia, o bien mejorar sus propiedades farmacocinéticas. Este es el caso de los derivados de tipo **48**, que presentan aminofosfonatos en su estructura.

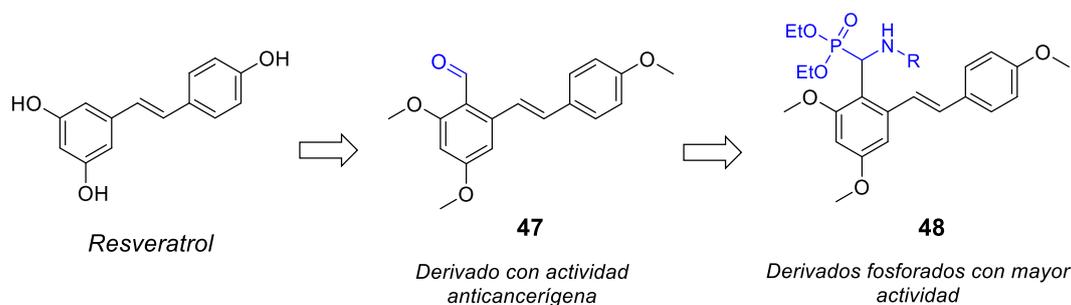


Figura I.30. Derivados fosforados de Resveratrol con actividad anticancerígena.

El incremento de la actividad biológica puede deberse a un aumento en la biodisponibilidad del fármaco, y los autores postulan que el grupo fosfonato facilitaría el transporte a través de la membrana celular.⁷⁹

También pueden emplearse fosfonatos como prodrugs de ácidos fosfónicos. A pesar del potencial farmacológico de los ácidos fosfónicos, estos no suelen ser considerados como candidatos durante el desarrollo de nuevos fármacos. Esto se debe a la elevada carga que presentan los mismos, con la consecuente incapacidad de estas moléculas de penetrar membranas celulares, o de lograr la biodisponibilidad deseada. En estos casos, pueden sintetizarse fosfonatos fácilmente hidrolizables, por ejemplo, la esterificación del ác. fosfónico presente en el antiviral PMEDAP (fosfonato **49**, **Figura I.31**), produjo un incremento significativo tanto en la potencia como en la selectividad hacia el virus de Hepatitis B.

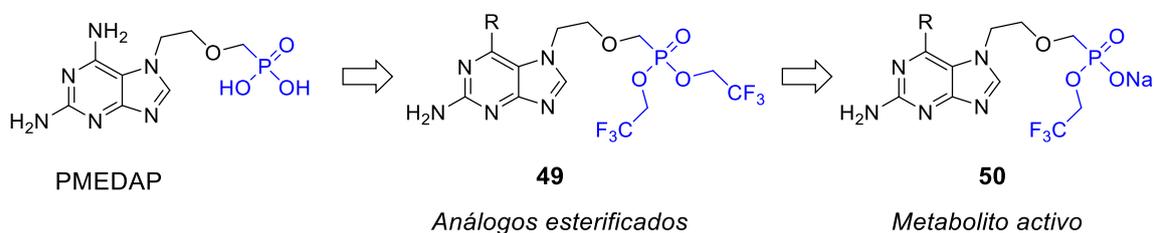


Figura I.31. Esterificación de ác. fosfónicos para generar profármacos.

⁷⁹ Shi, L.; Huang, X.-F.; Zhu, Z.-W.; Li, H.-Q.; Xue, J.-Z.; Zhu, H.-L.; Liu, C.-H. *Austr. J. Chem.*, **2008**, *61*, 472-475.

En este caso, la molécula esterificada es un profármaco, ya que el metabolito activo, **50**, se genera tras la hidrólisis en hígado.⁸⁰

La obtención de ésteres de ácidos fosfónicos es una herramienta común en la obtención de derivados con mejor perfil farmacológico. Otro ejemplo corresponde a la obtención de profármacos del antiviral Tenofovir⁸¹, y el inhibidor de fosfatasas MB05032, aunque en este caso se empleó una fosfonodiamida (compuestos **51** y **52** respectivamente, **Figura I.32**).⁸²

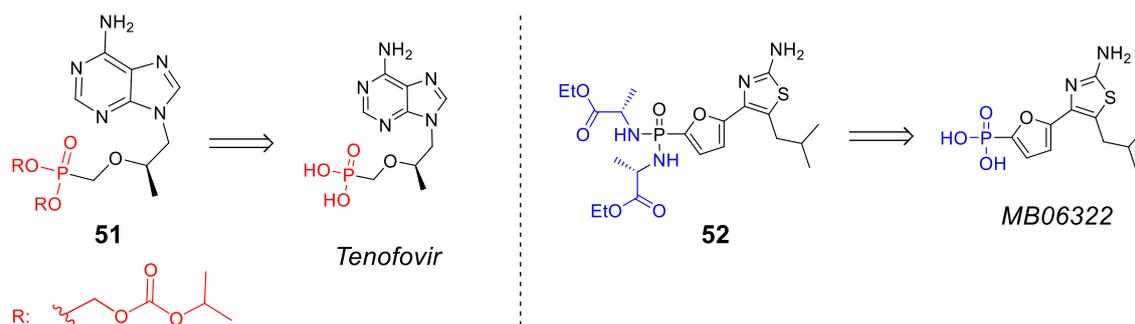


Figura I.32. Profármacos del Tenofovir (**51**) y del MB06322 (**52**).

⁸⁰ Sekiya, K.; Takashima, H.; Ueda, N.; Kamiya, N.; Yuasa, S.; Fujimura, Y.; Ubasawa, M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (14), 3138–3142.

⁸¹ Robbins, B. L.; Srinivas, R. V.; Kim, C.; Bischofberger, N.; Fridland, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 612–617.

⁸² Dang, Q.; Kasibhatla, S. R.; Jiang, T.; Fan, K.; Liu, Y.; Taplin, F.; Schulz, W.; Cashion, D. K.; Reddy, K. R.; van Poelje, P. D.; Fujitaki, J. M.; Potter, S. C.; Erion, M. D. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4331.

I.2.2. Compuestos organofosforados como inhibidores enzimáticos

Muchos compuestos organofosforados, en particular los ácidos fosfónicos, ejercen su actividad biológica actuando como miméticos de grupos funcionales polares presentes en los sustratos naturales de las enzimas sobre las que actúan. En la **Tabla I.5** se muestran ejemplos de este comportamiento por parte de compuestos organofosforados conocidos, entre los cuales se cuentan algunas drogas comerciales.

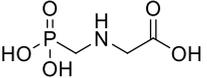
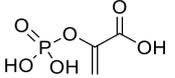
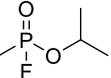
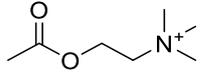
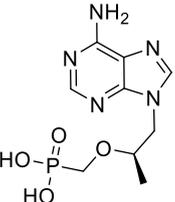
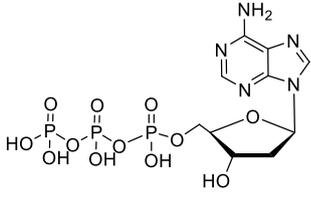
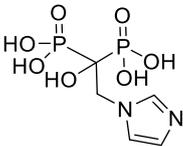
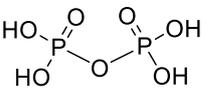
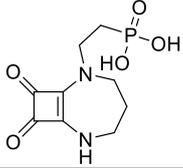
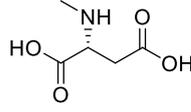
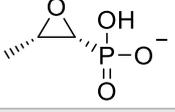
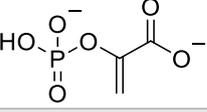
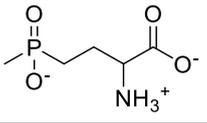
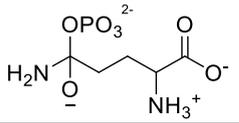
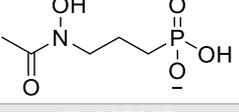
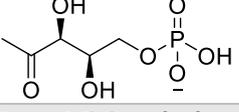
Compuesto	Sustrato natural	Actividad biológica (enzima o receptor)
 Glyphosato	 Fosfoenolpiruvato	Herbicida (EPSP sintasa)
 Sarín	 Acetilcolina	Agente nervioso (AChE)
 Tenofovir	 Desoxinucleósido trifosfato	Anti-VIH (VIH transcriptasa reversa)
 Zoledronato	 Pirofosfato	Anti-cáncer (farnesil pirofosfato sintasa)
 Perzinfotel	 NMDA	Efectos neuroprotectores (Receptores NMDA)
 Fosfomicina	 Fosfoenolpiruvato	Antibiótico (EPSP sintasa)
 Fosfinotricina	 Glutamil fosfato	Herbicida (Glutamina sintetasa)
 FR-900098	 Desoxixilulosa fosfato	Antimalárico (DXP reductoisomerasa)

Tabla I.5. Compuestos organofosforados que actúan como inhibidores enzimáticos.

I.2.3. Reacciones de obtención de fosfonatos y derivados: alcances y limitaciones

En la **Tabla I.6** se realiza una breve reseña de las reacciones más comúnmente empleadas en la obtención de fosfonatos y derivados. Se abarcan tanto las reacciones de sustitución de haluros como la adición a compuestos carbonílicos.

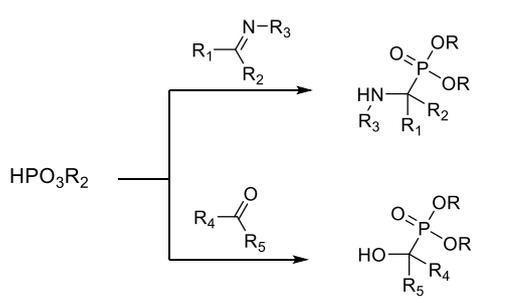
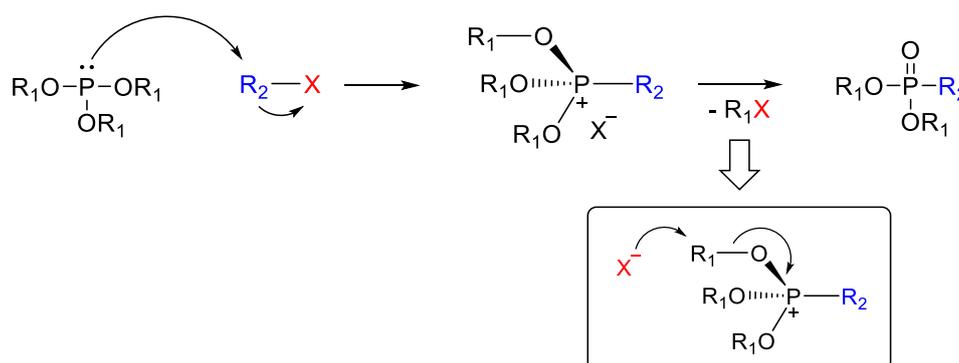
Obtención de fosfonatos		
Reacción de Michaelis-Arbuzov	$\text{P(OR)}_3 + \text{R}'\text{X} \xrightarrow{\Delta} \text{R}'\text{-}\overset{\text{O}}{\underset{\text{OR}}{\text{P}}}\text{-OR}$	Se requieren elevadas T. Se genera subproducto. Se emplea exceso de fosfito.
Reacción de Michaelis-Becker	$\text{HPO}_3\text{R}_2 \xrightarrow[2. \text{R}'\text{X}]{1. \text{Base}} \text{R}'\text{-}\overset{\text{O}}{\underset{\text{OR}}{\text{P}}}\text{-OR}$	Se requiere una base fuerte y trabajar en condiciones anhidras a bajas T.
Adición de fosfitos a compuestos carbonílicos		
Reacción de Pudovik		Se requiere base y en algunos casos elevadas T. En las condiciones clásicas de reacción no hay control de la estereoquímica.
Reacción de Abramov	$\text{P(OR)}_3 \xrightarrow[\text{TMSCl}]{\text{R}_1\text{-C(=O)-R}_2} \text{TMSO-}\overset{\text{O}}{\underset{\text{R}_1}{\text{C}}}\text{-P(OR)}_2\text{-R}_2$	Es necesaria la formación de éteres de silicio, que luego pueden ser hidrolizados.
Reacción de Kabachnik-Fields	$\text{HPO}_3\text{R}_2 + \text{R}_1\text{-C(=O)-R}_2 + \text{H-N(R}_3\text{)-R}_4 \longrightarrow \text{RO-}\overset{\text{O}}{\underset{\text{R}_1}{\text{C}}}\text{-P(OR)}_2\text{-N(R}_3\text{)-R}_4$	Se puede efectuar la reacción multicomponente o preformar la imina y luego adicionar el fosfito.

Tabla I.6. Reacciones de obtención de fosfonatos, α -hidroxifosfonatos y α -aminofosfonatos.

I.2.3.i. Reacción de Michaelis-Arbuzov

Se denomina reacción de Michaelis-Arbuzov, o simplemente reacción de Arbuzov, a la reacción de obtención de fosfonatos a través del ataque de un fosfito a un haluro de alquilo/acilo (**Esquema I.2**). Descubierta en 1898 por Michaelis⁸³, fue posteriormente estudiada en profundidad por Arbuzov y otros investigadores.⁸⁴

El mecanismo de reacción involucra el ataque nucleofílico del fosfito, a través de su par de electrones libres, sobre el haluro, generando un intermediario, que se descompone rápidamente para dar lugar al fosfonato como producto final de la reacción.



Esquema I.2. Mecanismo de la reacción de Arbuzov.

I.2.3.i.a. Alcance y limitaciones de la reacción

Haluros de alquilo terciarios, arílicos y vinílicos no son reactivos frente a trialquil fosfitos, de acuerdo al mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2) planteado. Los haluros secundarios tampoco presentan mucha reactividad, a excepción de ciertos casos puntuales (por ej., yoduro de isopropilo). Respecto a la selectividad, la reacción de Arbuzov es compatible con varios grupos funcionales. Por ejemplo, la reacción de bromoacetato de etilo con trietilfosfito da lugar al producto **53** (**Esquema I.3-I**), de gran utilidad sintética en reacciones de formación de enlaces C-C reacción de Wittig-Horner o reacción de Horner-Wadsworth-Emmons).⁸⁵ Estas reacciones serán analizadas en mayor detalle en el [Capítulo III \(Sección V.3.1\)](#) de la presente memoria.

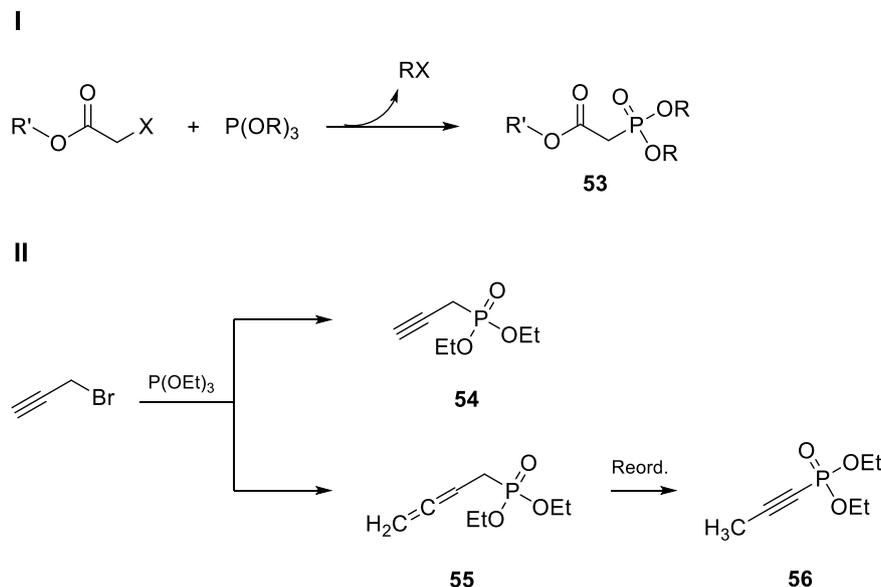
La reacción de Arbuzov también se puede llevar a cabo sobre sustratos alílicos o propargílicos, como el bromuro de propargilo (**Esquema I.3-II**, p.32). En este caso, en lugar de

⁸³ Michaelis, A.; Kaehne, R. *Chem. Ber.*, **1898**, 31, 1048.

⁸⁴ Arbuzov, A.E. *J. Russ. Phys. Chem. Soc.*, **1906**, 38, 687.

⁸⁵ Arbuzov A.E.; Nesterov, L. V. *Izv. Akad. Nauk USSR, Ser. Khim.*, **1954**, 361.; *Chem. Abstr.*, **1955**, 49, 95416.

obtenerse el propargilfosfonato de dietilo deseado, **54**, suelen producirse reordenamientos que dan lugar a subproductos indeseados (**55** y **56**, Esquema I.3-II).⁸⁶



Esquema I.3. Reacción de Arbuzov en presencia ésteres (I) u alquinos (II).

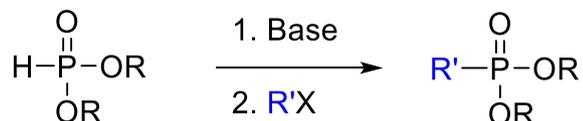
Por otra parte, α -cloro y α -bromocetonas no son buenos sustratos para la reacción de Arbuzov, ya que ocurre un reordenamiento conocido como reacción de Perkow, obteniéndose vinilfosfatos junto al fosfonato esperado. Los compuestos nitrados suelen reducirse en presencia de especies trivalentes de fósforo.

En cuanto a limitaciones, existen dos inconvenientes principales. El primero es la necesidad de trabajar a elevadas temperaturas, lo cual limita el tipo de sustratos compatibles con estas condiciones de reacción. Así mismo, hay que considerar la reacción competitiva de sustitución sobre el haluro de alquilo formado como subproducto (R_1X , Esquema I.2). Para mitigar este problema, se puede destilar el haluro formado a medida que transcurre la reacción, siempre y cuando su punto de ebullición sea bajo. También se suelen usar grandes excesos de fosfito; en estos casos la reacción se lleva a cabo sin solvente. Finalmente hay que considerar que este subproducto no se formará, o lo hará en menor medida, si el haluro de partida es más reactivo.

⁸⁶ Pudovik, A. N.; Arbuzov, B. A. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.*, **1949**, 522.; *Chem. Abstr.*, **1950**, 44, 1893.

I.2.3.ii. Reacción de Michaelis-Becker

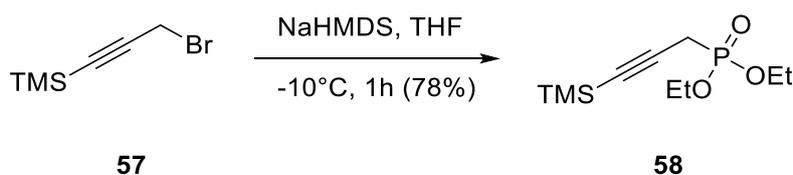
En este caso se emplean dialquilfosfitos (también denominados dialquilfosfonatos). Los mismos, en presencia de base, se desprotonan, permitiendo el ataque nucleofílico para dar lugar a una S_N2 . La base más utilizada es NaH, aunque también puede emplearse sodio metálico. En este último caso pueden obtenerse pequeñas cantidades de fosfina como subproducto.⁸⁷



Esquema I.4. Reacción de Michaelis-Becker

La reacción de Michaelis-Becker es una alternativa útil a la reacción de Arbuzov, particularmente cuando se trabaja con sustratos sensibles a la temperatura. En contrapartida, la reacción de Arbuzov se prefiere para sustratos sensibles a bases fuertes y al trabajar a escala industrial. Ocasionalmente puede ocurrir la *O*-alquilación de la sal.⁸⁸ En esta reacción es notoria la diferencia de reactividad al emplear distintos grupos salientes. Por ejemplo, en la sustitución empleando dietilfosfito e NaH en THF, se observó el siguiente orden de reactividad: RBr > ROTs > RCl. En el caso particular R = Bu, las velocidades de reacción relativas fueron 280:70:1, evidenciando la gran dependencia de la reacción con el tipo de sustrato a utilizar.⁸⁷

En general, los rendimientos son más bajos que en la reacción de Arbuzov, pero en ciertos casos la reacción de Michaelis-Becker representa una mejor alternativa, por ejemplo, se evita el reordenamiento en sustratos alílicos y propargílicos (formación de **58**, Esquema I.5).⁸⁹



Esquema I.5. Reacción de Michaelis-Becker sobre un sustrato propargílico.

Hay que tener en cuenta que se requiere proteger el alquino terminal, por ej. con TMS en **57**, para llevar a cabo la reacción.

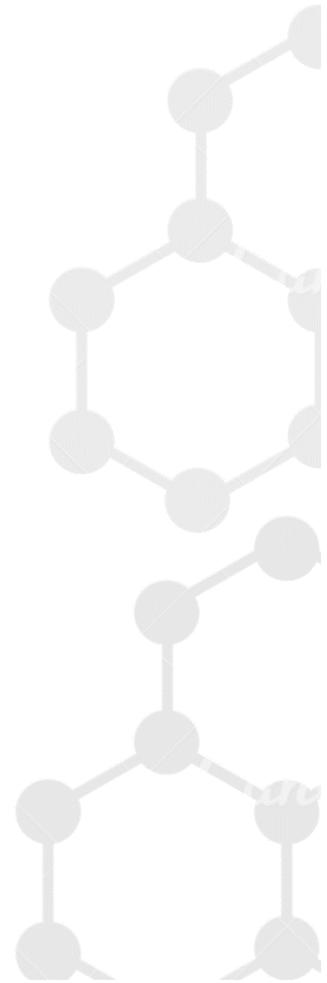
⁸⁷ Timperley, C. M. *Organophosphorus (V) Chemistry. Chapter 2 - Phosphonyl Compounds*; Elsevier Ltd: Reino Unido, **2015**.

⁸⁸ Murphy, P. J. *Organophosphorus Reagents A Practical Approach in Chemistry*; Oxford University Press: Reino Unido, **2004**.

⁸⁹ Van Summeren, R. P.; Feringa, B. L.; Minnaard, A. J. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3 (14), 2524–2533.



OBJETIVOS



II. Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral es la obtención de nuevos compuestos bioactivos que contengan al anillo de 1,2,3-triazol. Para ello se buscan emplear catalizadores basados en nanopartículas metálicas, sintetizados en nuestro grupo de investigación. Además, nos proponemos continuar con el estudio de compuestos fosforados, de interés en nuestro grupo de investigación ya que han sido exitosamente empleados en agentes anticancerígenos, ampliando el campo de aplicación a la modulación alostérica de receptores nicotínicos.

Teniendo en consideración lo mencionado anteriormente, se plantearon los siguientes objetivos específicos, que serán descritos en mayor detalle en sus correspondientes capítulos:

- Diseñar y llevar a cabo la síntesis de nuevos moduladores alostéricos positivos (PAMs) del receptor nicotínico $\alpha 7$, que incorporen 1,2,3-triazoles, y funciones fosforadas, en su estructura.
- Desarrollar la síntesis y evaluación de nuevos inhibidores de la enzima monoaminoxidasa (MAO), y de la interacción KEAP1-NRF2, a través de la incorporación del anillo de 1,2,3-triazol en derivados de indol.
- Sintetizar 1,2,3-triazoles di y trisustituidos como candidatos para reemplazar el anillo A de la vitamina D. Evaluar métodos de acoplamiento con el fragmento del biciclo CD de la Vitamina D.



CAPÍTULO I

SÍNTESIS DE 1,2,3-TRIAZOLES FÓSFORO FUNCIONALIZADOS CON ACTIVIDAD $\alpha 7$ -PAM



III. Capítulo I: Síntesis de 1,2,3-triazoles fósforo funcionalizados con actividad $\alpha 7$ -PAM

III.1. Introducción

III.1.1. Receptores nicotínicos: conceptos fundamentales

Los receptores nicotínicos (nAChRs, *nicotinic acetylcholine receptors*) son canales iónicos de la familia de receptores cys-loop de tipo colinérgicos, es decir, son capaces de responder al neurotransmisor acetilcolina. Además, los mismos pueden ser activados por nicotina.⁹⁰

Las neuronas se comunican entre sí en las uniones llamadas sinapsis (**Figura III.1**). La sinapsis química involucra a los neurotransmisores como mensajeros químicos, liberados por la neurona presináptica (o emisora). El tipo de respuesta de la neurona postsináptica (receptora) al neurotransmisor está determinado por el receptor hacia el cual va dirigido. En algunas ocasiones el receptor, al ser estimulado por el neurotransmisor, desencadena el desarrollo de ciertas acciones enzimáticas, por ejemplo, la modulación de la concentración de metabolitos intracelulares. En este caso, estos receptores son los llamados metabotrópicos. Otra clase de receptores presenta en su estructura un canal iónico, y la llegada del neurotransmisor induce una serie de cambios conformacionales muy rápidos, que abren el canal, y permiten el flujo de iones de acuerdo con su gradiente electroquímico. Estos receptores se denominan ionotrópicos, y en esta familia se encuentran los nAChRs.⁹¹

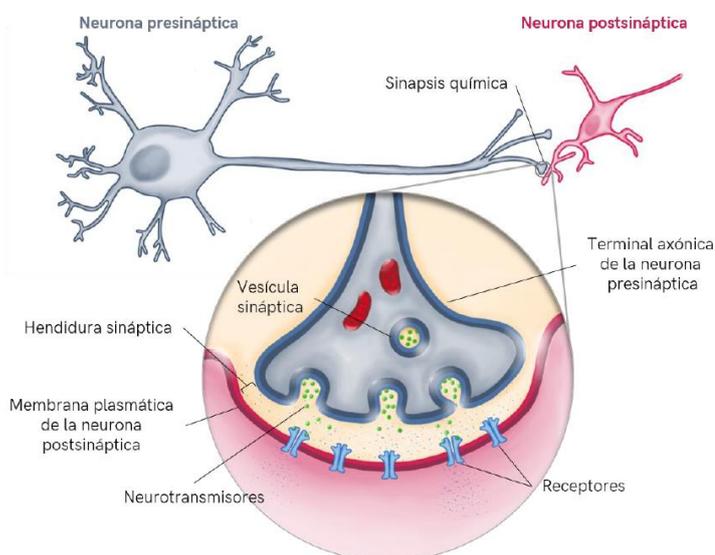


Figura III.1. Proceso de sinapsis.⁹²

⁹⁰ Dani, J. A. *Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine*, 1st ed.; Elsevier Inc: Filadelfia, **2015**.

⁹¹ Castellanos, J.E; Benito, M.A.; Ramírez, R. *Rev. Fac. Med.* **2011**, 49 (3), 155-161.

⁹² Tomado de: Lasala, M. *Tesis doctoral*, Universidad Nacional del Sur, **2019**, p.3.

Los canales iónicos son moléculas proteicas que contienen poros acuosos que permiten el flujo de iones a través de las membranas celulares. Son componentes esenciales en la actividad de todas las células, y se pueden clasificar en función del tipo de estímulo para su apertura o cierre en: canales activados por voltaje, canales activados por ligando y canales mecanosensibles.⁹³ Los nAChRs son miembros de una superfamilia de receptores ionotrópicos activados por ligandos, a la cual también pertenecen los receptores del ácido γ -aminobutírico (GABA), los receptores de glicina y los receptores de 5-hidroxitriptamina-3 (5-HT₃, una subclase de receptores de serotonina). La clasificación de los receptores nicotínicos dentro de la familia de receptores postsinápticos se discute en la [Sección III.1.3](#).

III.1.1.i. Familias de receptores nicotínicos

Los receptores nicotínicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino animal. En vertebrados, existen 17 subunidades de nAChRs distintas ($\alpha 2$ a $\alpha 10$ y $\beta 2$ a $\beta 4$ en neuronas, y $\alpha 1$, β , γ , ϵ y δ en músculo), que se combinan para formar receptores con diferente localización, función y farmacología (Cladograma, **Figura III.2**). En particular, las subunidades de tipo α contienen un puente disulfuro en el sitio de unión del agonista.⁹⁴ Estos receptores se expresan tanto en el sistema nervioso, central y periférico, como en tejidos no-neuronales. Los mismos pueden ser homoméricos, conteniendo 5 subunidades iguales (como el $\alpha 7$ o $\alpha 9$), o heteroméricos, los cuales presentan diferentes subunidades, de las cuales al menos 2 deben ser de tipo α ($\alpha 2\beta\epsilon/\gamma\delta$).⁹⁵

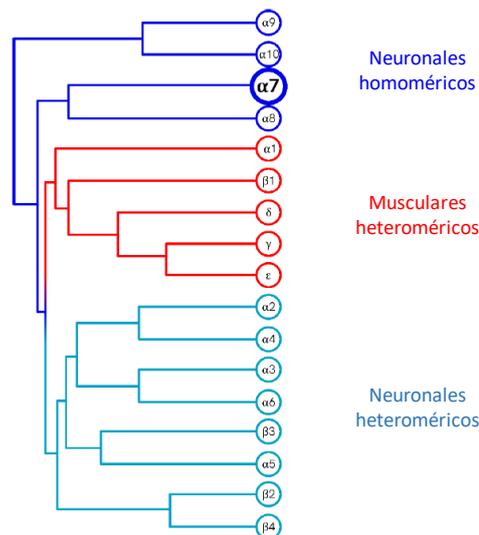


Figura III.2. Cladograma de las subunidades de nAChRs de vertebrados.⁹⁶

⁹³ Martínez, R.M. *Arch Cardiol Mex.* **2004**, 74 (Suppl: 2), 205-210.

⁹⁴ Ligand-gated ion channel database, <http://www.ebi.ac.uk/compneur-srv/LGICdb/cys-loop.php>.

⁹⁵ Wonnacott, S. *Tocris Sci. Rev. Ser.* **2014**, 1-31.

⁹⁶ Bouzat, C.; Lasala, M.; Nielsen, B. E.; Corradi, J.; Esandi, M. del C. *J. Physiol.* **2018**, 596 (10), 1847-1861.

III.1.1.ii. Importancia biológica del receptor nicotínico $\alpha 7$

El receptor nicotínico homopentamérico $\alpha 7$ es uno de los nAChRs más abundantes en el sistema nervioso central, donde media la entrada de calcio en respuesta a ACh. Se encuentra expresado principalmente en regiones importantes para la función cognitiva y la memoria, tales como hipocampo, corteza y regiones límbicas subcorticales⁹⁷, donde contribuye a la cognición, el procesamiento sensorial de la información, la atención, la memoria de trabajo y vías de recompensa.⁹⁸

En la enfermedad de Alzheimer existe una reducción significativa en la actividad de $\alpha 7$ en el cerebro, acorde a la hipótesis colinérgica. La misma establece que la deficiencia de acetilcolina es crítica en el inicio de los síntomas de la enfermedad. Esto ocurre particularmente en el hipocampo⁹⁹, como así también en pacientes con esquizofrenia.¹⁰⁰

Además, la activación del receptor $\alpha 7$ por parte de nicotina, u otros agentes selectivos a $\alpha 7$, produce una mejora en las habilidades cognitivas en pacientes y en modelos animales de distintos desórdenes neurológicos, como la EA, esquizofrenia, trauma cerebral y envejecimiento.¹⁰¹

El gen que codifica para la subunidad $\alpha 7$, *CHRNA7*, se encuentra en una región del cromosoma 15, genéticamente ligada a múltiples desórdenes con déficits cognitivos como esquizofrenia, discapacidad intelectual, desorden bipolar, desórdenes del espectro autista, déficit de atención con hiperactividad, epilepsia, EA y déficits en el procesamiento sensorial.¹⁰⁰

La presencia del receptor nicotínico $\alpha 7$ no se limita solo al sistema nervioso, ya que también se encuentra en células sanguíneas, epiteliales, endoteliales, fibroblastos, células del sistema digestivo y respiratorio, espermatoцитos y células de Sertoli.⁹⁹ Además, en células del sistema inmune cumple un rol fundamental en la vía antiinflamatoria colinérgica, y se encuentra en microglía, linfocitos T y B, células NK y macrófagos.¹⁰² Incluso, existe en cerebro una vía

⁹⁷ Lendvai, B; Kassai, F; Szájlí, A; Némethy Z. *Brain Res Bull*, **2013**, *93*, 86–96.

⁹⁸ Corradi, J; Bouzat, C. *Mol Pharmacol*. **2016**, *90*, 288–299.

⁹⁹ Kadir, A; Almkvist, O; Wall, A; Langstrom, B; Nordberg, A. *Psychopharmacology (Berl)*, **2006**, *188*, 509–520.

¹⁰⁰ (a) Schaaf, C.P. *Genet Med*. **2014**, *16*, 649–656. (b) Dineley, K.T; Pandya, A.A; Yakel, J.L. *Trends Pharmacol Sci*, **2015**, *36*, 96–108.

¹⁰¹ Uteshev, V.V. *Eur J Pharmacol*. **2014**, *727*, 181–185.

¹⁰² (a) Wang, H; Yu, M; Ochani, M; Amella, C.A; Tanovic, M; Susarla, S; Li, J.H; Wang, H; Yang, H; Ulloa, L; Al-Abed, Y; Czura, C.J; Tracey, K.J. *Nature*, **2013**, *421*, 384–388. (b) Costantini TW; Dang X; Coimbra R; Eliceiri BP; Baird A; Costantini TW; Dang X; Coimbra R; Eliceiri BP; Baird A. *J Leukoc Biol*. **2015**, *97*, 2292–2302.

colinérgica que regula la activación de la microglía a través de $\alpha 7$, la cual podría ser importante en la enfermedad de Parkinson (EP).¹⁰³

Finalmente, la expresión de $\alpha 7$ es beneficiosa para el sistema nervioso, dado que una activación moderada de estos receptores incrementa la resistencia celular al daño cerebral, lo que ha sido demostrado en experimentos *in vivo* y modelos *ex vivo* de demencias, isquemia cerebral y daño cerebral traumático.⁹⁷

III.1.2. Clasificación del receptor $\alpha 7$ dentro de la familia de receptores postsinápticos

El sistema nervioso está formado por una compleja red de billones de neuronas que utilizan señales específicas para comunicarse entre sí. La sinapsis química es una unión funcional entre neuronas, en la que el neurotransmisor liberado por una de ellas interactúa específicamente con proteínas de membrana de la otra, los receptores postsinápticos. Los mismos pueden clasificarse en dos tipos (**Figura III.3**): receptores metabotrópicos, los cuales generan respuesta mediante la interacción con proteínas G, y los receptores ionotrópicos. Estos últimos sufren cambios conformacionales ante la unión de su molécula ligando, lo cual provoca la apertura de un poro en su interior, permitiendo el pasaje de iones de un lado a otro de la membrana. Es por ello que se los denomina canales iónicos activados por ligando (LGIC, por sus siglas en inglés, *Ligand Gated Ion Channels*).

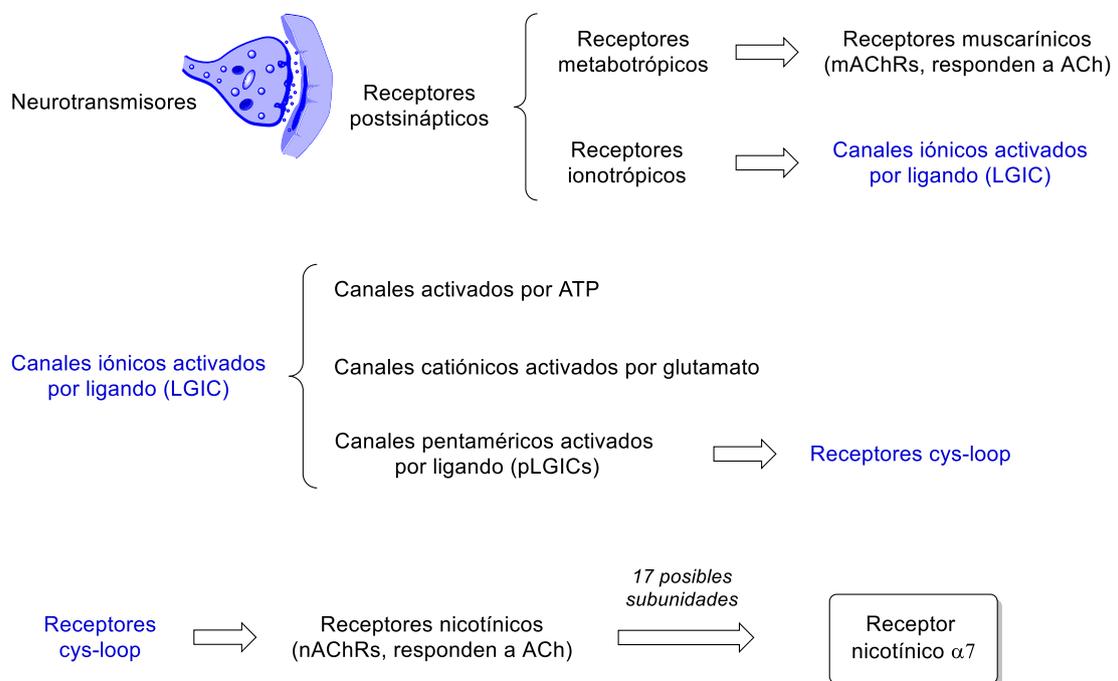


Figura III.3. Clasificación de receptores postsinápticos, entre los que se encuentra el receptor $\alpha 7$

¹⁰³ Stuckenholz V; Bacher M; Balzer-Geldsetzer M; Alvarez-Fischer D; Oertel W.H; Dodel R.C; Noelker C. *J Parkinsons Dis.* **2013**, 3, 161–172.

III.1.2.i. Estructura de receptores Cys-loop

Los receptores cys-loop están formados por cinco subunidades organizadas alrededor de un poro central (**Figura III.4**). Se denominan homoméricos cuando esas cinco subunidades son iguales (como en el receptor $\alpha 7$), o heteroméricos, cuando dichas subunidades son distintas. En la estructura de estos receptores se distinguen tres dominios funcionales¹⁰⁴, cuya función se detalla a continuación:

- El dominio extracelular (ECD, *extracellular domain*), que contiene los sitios de unión al agonista, localizados entre dos subunidades adyacentes. Cada sitio de unión está formado por tres loops de una subunidad tipo α (loops A, B, C), que forman la cara principal, y tres regiones compuestas por subunidades que pueden o no ser tipo α , conformando la cara complementaria (loops D, E y F).
- El dominio de transmembrana (TMD, *transmembrane domain*), que forma el canal y contiene sitios alostéricos para la acción de moduladores.
- El dominio intracelular (ICD, *intracellular domain*), de importancia en la conductancia del canal y en su modulación intracelular.

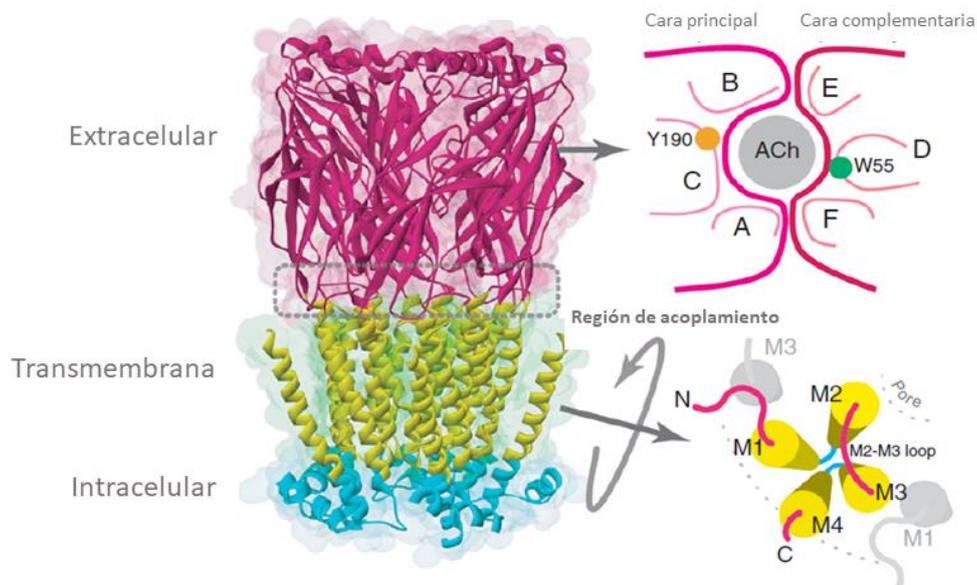


Figura III.4. Estructura de receptores cys-loop. Tomado de Bouzat et al., 2017.⁹⁶

¹⁰⁴ (a) Kelley, S.P; Dunlop, J.I; Kirkness, E.F; Lambert, J.J; Peters, J.A. *Nature*. **2013**, 424, 321–324. (b) Kabbani, N; Nordman, J.C; Corgiat, B.A; Veltri, D.P; Shehu, A; Seymour, V.A; Adams D.J. *BioEssays*. **2013**, 35, 1025–1034.

La interfase entre los dominios extracelulares y de transmembrana, llamada región de acoplamiento, es importante para la unión del agonista y la apertura del canal. Además, esta zona de la proteína gobierna el tiempo en el que el canal se mantiene abierto, y la velocidad de desensibilización.¹⁰⁵

III.1.3. Respuesta de receptores cys-loop a la unión del agonista

La respuesta funcional de un pLGIC puede ser interpretada como una selección de unas pocas conformaciones discretas, cerrado, abierto y desensibilizado, provocadas por la unión del agonista.¹⁰⁶ Los receptores cys-loop, en estado cerrado, se abren de manera transitoria luego de la unión de agonista (**Figura III.5**). En presencia continua del agonista, se vuelven refractarios al estímulo, y la respuesta de la célula disminuye. Durante este proceso, denominado *desensibilización*, los iones no pueden atravesar el poro del canal, a pesar de que el receptor posee alta afinidad por el agonista.¹⁰⁷

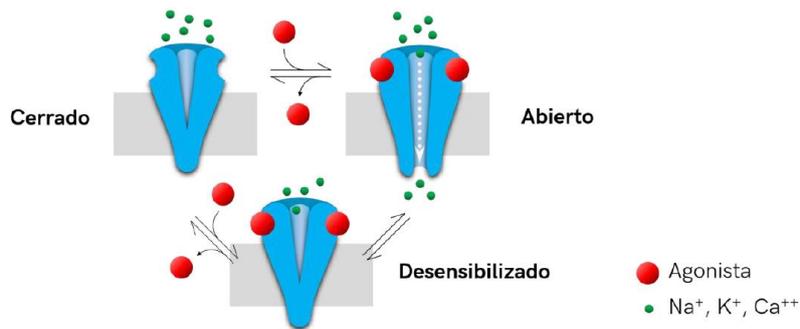


Figura III.5. Esquema de activación y desensibilización de pLGICs.¹⁰⁸

A partir de registros electrofisiológicos se demostró que, para cada receptor, existen múltiples estados abiertos, cerrados y desensibilizados, como así también estados intermedios cerrado-abierto y abierto-desensibilizado.¹⁰⁹ El número de estados en las conformaciones principales, y la velocidad de transición entre estados, determina la cinética del receptor, siendo lo que ajusta cada receptor a su rol fisiológico. Por ello, drogas que se unan a distintos estados pueden modular de manera distinta la función del receptor.⁹⁸

¹⁰⁵ Bouzat, C; Bartos, M; Corradi, J; Sine, S.M. *J Neurosci.* **2008**, *28*, 7808–7819.

¹⁰⁶ Monod, J; Wyman, J; Changeux, J.P. *J Mol Biol.* **1965**, *12*, 88–118.

¹⁰⁷ Zhang, J; Xue, F; Liu, Y; Yang, H; Wang, X. *Mol Neurobiol.* **2013**, *48*, 97–108.

¹⁰⁸ Tomado de: Lasala, M. *Tesis doctoral*, Universidad Nacional del Sur, **2019**, p.18.

¹⁰⁹ (a) Lape, R; Colquhoun, D; Sivilotti, L.G. *Nature.* **2008**, *454*, 722–727. (b) Mukhtasimova, N; Lee, W.Y; Wang, H-L; Sine, S.M. *Nature.* **2009**, *459*, 451–454.

Las corrientes generadas tras la unión del agonista y la apertura del canal se pueden detectar mediante la técnica de *patch clamp* (**Figura III.6-A**). La misma permite la detección de las **corrientes unitarias**, generadas por los pocos canales presentes en el parche (*patch*), o bien las **corrientes macroscópicas**, generadas por los canales de toda la célula. En este último caso se emplea la configuración *whole-cell* de esta técnica (**Figura III.6-B**).¹¹⁰

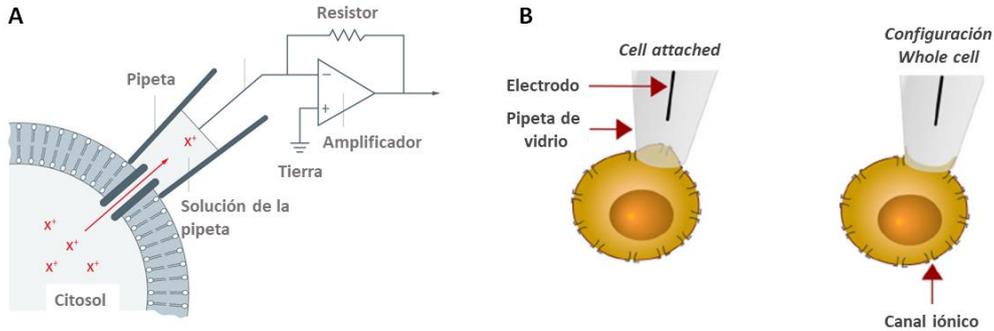


Figura III.6. A. Principio general de la técnica *patch clamp* (Adaptado de Leica microsystems¹¹¹). B. Tipos de configuración: *cell attached* (detección de corrientes unitarias) y *whole cell* (corrientes macroscópicas, adaptado de Alves 2012).¹¹²

III.1.3.i. Respuesta del receptor nicotínico $\alpha 7$

A nivel macroscópico, el receptor nicotínico $\alpha 7$, en presencia del agonista acetilcolina, provoca corrientes eléctricas que decaen rápidamente con el tiempo (**Figura III.7**), debido al proceso de desensibilización. Otros agonistas conocidos son la colina, menos potente que ACh, y la nicotina. Dentro de los receptores nicotínicos, el $\alpha 7$ es el que presenta la mayor velocidad de desensibilización, que puede relacionarse directamente con la velocidad de decaimiento de la corriente macroscópica.

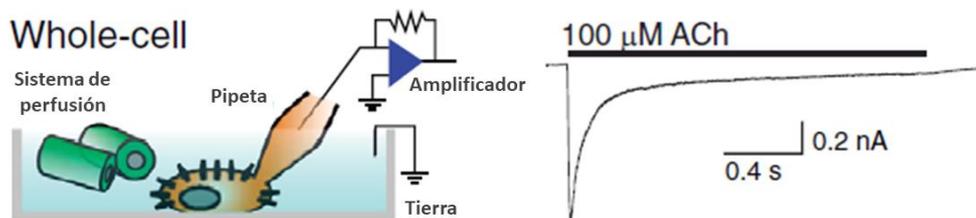


Figura III.7. Registro representativo de la corriente macroscópica generada por la unión de ACh (100 μM) al receptor nicotínico $\alpha 7$, a través de la configuración *whole-cell*. Adaptado de Bouzat et al, 2017.⁹⁶

¹¹⁰ Cardinali, D.P. *Neurociencia aplicada: sus fundamentos*; Médica Panamericana: Buenos Aires, 2007.

¹¹¹ <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/>

¹¹² Faria, R. X.; Ferreira, L. G. B.; Alves, L. A. *The Mystery of P2X7 Ionotropic Receptor: From a Small Conductance Channel to a Large Conductance Channel*. *Neurosci. - Deal. With Front*; IntechOpen: Londres, 2012.

A nivel de canal único, es decir, de corriente unitaria, en presencia de ACh se observan breves aperturas del canal, con una amplia distribución de amplitudes de corriente.¹¹³ El receptor $\alpha 7$ se activa predominantemente en episodios breves únicos, *opens*, separados por cierres largos (**Figura III.8**). Menos frecuentemente, estas aperturas aparecen agrupadas en *bursts*, que son conjuntos de dos o más aperturas ocasionadas por una misma molécula de receptor. Este patrón temporal no se ve afectado por la concentración de ACh.¹⁰⁵

ACh (100 μ M)

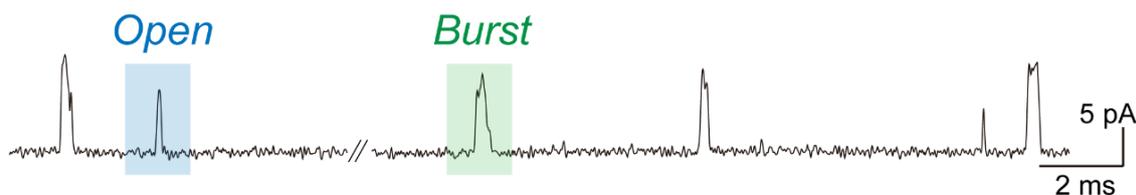


Figura III.8. Registro de canal único de ACh.

Esta falta de dependencia con la concentración de agonista, en conjunto con el hecho de que la mayoría de los episodios de activación consisten en una apertura simple con una duración similar a la de la constante de desensibilización, indican que el principal mecanismo por el cual el canal se cierra es la desensibilización. Esta es una característica única entre los distintos nAChRs. La rápida desensibilización y corta duración de los eventos de apertura podrían evitar la toxicidad celular debida a un incremento en el Ca^{2+} intracelular por una sobreestimulación de $\alpha 7$.⁹⁸

III.1.3.ii. Modulación alostérica del receptor nicotínico $\alpha 7$

Las estrategias terapéuticas más comunes para corregir los déficits colinérgicos (es decir, una baja concentración de ACh), incluyen: el aumento de la síntesis de ACh, la estimulación de los receptores colinérgicos (empleando agonistas distintos de ACh), o la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Sin embargo, el incremento en la síntesis de ACh ha mostrado poca eficacia, y la utilización de agonistas colinérgicos induce desensibilización de los receptores, llevando a tolerancia y por lo tanto pérdida de los efectos beneficiosos. Por otra parte, la inhibición de la acetilcolinesterasa produce mejoras de los síntomas de corta duración, que no impiden la progresión de la enfermedad.¹¹⁴

Una de las nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la función colinérgica es la utilización de moduladores alostéricos positivos (PAMs, *positive allosteric modulators*). Los

¹¹³ (a) Mike, A; Castro, N.G; Albuquerque, E.X. *Brain Res.* **2000**, *882*, 155–168. (b) daCosta, C.J.B; Sine, S. M. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2013**, *110*, 6595–6600.

¹¹⁴ Maelicke, A.; Albuquerque, E. X. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *393* (1–3), 165–170.

PAMs son compuestos cuyo sitio de unión al receptor, llamado sitio alostérico, es distinto al de unión al agonista (sitio ortostérico). Estos compuestos producen la potenciación de la respuesta del receptor a su agonista ortostérico, pero tienen un efecto muy escaso, o nulo, por sí solos. En otras palabras, los PAMs actúan solo en presencia del agonista, ya que no producen la apertura del canal iónico por sí mismos.¹¹⁵

Es probable que exista una variedad de distintos sitios alostéricos de unión en los nAChRs.¹¹⁶ Uno de los más importantes está localizado en una cavidad intrasubunidad, formada por cinco aminoácidos entre las cuatro hélices α transmembrana de cada subunidad $\alpha 7$, y es considerado un sitio modulador de receptores cys-loop altamente conservado.⁹⁸

Además de los PAMs, también existen los moduladores alostéricos negativos (NAMs, *negative allosteric modulators*), que tienen efectos inhibitorios sobre el canal, los agonistas alostéricos, los cuales activan al receptor, aún en ausencia de agonista, desde un sitio alostérico, y los moduladores alostéricos silentes (SAMs, *silent allosteric modulators*), los cuales no tienen efecto sobre la respuesta del agonista, pero bloquean el sitio alostérico.^{96,116} El accionar de cada tipo de modulador se representa en la **Figura III.9**.

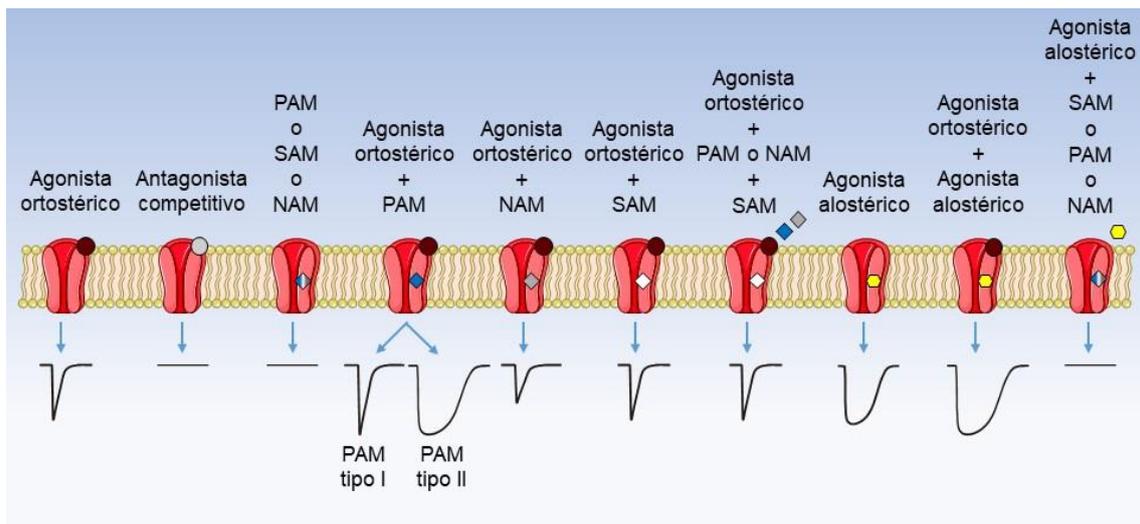


Figura III.9. Clasificación de moduladores del receptor $\alpha 7$, según su accionar en sitios alostéricos u ortostéricos. Debajo, se muestran las gráficas de corrientes macroscópicas que se esperan en cada caso.

La potencial utilización de PAMs como estrategia terapéutica presenta diferentes ventajas (**Figura III.10**, p.44). En primer lugar, mantienen las características temporales y espaciales de la activación endógena. Esto se debe a que no activan por sí solos al receptor, sino

¹¹⁵ (a) Andersen, N. D.; Nielsen, B. E.; Corradi, J.; Tolosa, M. F.; Feuerbach, D.; Arias, H. R.; Bouzat, C. *Neuropharmacology* **2016**, *107*, 189–200. (b) Véase Ref.98 y 114.

¹¹⁶ Taly, A.; Corringer, P. J.; Guedin, D.; Lestage, P.; Changeux, J. P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8* (9), 733–750.

que aumentan la eficacia de la activación por agonistas endógenos, que son liberados naturalmente según las necesidades fisiológicas.

En segundo lugar, los PAMs muestran mayor selectividad, debido a que los sitios alostéricos son menos conservados evolutivamente, entre los distintos nAChRs, que los sitios ortostéricos. Por otra parte, permiten mayor diversidad estructural y de efectos finales, a raíz de que existen distintos sitios alostéricos dentro de un mismo receptor. Además, la activación de los receptores nicotínicos se ve disminuida a causa de la desensibilización de $\alpha 7$, por lo que aquellos PAMs que actúen revirtiendo dicho proceso evitarían, o reducirían, el desarrollo de tolerancia, haciendo más eficaces los tratamientos con agonistas. Por último, el empleo de PAMs evita la sobreestimulación de los receptores, y además actúan como protectores neuronales.^{98,101,114}

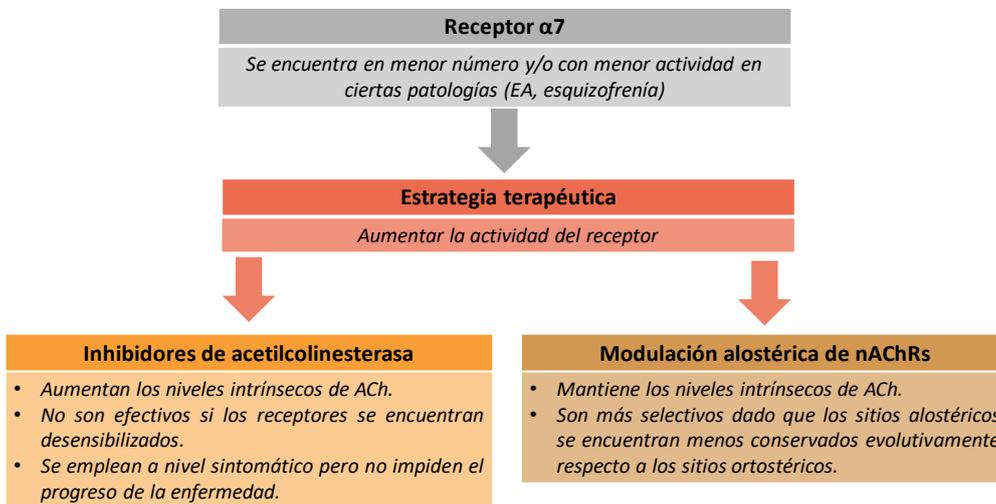


Figura III.10. Comparación entre inhibidores de acetilcolinesterasa y PAMs para el tratamiento de déficits colinérgicos.

Por lo expuesto anteriormente, la modulación alostérica del receptor nicotínico $\alpha 7$ resulta una herramienta terapéutica prometedora para el tratamiento de diversos desórdenes neurológicos, como pueden ser deficiencias cognitivas, esquizofrenia, dolor y procesos inflamatorios.^{100b,101} En este sentido, se han evaluado distintos PAMs y agonistas en ensayos clínicos, alguno de los cuales continúan en proceso.¹¹⁷

¹¹⁷ Hashimoto, K. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, 21 (26), 3797–3806.

III.1.3.iii. Clasificación de PAMs del receptor $\alpha 7$ según su modo de acción

En base a los efectos ejercidos en corrientes macroscópicas, se clasifica a los PAMs como tipo I o tipo II. En el caso de PAMs de tipo I, como el 5-hidroxiindol (5-HI) ¹¹⁸ y la Ivermectina (IVM)¹¹⁹, se produce un aumento en la corriente inducida por el agonista, pero no se afecta significativamente la velocidad de decaimiento (**Figura III.11**). En cambio, los PAMs de tipo II aumentan el pico de corriente y ralentizan el decaimiento.¹²⁰ Entre los PAMs de tipo II, el más eficaz y mejor caracterizado es el compuesto PNU-120596.¹²¹

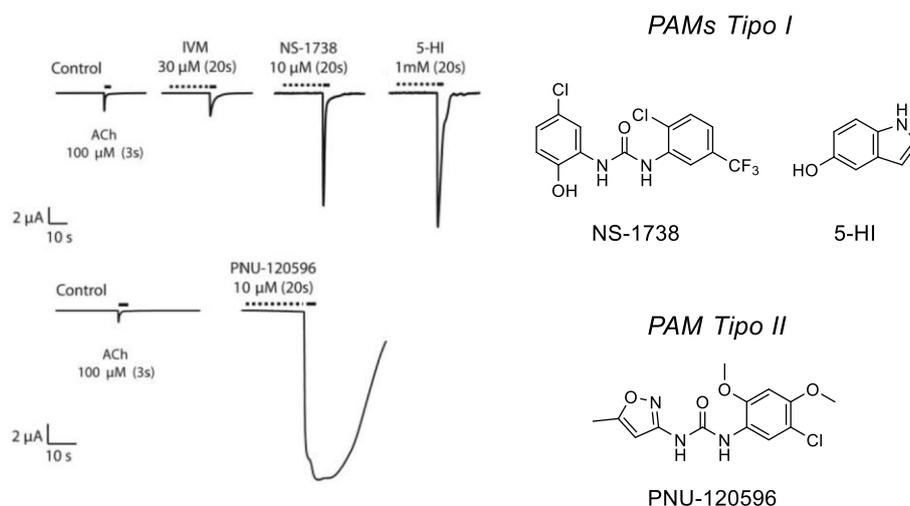


Figura III.11. Registro de corrientes macroscópicas, producidas por ACh (100 μ M), en presencia de los PAMs NS-1738, IVM, 5-HI, y PNU-120596. Imagen adaptada de Bertrand et al., 2008.¹²⁰

Aún se desconocen las razones por las cuales los PAMs de tipo I y II actúan de manera distinta, aunque podría postularse que esto se debe a diferencias en la estructura química, a la presencia de diferentes sitios de unión alostéricos, o bien a diferentes efectos alostéricos (véase **Figura III.9**, p.43). La mejor manera de identificar los sitios de unión alostéricos consistiría en co-cristalizar al receptor en conjunto con la droga, pero hasta el momento no se ha logrado obtener la estructura cristalina del receptor $\alpha 7$. En consecuencia, la localización de los sitios de unión alostéricos se ha propuesto a través del estudio de receptores mutados, o quimeras (estos se abordarán en mayor detalle en la [Sección III.3.8.iv](#)).

¹¹⁸ Zwart, R.; De Filippi, G.; Broad, L.M.; McPhie, G.I.; Pearson, K.H.; Baldwinson, T.; Sher, E. *Neuropharmacology*. **2002**, *43*, 374–384.

¹¹⁹ Krause, R.M.; Buisson, B.; Bertrand, S.; Corringer, P.J.; Galzi, J.L.; Changeux, J.P.; Bertrand, D. *Mol Pharmacol*. **1998**, *53*, 283–294.

¹²⁰ Bertrand, D; Bertrand, S; Cassar, S; Gubbins, E; Li, J; Gopalakrishnan, M. *Mol Pharmacol* **2008**, *74*, 407–1416.

¹²¹ Hurst, R. S.; Hajós, M.; Raggenbass, M.; Wall, T. M.; Higdon, N. R.; Lawson, J. A.; Rutherford-Root, K. L.; Berkenpas, M. B.; Hoffmann, W. E.; Piotrowski, D. W.; et al. *J. Neurosci*. **2005**, *25* (17), 4396–4405.

III.1.3.iv. Evolución en el desarrollo de PAMs: estructuras representativas.

En principio, se desarrolló una primera generación de PAMs evaluando compuestos conocidos por ejercer otro tipo de actividad biológica, entre los cuales se destacan: el antiparasitario IVM, el alcaloide galantamina, que también presenta actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa, el inhibidor de tirosina quinasa genisteína, y el metabolito de serotonina 5-HI, el cual también potencia al receptor 5-HT₃ (**Figura III.12**). Esta primera generación de PAMs carece de la potencia y eficacia deseadas, además de no ser selectivos al receptor $\alpha 7$, por lo cual se sintetizaron nuevos compuestos con actividad $\alpha 7$ -PAM. En la segunda generación de PAMs, es notoria la presencia de enlaces amida o urea (compuestos CCMI, NS-1738, SB-206553, PNU-120596), los heterociclos 1,3-tiazol e isoxazol (LY-2087101, JNJ-1930942 y CCMI, PNU-120596 respectivamente) y el núcleo de benzosulfonamida (TQS, A-867744).¹²²

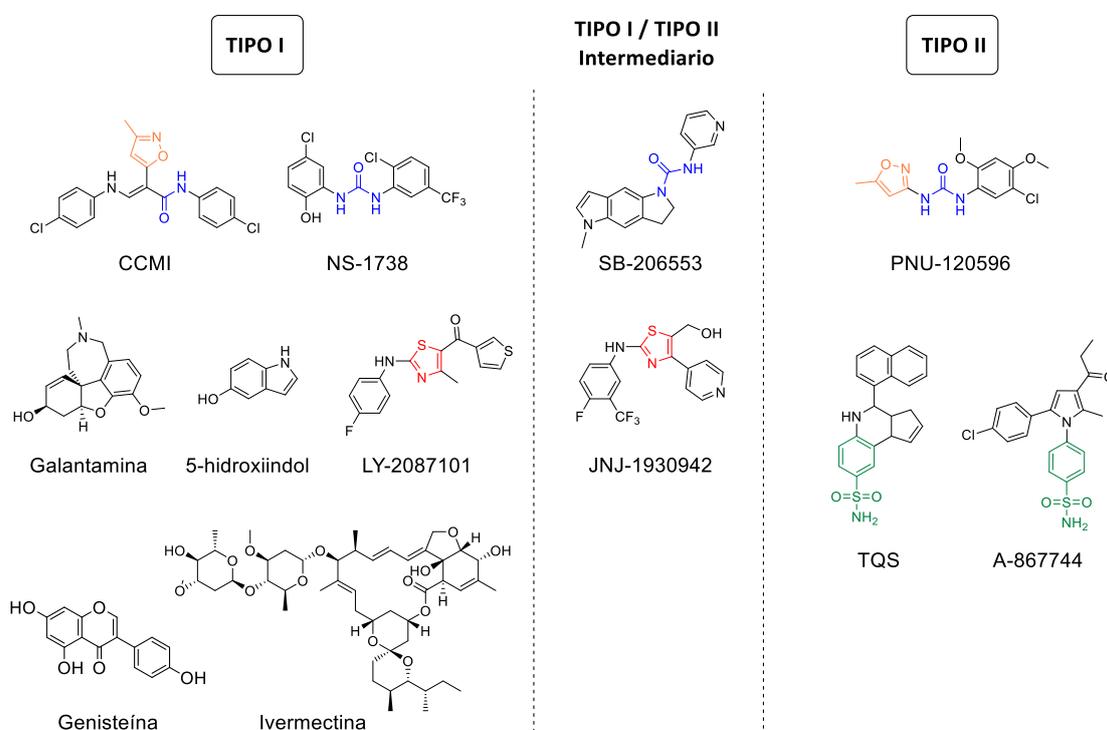


Figura III.12. Estructuras de $\alpha 7$ -PAMs activos. Figura adaptada de Williams et al., 2011.¹²⁴

Como puede observarse, existe una gran diversidad estructural entre los distintos PAMs. Además, no existen relaciones claras entre la presencia de un determinado bloque estructural, o *scaffold*, en la estructura química, y el efecto observado en corrientes macroscópicas, es decir, de qué tipo de PAM se trata. Pequeñas variaciones en la estructura del PAM pueden modificar su modo de acción (por ej., en el caso del PAM tipo I LY-2087101 y el de propiedades intermedias tipo I / tipo II JNJ-2087101, o la urea NS-1738, PAM tipo I, y la urea PNU-120596, PAM tipo II).

¹²² Williams, D. K.; Wang, J.; Papke, R. L. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, 82 (8), 915–930.

III.1.3.iv.a. Familia de benzosulfonamidas. Compuesto TQS y derivados

El compuesto denominado TQS fue patentado, en conjunto con diversos derivados de ciclopentaquinolinas, como PAM selectivo al receptor $\alpha 7^{123}$, y posteriormente catalogado como PAM tipo II.¹²⁴ Si bien se podría considerar que el núcleo de benzosulfonamida se corresponde únicamente con PAMs de tipo II (véase **Figura III.12**, p.46), un análisis más detallado de esta familia revela que estos compuestos, del tipo **59** y **60**, presentan distintos modos de acción, inclusive como agonistas alostéricos (**Figura III.13**).¹²⁵

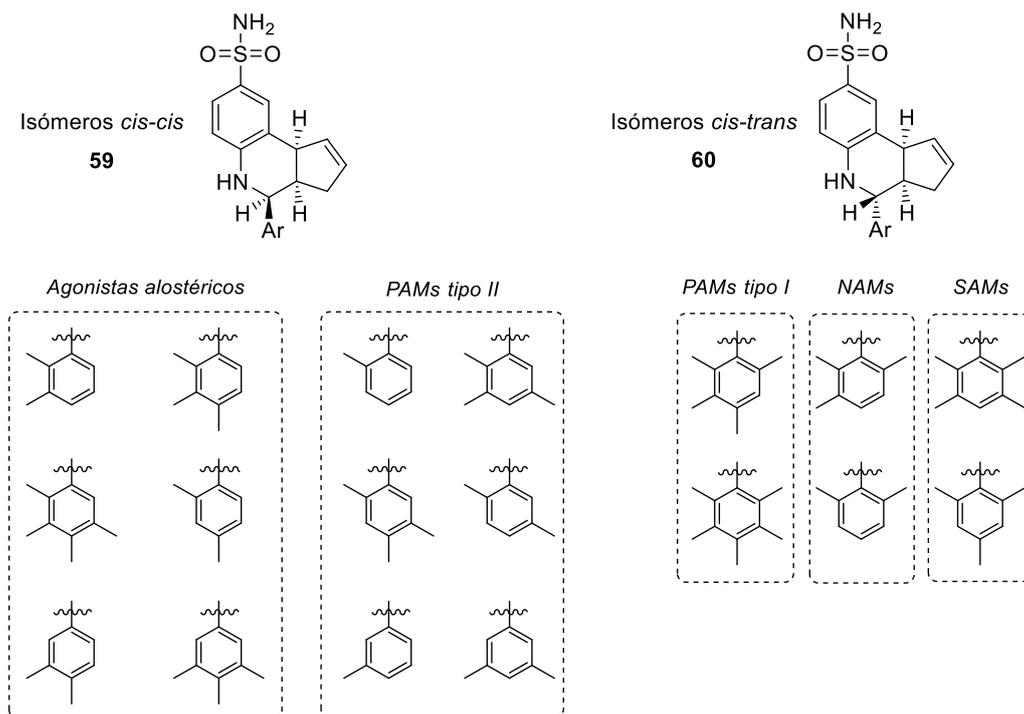


Figura III.13. Familia de derivados de TQS con distinta actividad sobre el receptor $\alpha 7$. Figura adaptada de Gill et al., 2015.¹²⁵

Otras modificaciones sobre el TQS involucran la síntesis de derivados con el sustituyente 4-bromofenil en lugar del grupo naftilo¹²⁶ (**Figura III.14**, p.48), y el reemplazo del núcleo de tetrahydroquinolina por el anillo 1,2,4-triazol.¹²⁷ En ambos casos se obtuvieron derivados activos con una amplia gama de actividades sobre el receptor $\alpha 7$.

¹²³ Becker, C.; Comstock, J.; Michne, W.F.; Murphy, M.; Phillips, E.; Rosamond, J.D.; Simpson, T.R.: WO 2004098600 A1 (2004).

¹²⁴ Williams, D. K.; Wang, J.; Papke, R. L. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82* (8), 915–930.

¹²⁵ Gill-Thind, J. K. K.; Dhankher, P.; D'Oyley, J. M.; Sheppard, T. D.; Millar, N. S. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (6), 3552–3562.

¹²⁶ Gill, J. K.; Savolainen, M.; Young, G. T.; Zwart, R.; Sher, E.; Millar, N. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (14), 5867–5872.

¹²⁷ Chatzidaki, A.; D'Oyley, J. M.; Gill-Thind, J. K. K.; Sheppard, T. D.; Millar, N. S. *Neuropharmacology* **2015**, *97*, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.006>.

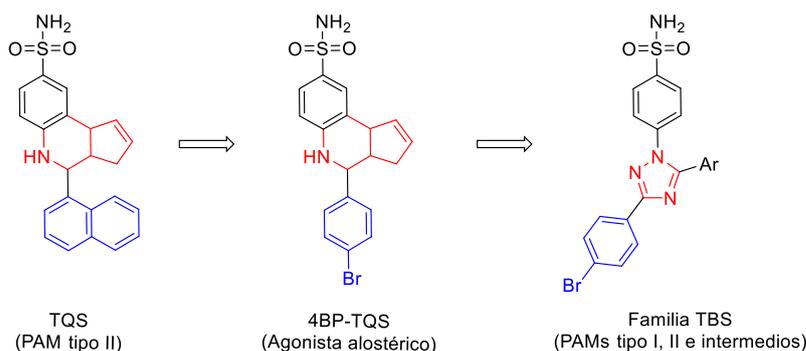


Figura III.14. Familia de derivados de TQS, 4BP-TQS y TBS.

III.1.3.iv.b. Familia de ureas/amidas. Compuesto PNU-120596 y derivados

El primer reporte de ureas y tioureas con actividad $\alpha 7$ -PAM se realizó en 2004 por parte de científicos de Pfizer. Las rutas sintéticas empleadas comprendieron tanto la adición de aminas/anilinas sobre isocyanatos/isotiocyanatos como el empleo de carbinoles unidos a buenos grupos salientes (**Figura III.15**).¹²⁸

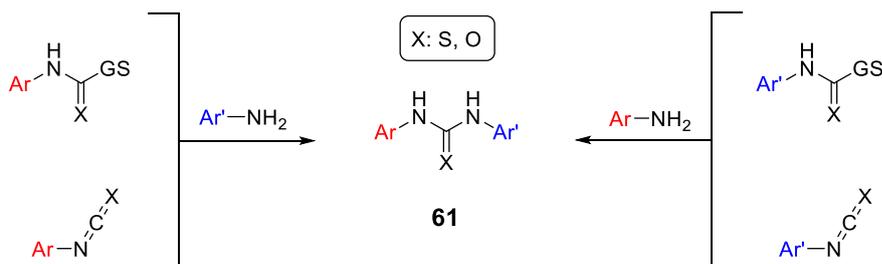


Figura III.15. Estrategias empleadas en la síntesis de ureas asimétricas.

De esta familia (**61**), destacan los compuestos mostrados en la **Figura III.16**, actuando como PAMs tipo II, dado que reactivan al receptor, desde el estado desensibilizado, luego de la aplicación de agonistas como el PNU-282987.

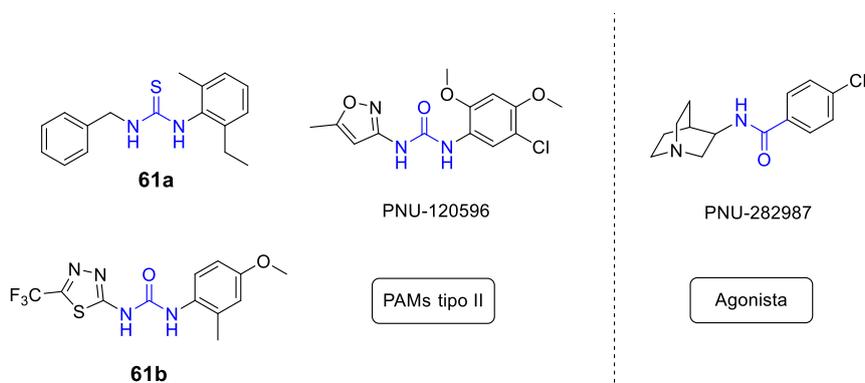


Figura III.16. Desarrollo de ureas (**61b**) y tioureas (**61a**) como $\alpha 7$ -PAMs tipo II.

¹²⁸ Rogers, B. N., Piotrowski, D. W., Margolis, B. J., Myers, J. K., Groppi, V. E. J., Rudmann, D. G.: WO04085433 A2 (2004).

Respecto a compuestos que puedan actuar agonistas del receptor $\alpha 7$, también podemos encontrar aminas, en particular aminas cíclicas, unidas a heterociclos (compuestos del tipo **62**, **Figura III.17**), en lugar de amidas (como en el PNU-282987).¹²⁹

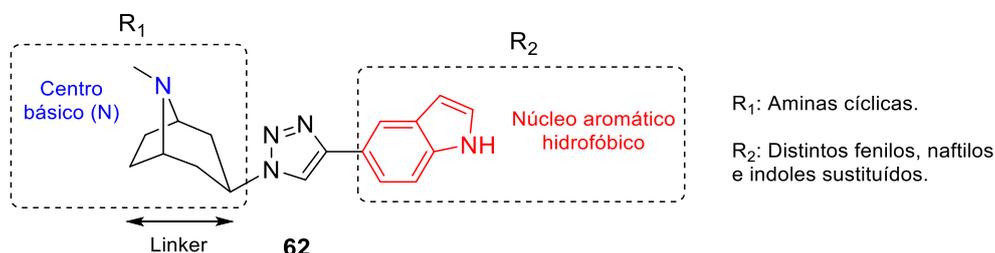


Figura III.17. Estructura general de agonistas del receptor $\alpha 7$.

Por otra parte, la farmacéutica NeuroSearch reportó independientemente una serie de biaril ureas para el tratamiento de desórdenes colinérgicos. Se encontró que al menos uno de los grupos arilo debe poseer grupos electroattractores. Se destaca el compuesto NS-1738 (**Figura III.18**), el cual revierte las dificultades de aprendizaje generadas tras emplear escopolamina (antagonista muscarínico), demostrando que $\alpha 7$ -PAMs pueden actuar sobre déficits cognitivos.¹³⁰ Por otro lado, la farmacéutica AstraZeneca describe la síntesis de 5-pirazol ureas (**63**), y su empleo como moduladores de receptores nicotínicos.

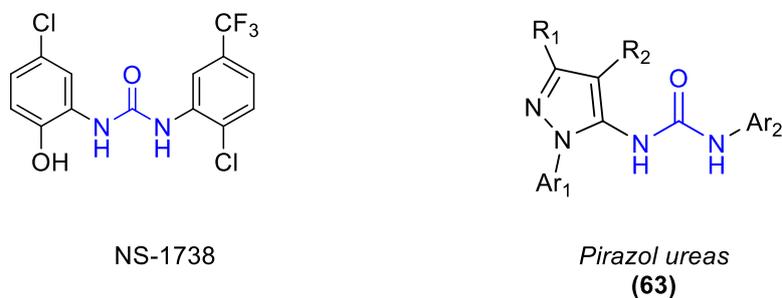


Figura III.18. Biaril y pirazol ureas empleadas como $\alpha 7$ -PAMs.

¹²⁹ Arunrungvichian, K.; Boonyarat, C.; Fokin, V. V.; Taylor, P.; Vajragupta, O. *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6* (8), 1331–1340.

¹³⁰ Dahl, B. H., Peters, D., Olsen, G. M., Jorgensen, T. D., Timmermann, D. B.: WO 05092843 A1 (**2005**).

Finalmente, *N*-aril amidas derivadas de furano (**64**), con actividad α 7-PAM, fueron reportadas por el grupo de Arias.¹³¹ Nuevamente, pequeñas modificaciones en la estructura producen variaciones en el modo de acción de los compuestos (Véanse los distintos sustituyentes R, **Figura III.19**). El reemplazo del anillo de furano por indol también genera actividad de tipo antagonista sobre nAChRs.

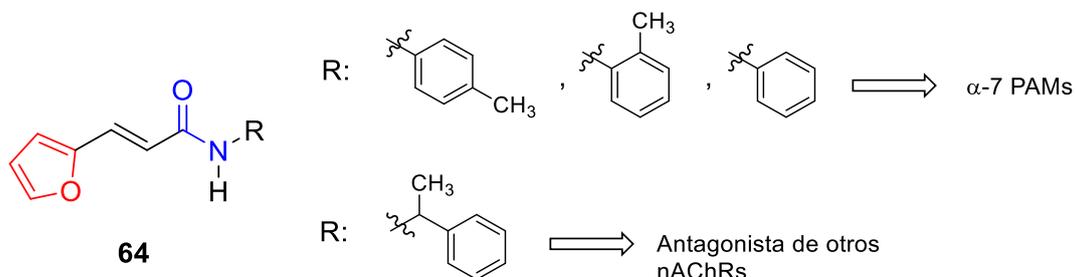


Figura III.19. Síntesis de derivados de amida con actividad α 7-PAM.

¹³¹ Arias, H. R.; Gu, R. X.; Feuerbach, D.; Guo, B. B.; Ye, Y.; Wei, D. Q. *Biochemistry* **2011**, 50 (23), 5263–5278.

III.2. Capítulo I: Objetivos específicos

En función de los antecedentes descriptos previamente, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Síntesis de nuevos PAMs del receptor nicotínico $\alpha 7$, que incorporen 1,2,3-triazoles en su estructura.

Diseño y elección de bloques estructurales

En principio, se realizó una revisión de los $\alpha 7$ -PAMs conocidos (**Figura III.12**, [Sección III.1.3.iv](#)), en particular aquellos que presentan heterociclos nitrogenados en su estructura (indoles, piridinas, isoxazoles, tiazoles y 1,2,4-triazoles). Compuestos representativos se muestran en la **Figura III.19**.

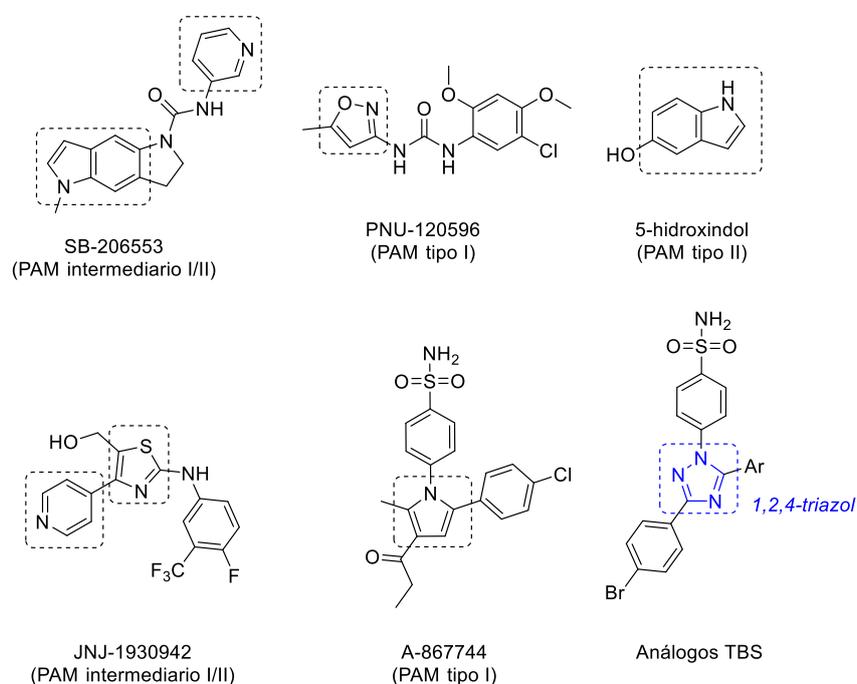


Figura III.19. Estructuras de $\alpha 7$ -PAMs activos, conteniendo heterociclos nitrogenados.

También hemos considerado que no se han reportado estructuras derivadas de 1,2,3-triazol con actividad $\alpha 7$ -PAM, a pesar de que el mismo presenta una gran variedad de actividades biológicas (Veáse [Sección I.1.4](#), Introducción general), y que además puede actuar como bioisómero de varios heterociclos⁴¹, en particular 1,2,4-triazoles¹³² e isoxazoles.¹³³

¹³² De Lourdes G. Ferreira, M.; Pinheiro, L. C. S.; Santos-Filho, O. A.; Peçanha, M. D. S.; Sacramento, C. Q.; Machado, V.; Ferreira, V. F.; Souza, T. M. L.; Boechat, N. *Med. Chem. Res.* **2014**, 23 (3), 1501–1511.

¹³³ Yermolina, M. V.; Wang, J.; Caffrey, M.; Rong, L. L.; Wardrop, D. J. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (3), 765–781.

- Sintetizar derivados que contengan fosfonatos, ácidos fosfónicos u otras funciones fosforadas, teniendo en cuenta que estos grupos tampoco han sido evaluados como farmacóforos en PAMs de receptores nicotínicos, a pesar de la extensa variedad de actividades biológicas vinculadas a estas funcionalidades de fósforo (Veáse [Sección 1.2](#), Introducción general).
- Evaluar los derivados sintetizados como $\alpha 7$ -PAMs a nivel de corrientes microscópicas. Clasificar los derivados activos como PAMs de tipo I o II, teniendo en cuenta su comportamiento en corrientes macroscópicas y frente a receptores mutados.

A raíz de estas consideraciones se planteó el diseño y la síntesis de una serie 1,2,3-triazoles seleccionando fragmentos estructurales y/o unidades isostéricas presentes en otros potenciadores conocidos (**Figura III.20**).

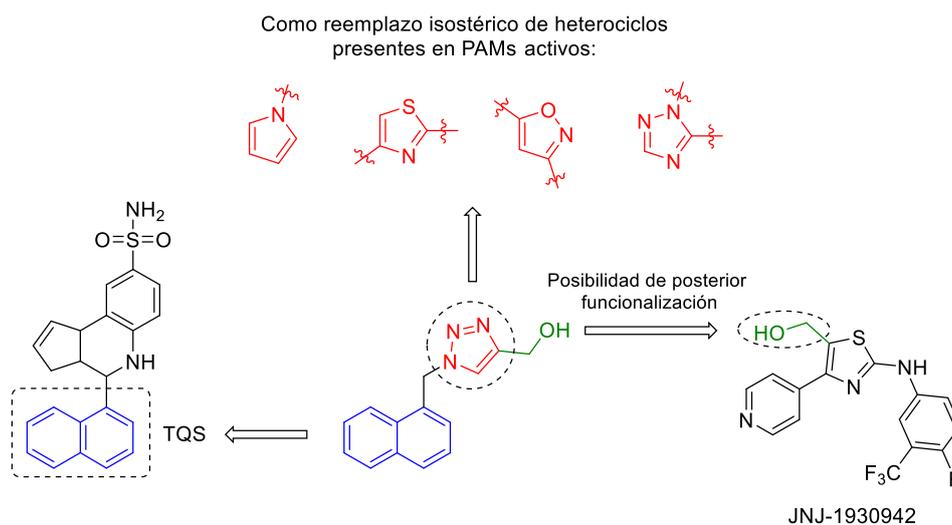


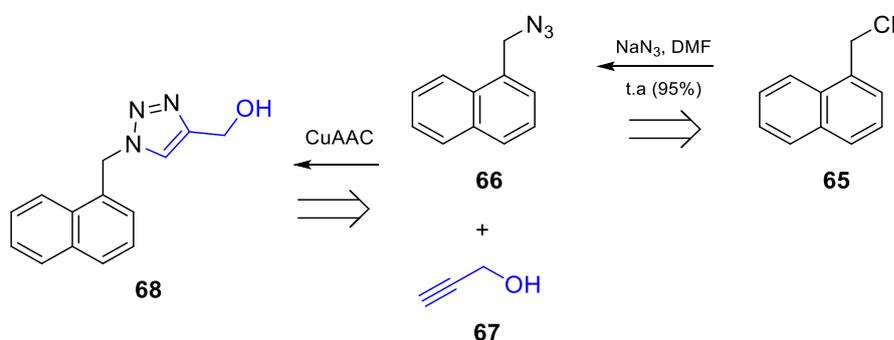
Figura III.20. Diseño del tipo de triazol a sintetizar en base a $\alpha 7$ -PAMs conocidos.

La presencia del grupo hidroximetil, en posición 4 del anillo de triazol le otorga versatilidad a la búsqueda de nuevos PAMs, ya que posibilita la preparación de bibliotecas de nuevos compuestos por funcionalización en dicha posición, por ej., mediante la incorporación de fosfonatos.

III.3. Resultados y discusión

III.3.1. CuAAC catalizada por CuNPs

La obtención del triazol propuesto, como paso clave en la construcción de la estructura base para la preparación de potenciales PAMs, se llevó a cabo a través de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos terminales catalizada por cobre, empleando catalizadores sintetizados en nuestro grupo de investigación, los cuales consisten en nanopartículas de cobre soportadas o sin soportar. En el análisis retrosintético (**Esquema III.1**), quedan planteados los precursores para la reacción click, 1-azidometilnaftaleno (**66**) y alcohol propargílico (**67**).

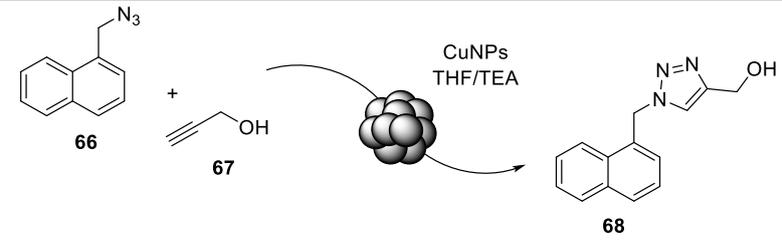


Esquema III.1. Análisis retrosintético del triazol **68** y obtención de la azida **66**.

El precursor **66** se obtuvo a partir de 1-clorometilnaftaleno (**65**), por sustitución con azida de sodio con excelente rendimiento (95%). Una vez obtenidos los precursores, se procedió a la optimización de la reacción de cicloadición.

III.3.1.i. CuAAC catalizada por CuNPs: selección del catalizador

En primera instancia, se evaluaron las CuNPs sin soportar, e inmovilizadas sobre distintos materiales, para determinar cuál es el mejor catalizador en la reacción de cicloadición entre 1-azidometilnaftaleno (**66**) y alcohol propargílico (**67**). Se eligió THF como solvente de reacción, ya que es comúnmente empleado en la síntesis de nanopartículas a través del método $\text{MCl}_n\text{-Li-areno(cat.)}$ mencionado previamente ([Sección I.1.2](#)). En todos los casos la carga de catalizador fue 5 mol%, y se agregó 1 equivalente de TEA como base. Otras variables a optimizar fueron la temperatura y el tiempo de reacción. Los resultados de esta optimización se resumen en la **Tabla III.1**.



Entrada	CuNPs (5mol %)/Soporte	T (°C)	t (h)	Conversión (%) ^a
1	Sin soportar	25	3	100
2	Nanotubos de carbono (NTsC)	25	24	74
3		65	3	60
4	Carbón activado (C)	25	6	99
5		65	3	95
6	Zeolita	25	24	93
7		65	3	100
8	Óxido de titanio (TiO ₂)	25	24	21
9		65	3	27
10	Montmorillonita (MK-10)	25	24	78
11		65	3	60
12	Óxido de magnesio (MgO)	25	24	89
13		65	3	42
14	MagSilica	25	24	72
15		65	3	98

^a Evaluado por CG-EM

Tabla III.1. Optimización de la CuAAC para la obtención de **68**.

En primer lugar, se evaluaron las CuNPs sin soportar, y la reacción se realizó a temperatura ambiente (Entrada 1), dado que las mismas representan al sistema más reactivo. En este caso, se observó la conversión completa de la azida de partida, para dar lugar al producto esperado, a las 3 h de reacción. Una limitación que posee el empleo de nanopartículas desnudas es el caso de sistemas que presenten baja reactividad, donde resulta necesario aumentar la temperatura, que favorece la aglomeración de las NPs, con la consecuente pérdida de actividad.

Posteriormente se evaluaron las CuNPs depositadas sobre distintos materiales, pudiéndose clasificar a los soportes dentro de 3 grupos principales: materiales inertes de elevada porosidad y estructura ordenada, carbón activado (superficie plana de tipo grafito), nanotubos de carbono y zeolita; por otra parte, óxidos inorgánicos, MgO, TiO₂ y MK-10 (mineral que contiene silicatos y óxidos de Al y Mg) y finalmente MagSilica, material magnético que permite la rápida recuperación y reutilización del catalizador.²⁰ Para la preparación de las CuNPs soportadas, se empleó 1 mmol de CuCl₂ por cada 0,8 g de soporte, y se consideró esta carga nominal para calcular la cantidad de catalizador a emplear en cada reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en dos condiciones: temperatura ambiente, y reflujo de THF.

Dentro del primer grupo, se destaca el uso de carbón activado como soporte (entradas 4 y 5), en comparación con los nanotubos de carbono (entradas 2 y 3). Para las CuNPs/C, no se observaron grandes diferencias en la conversión con las condiciones de reacción propuestas, logrando el mejor resultado trabajando a t.a por tiempos más prolongados (6 h, entrada 4). En el caso de las CuNPs/NTsC, aún tras 24 h de reacción, la conversión apenas superó el 70% (entrada 2). CuNPs/Z también resultó un catalizador muy eficiente para la CuAAC, en ambas condiciones de reacción las conversiones fueron superiores al 90% (entradas 6 y 7).

Dentro de los óxidos inorgánicos, el empleo de óxido de titanio como soporte, de carácter anfótero, dio lugar al catalizador menos efectivo, presentando conversiones bajas en ambas condiciones de reacción (entradas 8 y 9). Por otra parte, considerando el carácter básico del óxido de magnesio, se podría esperar que este soporte facilite la formación del alquiluro de cobre, acorde al mecanismo en el **Esquema I.2** (p.3, Introducción general), favoreciendo la formación del triazol. Trabajando a t.a, se observaron muy buenas conversiones (89% de conversión, entrada 12), sin embargo, al aumentar la T se observó un marcado descenso en la conversión (42%, entrada 13), siendo el único caso en el cual se observaron variaciones tan grandes entre ambas condiciones de reacción, para un mismo catalizador. El hecho de que el MgO también presente sitios ácidos de Lewis, dependiendo del método empleado para su preparación¹³⁴, puede contribuir a que este catalizador presente un desempeño menor al esperado. El empleo de CuNPs/MK-10 como catalizador produjo conversiones moderadas (entrada 11) a buenas (78%, entrada 10). Finalmente, las CuNPs/MagSiO₂ resultaron un catalizador muy eficiente para la CuAAC, especialmente a reflujo de THF (entrada 15).

En conclusión, de los 8 catalizadores evaluados, se destacaron las CuNPs sin soportar, y aquellas soportadas en carbón activado, zeolita o magsilica (esto puede observarse también en

¹³⁴ Lopez Goerne, T.; Gomez, R.; Navarrete, J.; López-Salinas, E. (1998). *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. **1998**, *13*, 1043-1047.

la Figura III.21). Considerando estos resultados, se eligió trabajar con NPs soportadas, que presentan una serie de ventajas, ya que pueden almacenarse durante varios meses sin pérdida de actividad, y no deben prepararse *in situ* cada vez que se quiera llevar a cabo la reacción. Teniendo en cuenta las elevadas conversiones observadas en ambas condiciones de reacción, su bajo costo, fácil preparación y disponibilidad, se seleccionó carbón activado como soporte.

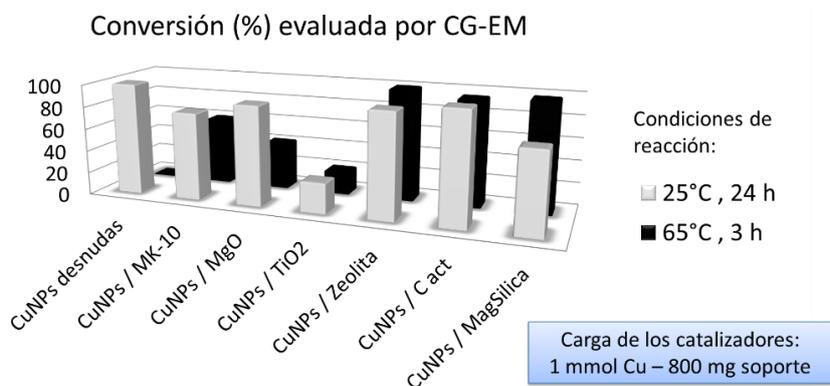
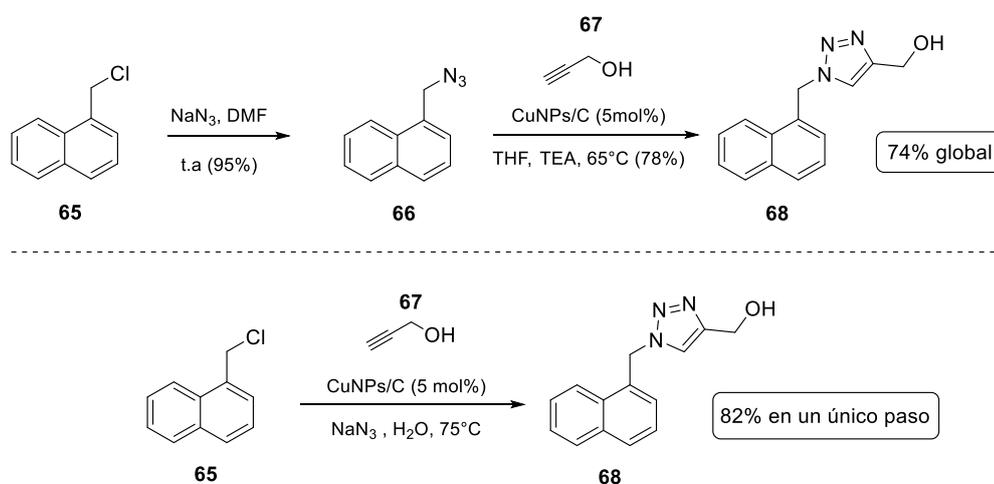


Figura III.21. Resultados de la optimización de la reacción de cicloadición para la obtención de **68**.

III.3.1.ii. CuAAC catalizada por CuNPs: selección del solvente

Habiendo seleccionado las CuNPs/C como catalizador de trabajo, y teniendo en cuenta reportes previos sobre su uso en reacciones multicomponente *one pot* para la CuAAC en agua¹³⁵, se llevó a cabo la reacción entre 1-clorometilnaftaleno (**65**), azida de sodio y alcohol propargílico (**67**), generando la azida orgánica en el medio de reacción, para luego sufrir la adición 1,3-dipolar con el alquino. Se muestran a continuación los resultados obtenidos, y la comparación con las condiciones de reacción empleadas previamente (**Esquema III.2**).



Esquema III.2. Comparación de condiciones de reacción en la obtención del triazol **68**.

¹³⁵ Alonso, F.; Moglie, Y.; Radivoy, G.; Yus, M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (18), 6385–6395.

Resultan claras las ventajas de llevar a cabo la reacción con la estrategia *one pot* multicomponente. En primer lugar, el uso de agua como solvente es uno de los principios postulados dentro de la química verde. Además, se evita un paso de reacción y purificación, mejorando los rendimientos de producto aislado. Finalmente, en estas condiciones no es necesario el empleo de TEA, ya que el propio solvente actúa como base. En conclusión, se elegirán estas condiciones de reacción siempre que sea posible, ya que representan una manera más eficiente, y menos contaminante, de obtener los triazoles deseados.

III.3.2. Síntesis de derivados fosforados de (1-(1-naftalenilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il) metanol (**68**)

Una vez sintetizado el triazol **68**, se procedió a preparar una primera serie de compuestos a evaluar como potenciales PAMs del receptor nicotínico $\alpha 7$, acorde a los objetivos descriptos previamente. El grupo funcional fosforado seleccionado como farmacóforo fue el fosfonato. Como puede observarse en la **Figura III.22**, se aplicaron dos estrategias para la síntesis de estos compuestos:

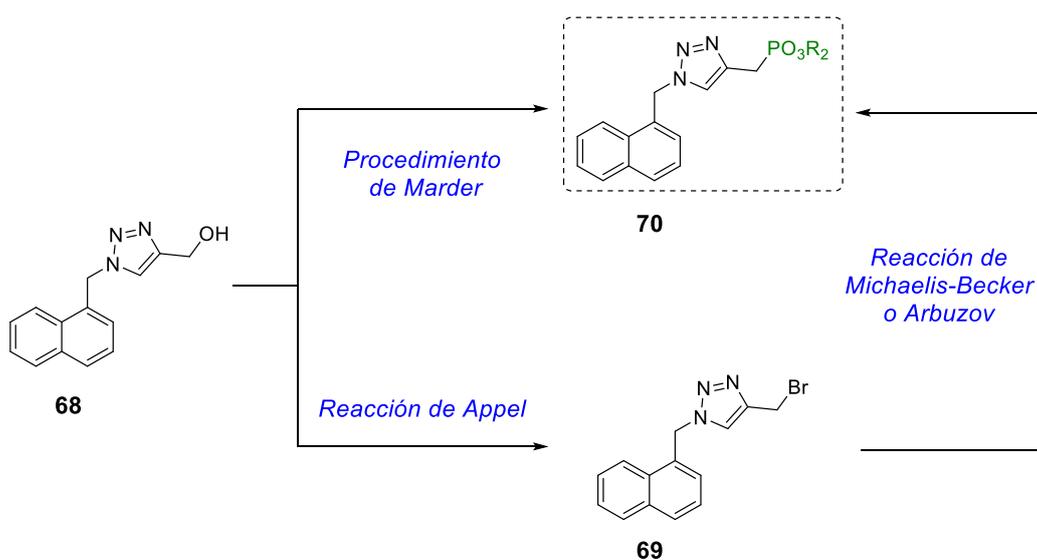


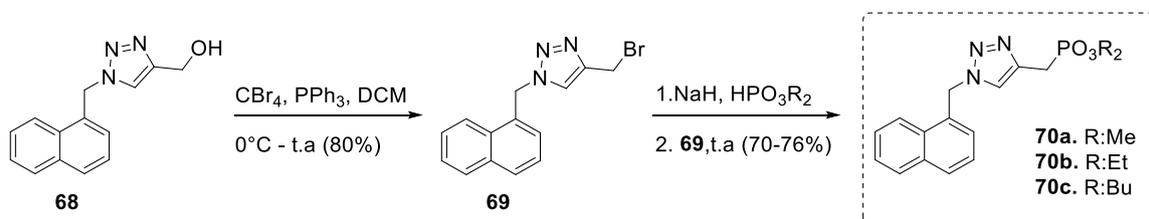
Figura III.22. Alternativas propuestas para la síntesis de fosfonatos derivados del triazol **68**.

En primer lugar, se evaluó la transformación directa del alcohol **68** en distintos fosfonatos, sin necesidad de formar el haluro, a través del procedimiento desarrollado por el grupo de Marder. Este método describe la reacción directa entre alcoholes bencílicos, ricos en electrones, y trietilfosfito, en presencia de yodo, para dar lugar a los correspondientes fosfonatos con rendimientos moderados a muy buenos.¹³⁶

¹³⁶ Zheng, S.; Barlow, S.; Parker, T. C.; Marder, S. R. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44 (43), 7989–7992.

Los resultados no fueron los esperados, ya que no logró aislarse el producto esperado, recuperando mayoritariamente el sustrato sin reaccionar. Esto pudo deberse a que el sustrato empleado no es lo suficientemente rico en electrones. Por lo tanto, se procedió a la formación del bromuro y posterior transformación en distintos fosfonatos (**Esquema III.3**). El bromuro **69** se formó por tratamiento del alcohol **68** con trifetilfosfina y tetrabromuro de carbono (reacción de Appel)¹³⁷, obteniéndose el producto esperado con muy buen rendimiento.

Para la obtención de los fosfonatos, se evaluaron las reacciones de Arbuzov y Michaelis-Becker, descritas en la [Sección I.5](#). Se prefirió esta última, ya que se requiere menor exceso de fosfito, y se trabaja a menores temperaturas. Se llevó a cabo esta reacción con distintos dialquilsfosfitos, para dar lugar a los fosfonatos de metilo, etilo y butilo (**70a-c** respectivamente). Los rendimientos fueron buenos en todos los casos, siendo el mayor (76%), empleando dimetilfosfito.



Esquema III.3. Síntesis de derivados fosforados del compuesto **68**.

III.3.3. Evaluación biológica: actividad $\alpha 7$ -PAM de la serie I

Se evaluaron los 5 triazoles sintetizados (Serie I) como moduladores alostéricos del receptor nicotínico $\alpha 7$, en presencia del neurotransmisor acetilcolina (100 μ M, actuando como agonista). Los resultados obtenidos se detallan en la **Tabla III.2** (p.59). Cabe destacar que todos los compuestos sintetizados (Series I-V) también fueron evaluados en ausencia de agonista, sin observarse la activación del receptor. Esto significa que los ninguno de los compuestos actúa como agonista, ortostérico o alostérico, del receptor $\alpha 7$.

¹³⁷ Appel, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1975**, *14*, 801–811.

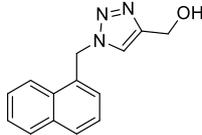
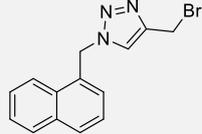
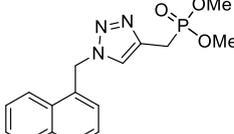
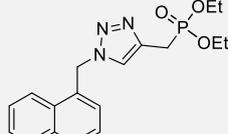
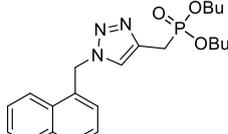
Receptor	Agonista	Compuestos serie I (50 μ M)	τ_{open} (ms)	τ_{burst} (ms)
$\alpha 7$	ACh (100 μ M)	---	$0,27 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,06$
		 68	$0,30 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,05^{**}$
		 69	$0,29 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,07$
		 70a	$1,06 \pm 0,04^{***}$	$2,26 \pm 0,34^{***}$
		 70b	$0,68 \pm 0,12^{***}$	$1,46 \pm 0,67^{***}$
		 70c	$0,19 \pm 0,08$	$0,26 \pm 0,13$

Tabla III.2. Efecto de los compuestos de la serie I sobre el receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias. Se muestran los valores de duración media de las aperturas y de los *bursts* en presencia de ACh y los distintos compuestos. Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control en presencia únicamente de ACh.

Respecto a esta primera serie de compuestos, el alcohol **68** no presenta efectos significativos sobre el *open* (tiempo de estado abierto) y presenta un leve efecto, aunque significativo, sobre la duración de episodios de *bursts*. El bromuro **69** no presenta efectos significativos en ninguno de los dos parámetros respecto al control. Respecto los derivados fosforados, el fosfonato de metilo **70a** presentó la mayor actividad potenciadora, prolongando significativamente la duración de las aperturas en ~ 4 veces, y de los episodios de activación o

bursts en ~7 veces (la comparación gráfica respecto al control puede observarse en la **Figura III.23**). El fosfonato de etilo **70b** también presentó actividad, aunque en menor medida (potenciando el tiempo de estado abierto en ~2,5 veces y los *bursts* en ~4,5 veces). Finalmente, el fosfonato de butilo **70c** no ejerció actividad.

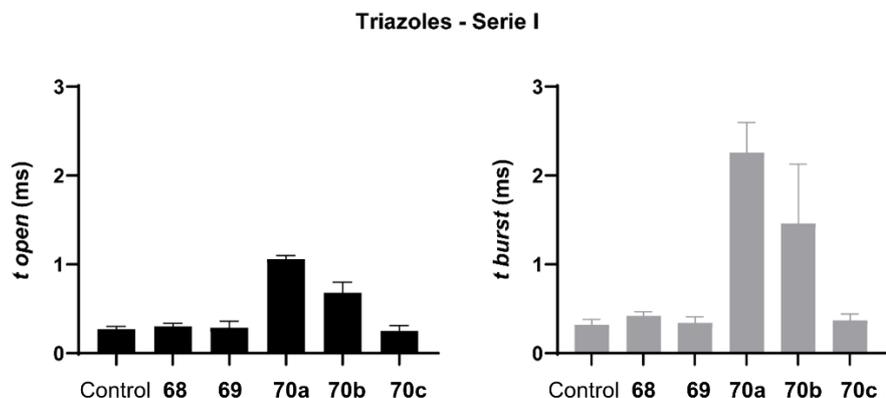
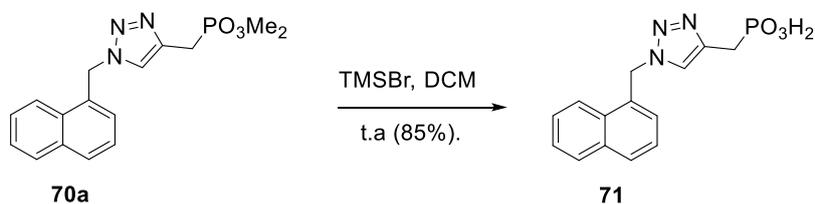


Figura III.23. Gráfica comparativa de los triazoles de la serie I (50 μ M). Efectos sobre el receptor α_7 : tiempos de apertura (izq.) y *bursts* (der.).

Dado que se observó un aumento en la actividad α_7 -PAM a medida que decrece la longitud de la cadena alquílica del éster fosfónico, resultó relevante realizar la hidrólisis del fosfonato **70a**, y evaluar la actividad del ácido fosfónico correspondiente (**71**).

III.3.3.i. Obtención del ácido (1-(1-naftalenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fosfónico (**71**)

La reacción de hidrólisis del fosfonato de metilo **70a** se realizó en primera instancia con HCl concentrado a reflujo, pero no se logró aislar el producto deseado, presumiblemente debido a la gran polaridad combinada del anillo de triazol y el ácido fosfónico. Es por ello que se optó por emplear condiciones de reacción más suaves, TMSBr en DCM a t.a (**Esquema III.4**).¹³⁸



Esquema III.4. hidrólisis del fosfonato de metilo **70a**.

Los subproductos volátiles se eliminaron por evaporación, sin necesidad de realizar extracciones ni purificar por cromatografía en columna. De esta manera, se obtuvo el ácido fosfónico **71** con muy buen rendimiento.

¹³⁸ Catel, Y.; Bock, T.; Moszner, N. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2014**, 52 (24), 3550–3563.

Como puede observarse en la **Tabla III.3**, no existen diferencias significativas en los tiempos de apertura en presencia del ácido fosfónico **71**, por lo cual el compuesto no presenta actividad a esta concentración. Los compuestos **70a-b** y **71** fueron evaluados en mayor profundidad, trabajando a distintas concentraciones (**Sección III.3.8.i**).

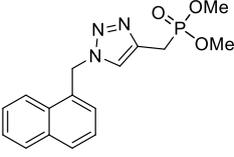
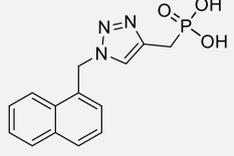
Receptor	Agonista	Compuestos serie I (50 μM)	τ_{open} (ms)	τ_{burst} (ms)
$\alpha 7$	ACh (100 μM)	---	$0,27 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,06$
		 70a	$1,06 \pm 0,04^{***}$	$2,26 \pm 0,34^{***}$
		 71	$0,25 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,07$

Tabla III.3. Efecto del compuesto **71** de la serie I sobre el receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias. Se observa la pérdida de actividad a nivel de aperturas y *bursts*.

Evidentemente, este incremento en la polaridad del compuesto, considerando que a pH fisiológico se encuentra parcialmente desprotonado (**Figura III.24**), tiene un efecto negativo en la actividad potenciadora. Dado que hasta el momento no se reportaron PAMs que presenten estructuras con carga neta, es posible que en el sitio alostérico prevelezcan las interacciones hidrofóbicas, en detrimento de las fuerzas electrostáticas.

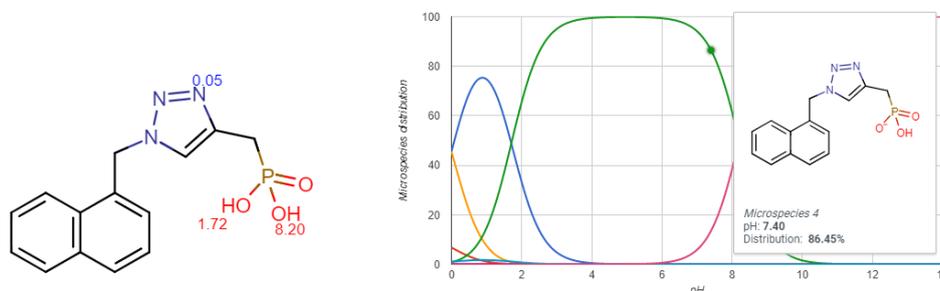


Figura III.24. Distribución de especies del ácido fosfónico **71** a distinto pH. Valores de pKa calculados mediante el programa Chemicalize (<https://chemicalize.com/welcome>).

III.3.4. Estudios SAR a partir de (1-(1-naftalenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fosfonato de dimetilo (**70a**)

Considerando los resultados biológicos obtenidos hasta el momento, que mostraron al fosfonato de metilo **70a** como el compuesto más potente y activo de la serie, se decidió realizar un estudio de relaciones estructura-actividad sobre este compuesto. El objetivo es determinar qué partes de la estructura resultan esenciales para ejercer la actividad biológica, es decir la identificación del farmacóforo, como así también realizar cambios en la estructura que pudiesen aumentar la actividad. Para ello, se sintetizaron nuevas series de compuestos, a través de las cuatro aproximaciones mostradas en la **Figura III.25**.

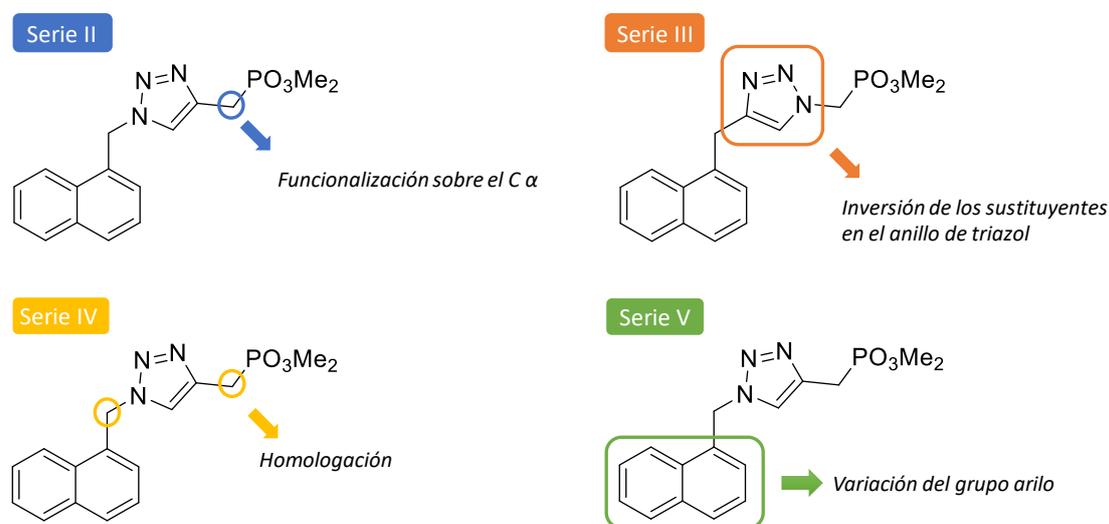


Figura III.25. Estrategias SAR empleadas sobre el fosfonato **70a**.

III.3.4.i. Serie II. Funcionalización sobre el carbono α del fosfonato

Se aplicó una estrategia de *ampliación de la estructura* para la obtención de nuevos análogos. Esta consiste en la adición de nuevos grupos funcionales, o sustituyentes, sobre el compuesto líder. Los mismos pueden aportar nuevas interacciones con la diana, basándose en la idea de que el compuesto líder no interacciona con todas las regiones posibles.¹³⁹ En consecuencia, nos planteamos la síntesis de derivados conteniendo una función adicional sobre el C α , respecto al grupo fosfonato.

Consideramos efectuar la síntesis de α -hidroxifosfonatos y de α -aminofosfonatos. Por una parte, los α -hidroxifosfonatos presentan actividad como inhibidores enzimáticos¹⁴⁰,

¹³⁹ Patrick, G.L. Drug discovery, design, and development. An introduction to Medicinal Chemistry, 5th edition; Oxford University Press: Oxford, **2013**.

¹⁴⁰ Patel, D. V.; Rielly-Gauvin, K.; Ryono, D. E.; Free, C. A.; Rogers, W. L.; Smith, S. A.; DeForrest, J. M.; Oehl, R. S.; Petrillo, E. W. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4557–4569.

herbicidas¹⁴¹, antibióticos¹⁴², fungicidas¹⁴³, anticancerígenos¹⁴⁴ y agentes antioxidantes¹⁴⁵, por lo que resulta de interés la síntesis y evaluación de este tipo de compuestos. Además, permiten una posterior funcionalización a través del grupo hidroxilo libre.¹⁴⁶ Por otro lado, la reacción multicomponente de Kabachnik-Fields entre aldehídos, fosfitos y anilinas permitiría obtener de forma sencilla una serie de α -aminofosfonatos, cuyas propiedades fueron presentadas anteriormente ([Sección I.2.1.iii](#)).

Ambos productos podrían obtenerse a través de la adición de fosfitos sobre el aldehído intermediario **72**. La propuesta sintética se resume en la **Figura III.26**.

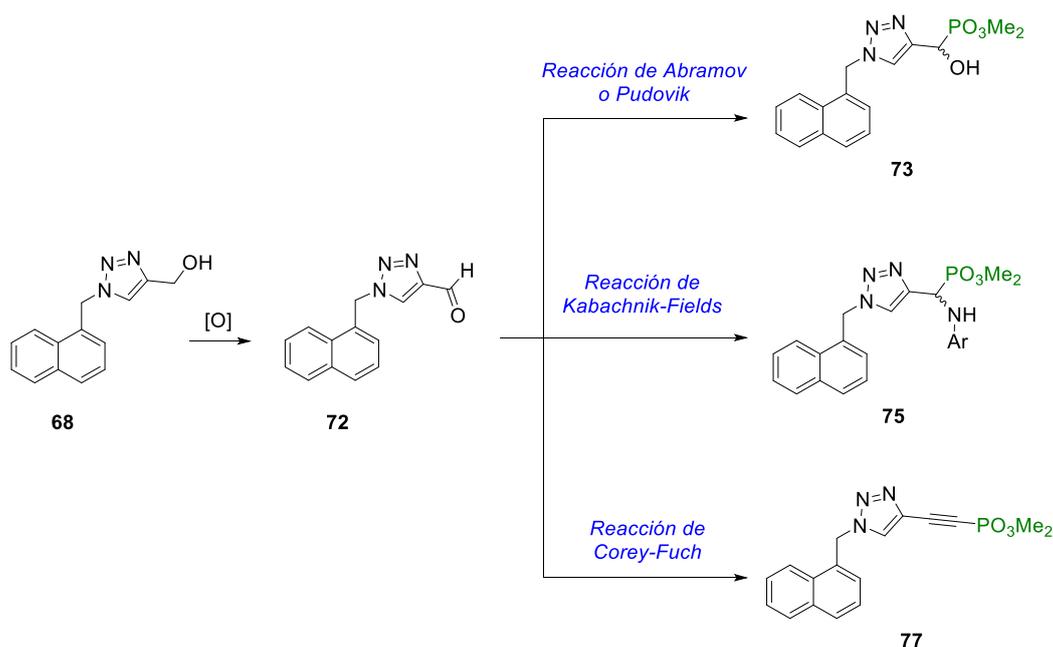


Figura III.26. Propuesta sintética para la obtención de α -hidroxi y α -(aminoaril)fosfonatos.

Adicionalmente se planteó la obtención de un alquínico fosfonato, inspirados en la síntesis y ensayos biológicos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, para el análogo de vitamina D con actividad anticancerígena EM1¹⁴⁷, como así también una gama de alquínico fosfonatos con actividad inhibitoria de la enzima butirilcolinesterasa.¹⁴⁸

¹⁴¹ Song, H.; Mao, H.; Shi, D. *Chin. J. Chem.* **2010**, *28*, 2020–2024.

¹⁴² Pokalwar, R. U.; Hangarge, R. V.; Maske, P. V.; Shingare, M. S. *Arkivoc.* **2006**, *11*, 196–204.

¹⁴³ Reddy, G. S.; Sundar, C. S.; Prasad, S. S.; Dadapeer, E.; Reddy, C. *Pharma Chem.* **2012**, *4*, 2208–2213.

¹⁴⁴ Kalla, R. M. N.; Lee, H. R.; Cao, J.; Yoo, J.-W.; Kim, I. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 3916–3922.

¹⁴⁵ Naidu, K. R. M.; Kumar, K. S.; Arulsevan, P.; Reddy, C. B.; Lasekan, O. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2012**, *345*, 957–963.

¹⁴⁶ Rádai, Z. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2019**, *194* (4–6), 425–437.

¹⁴⁷ (a) Salomón, D. G.; Grioli, S. M.; Buschiazzi, M.; Mascaró, E.; Vitale, C.; Radivoy, G.; Perez, M.; Fall, Y.; Mesri, E. A.; Curino, A. C.; et al. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2* (7), 503–508. (b) Ferronato, M. J.; Obiol, D. J.; Fermento, M. E.; Gandini, N. A.; Alonso, E. N.; Salomón, D. G.; Vitale, C.; Mascaró, E.; Fall, Y.; Raimondi, A. R.; et al. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *154*, 285–293.

¹⁴⁸ Cavallaro, V.; Moglie, Y. F.; Murray, A. P.; Radivoy, G. E. *Bioorg. Chem.* **2018**, *77*, 420–428.

Debido a que el empleo de BuLi o LDA conduce a la descomposición del intermediario, y que las bases alternativas tampoco permitieron acceder al alquinilfosfonato deseado, se desestimó esta ruta sintética y se procedió a evaluar a los compuestos **73** y **75**.

III.3.4.i.a. Evaluación biológica: actividad $\alpha 7$ -PAM de la serie II

Como puede observarse en la **Tabla III.4**, la incorporación de un grupo hidroxilo u aminofenil, en el C α del fosfonato, provoca la pérdida de actividad de estos compuestos, tanto en *opens* como en *bursts*, ya que no se observaron diferencias significativas respecto al control.

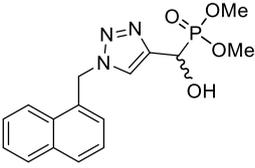
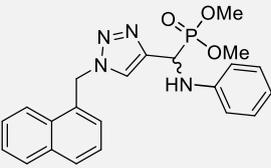
Receptor	Agonista	Compuestos serie II (50 μ M)	τ_{open} (ms)	τ_{burst} (ms)
$\alpha 7$	ACh 100 μ M	---	0,27 \pm 0,03	0,32 \pm 0,06
		 73	0,30 \pm 0,15	0,42 \pm 0,15
		 75	0,20 \pm 0,06	0,18 \pm 0,03

Tabla III.4. Efecto de la incorporación de distintas funciones en C α en la actividad $\alpha 7$ -PAM.

Considerando estos resultados, concluimos que la funcionalización sobre el C α del fosfonato no es una estrategia efectiva en la obtención de nuevos PAMs. Consecuentemente, se abandonó la posibilidad de sintetizar otros compuestos por esta vía, y se procedió a la síntesis de nuevos derivados empleando otras estrategias.

III.3.4.ii. Serie III. Inversión de los sustituyentes en el anillo de triazol.

III.3.4.ii.a. Propuesta sintética

Considerando las posibles interacciones con el receptor, dados los grupos presentes¹⁵⁶ (**Figura III.27**), resulta importante la posición relativa de los sustituyentes respecto al anillo de triazol. Por lo tanto, otra de las estrategias empleadas en la búsqueda de nuevos moduladores fue la inversión de los sustituyentes en el anillo de triazol del compuesto **70a**.

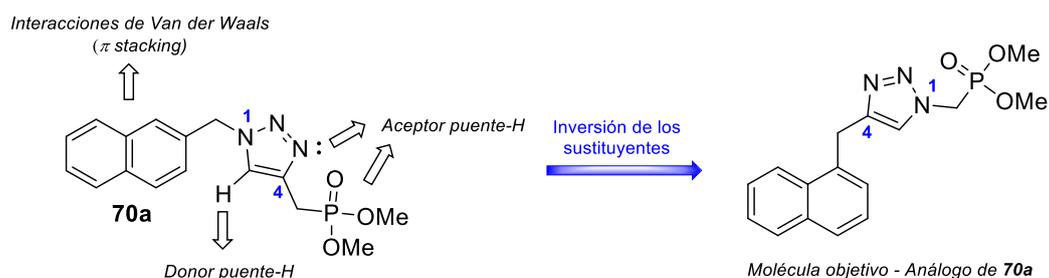
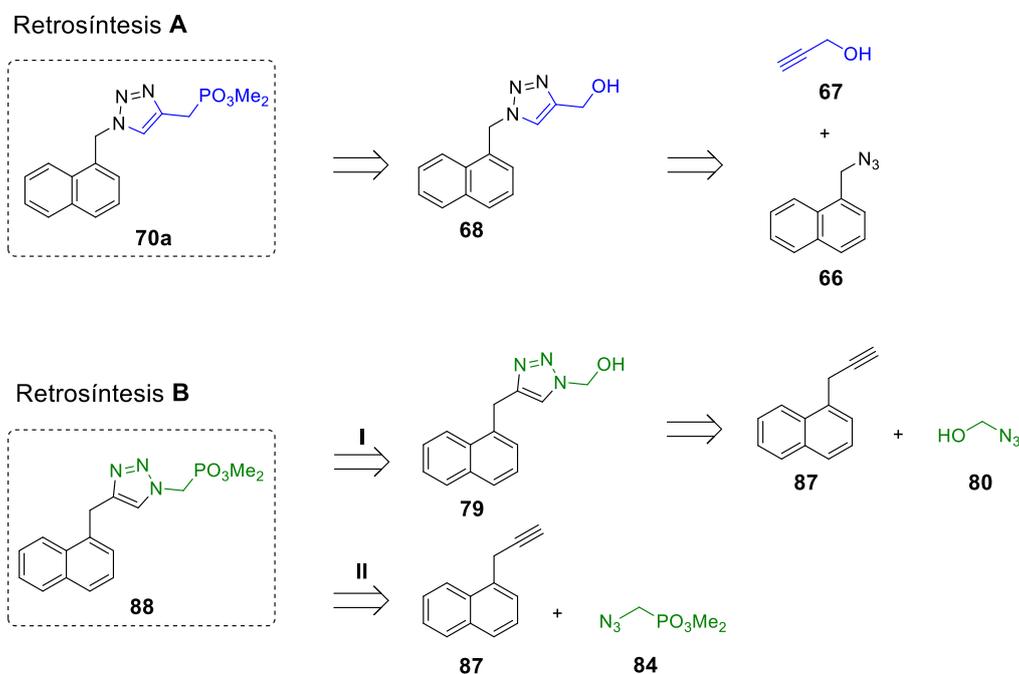


Figura III.27. Posibles interacciones de **70a** con el receptor α_7 , y estructura del análogo a sintetizar.

La síntesis del compuesto **68** ([Sección III.1.2](#)) se realizó empleando alcohol propargílico como alquino terminal en la reacción de cicloadición (**Esquema III.7-A**). De manera análoga, podría plantearse la síntesis de **79** partiendo de 1-azidometanol (**80**, **Esquema III.7-B-I**), o la síntesis de **88**, partiendo de una azida que contenga directamente al grupo fosfonato (**84**, **Esquema III.7-B-II**). En ambos casos, el grupo naftilo sería el portador del alquino (**87**).



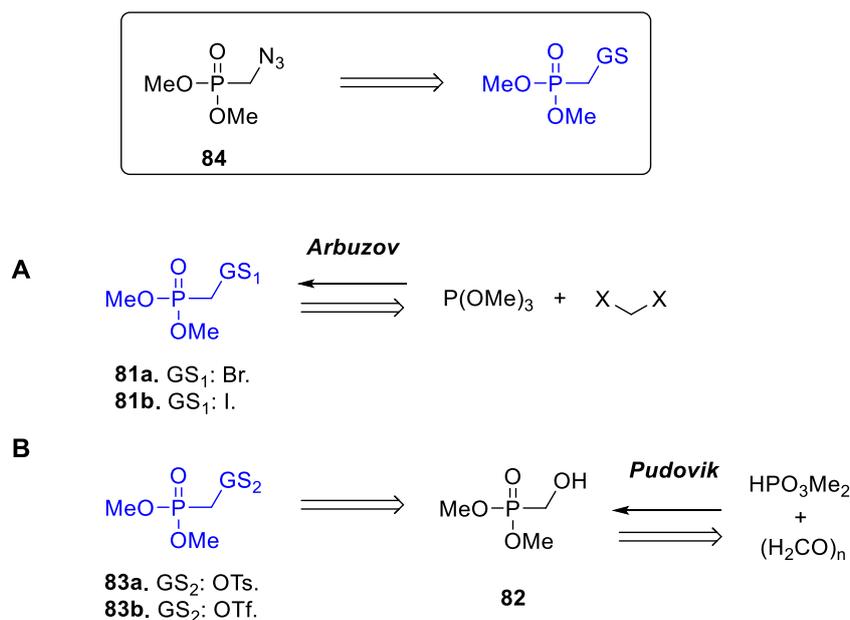
Esquema III.7. Análisis retrosintético de los triazoles **70a** y **88**.

¹⁵⁶ Triazol como donador/aceptor de puente de H, véase: Tron, G.C.; Pirali, T.; Billington, R.A.; Canonico, P.L.; Sorba, G.; Genazzani, A.A. *Med. Res. Rev.* **2008**, 28 (2), 278–308.

La estrategia “B-I” requiere la síntesis de azidometanol, **80**. La obtención de este compuesto es dificultosa, y ha sido escasamente reportada. **80** puede obtenerse a través del tratamiento de formaldehído con ácido hidrazoico (HN₃), con el inconveniente de que el producto deseado se encuentra en equilibrio con otras especies, y no puede aislarse.¹⁵⁷ Respecto a la retrosíntesis B-II, esta comprende la obtención de la azida **84**, la cual podría sintetizarse empleando las reacciones de Arbuzov o Pudovik.

III.3.4.ii.b. Síntesis de azidometil fosfonato de dimetilo (**84**)

En el **Esquema III.8** se muestra la retrosíntesis de la azida **84**. Se plantearon dos tipos de intermediarios que pueden dar lugar al producto deseado. La ruta “A” permitiría el acceso a α -halofosfonatos (**81a-b**), a partir de la reacción de Arbuzov sobre dihalometanos. Por otra parte, la ruta “B” implicaría la formación del alcohol **82**, y posterior transformación en su correspondiente tosilato o triflato (**83a-b**). Si bien la ruta “A” es más directa, existen reacciones secundarias de desalquilación asociadas a la sustitución nucleofílica sobre α -halofosfonatos.¹⁵⁸



Esquema III.8. Esquema retrosintético de **84**.

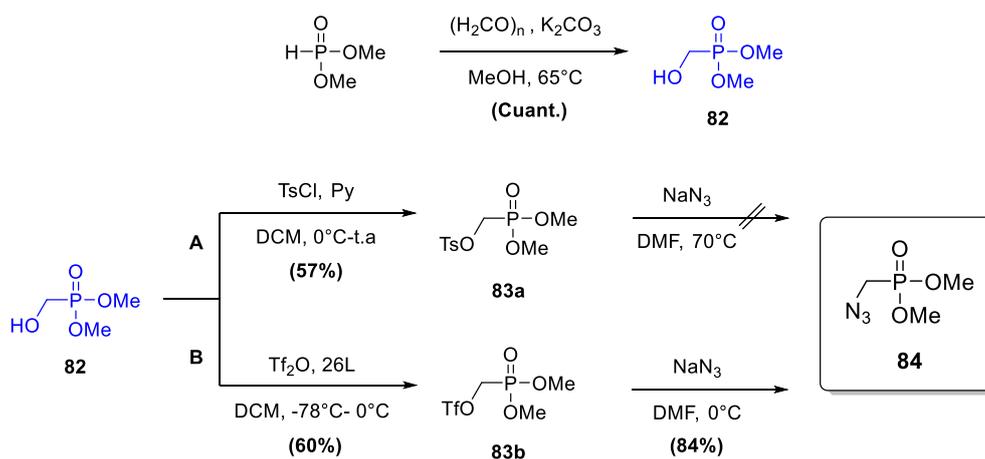
Es por ello que se decidió trabajar en base a la ruta “B”, sintetizando el alcohol **82** a partir de la adición de dimetilfosfito sobre paraformaldehído (PFA), en condiciones de reacción suaves, empleando K₂CO₃ como base.¹⁵⁹

¹⁵⁷ Banert, K.; Berndt, C.; Firdous, S.; Hagedorn, M.; Joo, Y. H.; Ruffer, T.; Lang, H. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, 49 (52), 10206–10209.

¹⁵⁸ Błaszczuk, R.; Gajda, T. *Synth. Commun.* **2008**, 38 (7), 1110–1119.

¹⁵⁹ Jeanmaire, T.; Hervaud, Y. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, **2012**, 177:5, 1137–1145.

Se obtuvo el producto esperado, **82**, con rendimientos excelentes (**Esquema III.9**). A partir de este alcohol, se evaluaron dos posibles intermediarios para la formación de la azida. En primera instancia (**Esquema III.9-A**) se formó el tosilato **83a**¹⁶⁰, en condiciones de reacción clásicas, con rendimiento moderado. Luego, se efectuó la sustitución con NaN₃ en DMF a 70°C. Lamentablemente, no se obtuvo el producto esperado, nuevamente debido a reacciones de desalquilación que ocurren trabajando a altas temperaturas.¹⁵⁸



Esquema III.9. Estrategias empleadas en la obtención de la azida **84**.

Con el objetivo de poder realizar la sustitución a menor temperatura, evitando así la formación de subproductos indeseados, se empleó un triflato como grupo saliente (**Esquema III.9-B**). Para obtenerlo, se sometió al alcohol **82** a reacción con Tf₂O a -78°C en presencia de 2,6-lutidina (26L) como base.¹⁶¹ Inmediatamente, se realizó la sustitución con NaN₃ a bajas temperaturas (0°C), para dar lugar a la azida esperada con muy buen rendimiento.¹⁶²

III.3.4.ii.c. Síntesis de 1-(2-propinil)naftaleno (**87**)

Para la obtención del alquino **87**, se consideraron distintas estrategias de acoplamiento entre alquinos terminales y haluros bencílicos. Si bien este acoplamiento cruzado es más común en el caso de emplear haluros arílicos, a través de la reacción de Sonogashira, existen reportes empleando haluros bencílicos, aunque su dificultad sintética es mayor. Se destacan el uso de

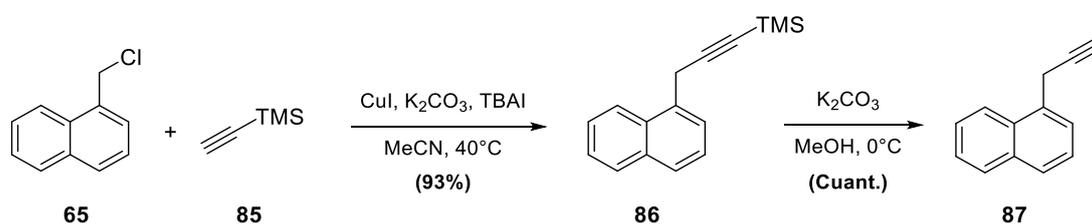
¹⁶⁰ Doboszewski, B.; Groaz, E.; Herdewijn, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, No. 22, 4804–4815.

¹⁶¹ Maegawa, T.; Otake, K.; Hirosawa, K.; Goto, A.; Fujioka, H. *Org. Lett.* **2012**, 14 (18), 4798–4801.

¹⁶² Hanaya, T.; Miyoshi, A.; Kawamoto, H.; Armour, M.-A.; Hogg, A.M.; Yamamoto, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, 63, 3590-3594.

reactivos de Grignard¹⁶³, catalizadores de Pd¹⁶⁴, reactivos organometálicos de indio¹⁶⁵, o ioduro de cobre (I).¹⁶⁶

Dentro de los métodos analizados, consideramos que el último resulta el más ventajoso, dado que es operacionalmente simple, no requiere de la formación de precursores, y emplea catalizadores y aditivos económicos. Considerando que en última instancia se requiere un alquino terminal (para la posterior reacción *click*), se usó trimetilsililacetileno en el acoplamiento, obteniéndose **86** con excelente rendimiento. Posteriormente, se planteó la desprotección del grupo sililo para dar lugar a **87**. Empleando TBAF, se observó la formación del aleno en lugar del alquino terminal esperado¹⁶⁷, sin embargo, empleando K₂CO₃ se obtuvo **87** cuantitativamente, sin formación de subproductos.



Esquema III.10. Obtención de **87** a través del acoplamiento entre haluros bencílicos y alquinos terminales, promovido por CuI.

III.3.4.ii.d. Síntesis de (4-(1-naftalenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metilfosfonato de dimetilo (**88**)

En primer lugar, se llevó a cabo la reacción multicomponente *one pot* de formación de la azida **84** en H₂O, a partir del tosilato **83a**, y su posterior cicloadición con el alquino **87**, pero no se verificó la formación del producto esperado. Presumiblemente, en estas condiciones de reacción se favoreció la reacción de desalquilación del fosfonato, de manera similar a lo ocurrido en la síntesis de **84** a partir de **83a**. Por ende, se realizó la cicloadición empleando la azida **84**, en THF/TEA a 65°C, para dar lugar al triazol **88** con rendimiento moderado (**Esquema III.11**, p.71). Se observaron subproductos sin identificar, presumiblemente debido a reacciones secundarias sobre el grupo fosfonato de la azida **84**. No obstante, se obtuvo suficiente cantidad del análogo **88** para su evaluación biológica, por lo cual no se llevó a cabo la optimización de esta reacción.

¹⁶³ Chemla, F.; Ferreira, F.; Perez-Luna, A.; Micouin, L. and Jackowski, O. *Carbon–Carbon–Bond–Forming Reactions Mediated by Organomagnesium Reagents*. In *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions and More*. Wiley-VCH: Weinheim, **2014**.

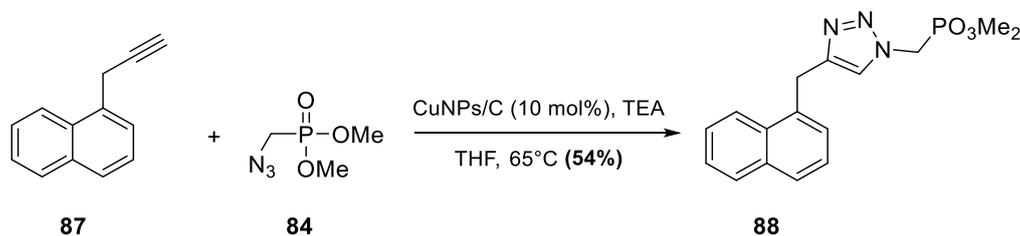
¹⁶⁴ Larsen, C. H.; Anderson, K. W.; Tundel, R. E.; Buchwald, S. L. *Synlett* **2006**, No. 18, 2941–2946.

¹⁶⁵ Pérez, I.; Sestelo, J. P.; Sarandeses, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (18), 4155–4160.

¹⁶⁶ Davies, K.A.; Abel, R.C. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3997–4000.

¹⁶⁷ (a) Huang, X.; Bugarin, A. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (36), 12696–12700. (b) Blanco, B.; Sedes, A.; Peón, A.; Lamb, H.; Hawkins, A. R.; Castedo, L.; González-Bello, C. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (18), 3662–3676.

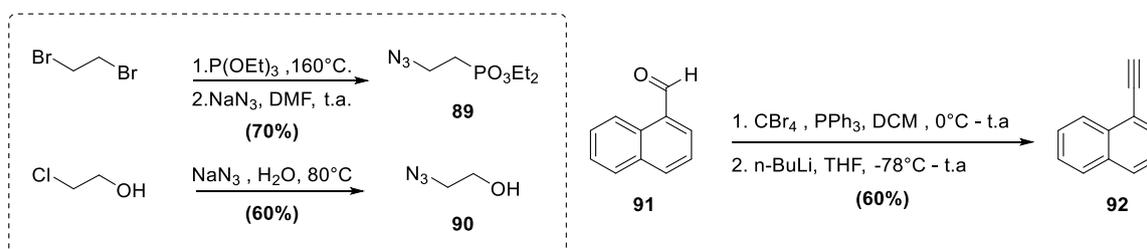
En estos casos sería conveniente emplear CuNPs sin soportar, más reactivas, dado que se podría trabajar a temperatura ambiente. Estas condiciones experimentales serán analizadas posteriormente ([Sección V.3.2](#)).



Esquema III.11. Obtención del fosfonato **88** vía CuAAC empleando CuNPs/C.

III.3.4.ii.e. Síntesis de análogos de 4-(1-naftalenilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil fosfonato de dimetilo (**88**)

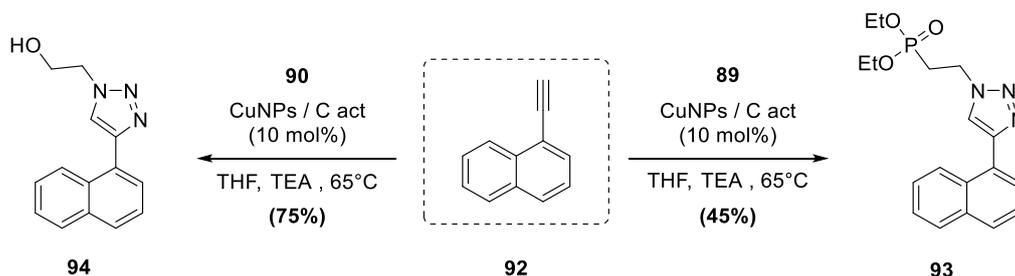
Como parte de la serie de triazoles con inversión de los sustituyentes en posiciones 1 y 4, derivados de **70a**, se sintetizaron dos compuestos adicionales con variaciones en la longitud de cadena y el tipo de fosfonato (metilo y etilo, los más activos de la serie I), empleando una ruta sintética que permitió obtener los precursores de manera rápida y sencilla. Se utilizaron 1,2-dibromoetano y 2-cloroetanol para formar las azidas orgánicas **89** y **90** respectivamente (**Esquema III.12**), mientras que el 1-etilnaftaleno (**92**) se obtuvo a partir de naftaldehído, **91**, vía reacción de Corey-Fuchs.



Esquema III.12. Síntesis de las azidas y alquino precursores.

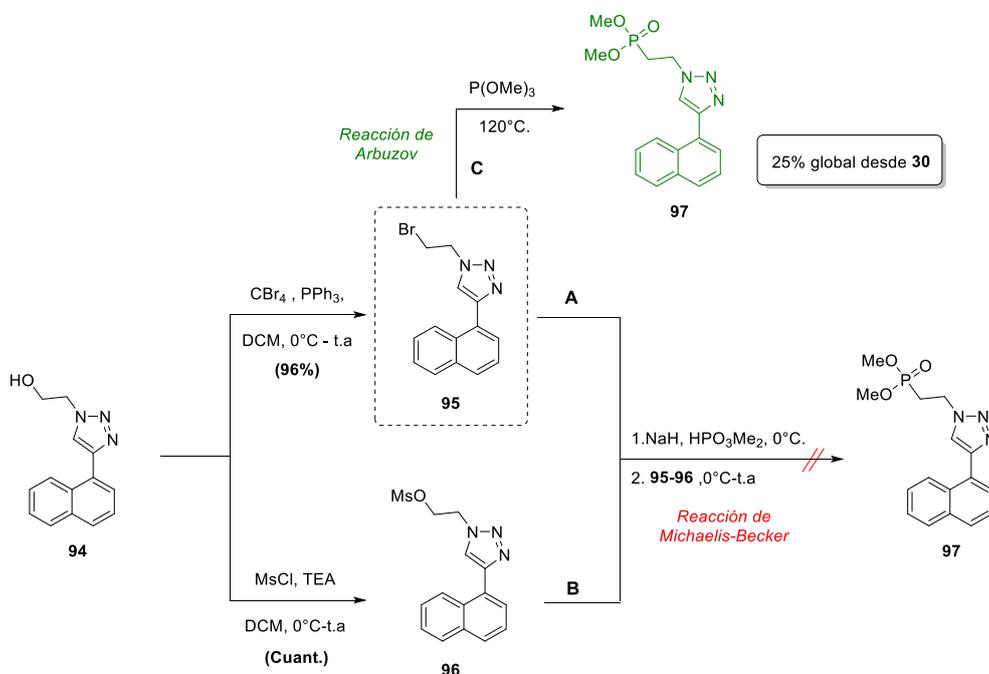
Una vez sintetizados los precursores, se realizó la reacción click empleando las mismas condiciones de reacción para ambas azidas (**89** y **90**, **Esquema III.13**, p.72). La presencia del grupo hidroxilo en la azida **90** resultó compatible con el sistema catalítico empleado, obteniéndose el triazol **94** con buen rendimiento, comparable al obtenido al emplear alcohol propargílico ([Sección III.3.1.ii](#)). Sin embargo, al emplear la azida **89**, que contiene un grupo fosfonato, el rendimiento decae notoriamente, obteniéndose el triazol **93** con un 45 % de rendimiento. En este caso, se recuperó parte del alquino sin reaccionar, evidenciando que parte

de la azida se descompone, probablemente a través de reacciones secundarias sobre el grupo fosfonato. Un resultado similar se obtuvo empleando la azida **84** ([Sección III.3.5.iv](#)).



Esquema III.13. Obtención de análogos del compuesto **24**, con variaciones en la longitud de cadena.

A partir de **94**, se sintetizó el bromuro **95** por reacción de Appel, el cual se sometió a reacción de Michaelis-Becker con dimetilfosfito (**Esquema III.14-A**). A diferencia de lo observado anteriormente para la síntesis de los compuestos **70a-c** (**Esquema III.3**, [Sección III.3.2](#)), no se obtuvo el fosfonato deseado, recuperando el sustrato sin reaccionar. Cambios en las condiciones de reacción (Na° como base en lugar de NaH, otros solventes, temperatura y los tiempos de reacción), no dieron lugar a mejores resultados. Además, el empleo del mesilato **96** como sustrato (**Esquema III.14-B**), en lugar del bromuro, tampoco permitió obtener el fosfonato **97**. Finalmente, se decidió llevar a cabo la reacción de Arbuzov con trimetilfosfito a reflujo (**Esquema III.14-C**), obteniéndose el fosfonato deseado.



Esquema III.14. Evaluación de las reacciones de Michelis-Becker y Arbuzov para obtener el fosfonato **97**.

A raíz de estos resultados, se continuó empleando la reacción de Arbuzov para la obtención de los fosfonatos en reacciones posteriores.

III.3.4.ii.f. Evaluación biológica: actividad $\alpha 7$ -PAM de la serie III

En la **Tabla III.5** se resumen los resultados obtenidos para los fosfonatos de la serie III:

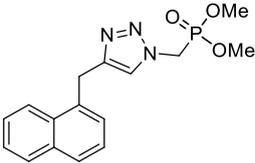
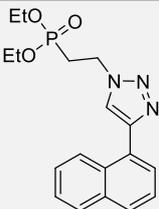
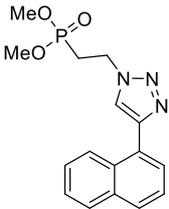
Receptor	Agonista	Compuestos serie III (50 μ M)	τ_{open} (ms)	τ_{burst} (ms)
$\alpha 7$	ACh 100 μ M	---	$0,27 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,06$
		 88	$0,45 \pm 0,13^{**} ###$	$1,27 \pm 0,24^{***} ##$
		 93	$0,19 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,01$
		 97	$0,35 \pm 0,08$	$0,46 \pm 0,05$

Tabla III.5. Evaluación de la actividad $\alpha 7$ -PAM de los fosfonatos de la serie III.

En cuanto al fosfonato **88**, en el cual solo se realizó la inversión de los sustituyentes, se observó que presenta actividad como $\alpha 7$ -PAM, tanto en los valores de duración media de las aperturas como en la de los *bursts*. De todas maneras, estos valores son inferiores a los observados para el fosfonato **70a**, el cual sigue siendo el compuesto que presenta mayor actividad. En cambio, en el caso de los fosfonatos **93** y **97**, se puede aseverar que los cambios propuestos, la inversión de los sustituyentes sumada a las variaciones en la longitud de los conectores (**Figura III.28**), produjeron un marcado decrecimiento de la actividad. Se observó además una disminución en la duración de los episodios de activación en *bursts*, en comparación al fosfonato **70a** y, por último, no se apreciaron diferencias significativas en los tiempos de apertura respecto al control.

Triazoles - Serie III

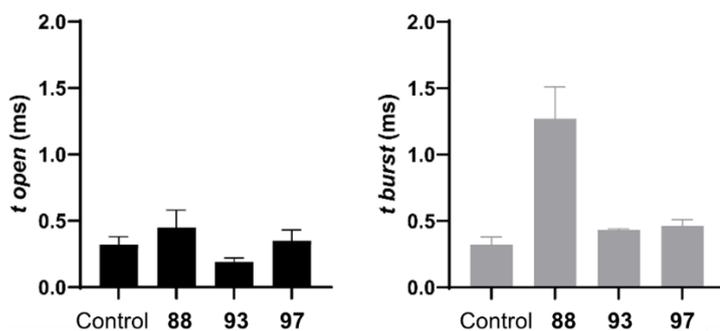


Figura III.28. Gráfico de barras de las constantes de tiempo de estado abierto (negro) y de *burst* (gris) de los triazoles de la serie III.

De la serie de modificaciones estructurales analizadas (a, b y c, **Figura III.29**), se puede concluir que la inversión de los sustituyentes en el triazol **88** provoca una pérdida parcial de la actividad. Por otra parte, se desconoce cuál de las homologaciones (a o c) contribuye a la pérdida total de actividad, por lo cual se continuó el estudio de relaciones estructura-actividad realizando una serie de homólogos del fosfonato **70a**.

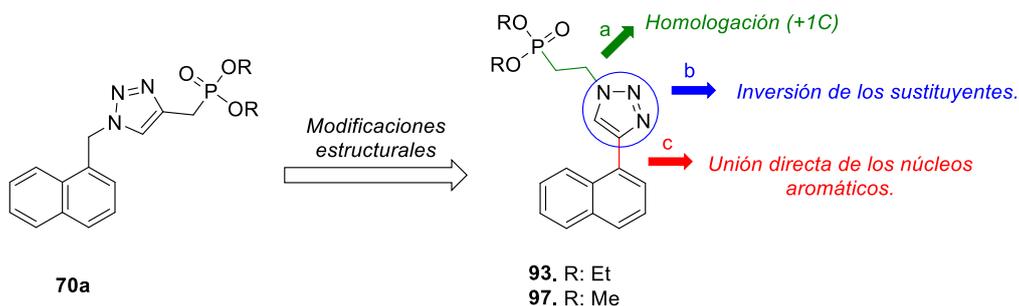


Figura III.29. Modificaciones sobre el fosfonato **70a**, que produjeron la pérdida de actividad $\alpha 7$ -PAM.

III.3.4.iii. Serie IV. Síntesis de homólogos y vinílogos

III.3.4.iii.a. Propuesta sintética

A fin de estudiar las distancias óptimas entre el anillo de triazol y los grupos naftilo o fosfonato respectivamente, se sintetizaron dos homólogos del compuesto **70a**, y se evaluó el efecto de estos cambios en la actividad α 7-PAM. Como puede observarse en la **Figura III.30**, se sintetizó un homólogo en el cual el grupo naftilo se encuentra directamente unido al triazol (**102**), extendiendo la conjugación entre ambos anillos aromáticos, y otro (**106**), en el cual se alarga en un carbono la distancia entre el triazol y el grupo fosfonato. Además, se propuso la síntesis de un vinílogo, en el cual el triazol y el grupo naftilo se encuentren unidos a través de un doble enlace, con posibles efectos tanto en la geometría como en la distribución electrónica del sistema aromático.

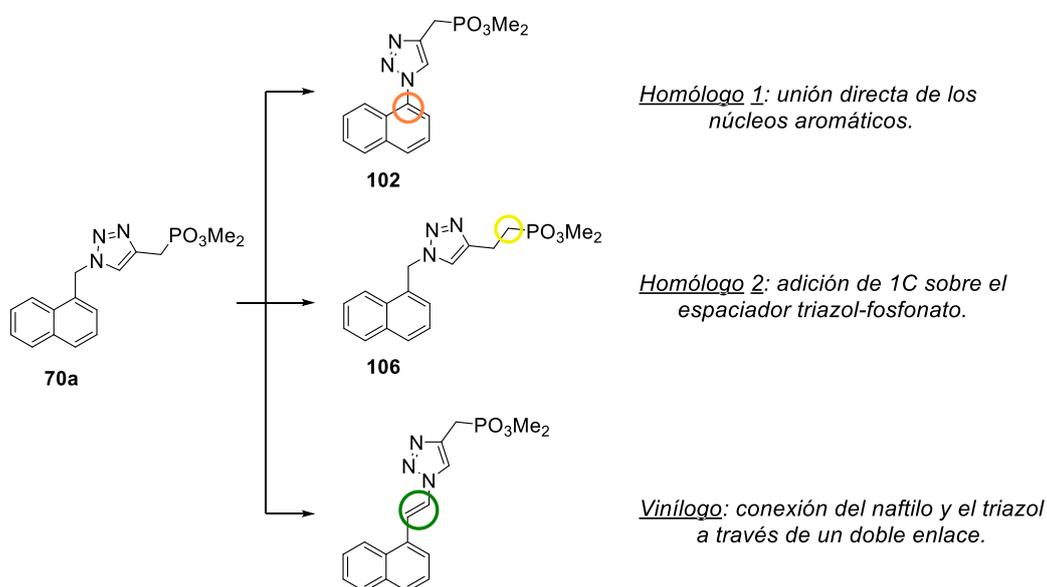


Figura III.30. Derivados a sintetizar, aplicando las estrategias SAR de homología y vinilología.

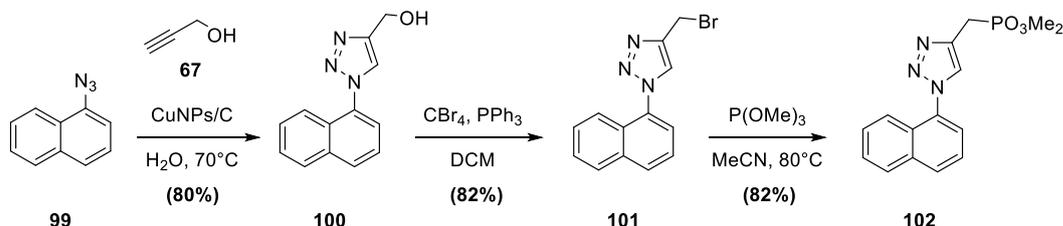
III.3.4.iii.b. Síntesis de homólogos de **70a**.

Respecto a la obtención de los homólogos (**Esquema III.15**, p.76), se aplicaron las estrategias sintéticas empleadas anteriormente, es decir, la síntesis de triazoles conteniendo grupos hidroxilo, y su posterior transformación en fosfonatos. Respecto al primer homólogo, compuesto **102**, la obtención del precursor 1-azidonaftaleno (**99**) se realizó vía sal de diazonio, partiendo de 1-naftilamina (**98**, véase sección experimental). Se aplicaron las condiciones clásicas para este tipo de reacciones.¹⁶⁸ A continuación, se realizó la cicloadición con alcohol propargílico (para dar **100**), la transformación en el correspondiente bromuro (**101**) y

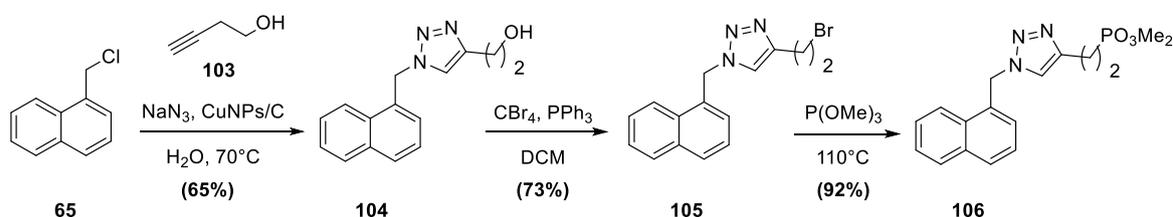
¹⁶⁸ Suga, K.; Watanabe, S. *Isr. J. Chem.* **1968**, *6*, 521-523.

finalmente, la reacción de Arbuzov con trimetilfosfito, obteniéndose el fosfonato **102**. Los rendimientos fueron muy buenos en todas las reacciones involucradas. El segundo homólogo, **106**, se sintetizó de la misma manera, empleando 3-butin-1-ol (**103**) como dipolarófilo en la cicloadición.

Homólogo 1



Homólogo 2



Esquema III.15. Síntesis de homólogos del fosfonato **70a**.

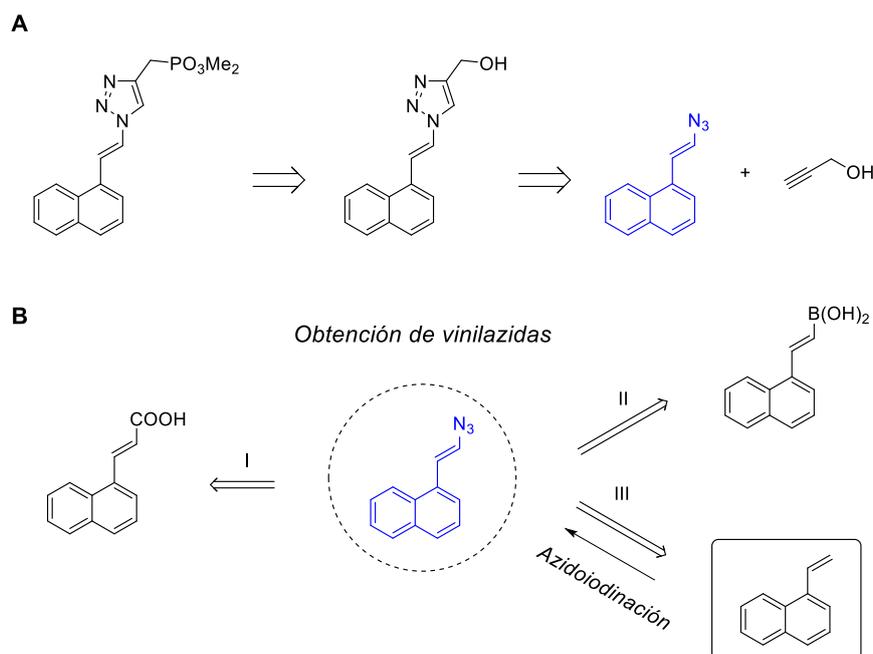
III.3.4.iii.c. Síntesis de un vinílogo de **70a**.

En el **Esquema III.16-A** (p.77) se muestra la retrosíntesis asociada al vinílogo a sintetizar. Como puede observarse, se requiere la formación de una vinilazida. La misma puede obtenerse a partir de distintos precursores (**Esquema III.16-B**), ácidos carboxílicos α,β -insaturados¹⁶⁹, ácidos borónicos¹⁷⁰ o vinilarenos.¹⁷¹

¹⁶⁹ (a) Nair, V.; George, T. G. A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41 (17), 3199–3201. (b) Telvekar, V. N.; Takale, B. S.; Bachhav, H. M. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50 (35), 5056–5058.

¹⁷⁰ Tao, C. Z.; Cui, X.; Li, J.; Liu, A. X.; Liu, L.; Guo, Q. X. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48 (20), 3525–3529.

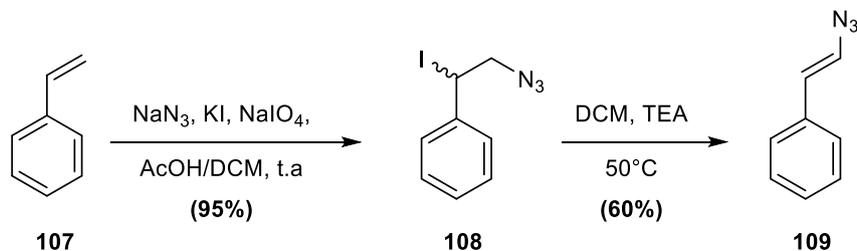
¹⁷¹ (a) Chouthaiwale, P. V.; Karabal, P. U.; Suryavanshi, G.; Sudalai, A. *Synthesis (Stuttg.)* **2010**, 3 (22), 3879–3882. (b) Caprioglio, D.; Torretta, S.; Ferrari, M.; Travelli, C.; Grolla, A. A.; Condorelli, F.; Genazzani, A. A.; Minassi, A. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, 24 (2), 140–152.



Esquema III.16. A. Retrosíntesis del vinílogo propuesto. B. Métodos de obtención de vinilazidas.

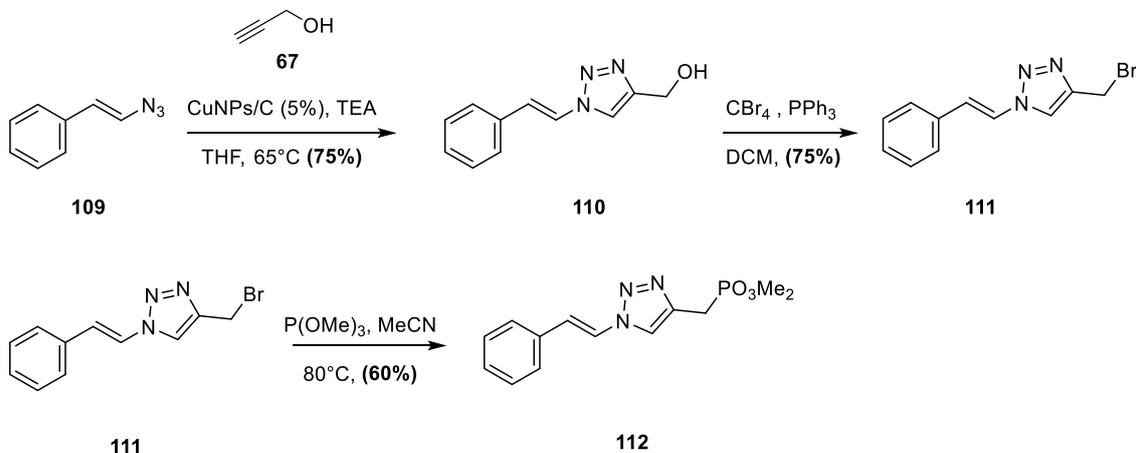
Respecto a estos métodos, aquellos que emplean ácidos carboxílicos α,β -insaturados (**Esquema III.16.B-I**) requieren reactivos costosos, como pueden ser especies hipervalentes de iodo^{169a}, o bien dan mezclas de isómeros.^{169b} La obtención de vinilazidas a partir de ácidos borónicos (**Esquema III.16.B-II**) requeriría sintetizar estos precursores, mientras que en el caso de usar vinilarenos (**Esquema III.16.B-III**), estos pueden obtenerse comercialmente de manera económica, o bien ser sintetizados a partir de la olefinación de Wittig. Se seleccionó este último método, conocido como azidoiodinación. El mismo consiste en la obtención de vinilazidas a partir de β -iodoazidas, fue postulado en primera instancia por el grupo de Sudolai^{171a}, y posteriormente modificado para aumentar el rendimiento de la reacción.^{171b}

En primer lugar, se empleó estireno (**107**) como sustrato modelo, para evaluar las condiciones de reacción propuestas (**Esquema III.17**).^{171b} Los rendimientos de estas reacciones fueron excelentes, para la obtención del intermediario **108**, y buenos para la vinilazida **109**.



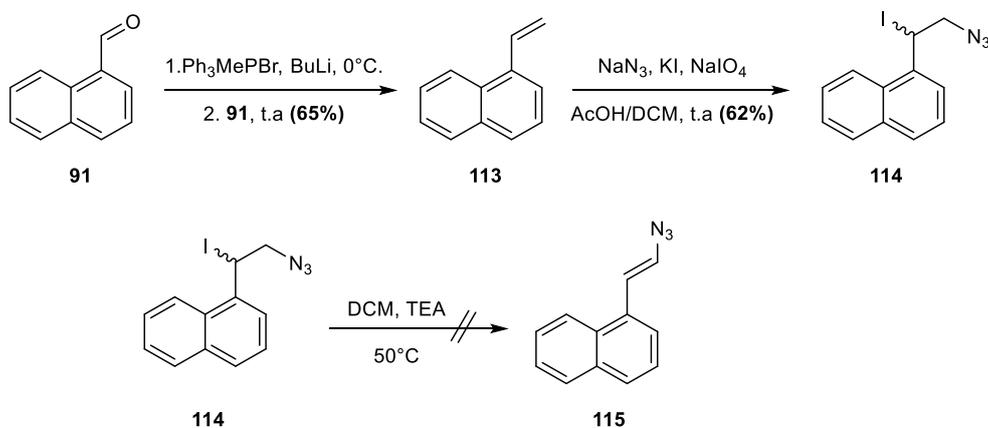
Esquema III.17. Obtención de vinilazidas mediante la azidoiodinación de alquenos.

Dados estos resultados, se continuó trabajando con la vinilazida **109**. Se realizó la reacción de cicloadición con alcohol propargílico, obteniéndose el triazol **110** con buen rendimiento, tras purificación por cromatografía en columna (**Esquema III.18**).



Esquema III.18. Obtención del triazolilfosfonato **112**, derivado del (*E*)-(2-azidovinil)benceno.

Una vez probado el método, se sintetizó 1-vinilnaftaleno (**113**), partiendo de naftaldehído (**91**), a través de la olefinación de Wittig. Luego, se realizó la azidoiodinación (**Esquema III.19**), observándose una disminución notable en el rendimiento de **114**, comparado a la obtención de **108**. Variando las condiciones de reacción originales de la azidoiodinación, es decir, omitiendo el uso de DCM y agregando un exceso de AcOH^{171a}, se obtuvieron peores resultados, observándose la formación de múltiples subproductos. En el siguiente paso, este intermediario no logró convertirse en la vinilazida deseada (**115**), aun empleando un exceso de base y tiempos de reacción prolongados. Cabe destacar que este compuesto no se encuentra reportado en bibliografía, y la obtención de vinilazidas por este método solo se efectuó en derivados de estireno.



Esquema III.19. Síntesis propuesta para la obtención de (*E*)-(2-azidovinil)naftaleno.

III.3.4.iii.d. Evaluación biológica: actividad $\alpha 7$ -PAM de la serie IV

En relación a la actividad biológica, ambos homólogos fueron evaluados, y se encontró que las variaciones propuestas disminuyeron la actividad $\alpha 7$ -PAM.

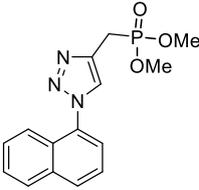
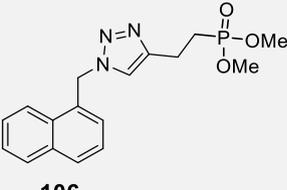
Receptor	Agonista	Compuestos serie I (50 μ M)	τ_{open} (ms)	τ_{burst} (ms)
$\alpha 7$	ACh 100 μ M	---	$0,27 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,06$
		 102	$0,31 \pm 0,16^{##}$	$0,30 \pm 0,11^{###}$
		 106	$0,23 \pm 0,08^{###}$	$0,28 \pm 0,11^{###}$

Tabla III.6. Evaluación de la actividad $\alpha 7$ -PAM de los fosfonatos de la serie IV.

Respecto de la actividad biológica de **102**, de un total de diez registros, sólo uno exhibió potenciación a nivel de las aperturas (~ 1 ms), y únicamente tres registros evidenciaron potenciación a nivel de los *bursts* ($1,28 \pm 0,27$ ms), la cual fue significativa con respecto al control. En promedio, se produjo una pérdida de la actividad. Lo mismo ocurrió para el compuesto **106**, el cual no potenció al receptor $\alpha 7$, ya que no hubo diferencias significativas en las duraciones de las aperturas y de los *bursts* con respecto la condición control. En conclusión, ambos cambios, que afectan a la distancia de cada uno de los grupos farmacóforos, suprimen la actividad potenciadora $\alpha 7$ -PAM de estos fosfonatos.

III.3.4.iv. Serie V. Variaciones en el grupo arilo

III.3.4.iv.a. Propuesta sintética

Para finalizar los estudios estructura-actividad sobre el compuesto **70a**, analizamos variaciones sobre el grupo arilo, introduciendo las mismas a través de la azida (**Figura III.31**).

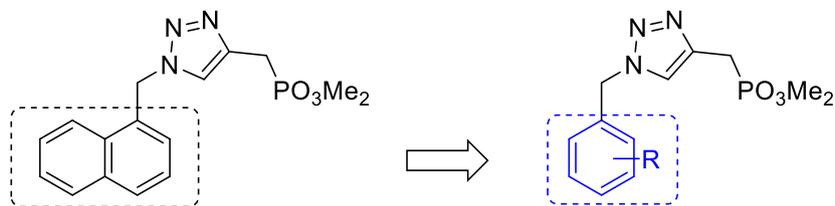
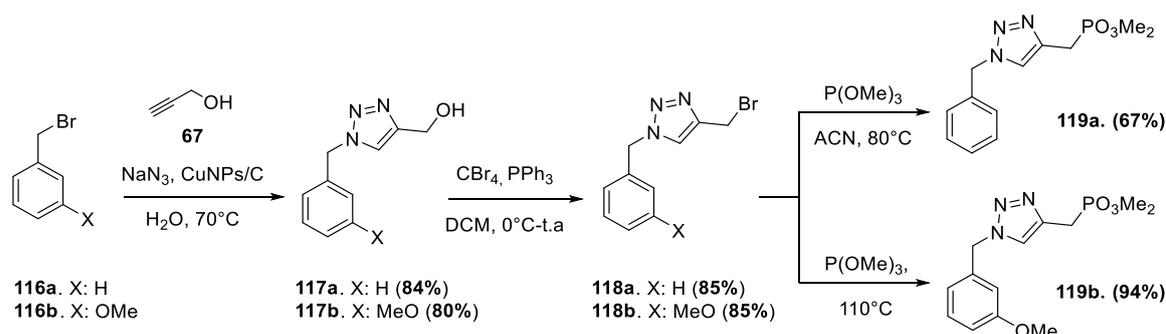


Figura III.31. Derivados del compuesto **70a** con grupos fenilo, en lugar del anillo de naftaleno.

Se sintetizaron dos nuevos análogos como prueba de concepto, uno conteniendo un grupo fenilo sin sustituir, y el segundo incorporando un grupo metoxilo en posición meta, de manera de tener un anillo rico en electrones similar al naftilo.

III.3.4.iv.b. Síntesis de los derivados bencílicos **119a-b**.

En primer lugar, se empleó bromuro de bencilo (**116a**) para realizar la reacción *one-pot* de sustitución con NaN_3 y posterior formación del triazol **117a**, empleando alcohol propargílico (**Esquema III.20**). Luego, a través de la secuencia de reacciones empleada anteriormente, se obtuvo el fosfonato **119a**. De manera similar, se obtuvo el fosfonato **119b**, a partir de **117b**, en tres pasos de reacción.



Esquema III.20. Síntesis de derivados de **70a** con variaciones en el grupo arilo.

Cabe destacar que se emplearon dos condiciones distintas en la reacción de Arbusov. Para el bromuro **118a**, en lugar de calentar a reflujo con un gran exceso de fosfito, la forma tradicional de llevar a cabo la reacción, se realizó la reacción en acetonitrilo a 80°C .¹⁷² Si bien se observó conversión completa, y pese a que la menor cantidad de fosfito empleada facilitó la

¹⁷² Setti, E. L.; Fiakpui, C.; Phillips, O. A.; Czajkowski, D. P.; Atchison, K.; Micetich, R. G.; Maiti, S. N. *J. Antibiot.* **1995**, 1320–1329.

purificación en columna cromatográfica, los rendimientos fueron menores a los esperados (**119a**, 67%). Lo mismo había ocurrido anteriormente en la síntesis del fosfonato **112** (Sección III.3.6.ii). En cambio, el bromuro **118b** se hizo reaccionar de manera tradicional, obteniéndose el fosfonato **119b** con excelente rendimiento (94%).

III.3.4.iv.c. Evaluación biológica: actividad $\alpha 7$ -PAM de la serie V

En la **Tabla III.7** se resumen los resultados obtenidos para los fosfonatos de la serie V:

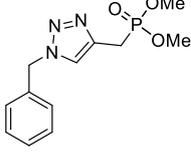
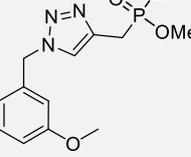
Receptor	Agonista	Compuestos serie I (50 μ M)	τ_{open} (ms)	τ_{burst} (ms)
$\alpha 7$	ACh 100 μ M	---	$0,27 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,06$
		 119a	$0,29 \pm 0,02^{###}$	$0,37 \pm 0,07^{###}$
		 119b	$0,30 \pm 0,02^{###}$	$0,29 \pm 0,08^{###}$

Tabla III.7. Evaluación de la actividad $\alpha 7$ -PAM de los fosfonatos de la serie V.

Respecto a la actividad biológica de los compuestos **119a-b**, se observó que no ejercieron ningún efecto significativo sobre el receptor $\alpha 7$, ya que las duraciones de las aperturas y de los *bursts* fueron similares en presencia y en ausencia de los compuestos ($p > 0,05$) (**Tabla III.7**). A partir de estos resultados, se propone que el grupo naftilo es el núcleo aromático más adecuado, hasta este momento, para ejercer la actividad potenciadora deseada.

III.3.5. Evaluación detallada de la actividad $\alpha 7$ -PAM de compuestos seleccionadosIII.3.5.i. Evaluación de los compuestos **70a-b** y **71** a distintas concentraciones

Al analizar el efecto de los 1,2,3-triazoles funcionalizados con grupos fosfonato (**70a-b**) y ácido fosfónico (**71**), en un rango de concentraciones más extenso de 5-150 μM (**Tabla III.8**), se observó que el compuesto **70a** fue el más potente y eficaz, mostrando un efecto significativo a partir de concentraciones 10 μM . Por su parte, los compuestos **70b** y **71** ejercieron potenciación significativa sólo a una de las concentraciones evaluadas, 50 μM y 10 μM respectivamente, e incluso el primero inhibió al receptor a concentraciones muy elevadas. El compuesto **70b** potenció las aperturas en menor medida que el compuesto **70a** ($p < 0,001$), mientras que los *bursts* no exhibieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos fosfonatos a la concentración de máximo efecto (50 μM).

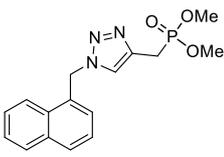
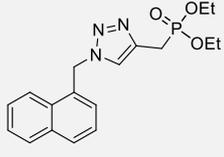
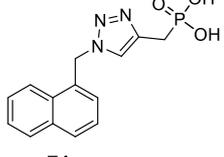
Receptor	Agonista	Compuesto	τ_{open} (ms)	τ_{burst} (ms)	
$\alpha 7$	ACh 100 μM	---	$0,27 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,06$	
		 70a	5 μM	$0,22 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,09$
			10 μM	$1,05 \pm 0,02^{***}$	$2,08 \pm 0,13^{***}$
			50 μM	$1,06 \pm 0,04^{***}$	$2,26 \pm 0,34^{***}$
			100 μM	$0,52 \pm 0,01^{***}$	$0,96 \pm 0,04^{***}$
			150 μM	$0,13 \pm 0,02^{***}$	$0,25 \pm 0,05$
		 70b	5 μM	$0,42 \pm 0,27$	$0,48 \pm 0,27$
			10 μM	$0,35 \pm 0,13$	$0,40 \pm 0,14$
			50 μM	$0,68 \pm 0,12^{***}$	$1,46 \pm 0,67^{***}$
			100 μM	$0,20 \pm 0,03^{**}$	$0,23 \pm 0,06^*$
			150 μM	$0,14 \pm 0,04^{***}$	$0,24 \pm 0,09$
		 71	5 μM	$0,23 \pm 0,06$	$0,32 \pm 0,14$
			10 μM	$0,26 \pm 0,06$	$1,33 \pm 0,43^{***}$
			50 μM	$0,25 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,07$
			100 μM	$0,26 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,06$
			150 μM	$0,22 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,09$

Tabla III.8. Actividad $\alpha 7$ -PAM de los compuestos **70a-b** y **71** a distintas concentraciones. Se muestran los valores de duración media de las aperturas y de los *bursts* en presencia de ACh y los distintos compuestos en un rango de concentraciones de 5-150 μM .

A diferencia de los ésteres fosfónicos, el compuesto **71** prolongó únicamente los *bursts*, en menor medida que el compuesto **70a** ($p > 0,01$) y sin diferencias con respecto al compuesto

70b ($p > 0,05$). Por lo tanto, en base a la duración del *burst* se definió el siguiente orden de eficacia: **70a** \geq **70b** \geq **71**. En consecuencia, se decidió continuar la caracterización detallada del compuesto **70a**, por ser el derivado con mayor actividad $\alpha 7$ -PAM.

III.3.5.ii. Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ activado por ACh

III.3.5.ii.a. Registros Serie I

En la **Figura III.32** se muestran registros representativos de las corrientes unitarias generadas en presencia de los compuestos de la Serie I (50 μM), en presencia de ACh (100 μM). Se puede observar claramente el aumento en los episodios de activación, tanto en *opens* como en *bursts*, en el caso de los fosfonatos **70a** y **70b**.

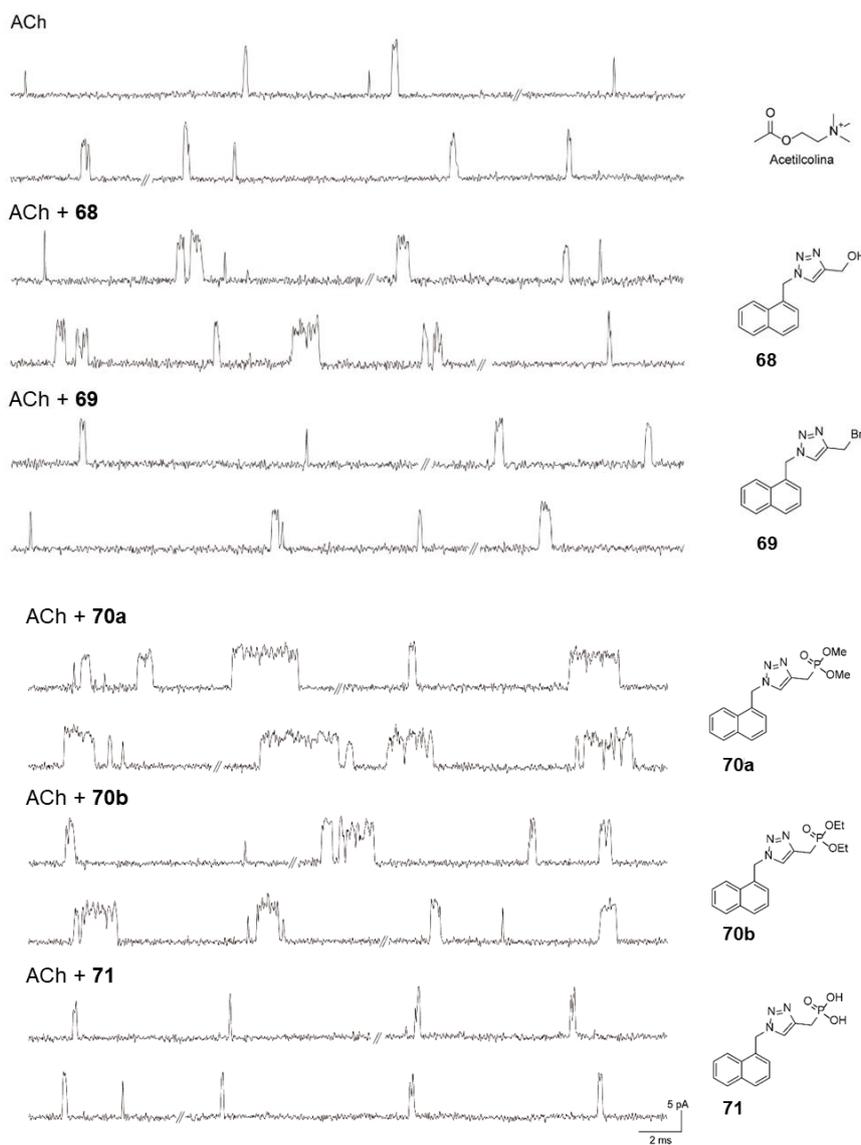


Figura III.32. Efecto de los compuestos de la serie I sobre el receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias. Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ activado por ACh.

III.3.5.ii.b. Registros de fosfonatos seleccionados (Serie II-V)

En la **Figura III.33** se muestran registros representativos de corrientes unitarias producidas por ACh (100 μ M), en presencia de los siguientes compuestos (50 μ M): fosfonatos **102** y **106** (homólogos de **70a**), análogo bencílico **119a**, y derivado **88**, que presenta la inversión de los sustituyentes en el anillo de triazol. Se comparan los resultados con los registros del agonista (ACh) en ausencia de PAM y con los obtenidos para el compuesto líder **70a**.

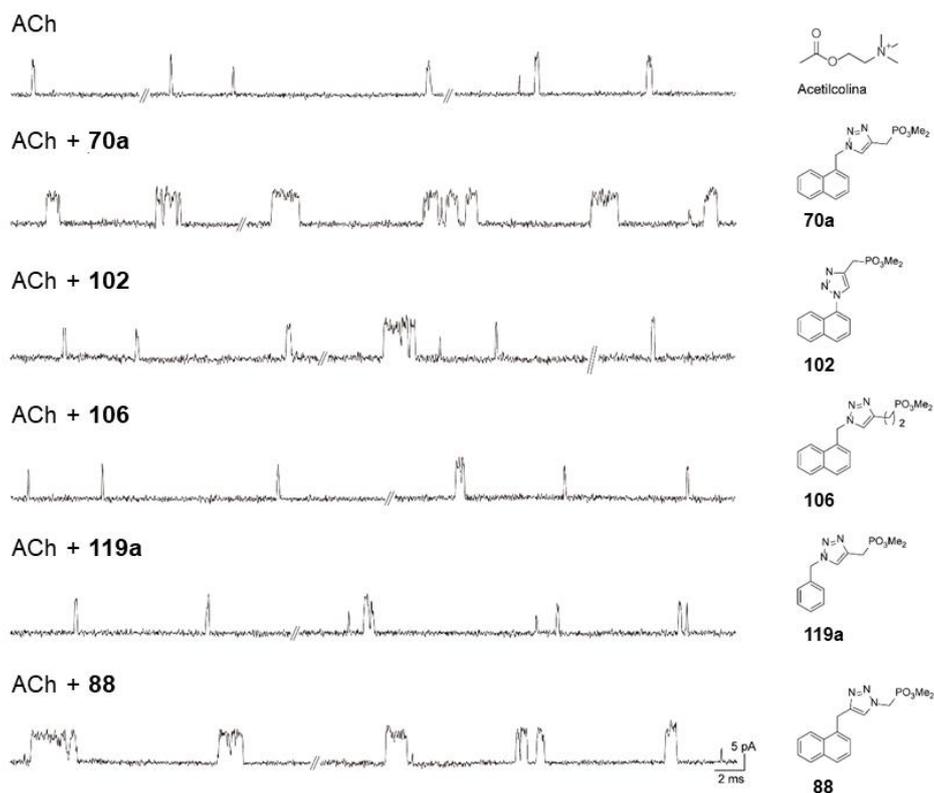


Figura III.33. Efecto de los fosfonatos derivados del compuesto **70a** sobre el receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias. Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ activado por ACh.

III.3.5.iii. Caracterización del accionar de (1-(1-naftalenilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il) fosfonato de dimetilo (**70a**).

Se procedió a caracterizar en profundidad el accionar a nivel microscópico y macroscópico del fosfonato **70a**, para determinar si se trata de un PAM tipo I o II. Respecto de las **corrientes unitarias** de $\alpha 7$ activadas por la ACh y moduladas por el compuesto **70a**, en un rango de concentraciones de 5-150 μM (**Tabla III.8**, p.82), la potenciación fue evidente a partir de 10 μM y permaneció en su máximo nivel hasta 50 μM , prolongándose las aperturas y los episodios de activación en *bursts* a ~ 1 ms y ~ 2 ms respectivamente (**Figura III.34-A**, p.86). A 100 μM el efecto potenciador se mantuvo, pero disminuyó levemente con respecto a la máxima potenciación ($p < 0,001$ para ambos parámetros cinéticos, **Figura III.34-B**). A 150 μM ya no se detectó potenciación, observándose incluso inhibición en el tiempo de estado abierto, probablemente por bloqueo a altas concentraciones del compuesto, lo cual también podría explicar la disminución del efecto a 100 μM (**Tabla III.8**, p.82).

Las **corrientes macroscópicas** fueron obtenidas por la técnica de *patch-clamp* sobre células BOSC23 en configuración *whole-cell*, a un potencial de membrana de -50 mV. El compuesto **70a** potenció la corriente evocada por la ACh, incrementando significativamente el pico de corriente en $1,51 \pm 0,26$ veces ($p < 0,001$; $n = 7$; $N = 3$; **Figura I.III.4C**). La velocidad de decaimiento ajustó con dos componentes, $\tau_{\text{rápido}}$ de 29 ± 14 ms y τ_{lento} de 901 ± 649 ms, sin observarse una disminución con respecto a los componentes de la corriente de control ($\tau_{\text{rápido}} = 37 \pm 7$ ms y $\tau_{\text{lento}} = 1294 \pm 1334$ ms). De hecho, en presencia del compuesto **70a**, la velocidad del componente rápido fue ligeramente mayor ($p = 0,03 > 0,05$). La carga neta prácticamente no se modificó ($1,02 \pm 0,22$; $p > 0,05$), por lo tanto, la relación entre el incremento en la carga neta y el incremento en el pico de corriente (relación carga neta/pico) fue de $0,68 \pm 0,15$.

En resumen, el compuesto **70a** incrementó el pico de la corriente macroscópica de $\alpha 7$ inducida por la ACh sin modificar significativamente la velocidad de desensibilización, no afectó la conductancia unitaria de los canales, prolongó la duración de las aperturas e indujo la potenciación en episodios de activación sostenidos en *bursts*, modificando la cinética de una forma perceptible únicamente a nivel de canal único. Todas estas características permitieron clasificar al compuesto **70a** como el **primer derivado sintético de 1,2,3-triazol funcionalizado con grupos fosfonato** con actividad $\alpha 7$ -PAM, específicamente **tipo I**.

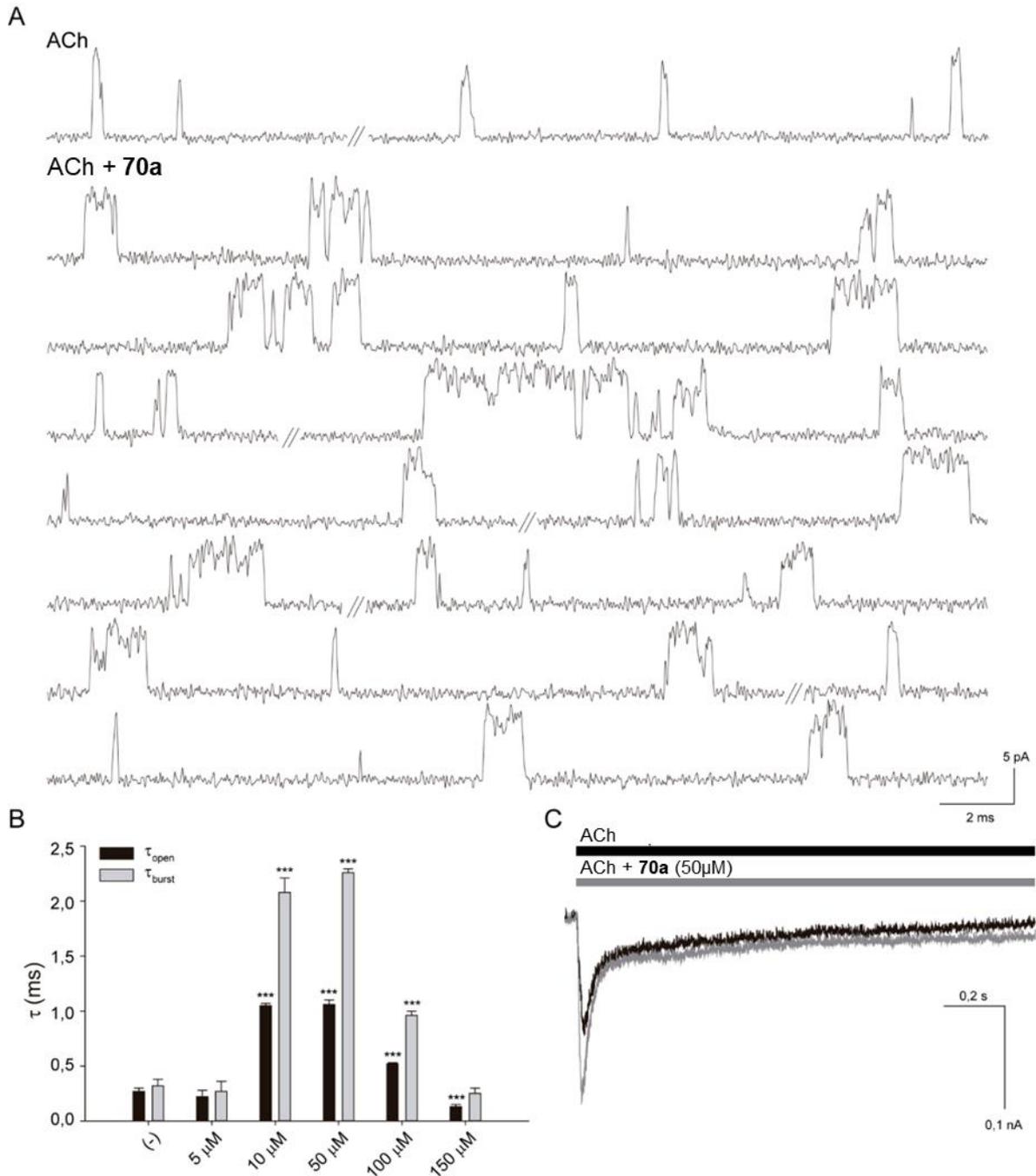


Figura III.34. Efecto del derivado **70a** sobre el receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias y macroscópicas.

A- Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ activado por ACh 100 μM en ausencia y en presencia del compuesto **70a** (50 μM). Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. **B-** Gráfico de barras de las constantes de tiempo de estado abierto (negro) y de *burst* (gris). Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control en ausencia de compuesto. **C-** Corriente macroscópica representativa del receptor $\alpha 7$ activado por ACh 100 μM en ausencia (trazo negro) y en presencia del compuesto **70a** (trazo gris). Potencial de membrana: -50 mV.

III.3.5.iv. Determinantes estructurales de la potenciación

Con el objetivo de identificar los determinantes estructurales de la potenciación ejercida por el compuesto **70a**, inicialmente se exploró su efecto sobre el **receptor quimérico $\alpha 7$ -HT₃A HC** (Figura III.35-A). Este receptor presenta el dominio extracelular de $\alpha 7$, y el intracelular y transmembrana del receptor de serotonina.

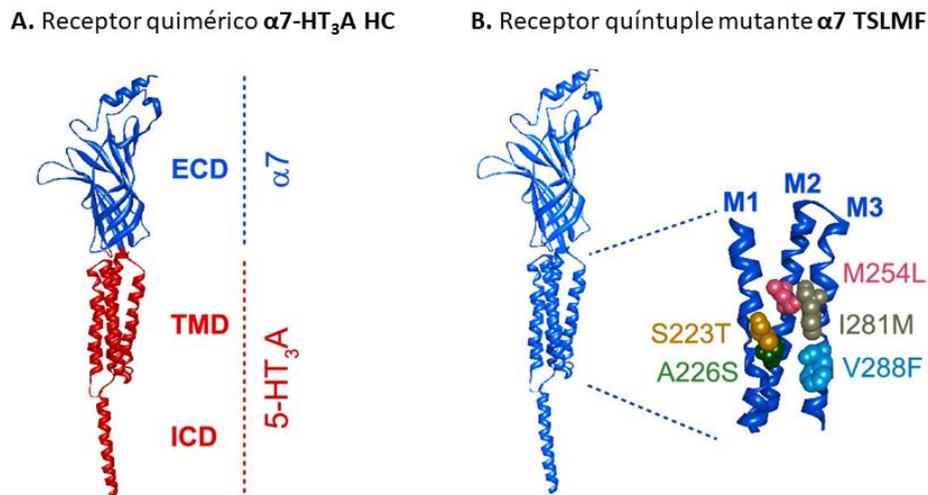


Figura III.35. Receptores de $\alpha 7$ mutados. A. Receptor quimérico $\alpha 7$ -HT₃A HC. B. Quíntuple mutante $\alpha 7$ TSLMF.

Se realizaron registros de las corrientes unitarias del receptor quimérico por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* sobre células BOSC23 a un potencial de membrana de -70 mV. Las concentraciones utilizadas fueron $500 \mu\text{M}$ para ACh y $50 \mu\text{M}$ para el derivado **70a** (máximo efecto en receptor $\alpha 7$ sin mutar). El compuesto **70a** no ejerció potenciación sobre la quimera (Figura III.36, p.89), siendo la duración de las aperturas de $5,01 \pm 0,56$ ms y la duración de los *bursts* de $10,89 \pm 3,06$ ms ($n = 4$, $N = 3$), sin diferencias significativas con respecto a los parámetros del receptor activado únicamente por la ACh ($\tau_{\text{open}} = 5,26 \pm 0,30$ ms y $\tau_{\text{burst}} = 12,35 \pm 3,00$ ms, $n = 5$, $N = 4$, $p > 0,05$ en cada caso). Por lo tanto, el compuesto **70a** no actuó como PAM del receptor quimérico, sugiriendo un rol preponderante del dominio de transmembrana (TMD) o de la interfaz ECD-TMD de $\alpha 7$ en su efecto potenciador.

Para profundizar en los determinantes estructurales de potenciación del derivado **70a** se utilizó el **receptor quíntuple mutante $\alpha 7$ TSLMF** (Figura III.35-B). Este receptor presenta mutaciones en 5 aminoácidos, esenciales para la interacción con cierto tipo de PAMs.

Las corrientes unitarias fueron registradas por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* sobre células BOSC23 a un potencial de membrana de -70 mV. Se

utilizaron concentraciones de 100 μM para ACh y 50 μM para el compuesto **70a** (máximo efecto en receptor $\alpha 7$) (Figura I.II.5). En presencia del compuesto, las aperturas fueron de $1,04 \pm 0,20$ ms y los *bursts* de $1,76 \pm 0,05$ ms ($n = 4$, $N = 3$), sin diferencias significativas con los parámetros cinéticos del receptor quíntuple mutante activado únicamente por ACh ($\tau_{\text{open}} = 1,26 \pm 0,43$ ms y $\tau_{\text{burst}} = 1,98 \pm 0,74$ ms, $n = 5$, $N = 4$, $p > 0,05$ en cada caso, **Figura III.36**). Por lo tanto, los cinco residuos de la cavidad transmembrana, o al menos algunos de ellos, resultarían esenciales para la potenciación mediada por **70a**.

Estos resultados revelaron que, pese a que el compuesto **70a** se comportó como PAM tipo I, compartió **determinantes estructurales de potenciación transmembranales** con el prototipo de PAM tipo II PNU-120596, semejando el comportamiento del prototipo de PAM tipo I NS-1738 y de ciertos flavonoides, que también presentan actividad $\alpha 7$ -PAM tipo I.¹⁷³

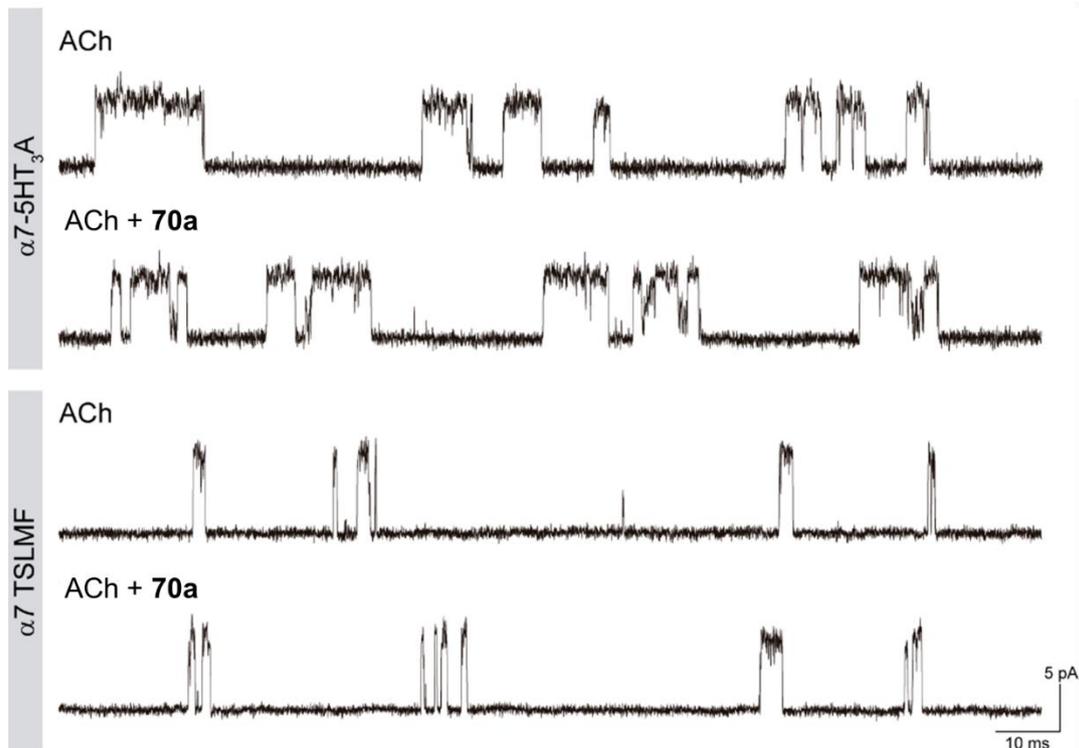
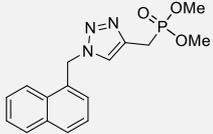
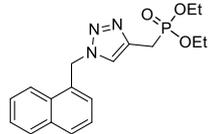
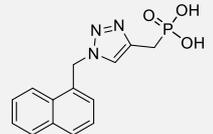
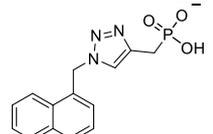
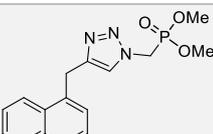


Figura III.36. Determinantes estructurales de la potenciación por el derivado 70a. Registros representativos de corrientes microscópicas del receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT₃A HC activado por ACh 500 μM (porción superior) y del receptor $\alpha 7$ TSLMF activado por ACh 100 μM (porción inferior) en ausencia y en presencia del compuesto 3a 50 μM . Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV.

¹⁷³ Nielsen, B. E.; Bermudez, I.; Bouzat, C. *Neuropharmacology* **2019**, *160*, 107794.

III.3.5.v. Permeabilidad - Barrera hematoencefálica

Debido a que la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) es una propiedad de gran importancia a la hora de diseñar fármacos, especialmente para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, se estimó la habilidad de los fosfonatos evaluados para atravesar esta barrera. Para ello se emplearon dos predictores, la plataforma SwissADME¹⁷⁴ y el servicio de predicción CBLigand.¹⁷⁵ Tal como se muestra en la **Tabla III.9**, los fosfonatos con actividad α 7-PAM, **70 a-b** y **88**, pueden atravesar la barrera hematoencefálica.

Compuesto	Permeabilidad BHE (\pm) ^a	Permeabilidad BHE (\pm) y puntaje ^b
 <p>70a</p>	BHE+	BHE + (Puntaje: 0.110)
 <p>70b</p>	BHE +	BHE + (Puntaje: 0.092)
 <p>71</p>	BHE -	BHE + (Puntaje: 0.075)
 <p>71</p>	BHE -	BHE + (Puntaje: 0.088)
 <p>88</p>	BHE +	BHE + (Puntaje: 0.114)
<p>a. Predicción SwissADME. b. Predicción CBLigand. Umbral BBB-/BBB+ corresponde a un puntaje de 0.02</p>		
Tabla III.9. Permeabilidad de los fosfonatos evaluados frente a la BHE.		

¹⁷⁴ <http://www.swissadme.ch>.

¹⁷⁵ <http://www.cbligand.org/BBB/>.

III.4. Conclusiones

Se sintetizaron 16 nuevos derivados de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos, diseñados a partir de subestructuras de PAMs conocidos. Acorde a los objetivos propuestos, 14 de ellos presentaron funciones fosforadas en su estructura. Al analizar la actividad α 7-PAM de los compuestos de fórmula general:

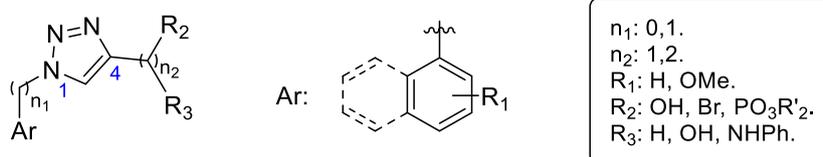


Figura III.37. Estructura general de los triazoles evaluados como α 7-PAM.

A través de los estudios SAR realizados, se encontró que aquellos triazoles en los cuales:

- ✓ Ar: naftil.
- ✓ $R_2: PO_3R'_2$ (particularmente $R': Me$ o Et).
- ✓ $R_3: H$.

Presentan la actividad deseada, siendo $n_1: 1$ y $n_2: 1$ la distancia óptima entre los grupos funcionales presentes (correspondiente a los fosfonatos **70a-b** y **88**) y el anillo de triazol. En líneas generales, se encontró que no se pueden efectuar muchas modificaciones sobre el compuesto líder **70a** sin que esto conlleve a la pérdida de actividad α 7-PAM (por ej., compuestos **102**, **106** y **119a**, **Figura III.37**).

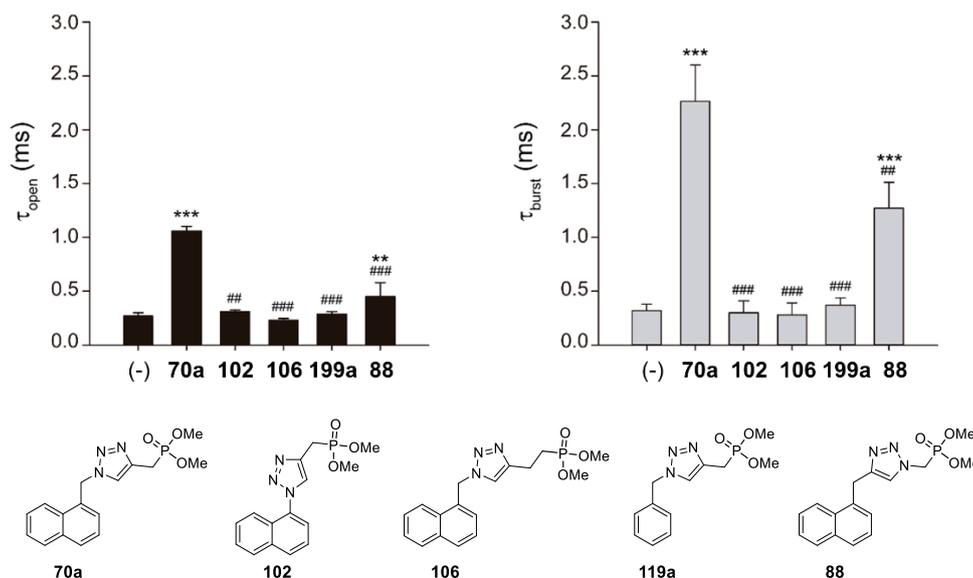


Figura III.37. Gráficos de barras de las constantes de tiempo de estado abierto (negro) y de *burst* (gris). Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control en ausencia de compuesto (*) y contra la condición experimental con compuesto **70a** (#).

De esta familia de compuestos, los fosfonatos **70a**, **70b** y **88** presentaron la mayor actividad, siendo el compuesto **70a** el más activo, por lo cual su efecto sobre el receptor nicotínico $\alpha 7$ fue estudiado en mayor profundidad. Se determinó que el compuesto ejerce la mayor actividad en un rango de concentraciones 10-50 μM . Teniendo en cuenta el efecto observado a nivel de corrientes macroscópicas, aumentando el pico de corriente sin alterar la velocidad de desensibilización, se lo clasificó como **PAM tipo I**.

Finalmente, cabe destacar que estos compuestos representan la primera familia de 1,2,3-triazoles funcionalizados con grupos fosfonatos que ejercen este tipo de actividad.

III.5. Sección experimental

III.5.1. Procedimientos generales

Todas las reacciones sensibles a la humedad o al aire se realizaron bajo atmósfera inerte de nitrógeno. El material de vidrio se secó antes de su empleo, aplicando calor, evacuando el sistema bajo vacío (1 mmHg), y permitiendo luego llegar a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno.

Para las mezclas frigoríficas, se utilizó acetona/nitrógeno para enfriar a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, y hielo/agua para enfriar a 0°C . Para las reacciones a alta temperatura se emplearon refrigerantes y baños de aceite de silicona. Para el secado de las disoluciones procedentes de la elaboración de las diversas reacciones, se utilizó Na_2SO_4 anhidro.

III.5.1.i. Solventes y reactivos.

Los solventes utilizados en las reacciones se purificaron siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía¹⁷⁶, secándose por calentamiento a reflujo utilizando el agente desecante adecuado, en atmósfera inerte, y destilados inmediatamente antes de su uso. Los agentes desecantes utilizados fueron: Na° /Benzofenona (THF y Et_2O), CaH_2 (DCM y MeOH), KOH (Py). DMF y DMSO se destilaron sobre CaH_2 y se almacenaron sobre tamices moleculares de 4 \AA .

Los tamices moleculares (4 \AA , MS) se activaron inmediatamente antes de su utilización, por calentamiento a 300°C con una corriente de nitrógeno, en una columna de vidrio recubierta con cintas calefactoras. Para las reacciones de cicloadición se utilizó cloruro de cobre(II) anhidro (Aldrich). El DTBB (4,4'-di-*tert*-butilbifenilo) utilizado como areno fue de la mejor calidad disponible (Aldrich, Fluka). El litio (Aldrich) se utilizó en polvo.

Los reactivos organometálicos empleados se prepararon inmediatamente antes de ser utilizados (*n*-BuLi, LDA). Aquellos sustratos no asequibles en forma comercial, fueron sintetizados empleando reactivos de la mayor pureza posible, y se purificaron por destilación, cristalización o cromatografía en columna.

III.5.1.ii. Cromatografía

Para las cromatografías en capa fina (TLC) se utilizaron cromatofolios de 20 x 20 cm de área y 0,2 mm de espesor de gel de sílice 60 GF₂₅₄ sobre soporte de aluminio. El revelado de los cromatogramas se realizó por visualización con luz UV (254 y 366 nm), y/o con diversas soluciones reveladoras. Como reveladores se utilizaron: (a) solución de ácido fosfomolibdico al 5% en etanol; (b) solución de *p*-anisaldehído (0,5 mL) en H_2SO_4 (5 mL), ácido acético glacial (10

¹⁷⁶ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. y Perrin, D. R. "Purification of Laboratory Chemicals", 4^{ta} Ed., Butterworth-Heinemann, 1996.

mL) y metanol (85 mL), y (c) solución acuosa de permanganato de potasio 1%. La cromatografía flash en columna se realizó en columnas de vidrio, utilizándose como fase estacionaria gel de sílice Merck 60, con un tamaño de partícula de 0,040-0,063 mm (240-400 mesh). Como eluyente, se emplearon mezclas de polaridad creciente de hexano/acetato de etilo, acetato de etilo/metanol o diclorometano/metanol, según se especifica en cada caso.

III.5.1.iii. Instrumentos y equipos

La evaporación de solventes de las disoluciones procedentes de la elaboración de las reacciones se realizó en un evaporador rotatorio Büchi a presión reducida (15 mmHg). Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron registrados con un espectrómetro Bruker ARX-300 (300 MHz para ^1H -RMN, 75 MHz para ^{13}C -RMN, y 121 MHz para ^{31}P -RMN), empleando como solvente cloroformo deuterado, y como referencia interna tetrametilsilano (TMS) o la señal residual de CHCl_3 en ^1H - y ^{13}C -RMN; y H_3PO_4 como referencia externa en ^{31}P -RMN. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en ppm y entre paréntesis se informa la integración, multiplicidad y las constantes de acoplamiento J en Hz.

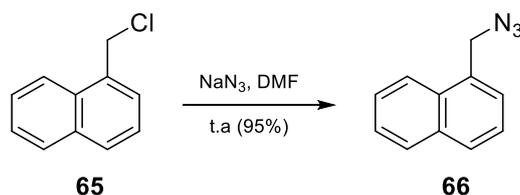
Los análisis mediante espectrometría de masas se realizaron introduciendo la mezcla, por inyección, en un cromatógrafo de gases Agilent GC 7890B equipado con detector selectivo de masas 5977A.

III.5.2. Procedimiento general para la preparación de CuNPs

Para la preparación de las nanopartículas de cobre se colocó en un matraz de reacción previamente secado, provisto de agitador magnético y bajo atmósfera de nitrógeno, litio metálico (14 mg, 2,0 mmol), 4,4'-di-ter-butilbifenilo (27 mg, 0,1 mmol) y THF (2 mL) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó hasta observar la formación del arenuro de litio, de color verde. Sobre esta suspensión se agregó CuCl_2 , (1.0 mmol, previamente secado en estufa a 120°C durante 1h), agitando hasta la aparición de una suspensión de color negro, que indica la formación de las nanopartículas (NPs) metálicas, a las cuales se les agregó una cantidad adicional de THF (2 mL).

En el caso de las CuNPs soportadas, una vez adquirida la coloración negra, se procedió a agregar el soporte (0,8 g) y THF (10 mL), bajo atmósfera inerte de nitrógeno, y se continuó agitando la suspensión por una hora más. Posteriormente, se filtró la suspensión, lavando con EtOH para eliminar los restos de Li. Finalmente, el catalizador se secó a vacío aplicando calentamiento.

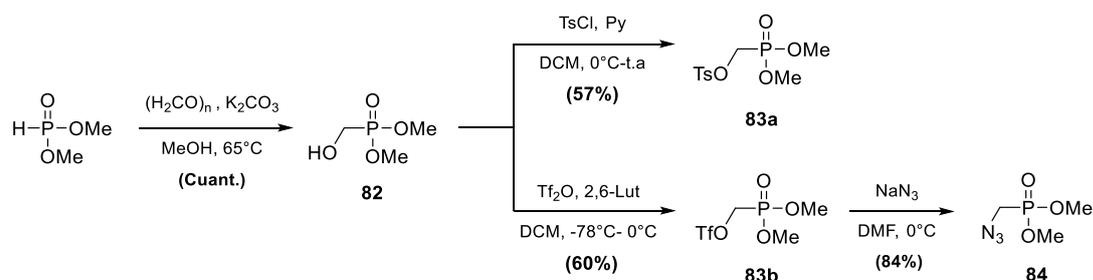
III.5.3. Síntesis de precursores

III.5.3.i. Síntesis de 1-azidometilnaftaleno (**66**)

Sobre una solución de **65** (1,056 g, 6 mmoles) en DMF seca (20 mL), bajo atmósfera inerte, se adicionó azida de sodio (0,78 g, 12 mmoles, 2 eq.). Se agitó la suspensión resultante durante 2,5 h, hasta la finalización de la reacción (monitoreado por TLC). Posteriormente, se adicionó H₂O (50 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (20 mL) y NaCl (sat.) (20 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hexano, 5%), obteniéndose la azida **66** (1,044 g, 95%, aceite incoloro, R_f = 0,5, Hexano).¹⁷⁷

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.61 – 7.55 (m, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.19 – 7.06 (m, 2H), 7.03 – 6.94 (m, 2H), 4.20 (s, 2H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 133.88, 131.34, 130.99, 129.23, 128.73, 126.87, 126.54, 126.00, 125.04, 123.44, 52.65.

III.5.3.ii. Síntesis de azidometilfosfonato de dimetilo (**84**)III.5.3.ii.a. Síntesis hidroximetilfosfonato de dimetilo (**82**)

Sobre una solución de dimetilfosfito (1 mL, 10,9 mmoles) en MeOH (5 mL), se adicionó PFA (0,392 g, 13,1 mmoles, 1,2 eq.) y carbonato de potasio anhidro (0,075g, 5 mol%). Se agitó la suspensión resultante durante 2 h a 65°C, tras lo cual se filtró la suspensión sobre placa porosa, y se concentró la solución resultante. De esta manera se obtuvo **82** (1,524g, cuant., aceite incoloro), el cual fue empleado en la siguiente reacción sin previa purificación.

¹⁷⁷ Giovanni, S.; Singh, R.; Fasan, R. *Chem. Sci.* **2016**, 7 (1), 234–239.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 4.89 (s ancho, 1 H), 3.96 (d, $J = 5.8$ Hz, 2 H), 3.82 ppm (d, $J = 10.6$ Hz, 6H)

^{31}P -RMN (121 MHz, CDCl_3) δ 27.9 ppm.

III.5.3.ii.b. Síntesis de (tosiloximetil)fosfonato de dimetilo (**83a**)

Sobre una solución de **82** (0,496 g, 3,54 mmoles) y piridina (1,36 mL, 17,5 mmoles) en DCM seco (5 mL), bajo atmósfera inerte a 0°C , se adicionó TsCl (0,78 g, 12 mmoles, 2 eq.). Se agitó la solución resultante toda la noche, a temperatura ambiente, tras lo cual se adicionó H_2O (10 mL), y se extrajo con DCM (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO_3 (sat.) (5 mL) y H_2O (20 mL), se secaron, filtraron y concentraron. Se adicionó xileno y se volvió a concentrar a presión reducida para eliminar restos de piridina. De esta manera se obtuvo **83a** (0,592 g, 57%).¹⁷⁸

^{31}P -RMN (121 MHz, CDCl_3) δ 17.82.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.77 – 7.71 (m, 2H), 7.35 – 7.29 (m, 2H), 4.17 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H), 3.72 (d, $J = 10.9$ Hz, 6H), 2.40 (s, 3H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 145.64, 131.53, 130.04, 128.14, 60.54 (d, $J = 169.2$ Hz), 53.63 (d, $J = 6.4$ Hz), 21.63.

III.5.3.ii.c. Síntesis de (trifiloximetil)fosfonato de dimetilo (**83b**)

Sobre una solución de **82** (0,50 g, 3,57 mmoles) y 2,6-lutidina (0,41 mL, 3,57 mmoles), en DCM seco (4 mL), bajo atmósfera inerte a -78°C , se adicionó por goteo lento Tf_2O (0,5 mL, 2,97 mmoles). Se agitó la solución resultante a -78°C por 30 min, y luego otras 2h a 0°C , tras lo cual se adicionó HCl 1M (5 mL). Se extrajo con DCM (3 x 10 mL), y las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. De esta manera se obtuvo **83b** (0,456 g, 60%, aceite naranja pálido), el cual fue empleado inmediatamente en la siguiente reacción.¹⁷⁹

^{31}P -RMN (121 MHz, CDCl_3) δ 14.79.

^{19}F -RMN (282 MHz, CDCl_3) δ -74.15.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 4.61 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.83 (d, $J = 11.0$ Hz, 6H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 127.00 – 110.44 (m), 65.77 (d, $J = 168.7$ Hz), 54.02 (d, $J = 6.4$ Hz).

¹⁷⁸ Kóšiová, I.; Točík, Z.; Buděšínský, M.; Šimák, O.; Liboska, R.; Rejman, D.; Pačes, O.; Rosenberg, I. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50 (49), 6745–6747.

¹⁷⁹ Véase Ref. 91.

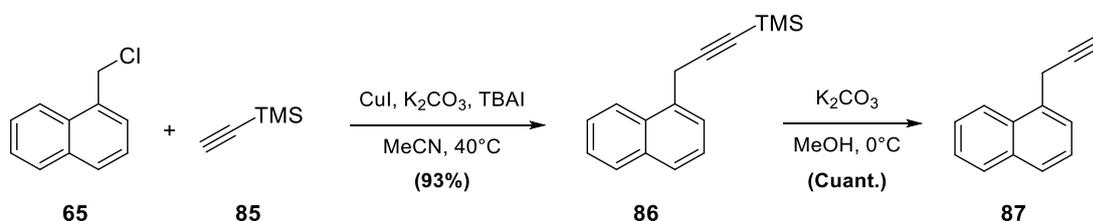
III.5.3.ii.d. Síntesis de azidometilfosfonato de dimetilo (**84**)

Sobre una solución de **83b** (0,21 g, 0,83 mmoles), en DMF seca (4 mL), bajo atmósfera inerte a 0°C, se adicionó azida de sodio (0,162 g, 2,5 mmoles, 3 eq.). Se agitó la solución resultante durante 3h, tras lo cual se agregó H₂O (10 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (10 mL) y NaCl (sat.) (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hexano, 95%), obteniéndose la azida **84** (0,115 g, 84%, aceite incoloro, R_f = 0,55, AcOEt).

³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 22.41.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 3.84 (d, J = 10.8 Hz, 6H), 3.50 (d, J = 11.9 Hz, 2H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 53.42 (d, J = 6.6 Hz), 44.60 (d, J = 156.3 Hz).

III.5.3.iii. Síntesis de 1-(2-propinil)naftaleno (**87**)III.5.3.iii.a. Síntesis de 1-((3-trimetilsilil)-2-propinil)naftaleno (**86**)

Sobre una solución de **65** (0,150 mL, 1 mmol), en MeCN seco (4 mL), se adicionó CuI (0,194 g, 1 mmol), K₂CO₃ (0,276 g, 2 mmoles) y TBAI (0,369 g, 1 mmol). Se calentó a 40°C bajo agitación constante, y se dejó reaccionar durante 24h. Finalizada la reacción (TLC), se agregó NH₄Cl (sat.) (10 mL), y se extrajo con hexano (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido, **86** (0,222 g, 93%, aceite amarillento, R_f = 0,39, 2 x Hexano) fue empleado en la siguiente reacción sin previa purificación.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.10 – 8.02 (m, 1H), 7.97 – 7.90 (m, 1H), 7.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.78 – 7.72 (m, 1H), 7.64 - 7.49 (m, 3H), 4.12 (s, 2H), 0.31 (s, 9H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 133.7, 132.2, 131.5, 128.8, 127.6, 126.2, 125.8, 125.7, 125.7, 123.4, 104.1, 88.1, 24.2, 0.3.

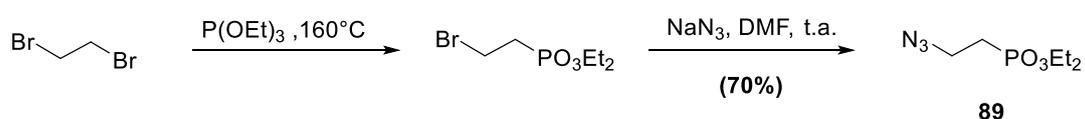
El compuesto **86** (0,222g, 0,93 mmoles) se disolvió en MeOH (3 mL), se enfrió a 0°C, y se adicionó K₂CO₃ (0,643g, 4,65 mmoles). Se dejó reaccionar durante 2h, tras lo cual se agregó H₂O (5 mL), y se extrajo con Et₂O (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. Se obtuvo **87** (0,155 g, cuant., aceite levemente

amarillento, $R_f = 0,43$, hexano), que fue empleado en la reacción de cicloadición sin previa purificación.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.95 – 7.89 (m, 1H), 7.82 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.72 – 7.67 (m, 1H), 7.64 – 7.46 (m, 4H), 4.05 (d, $J = 2.7$ Hz, 2H), 2.32 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 133.8, 132.0, 131.4, 128.9, 127.8, 126.3, 125.9, 125.8, 125.7, 123.3, 81.8, 71.5, 22.8.

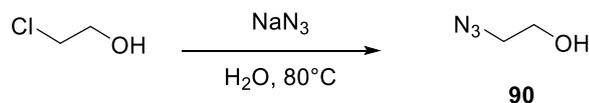
III.5.3.iv. Síntesis de 2-azidoetilfosfonato de dietilo (**89**)



La mezcla de 1,2-dibromoetano (5,0 mL; 58,0 mmol) y P(OEt)_3 (2,0 mL; 11,7 mmol) se calentó a 160°C durante 24 h. El exceso de reactivos se eliminó a 20 y 5 mmHg respectivamente. El compuesto obtenido, 2-bromoetilfosfonato de dietilo, fue utilizado en la siguiente reacción sin previa purificación. Una fracción del mismo (0,74 g, 3,04 mmoles) se disolvió en DMF seca (5 mL), bajo atmósfera inerte, y se agregó azida de sodio (0,395 g, 6.07 mmoles, 2 eq.). La mezcla de reacción se dejó reaccionar toda la noche, tras lo cual se adicionó H_2O (10 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H_2O (10 mL) y NaCl (sat.) (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hexano , 70%), obteniéndose la azida **89** (0,44 g, 70%, aceite ligeramente verdoso, $R_f = 0,4$, AcOEt/Hexano 60%).

$^{31}\text{P-RMN}$ (121 MHz, CDCl_3) δ 25.10.

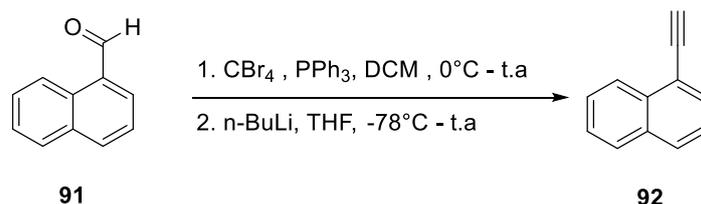
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 3.85 – 3.64 (m, 4H), 3.24 (q, $J = 8.5$ Hz, 2H), 2.19 – 1.99 (m, 2H), 0.99 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

III.5.3.v. Síntesis de 2-azidoetanol (**90**)

Sobre una solución de 2-cloroetanol (0,20 g, 2,48 mmoles), en H₂O (1 mL), se adicionó azida de sodio (0,21 g, 3,22 mmoles, 1,3 eq.). Se agitó la solución resultante toda la noche a 80°C, tras lo cual se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó NaCl (sat.) (5 mL), y se extrajo con DCM (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hexano, 60%), obteniéndose la azida **90** (0,128 g, 60%, aceite incoloro, R_f = 0,7, AcOEt/Hexano 80%).¹⁸⁰

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 3.71 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.37 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.29 (s ancho, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 61.26, 53.41.

III.5.3.vi. Síntesis de 1-etilnaftaleno (**92**)

Sobre una solución de CBr₄ (2,12 g, 6,4 mmoles), en DCM seco (20 mL), bajo atmósfera inerte a 0°C, se adicionó PPh₃ (3,35 g, 12,8 mmoles) en 3 porciones. La solución adquiere una coloración naranja intensa, indicando la formación del iluro. Posteriormente, se adicionó vía jeringa la solución del iluro sobre una solución de **91** (0,5 g, 3,2 mmoles) en DCM seco (10 mL), y se dejó la solución resultante bajo agitación durante 2h, dejando que alcance temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción (TLC), se agregó hexano (100 mL) y se dejó con agitación vigorosa 10 min. Luego se filtró la suspensión blanca a través de sílica gel, en una placa filtrante, y se lavó con hexano hasta arrastrar todo el producto (TLC). El filtrado se concentró bajo presión reducida obteniéndose el dibromoalqueno intermediario, el cual fue utilizado para la siguiente reacción sin previa purificación (0,936 g, 94%).

El compuesto previamente sintetizado se disolvió en THF seco (10 mL), y se enfrió la solución resultante a -78°C. Luego se adicionó *n*-BuLi (4,2 mL, 1,69 M), por goteo lento, y se dejó

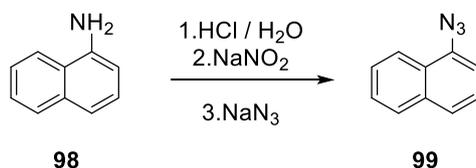
¹⁸⁰ Eissa, A. M.; Smith, M. J. P.; Kubilis, A.; Mosely, J. A.; Cameron, N. R. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2013**, *51* (24), 5184–5193.

la solución bajo agitación, en atmósfera inerte, durante 4h, dejando que la misma alcance temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción (TLC), se adicionó HCl 10% (5 mL), y se extrajo con Et₂O (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (Hexano), obteniéndose el alquino **92** (0,29 g, 60% para los dos pasos, aceite ligeramente amarillo, R_f = 0,65, AcOEt/Hexano 5%).¹⁸¹

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (d, *J* = 8.36 Hz, 1H), 7.91 – 7.84 (m, 2H), 7.78 (dd, *J* = 7.1, 1.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.58 (m, 2H), 7.45 (dd, *J* = 8.3, 7.1 Hz, 1H), 3.51 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 133.64, 133.21, 131.35, 129.39, 128.41, 127.07, 126.61, 126.17, 125.21, 119.90, 82.11, 81.90.

III.5.3.vii. Síntesis de 1-azidonaftaleno (**99**)

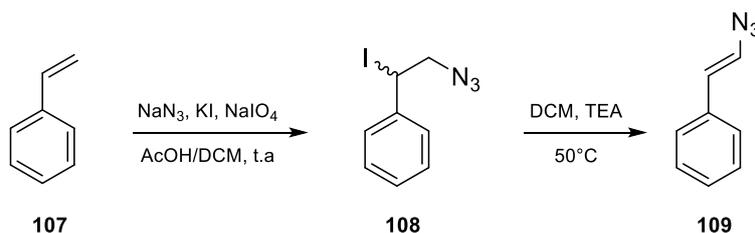


Sobre una suspensión de **98** (0,716 g, 5 mmoles), en H₂O (8 mL), se adicionó por goteo HCl 37% (3 mL), observándose la aparición de un precipitado blanco. Tras agitar 1h a t.a, se enfrió la suspensión a 0°C, y se agregó una solución de NaNO₂ (0,724 g, 10,5 mmoles, 2 eq.) en H₂O (2,5 mL), observándose la aparición de una coloración marrón turbia. Una vez finalizado el agregado, se filtró la suspensión, obteniéndose una solución traslúcida naranja oscuro, sobre la cual se agregó azida de sodio (0,558 g, 8,6 mmoles, 1,7 eq.). Se dejó la solución bajo agitación toda la noche, tras lo cual se extrajo con (*i*-Pr)₂O (3 X 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron, obteniéndose la azida **99** (0,792 g, 94%, aceite marrón oscuro), lo suficientemente pura como para ser utilizada sin posterior purificación.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.12 – 8.05 (m, 1H), 7.83 – 7.76 (m, 1H), 7.61 (dt, *J* = 8.2, 1.0 Hz, 1H), 7.54 – 7.45 (m, 2H), 7.45 – 7.39 (m, 1H), 7.26 – 7.19 (m, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 136.54, 134.37, 127.74, 126.89, 126.44, 126.14, 125.66, 124.70, 122.57, 113.92.

¹⁸¹ Ikeda, A; Omote, M; Kusumoto, K; Tarui, A; Sato, K; Ando, K. *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 8886-8892.

III.5.3.viii. Síntesis de (*E*)-2-azidovinil benceno (**109**)

Sobre una suspensión de azida de sodio (0,585 g, 9 mmoles) en DCM seco (9 mL) a t.a, se agregó KI (0,498 g, 3 mmoles), NaIO₄ (0,642 g, 3 mmoles) y AcOH (1 mL), y se dejó agitar durante 10 min. La solución resultante adquirió una coloración marrón, momento en el cual se adicionó estireno, **107** (0,345 mL, 3 mmoles). Tras dejar a t.a durante toda la noche, se adicionó NaHCO₃ (sat.) (10 mL), y se extrajo con DCM (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con Na₂SO₃ (ac.) (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (Hexano), obteniéndose la azida **108** (0,774 g, 95%, aceite amarillo).

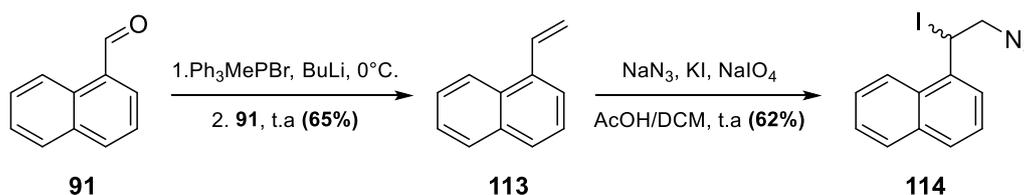
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.47 – 7.40 (m, 2H), 7.40 – 7.30 (m, 3H), 5.16 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.94 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 140.37, 129.13, 128.91, 127.70, 58.86, 28.01.

El compuesto obtenido previamente, **108** (0,773 g, 2,83 mmoles), fue disuelto en DCM seco (9 mL), y se agregó TEA (2 mL, 14,15 mmoles, 5 eq.). Se calentó a 50°C, bajo atmósfera inerte, durante toda la noche. Posteriormente, se adicionó H₂SO₄ 2N (10 mL) y se extrajo con DCM (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hexano, 5%), obteniéndose la azida **109** (0,246 g, 60%, aceite naranja pálido, R_f = 0,6, AcOEt/Hexano 5%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.35 – 7.17 (m, 5H), 6.61 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 134.73, 128.47, 127.10, 126.39, 125.53, 119.51.

III.5.3.ix. Síntesis de 1-(2-azido-1-iodoetil)naftaleno (**114**)

Sobre una solución de Ph_3MePBr (0,857 g, 2,4 mmoles) en THF seco (5 mL) a 0°C , bajo atmósfera inerte, se agregó BuLi (1,5 mL, 1,6 M). La solución adquirió una coloración naranja. Al cabo de 1h, se adicionó **91** (0,272 mL, 2 mmoles). Se dejó reaccionar la mezcla toda la noche, dejando que la solución alcance t.a. Posteriormente, se adicionó NaH_4Cl (sat.) (10 mL), y se extrajo con DCM (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hexano 5%), obteniéndose **113** (0,197 g, 65%, aceite naranja, $R_f = 0,45$, AcOEt/Hexano 5%).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8.13 – 8.04 (m, 1H), 7.84 – 7.69 (m, 2H), 7.59 (dt, $J = 7.1, 1.0$ Hz, 1H), 7.53 – 7.36 (m, 4H), 5.76 (dd, $J = 17.3, 1.6$ Hz, 1H), 5.44 (dd, $J = 10.9, 1.6$ Hz, 1H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 135.66, 134.45, 133.67, 131.19, 128.55, 128.14, 126.08, 125.77, 125.65, 123.80, 123.67, 117.07.

Sobre una suspensión de azida de sodio (0,17 g, 2,61 mmoles) en DCM seco (7 mL) a t.a, se agregó KI (0,144 g, 0,87 mmoles), NaIO_4 (0,186 g, 0,87 mmoles) y AcOH (0,3 mL) y se dejó agitar durante 10 min. La solución adquirió una coloración marrón, momento en el cual se adicionó **113** (0,134 g, 0,87 mmoles). Tras dejar a t.a durante toda la noche, se adicionó NaHCO_3 (sat.) (10 mL), y se extrajo con DCM (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con Na_2SO_3 (ac.) (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hexano 5%), obteniéndose la azida **114** (0,174 g, 62%, aceite marrón, $R_f = 0,50$, AcOEt/Hexano 5%).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8.16 – 7.99 (m, 1H), 7.96 – 7.81 (m, 2H), 7.78 – 7.40 (m, 4H), 5.97 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.24 (dd, $J = 7.6, 1.9$ Hz, 1H), 3.69 – 3.62 (m, 1H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 131.85, 129.61, 129.34, 129.10, 127.01, 126.58, 126.35, 126.14, 125.60, 125.42, 125.00, 122.25, 62.75, 57.93.

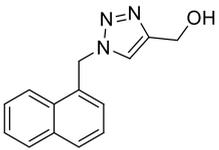
III.5.4. Procedimiento general: cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada por CuNPs/C.

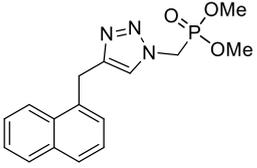
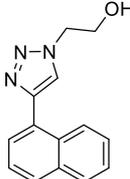
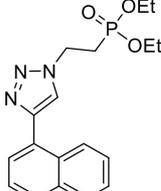
Método A

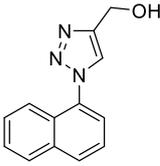
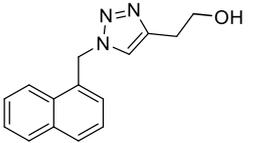
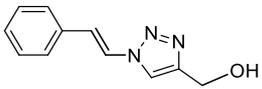
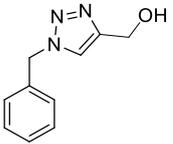
Sobre una suspensión de CuNPs/C (5 o 10 mol% Cu) en H₂O (2 mL), se adicionó el haluro (1 mmol), azida de sodio (0,072 g, 1,1 mmol) y el alquino (1 mmol). La mezcla de reacción se dejó bajo agitación a 70°C, monitoreando el progreso de la misma por TLC. Una vez finalizada la reacción, se agregó H₂O (10 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hexano, 90%), para dar lugar a los correspondientes triazoles.

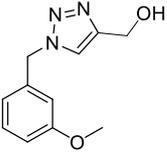
Método B

Sobre una solución de la azida orgánica (1 mmol), en THF (5 mL), se adicionó el alquino (1 mmol), TEA (1 mmol) y el catalizador (5 o 10 mol% Cu, según se indique en cada caso). La mezcla de reacción se dejó bajo agitación a 65°C, monitoreando el progreso de la misma por TLC. Una vez finalizada la reacción, se agregó H₂O (10 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hexano, 90%, o MeOH/DCM 5% en el caso de los fosfonatos) para dar lugar a los correspondientes triazoles.

	<p style="text-align: center;">(1-(1-naftalenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metanol (68)</p> <p style="text-align: center;">Método A (5 mol% Cu)</p> <p style="text-align: center;">Sólido blanco (0,192 g, 82%). P.f: 132-134 °C</p> <p style="text-align: center;">R_f = 0,29 (AcOEt)</p>
<p>¹H-RMN (300 MHz, CD₃CN) δ 8.05 – 7.98 (m, 1H), 7.85 (dtd, <i>J</i> = 7.1, 5.9, 5.3, 4.0 Hz, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.50 – 7.44 (m, 2H), 7.44 – 7.38 (m, 1H), 7.37 – 7.32 (m, 1H), 5.91 (s, 2H), 4.45 (d, <i>J</i> = 5.1 Hz, 2H), 3.13 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 148.0, 135.4, 132.5, 131.9, 130.8, 129.9, 128.8, 128.00, 127.95, 127.3, 126.5, 124.0, 56.4, 52.9.</p>	

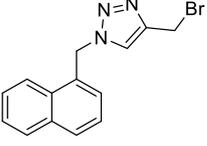
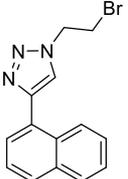
	<p>(4-(1-naftalenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metilfosfonato de dimetilo (88)</p> <p>Método B (10 mol% Cu), partiendo de 0,3 mmoles de azida/alquino.</p> <p>Aceite incoloro (0,054 g, 54%)</p> <p>Rf = 0,47 (MeOH/DCM 10%)</p>
<p>³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 18.37.</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.01 – 7.95 (m, 1H), 7.87 – 7.80 (m, 1H), 7.75 (dd, <i>J</i> = 6.2, 3.4 Hz, 1H), 7.48 – 7.42 (m, 2H), 7.40 (d, <i>J</i> = 6.2 Hz, 2H), 7.19 (s, 1H), 4.63 (d, <i>J</i> = 13.0 Hz, 2H), 4.52 (s, 2H), 3.65 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 6H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 148.24, 134.76, 134.04, 131.66, 128.79, 127.73, 127.00, 126.17, 125.77, 125.69, 124.13, 122.95, 53.65 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz), 45.09 (d, <i>J</i> = 156.0 Hz), 30.15.</p>	
	<p>2-(4-(1-naftalenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etanol (94)</p> <p>Método B (10 mol% Cu)</p> <p>Sólido blanco (0,180 g, 75%)</p> <p>Rf = 0,34 (AcOEt)</p>
<p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.36 – 8.24 (m, 1H), 7.97 – 7.77 (m, 3H), 7.64 (dd, <i>J</i> = 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.57 – 7.39 (m, 3H), 4.53 (t, <i>J</i> = 4.7 Hz, 2H), 4.09 (t, <i>J</i> = 5.0 Hz, 2H), 3.27 (s ancho, 1H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 146.74, 133.97, 131.16, 129.06, 128.57, 127.94, 127.34, 126.77, 126.14, 125.46, 125.41, 124.01, 61.21, 52.85.</p>	
	<p>2-(4-(1-naftalenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etilfosfonato de dietilo (93)</p> <p>Método B (10 mol% Cu)</p> <p>Aceite ligeramente amarillo (0,162 g, 45%)</p> <p>Rf = 0,18 (AcOEt)</p>
<p>³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 25.81.</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.40 – 8.31 (m, 1H), 7.93 – 7.81 (m, 3H), 7.68 (dd, <i>J</i> = 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.54 – 7.44 (m, 3H), 4.72 (dt, <i>J</i> = 12.8, 7.6 Hz, 2H), 4.08 (q, <i>J</i> = 7.3 Hz, 4H), 2.52 (dt, <i>J</i> = 18.4, 7.6 Hz, 2H), 1.28 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 6H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 146.85, 133.91, 131.10, 128.97, 128.50, 127.94, 127.22, 126.68, 126.04, 125.38, 125.37, 123.16, 62.30 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz), 44.65 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz), 27.27 (d, <i>J</i> = 141.2 Hz), 16.42 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz).</p>	

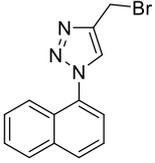
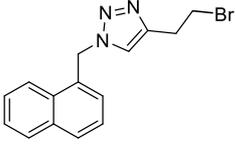
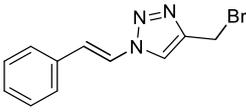
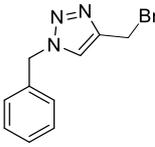
	<p align="center">(1-(1-naftalenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metanol (100)</p> <p align="center">Método A (5 mol% Cu)</p> <p align="center">Sólido amarillo pálido (0,180 g, 80%). P.f: 109-110 °C</p> <p align="center">Rf = 0,47 (AcOEt)</p>
<p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.04 – 7.97 (m, 1H), 7.94 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H), 7.63 – 7.46 (m, 5H), 4.98 (s, 2H), 3.41 (s, 1H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 147.70, 134.13, 133.63, 130.44, 128.48, 128.27, 127.92, 127.09, 124.97, 124.53, 123.58, 122.27, 56.48.</p>	
	<p align="center">(2-(1-naftalenmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)etanol (104)</p> <p align="center">Método A (5 mol% Cu)</p> <p align="center">Sólido blanco (0,164 g, 65%). P.f: 145-146,5 °C</p> <p align="center">Rf = 0,26 (AcOEt)</p>
<p>¹H-RMN (CDCl₃) δ 8.01–7.93 (m, 1H), 7.93–7.86 (m, 2H), 7.57–7.49 (m, 2H), 7.49–7.40 (m, 2H), 7.17 (s, 1H), 5.95 (s, 2H), 3.87 (c, <i>J</i> = 5.9 Hz, 2H), 2.84 (t, <i>J</i> = 5.9 Hz, 2H), 2.65 (s, 1H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 145.83, 133.94, 131.22, 130.03, 129.91, 128.93, 127.88, 127.30, 126.41, 125.35, 122.90, 121.40, 61.56, 52.27, 28.67.</p>	
	<p align="center">(E)-(1-estiril-1H-1,2,3-triazol-4-il)metanol (110)</p> <p align="center">Método B (5 mol% Cu)</p> <p align="center">Sólido blanco (0,150 g, 75%)</p> <p align="center">Rf = 0,60 (AcOEt)</p>
<p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.87 (s, 1H), 7.74 (d, <i>J</i> = 14.7 Hz, 1H), 7.50 – 7.31 (m, 5H), 7.19 – 7.11 (m, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.71 (s, 1H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 133.59, 129.18, 129.02, 128.58, 126.89, 123.94, 123.06, 122.17, 56.65.</p>	
	<p align="center">(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metanol (117a)</p> <p align="center">Método A (5 mol% Cu)</p> <p align="center">Sólido blanco (0,159 g, 84%). P.f: 74-75 °C</p> <p align="center">Rf = 0,12 (AcOEt/Hexano 50%)</p>
<p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.45 (s, 1H), 7.33 (m, 3H), 7.26 – 7.21 (m, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.17 – 3.69 (s, 1H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 148.33, 134.60, 129.16, 128.81, 128.17, 121.91, 56.18, 54.22.</p>	

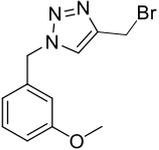
	<p style="text-align: center;">(1-(3-metoxibencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metanol (117b)</p> <p style="text-align: center;">Método A (5 mol% Cu)</p> <p style="text-align: center;">Sólido blanco (0,175 g, 80%)</p> <p style="text-align: center;">Rf = 0,29 (AcOEt)</p>
<p>¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 7.88 (s, 1H), 7.36 – 7.16 (m, 1H), 6.87 (m, 3H), 5.53 (s, 2H), 4.90 (s, 1H), 4.72 – 4.59 (s, 2H), 3.75 (s, 3H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ 161.50, 149.40, 138.16, 131.07, 124.11, 121.15, 114.93, 114.68, 56.43, 55.70, 54.77.</p>	

III.5.5. Procedimiento general para la obtención de bromuros. Reacción de Appel

Sobre una solución del correspondiente alcohol (0,5 mmoles) y CBr₄ (0,199 g, 0,6 mmoles) en DCM seco (5 mL) a 0 °C, se agregó PPh₃ (0,209 g, 0,8 mmoles) en pequeñas porciones. Se dejó la solución bajo agitación, dejando que alcance t.a. Una vez finalizada la reacción (TLC), se evaporó el solvente a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en columna (AcOEt/Hex 50%) para dar lugar a los correspondientes bromuros.

	<p style="text-align: center;">4-(bromometil)-1-(1-naftalenmetil)-1H-1,2,3-triazol (69)</p> <p style="text-align: center;">Sólido amarillo pálido (0,120 g, 80%). P.f: 108-109°C</p> <p style="text-align: center;">Rf = 0,35 (AcOEt/Hexano 50%)</p>
<p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.91 (dd, <i>J</i> = 8.7, 5.3 Hz, 3H), 7.57 – 7.39 (m, 4H), 7.34 (s, 1H), 5.93 (s, 2H), 4.45 (s, 2H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 144.94, 134.08, 131.25, 130.34, 129.58, 129.11, 128.17, 127.52, 126.61, 125.49, 122.90, 122.77, 52.55, 21.74.</p>	
	<p style="text-align: center;">1-(2-bromoetil)-4-(1-naftalenil)-1H-1,2,3-triazol (95)</p> <p style="text-align: center;">Sólido amarillo pálido (0,145 g, 96%).</p> <p style="text-align: center;">Rf = 0,52 (AcOEt/Hexano 50%)</p>
<p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.41 – 8.32 (m, 1H), 7.96 – 7.85 (m, 3H), 7.72 (dd, <i>J</i> = 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.58 – 7.48 (m, 3H), 4.85 (t, <i>J</i> = 6.1 Hz, 2H), 3.83 (t, <i>J</i> = 6.2 Hz, 2H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 146.81, 133.97, 131.21, 129.11, 128.57, 127.89, 127.42, 126.81, 126.14, 125.45, 125.41, 123.58, 51.72, 29.72.</p>	

	<p style="text-align: center;">4-(bromometil)-1-(1-naftalenil)-1H-1,2,3-triazol (101)</p> <p style="text-align: center;">Aceite naranja pálido (0,118 g, 82%)</p> <p style="text-align: center;">Rf = 0,71 (AcOEt/Hexano 50%)</p>
<p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.02 (q, <i>J</i> = 4.2, 3.5 Hz, 1H), 8.00 – 7.93 (m, 2H), 7.66 – 7.50 (m, 5H), 4.73 (s, 2H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 144.68, 134.16, 133.41, 130.64, 128.41, 128.35, 128.04, 127.18, 125.48, 124.97, 123.63, 122.15, 21.49.</p>	
	<p style="text-align: center;">4-(2-bromoetil)-1-(1-naftalenmetil)-1H-1,2,3-triazol (105)</p> <p style="text-align: center;">Sólido amarillo pálido (0,115 g, 73%). P.f: 159-161°C</p> <p style="text-align: center;">Rf = 0,61 (AcOEt/Hexano 50%)</p>
<p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.99 – 7.89 (m, 1H), 7.89 – 7.80 (m, 2H), 7.52 – 7.40 (m, 3H), 7.35 (dd, <i>J</i> = 7.1, 1.3 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 5.90 (s, 2H), 3.54 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 3.14 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 145.12, 133.89, 131.13, 130.01, 129.95, 128.94, 127.68, 127.25, 126.41, 125.40, 122.87, 121.74, 52.22, 31.43, 29.47.</p>	
	<p style="text-align: center;">(E)-4-(bromometil)-1-estiril-1H-1,2,3-triazol (111)</p> <p style="text-align: center;">Sólido amarillo pálido (0,100 g, 75%).</p> <p style="text-align: center;">Rf = 0,84 (AcOEt/Hexano 50%)</p>
<p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (s, 1H), 7.73 (d, <i>J</i> = 14.7 Hz, 1H), 7.50 – 7.31 (m, 5H), 7.23 – 7.10 (m, 1H), 4.62 (s, 2H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, DEPT) δ 129.08, 129.00, 126.79, 122.41, 120.22, 21.31.</p>	
	<p style="text-align: center;">1-bencil-4-(bromometil)-1H-1,2,3-triazol (118a)</p> <p style="text-align: center;">Sólido amarillo pálido (0,107 g, 85%). P.f: 135-136°C</p> <p style="text-align: center;">Rf = 0,60 (AcOEt/Hexano 50%)</p>
<p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.49 (s, 1H), 7.38 (dd, <i>J</i> = 5.2, 1.9 Hz, 3H), 7.31 – 7.25 (m, 2H), 5.51 (s, 2H), 4.54 (s, 2H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 145.11, 134.35, 129.31, 129.02, 128.26, 122.80, 54.42, 21.74.</p>	

	<p style="text-align: center;">4-(bromometil)-1-(3-metoxibencil)-1H-1,2,3-triazol (118b)</p> <p style="text-align: center;">Sólido blanco (0,120 g, 85%)</p> <p style="text-align: center;">R_f = 0,75 (AcOEt/Hexano 80%)</p>
<p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.51 (s, 1H), 7.30 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 6.93 – 6.82 (m, 2H), 6.79 (t, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 5.47 (s, 2H), 4.54 (s, 2H), 3.78 (s, 3H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 160.24, 145.07, 135.77, 130.36, 122.83, 120.39, 114.41, 113.84, 55.42, 54.32, 21.75.</p>	

III.5.6. Procedimiento general para la síntesis de fosfonatos

Método A. Reacción de Michaelis-Becker

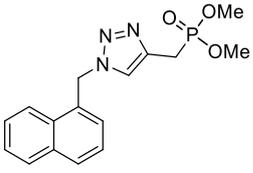
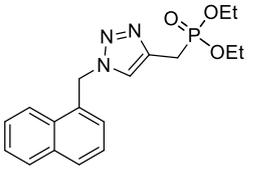
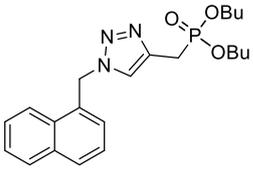
Sobre una suspensión de NaH al 60% (0,080 g, 2 mmoles) en DMF seca (3 mL), se agregó el dialquilfosfito (2 mmoles), observándose el desprendimiento de H₂ (g). Se dejó la solución bajo agitación 0,5 h, tras lo cual se agregó el bromuro (0,5 mmoles), disuelto en DMF seca (1,5 mL). Se dejó la solución bajo agitación toda la noche, y posteriormente se agregó H₂O (10 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaCl (sat.) (10 mL) y H₂O (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (MeOH/DCM 10%) para dar lugar a los correspondientes fosfonatos.

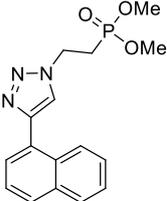
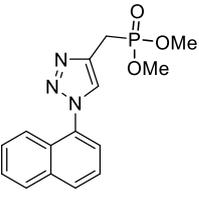
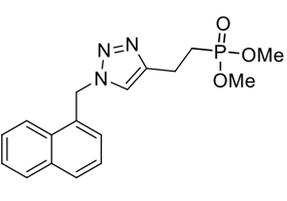
Método B. Reacción de Arbuzov

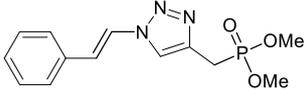
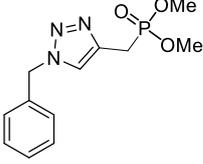
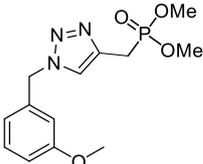
La mezcla del bromuro (0,3 mmol), y trimetil fosfito (2 mL, 15 mmoles), se calentó a 110°C durante toda la noche. El exceso de trimetil fosfito se eliminó a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (MeOH/DCM 10%), para dar lugar a los correspondientes fosfonatos de metilo.

Método C. Reacción de Arbuzov en MeCN

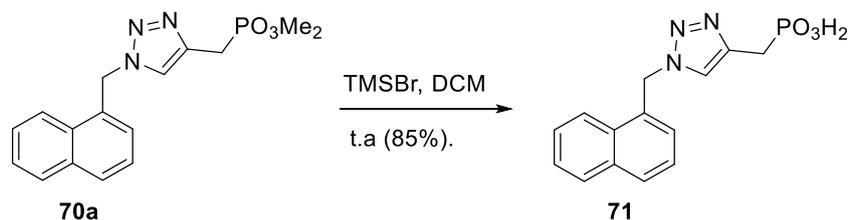
Sobre una solución del bromuro (0,3 mmol) en MeCN (2 mL), se adicionó trimetil fosfito (0,6 mL, 5 mmoles), y se calentó a 80°C durante toda la noche. El exceso de trimetil fosfito se eliminó a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (MeOH/DCM 10%), para dar lugar a los correspondientes fosfonatos de metilo.

	<p>(1-(1-naftalenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilfosfonato de dimetilo (70a)</p> <p>Método A</p> <p>Aceite incoloro (0,126 g, 76%)</p> <p>Rf = 0,50 (MeOH/DCM 10%)</p>
<p>³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 27.18.</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.16–8.07 (m, 1H), 8.00–7.90 (m, 2H), 7.64 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 7.61–7.52 (m, 2H), 7.52–7.47 (m, 1H), 7.47–7.40 (m, 1H), 6.00 (s, 2H), 3.63 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 6H), 3.30–3.19 (m, 2H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CD₃CN) δ 139.36 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz), 139.3, 134.8, 132.2, 131.9, 130.3, 129.8, 128.5, 127.8, 127.2, 126.5, 124.18 (d, <i>J</i> = 5.0 Hz), 53.39 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz), 52.5, 23.35 (d, <i>J</i> = 141.4 Hz).</p>	
	<p>(1-(1-naftalenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilfosfonato de dietilo (70b)</p> <p>Método A</p> <p>Aceite incoloro (0,125 g, 70%)</p> <p>Rf = 0,64 (MeOH/DCM 10%)</p>
<p>³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 24.72.</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.97–7.90 (m, 1H), 7.90–7.84 (m, 2H), 7.52–7.46 (m, 2H), 7.46–7.40 (m, 2H), 7.37 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H), 5.94 (s, 2H), 4.24–4.14 (m, 4H), 3.21 (d, <i>J</i> = 20.5 Hz, 2H), 1.14 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 6H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 138.7 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz), 134.0, 131.2, 130.1, 129.9, 129.0, 128.0, 127.3, 126.4, 125.4, 122.9, 122.7 (d, <i>J</i> = 4.1 Hz), 62.42 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz), 52.6, 24.2 (d, <i>J</i> = 142.7 Hz), 16.3 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz).</p>	
	<p>(1-(1-naftalenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilfosfonato de dibutilo (70c)</p> <p>Método A</p> <p>Aceite incoloro (0,145 g, 70%)</p> <p>Rf = 0,75 (MeOH/DCM 10%)</p>
<p>³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 24.72.</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.99–7.85 (m, 3H), 7.55–7.35 (m, 5H), 5.96 (s, 2H), 3.89 (q, <i>J</i> = 6.7 Hz, 4H), 3.28–3.17 (m, 2H), 1.49 (dq, <i>J</i> = 8.4, 6.6 Hz, 4H), 1.25 (dp, <i>J</i> = 9.6, 7.3 Hz, 4H), 0.85 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 6H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 138.75 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz), 133.96, 131.17, 130.06, 129.82, 128.94, 127.93, 127.21, 126.35, 125.34, 122.86, 122.58 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz), 66.01 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz), 52.45, 32.36 (d, <i>J</i> = 6.1 Hz), 24.03 (d, <i>J</i> = 142.6 Hz), 18.58, 13.52.</p>	

	<p>2-(4-(1-naftalenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil fosfonato de dimetilo (97)</p> <p>Método B</p> <p>Aceite ligeramente amarillo (0,025 g, 25% desde el alcohol 95)</p> <p>Rf = 0,17 (AcOEt)</p>
<p>³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 28.49.</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.40 – 8.31 (m, 1H), 7.94 – 7.84 (m, 3H), 7.70 (dd, J = 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.56 – 7.47 (m, 3H), 4.74 (dt, J = 13.2, 7.5 Hz, 2H), 3.74 (d, J = 11.0 Hz, 6H), 2.56 (dt, J = 18.5, 7.5 Hz, 2H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 134.00, 131.22, 129.08, 128.58, 127.99, 127.32, 126.78, 126.12, 125.42 (d, J = 3.8), 123.21, 52.84 (d, J = 6.5 Hz), 44.56 (d, J = 2.4 Hz), 26.37 (d, J = 141.5 Hz).</p>	
	<p>(1-(1-naftalenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilfosfonato de dimetilo (102)</p> <p>Método C</p> <p>Aceite incoloro (0,078 g, 82%)</p> <p>Rf = 0,17 (MeOH/AcOEt 10%)</p>
<p>³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 27.30.</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.06 – 7.91 (m, 3H), 7.66 – 7.48 (m, 5H), 3.81 (d, J = 10.9 Hz, 6H), 3.50 (d, J = 20.5 Hz, 2H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 138.15 (d, J = 7.1 Hz), 134.16, 133.62, 130.44, 128.43, 128.30, 127.92, 127.07, 125.39 (d, J = 4.3 Hz), 124.96, 123.55, 122.26, 53.06 (d, J = 6.7 Hz), 23.26 (d, J = 143.4 Hz).</p>	
	<p>(2-(1-naftalenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)etilfosfonato de dimetilo (106)</p> <p>Método B</p> <p>Aceite incoloro (0,095 g, 92%)</p> <p>Rf = 0,67 (MeOH/DCM 10%)</p>
<p>³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 32.95.</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.03 – 7.83 (m, 3H), 7.57 – 7.35 (m, 4H), 7.14 (s, 1H), 5.93 (s, 2H), 3.60 (d, J = 10.8 Hz, 6H), 3.01 – 2.79 (m, 2H), 2.19 – 1.99 (m, 2H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 146.70 (d, J = 16.5 Hz), 133.92, 131.17, 130.00, 129.97, 128.91, 127.82, 127.25, 126.39, 125.35, 122.90, 120.90, 52.3, 52.28 (d, J = 2.3 Hz), 24.26 (d, J = 141.2 Hz), 18.95 (d, J = 4.3 Hz).</p>	

	<p>(E)-(1-estiril-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilfosfonato de dimetilo (112)</p> <p>Método C</p> <p>Aceite amarillo (0,053 g, 60%)</p> <p>Rf = 0,55 (MeOH/AcOEt 10%)</p>
<p>³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 27.11.</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.93 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 7.71 (d, <i>J</i> = 14.7 Hz, 1H), 7.48 – 7.29 (m, 5H), 7.13 (d, <i>J</i> = 14.8 Hz, 1H), 3.75 (d, <i>J</i> = 11.0 Hz, 6H), 3.37 (d, <i>J</i> = 20.5 Hz, 2H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 138.62 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz), 133.58, 129.10, 128.90, 126.80, 122.99, 121.97, 120.19 (d, <i>J</i> = 4.4 Hz), 53.14 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz), 23.22 (d, <i>J</i> = 143.1 Hz).</p>	
	<p>(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilfosfonato de dimetilo (119a)</p> <p>Método C</p> <p>Aceite incoloro (0,056 g, 67%)</p> <p>Rf = 0,13 (MeOH/DCM 5%)</p>
<p>³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 27.36.</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.52 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 7.38 – 7.32 (m, 3H), 7.26 (dt, <i>J</i> = 6.6, 2.2 Hz, 2H), 5.51 (s, 2H), 3.71 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 6H), 3.31 (d, <i>J</i> = 20.4 Hz, 2H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 138.54 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz), 134.65, 129.18, 128.84, 128.12, 122.73 (d, <i>J</i> = 4.3 Hz), 54.33, 53.05 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz), 23.31 (d, <i>J</i> = 143.1 Hz).</p>	
	<p>(1-(3-metoxibencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metilfosfonato de dimetilo (119b)</p> <p>Método B</p> <p>Aceite incoloro (0,088 g, 94%)</p> <p>Rf = 0,39 (MeOH/DCM 10%)</p>
<p>³¹P-RMN (121 MHz, CD₃OD) δ 28.15.</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 7.88 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.92 – 6.80 (m, 3H), 5.54 (s, 2H), 3.75 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz, 6H), 3.70 (s, 3H), 3.38 (d, <i>J</i> = 20.6 Hz, 2H).</p> <p>¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ 161.54, 139.38 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz), 138.15, 131.09, 125.01 (d, <i>J</i> = 5.1 Hz), 121.11, 114.97, 114.62, 55.72, 54.84, 53.77 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz), 23.15 (d, <i>J</i> = 143.1 Hz).</p>	

III.5.7. Reacciones adicionales

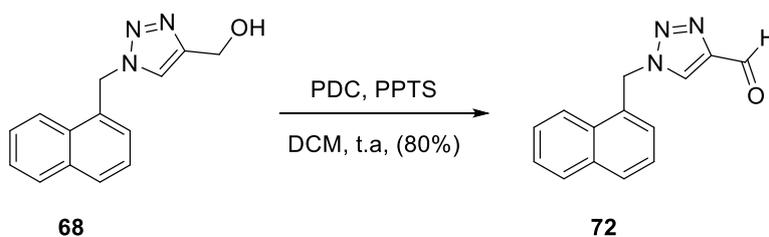
III.5.7.i. Síntesis de ácido (1-(1-naftalenilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)fosfónico (**71**)

Sobre una solución del fosfonato **70a** (0,059 g, 0,164 mmoles) en DCM seco (2 mL), se agregó el TMSBr (0,065 mL, 0,492 mmoles), y se dejó la solución bajo agitación toda la noche. Se eliminó el solvente a presión reducida, y se retomó con MeOH (2 mL). Al cabo de 2h, se volvió a eliminar el solvente a vacío, obteniéndose el ácido fosfónico **71** puro (0,042 g, 82%, sólido blanco, p.f: 150-152°C).

³¹P-RMN (121 MHz, CD₃OD) δ 21.60.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 8.41 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.95 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.55 (m, 3H), 6.26 (s, 2H), 5.52–5.31 (m, 2H + residual HDO), 3.37 (d, *J* = 20.6 Hz, 2H).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ 139.09 (d, *J* = 6.8 Hz), 135.38, 132.40, 131.60, 130.15, 130.08, 129.72, 128.44, 128.11 (d, *J* = 5.0 Hz), 127.51, 126.57, 123.81, 55.08, 24.87 (d, *J* = 138.2 Hz).

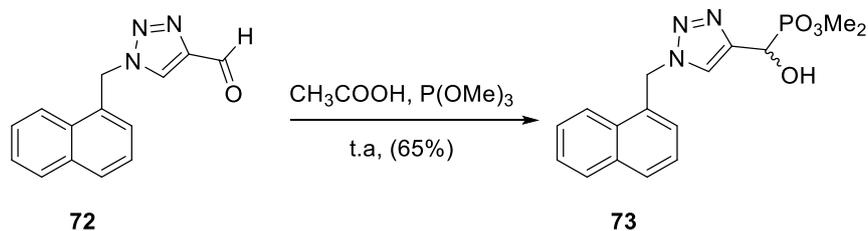
III.5.7.ii. Síntesis de (1-naftalenilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbaldehído (**72**)

Sobre una solución del alcohol **68** (1,15 g, 4,82 mmoles) en DCM seco (30 mL), se agregó PDC (2,27 g, 6 mmoles), una cantidad catalítica de PPTS, y se dejó la solución bajo agitación toda la noche. Posteriormente, se evaporó parcialmente el solvente, se retomó con una mezcla Hexano-AcOEt 1:1 (50 mL), y se filtró sobre celite en placa filtrante. Tras concentrar, se obtuvo el aldehído **72** puro (0,915 g, 80%, *R_f* = 0,24, AcOEt/Hexano 20%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 9.99 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.05 – 7.96 (m, 1H), 7.93 – 7.78 (m, 2H), 7.64 – 7.44 (m, 4H), 6.00 (s, 2H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 180.5, 146.2, 133.3, 132.1, 131.2, 128.3, 127.6, 127.5, 126.3, 125.9, 125.6, 124.5, 123.0, 50.6.

III.5.7.iii. Síntesis de (1-(1-naftalenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)hidroximetil fosfonato de dimetilo (**73**)



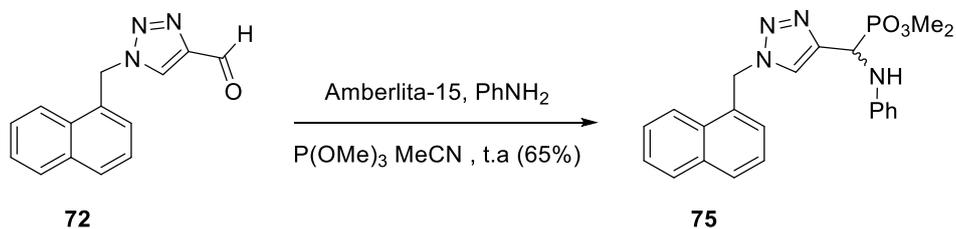
Sobre una suspensión del aldehído **72** (0,10 g, 0,42 mmoles) en ácido acético (3 mL) a t.a, se agregó trimetil fosfito (0,060 mL, 0,5 mmoles), formándose una solución homogénea. Se dejó reaccionar la mezcla toda la noche, tras lo cual se agregó NaHCO_3 (sat.) (10 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (MeOH/AcOEt 10%), obteniéndose el compuesto **73** (0,095 g, 65%, aceite amarillo, $R_f = 0,45$, MeOH/AcOEt 10%).

^{31}P -RMN (121 MHz, CDCl_3) δ 22.49.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.95 – 7.86 (m, 1H), 7.86 – 7.77 (m, 2H), 7.63 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.48 – 7.29 (m, 4H), 5.94 – 5.79 (m, 2H), 5.20 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H), 3.64 (d, $J = 10.5$ Hz, 3H), 3.50 (d, $J = 10.5$ Hz, 3H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 144.62 (d, $J = 1.9$ Hz), 133.85, 131.05, 129.92, 129.79, 128.90, 127.80, 127.14, 126.30, 125.37, 123.11 (d, $J = 4.1$ Hz), 122.82, 63.37 (p, $J = 167.8$ Hz), 53.91 (dd, $J = 13.7$, 7.0 Hz), 53.73 (d, $J = 7.1$ Hz), 52.30.

III.5.7.iv. Síntesis de (1-(1-naftalenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)(aminofenil)metil fosfonato de dimetilo (**75**)



Sobre una solución del aldehído **72** (0,080 g, 0,337 mmoles) y anilina (0,028 mL, 0,371 mmoles) en MeCN (1 mL) a t.a, se agregó trimetil fosfito (0,044 mL, 0,371 mmoles) y amberlita-15 (0,050 g), y se dejó bajo agitación durante 1h. Una vez finalizada la reacción (TLC), se separó el catalizador por filtración, se eliminó el solvente a presión reducida, se retomó con DCM (5 mL) y se agregó H_2O (5 mL). Finalmente se extrajo con DCM (3 x 5 mL), y las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo resultante se purificó por

cromatografía en columna (MeOH/AcOEt 10%), obteniéndose el compuesto **75** (0,092 g, 65%, aceite amarillo, $R_f = 0,66$, MeOH/AcOEt 10%).

^{31}P -RMN (121 MHz, CDCl_3) δ 23.44.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.82 (m, 3H), 7.50 – 7.32 (m, 4H), 7.23 (dd, $J = 7.1, 1.2$ Hz, 1H), 7.13 – 7.03 (m, 2H), 6.74 – 6.60 (m, 3H), 5.91 (d, $J = 14.9$ Hz, 1H), 5.76 (d, $J = 14.9$ Hz, 1H), 5.10 (d, $J = 22.0$ Hz, 1H), 4.82 (s ancho, 1H), 3.68 (d, $J = 10.6$ Hz, 3H), 3.45 (d, $J = 10.6$ Hz, 3H), 2.00 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 145.87 (d, $J = 12.0$ Hz), 143.65, 133.81, 130.93, 129.91, 129.61, 128.86, 127.62, 127.04, 126.25, 125.28, 122.73 (d, $J = 4.4$ Hz), 122.64, 118.87, 114.01, 54.04 (d, $J = 6.9$ Hz), 53.72 (d, $J = 7.3$ Hz), 52.39, 48.49 (d, $J = 159.5$ Hz).

III.5.8. Anexo: espectros de RMN de compuestos seleccionados

Espectros de RMN del compuesto **68**

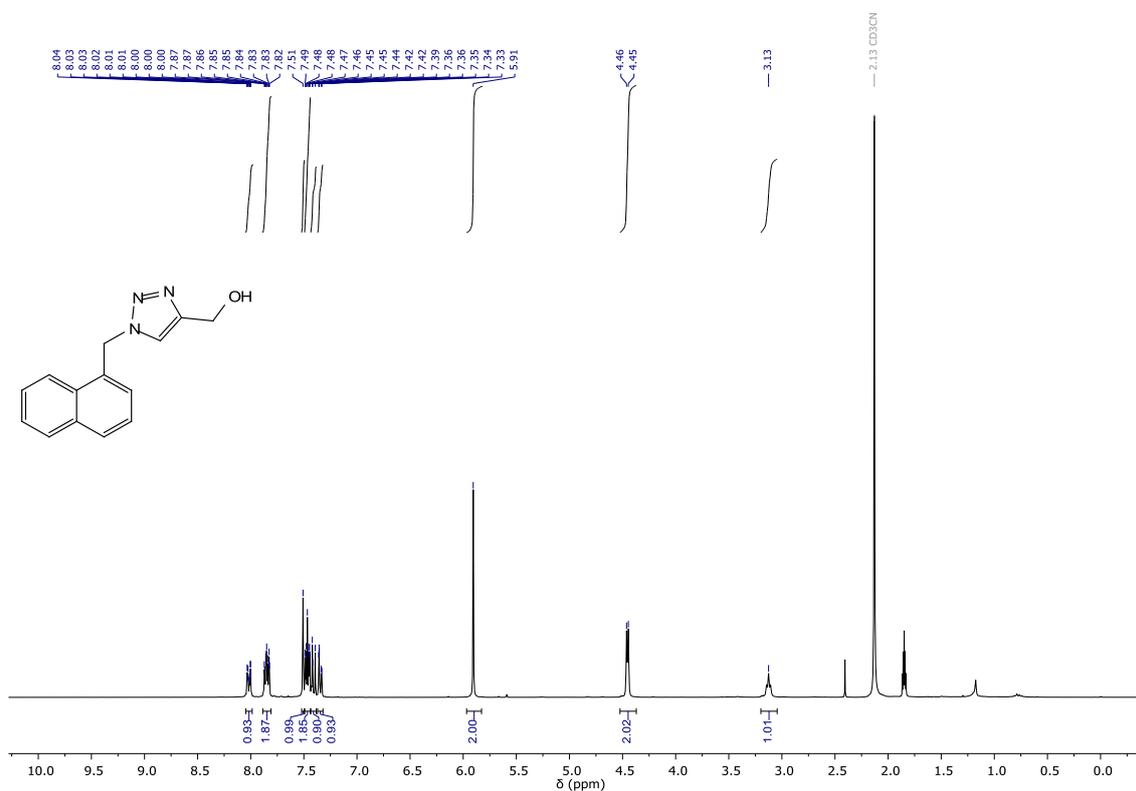


Figura III.38. Espectro de ^1H -RMN (CD_3CN , 300 MHz) de **68**.

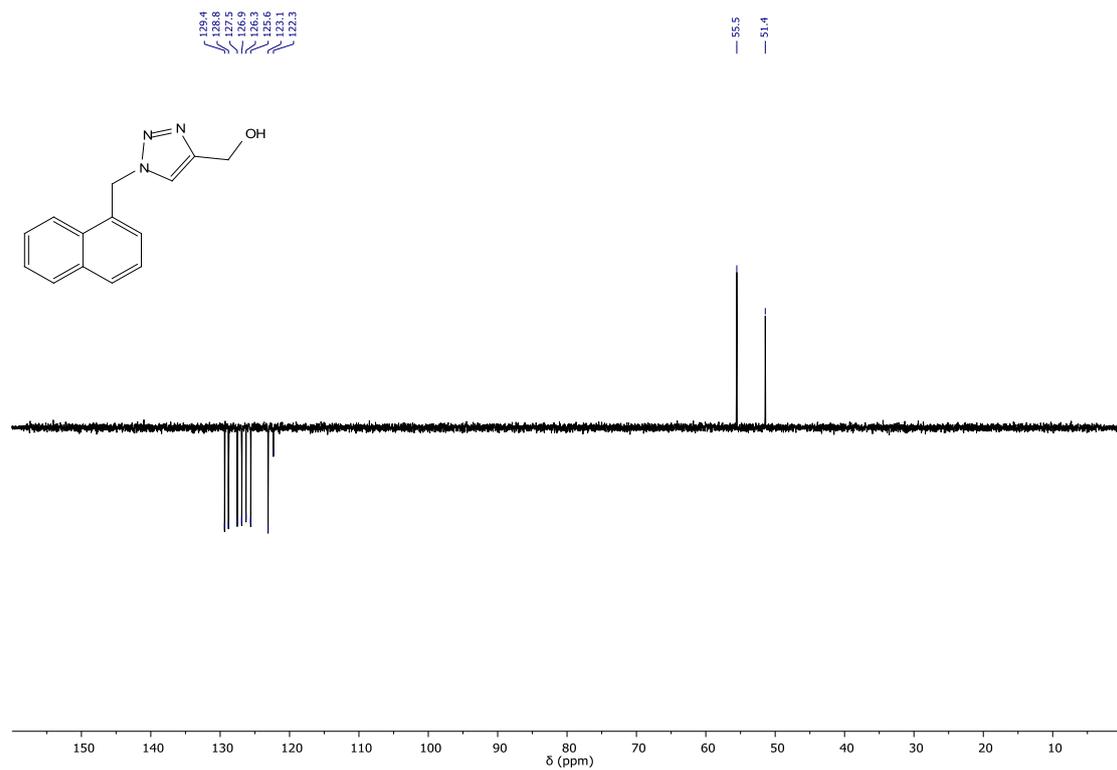


Figura III.39. Espectro de DEPT-135 (CD₃CN, 75 MHz) de 68.

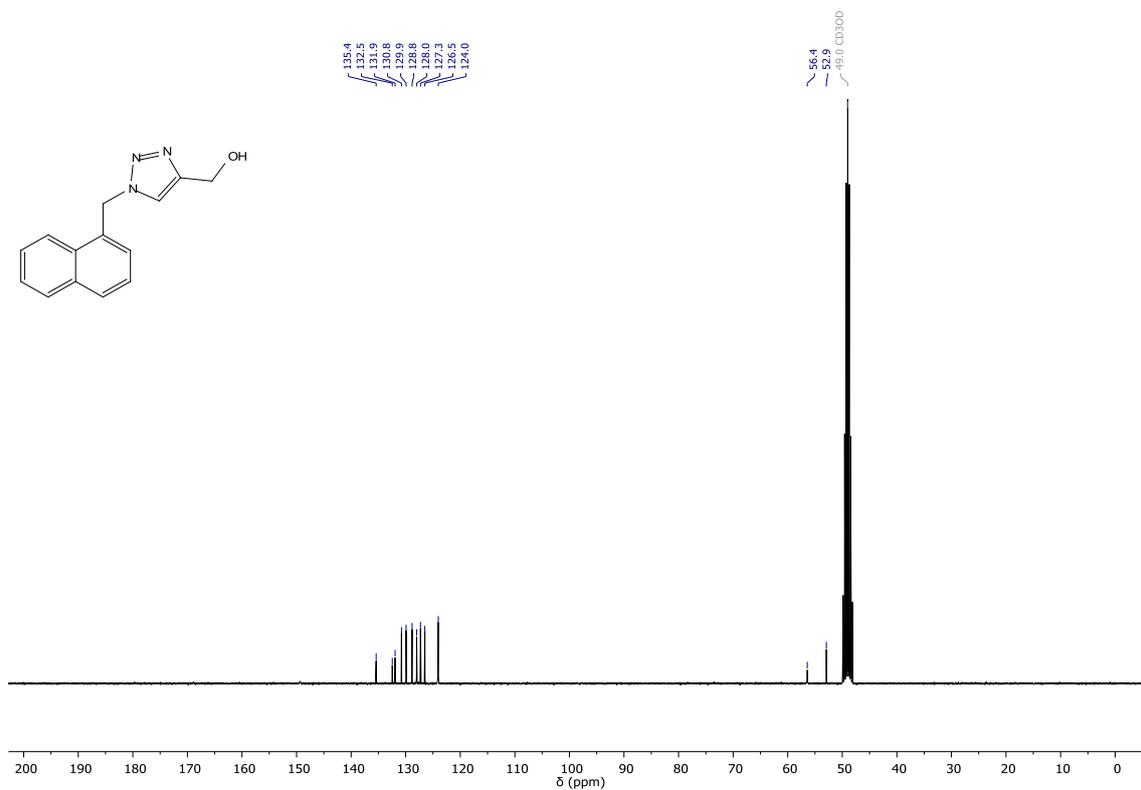


Figura III.40. Espectro de ¹³C-RMN (CD₃OD, 75 MHz) de 68.

Espectros RMN del compuesto 69

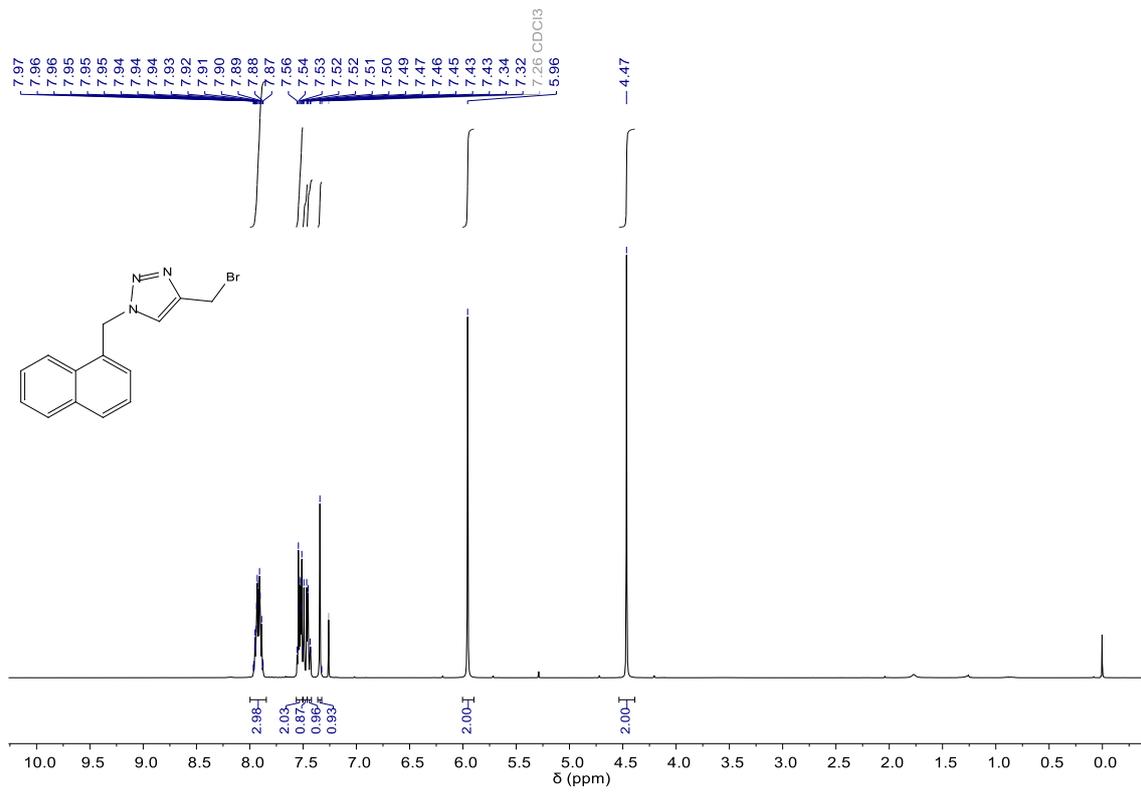


Figura III.41. Espectro de ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) de 69.

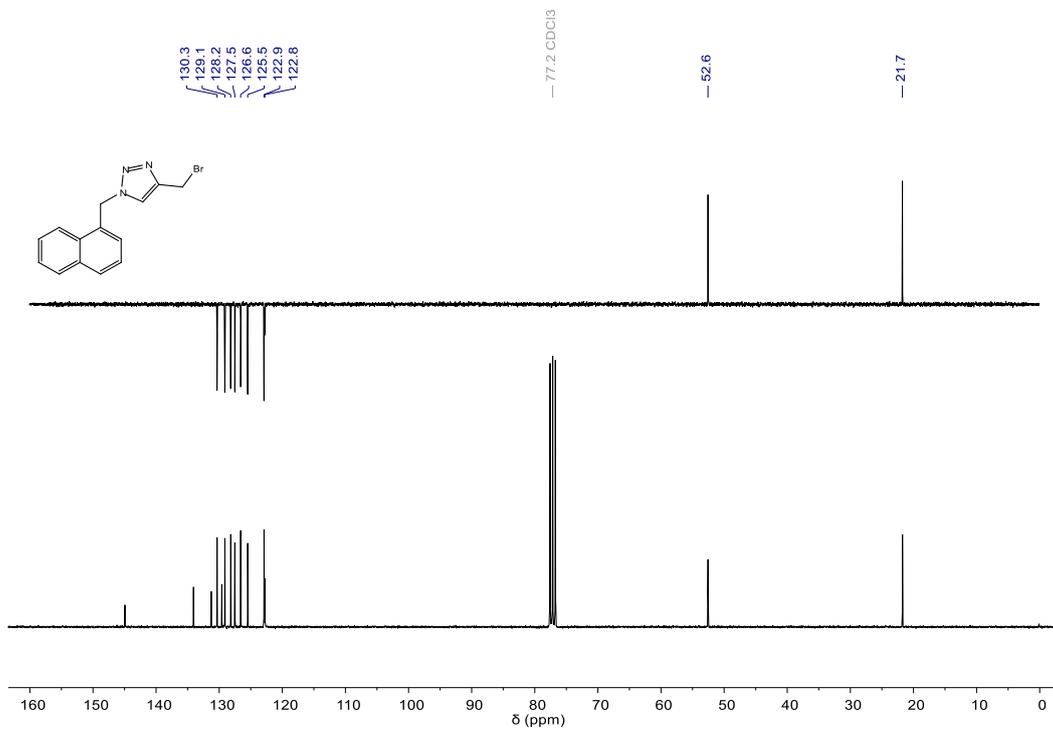


Figura III.42. Espectros DEPT-135 y ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) de 69.

Espectros de RMN del compuesto **70a**

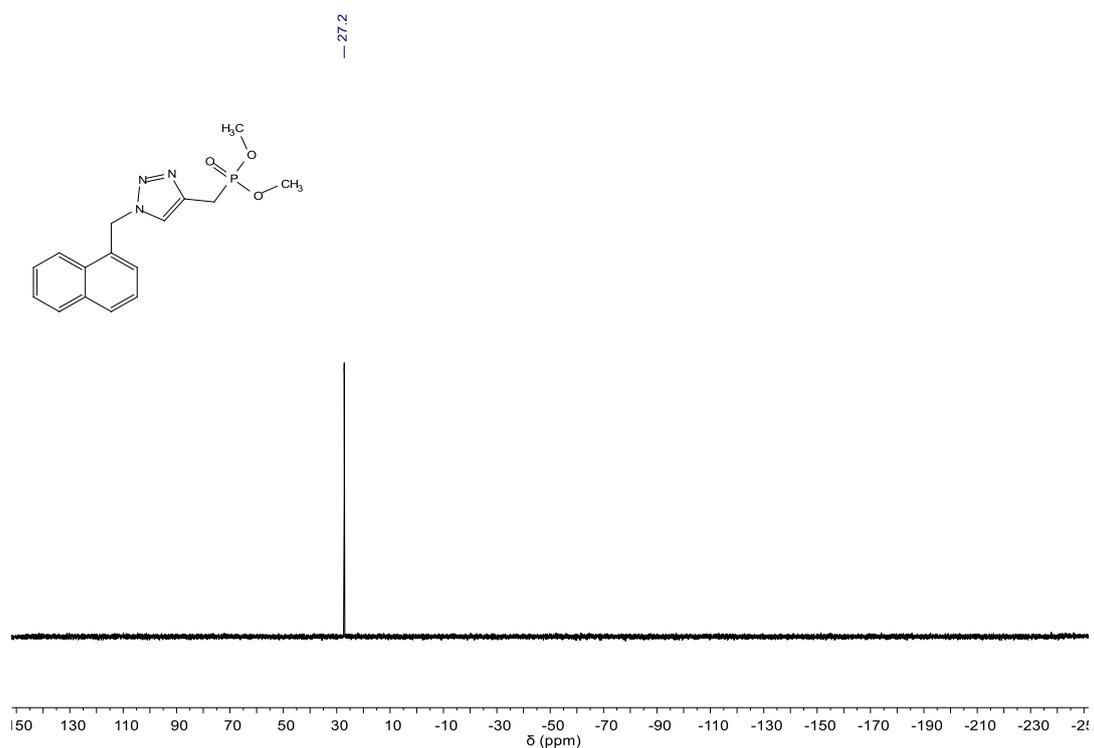


Figura III.43. Espectro de ^{31}P -RMN (CDCl₃, 121 MHz) de **70a**.

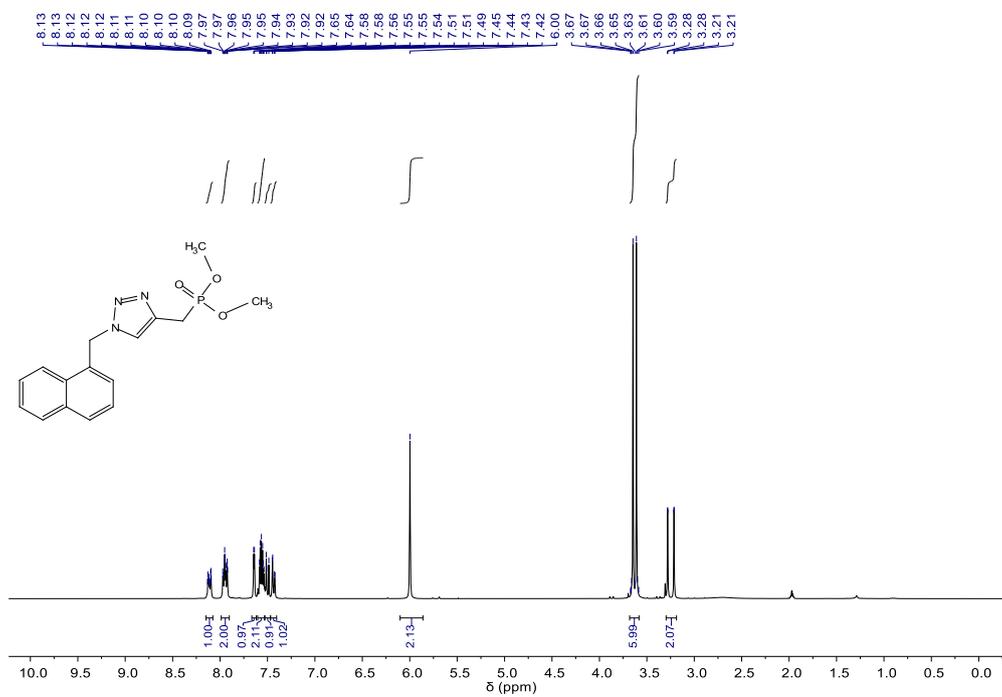


Figura III.44. Espectro de ^1H -RMN (CDCl₃, 300 MHz) de **70a**.

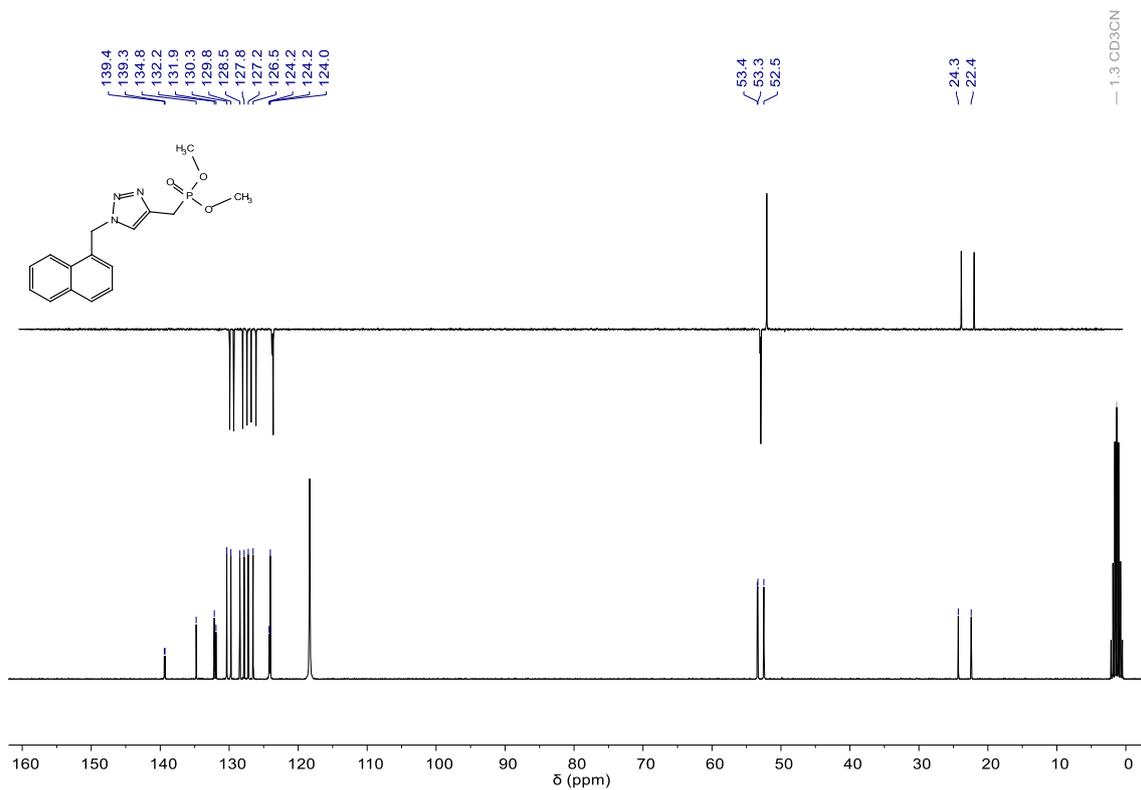


Figura III.45. Espectros DEPT-135 y ¹³C-RMN (CD₃CN, 75 MHz) de 70a.

Espectros RMN del compuesto 70b

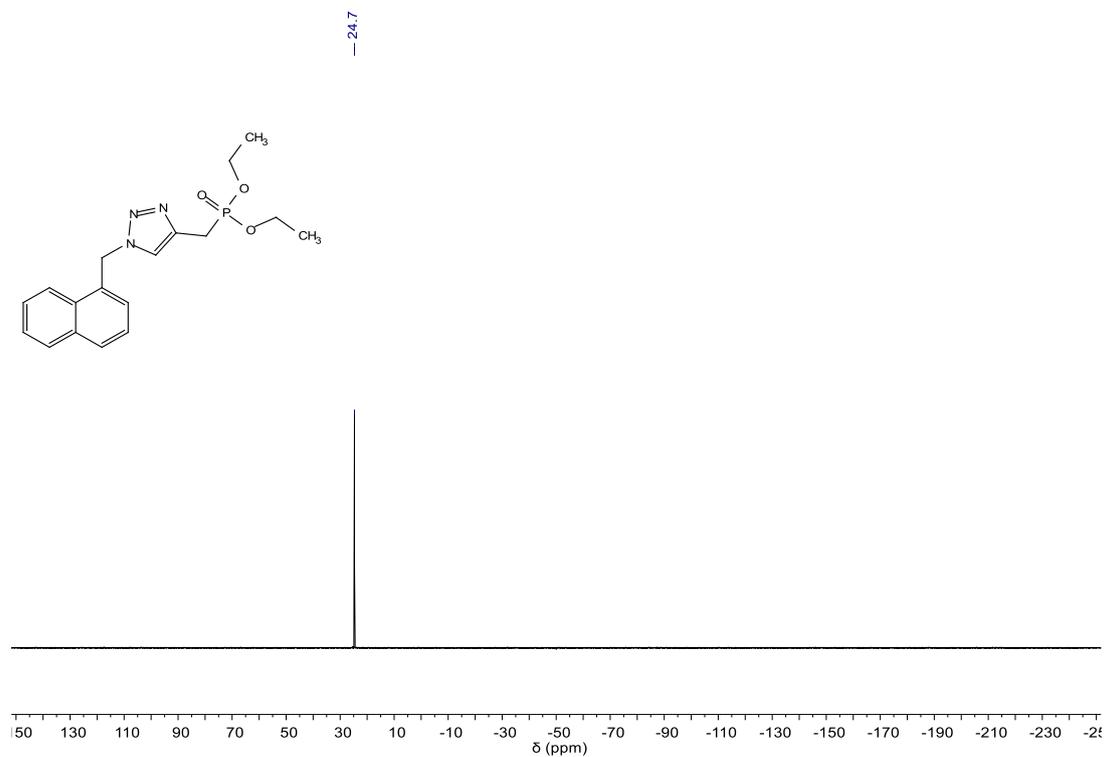


Figura III.46. Espectro de ³¹P-RMN (CDCl₃, 121 MHz) de 70b.

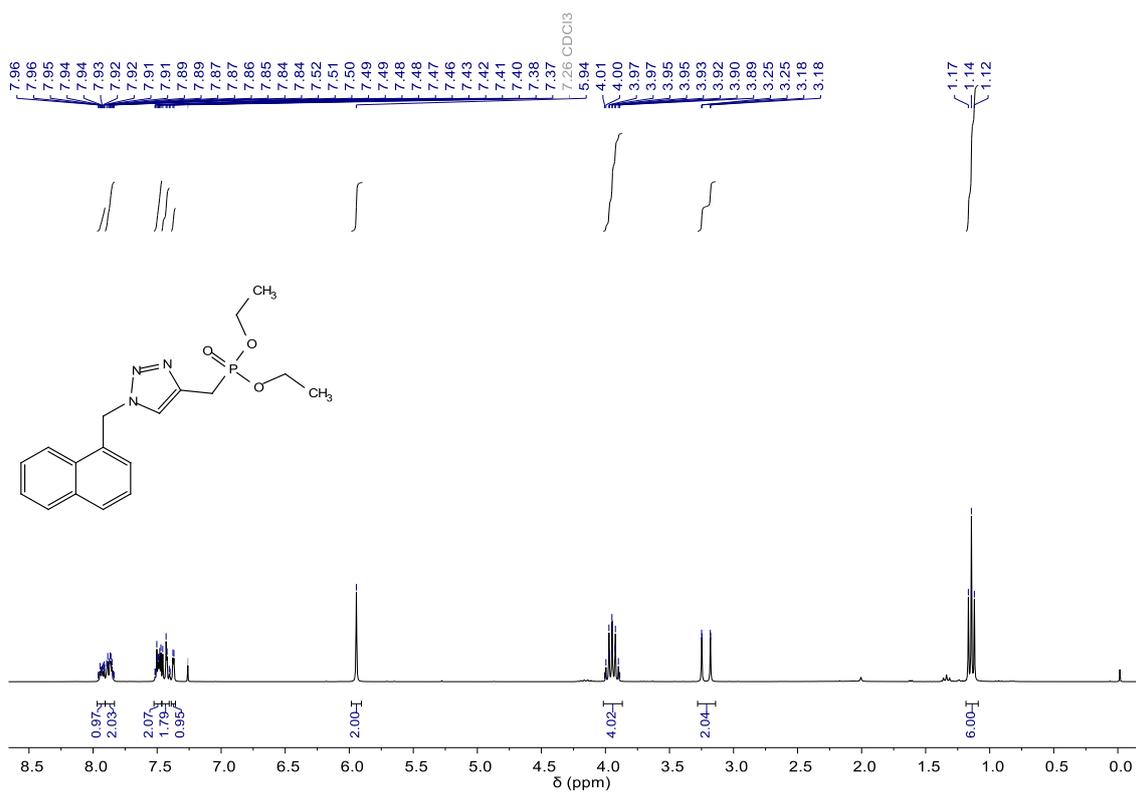


Figura III.47. Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) de **70b**.

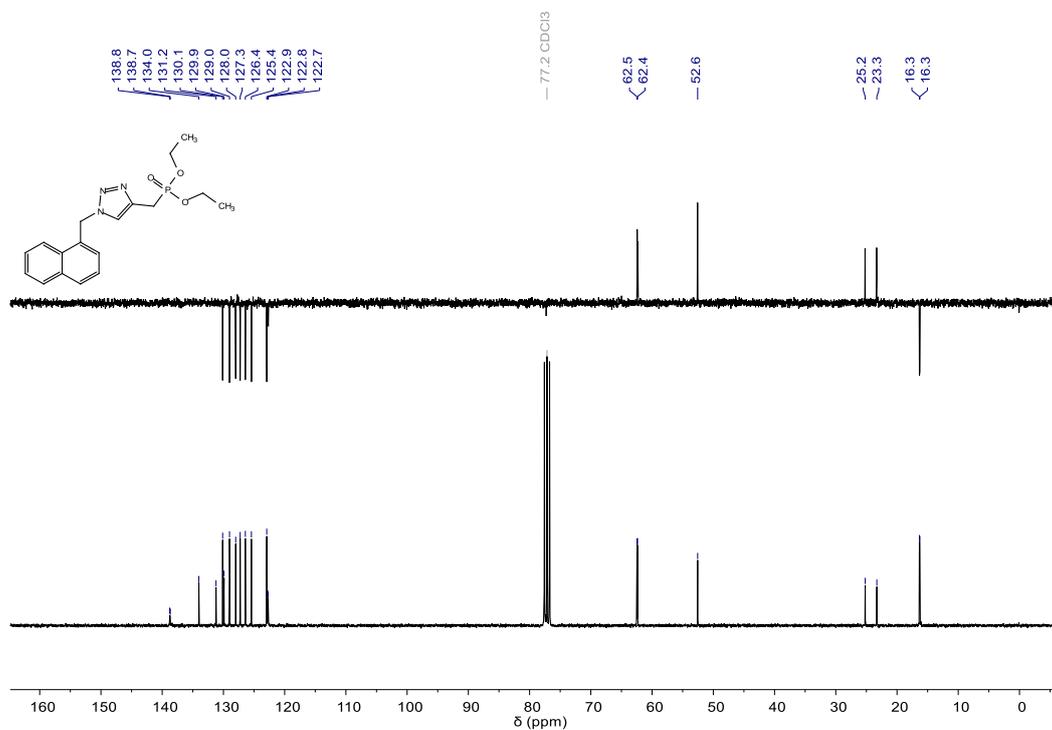


Figura III.48. Espectros DEPT-135 y ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) de **70b**.

Espectros RMN del compuesto **71**

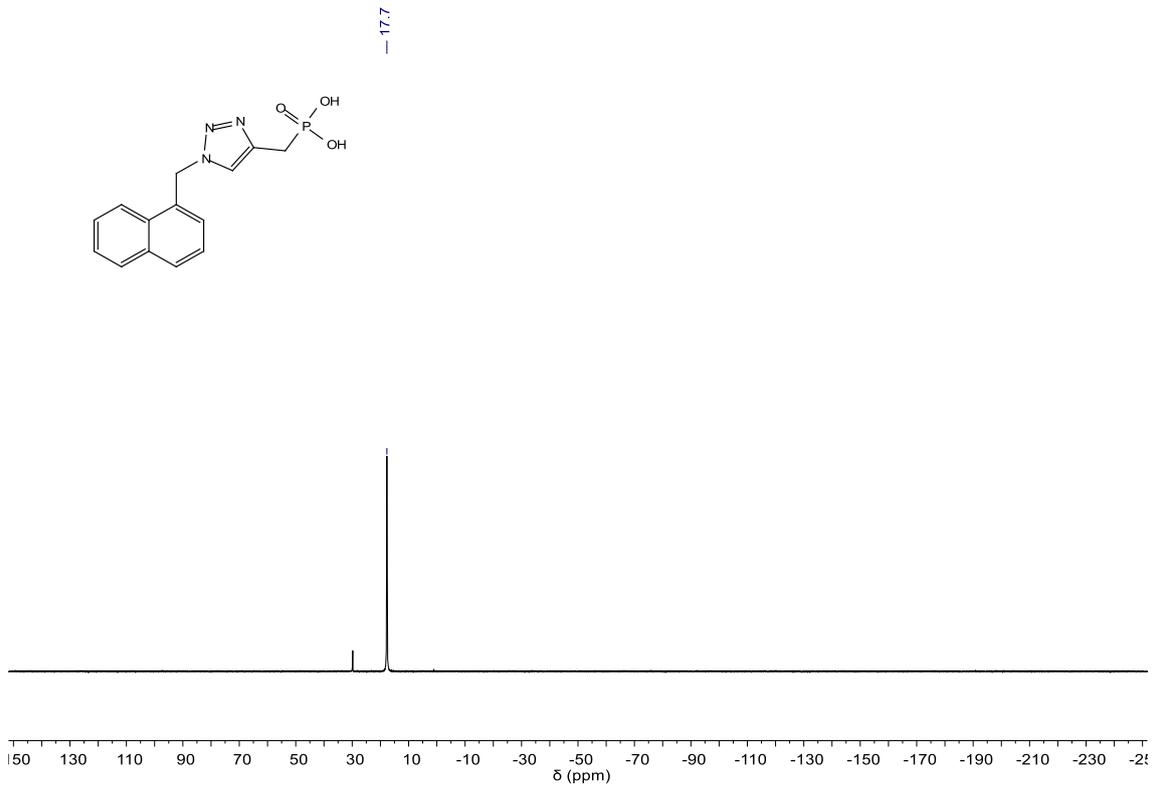


Figura III.49. Espectro de ^{31}P -RMN (CD₃OD, 121 MHz) de **71**.

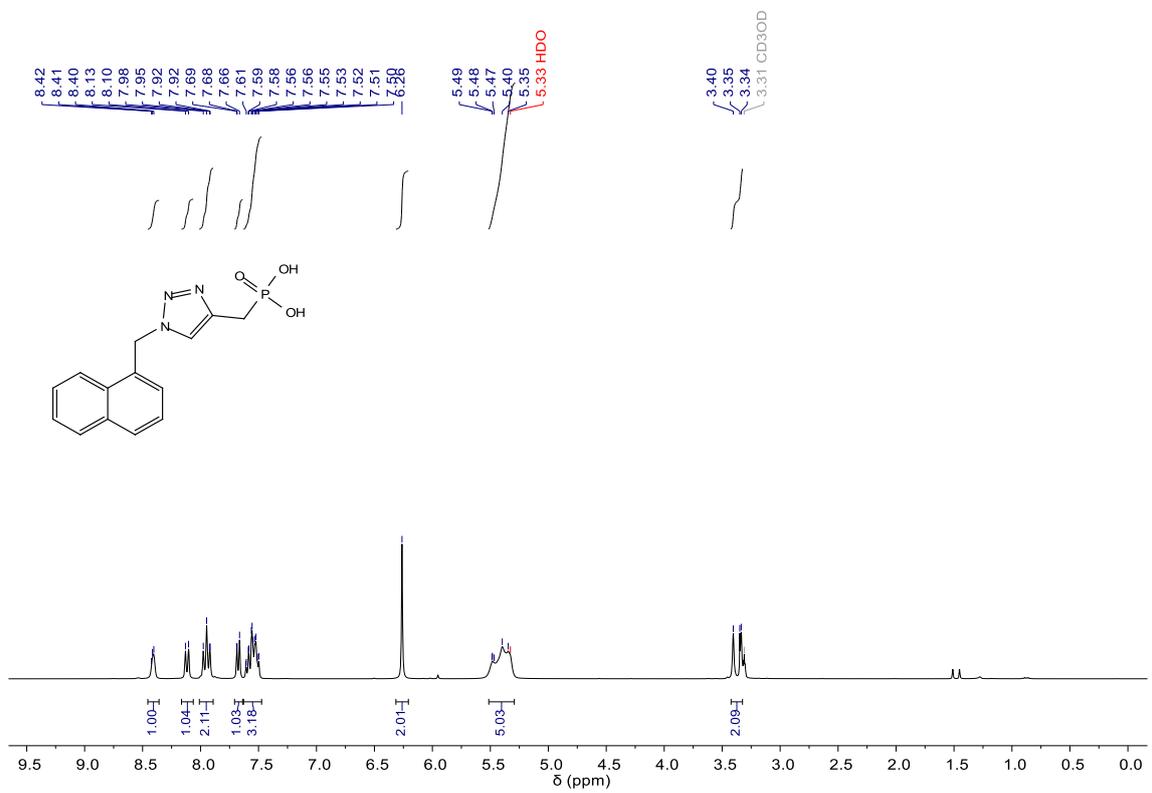


Figura III.50. Espectro de ^1H -RMN (CD₃OD, 300 MHz) de **71**.

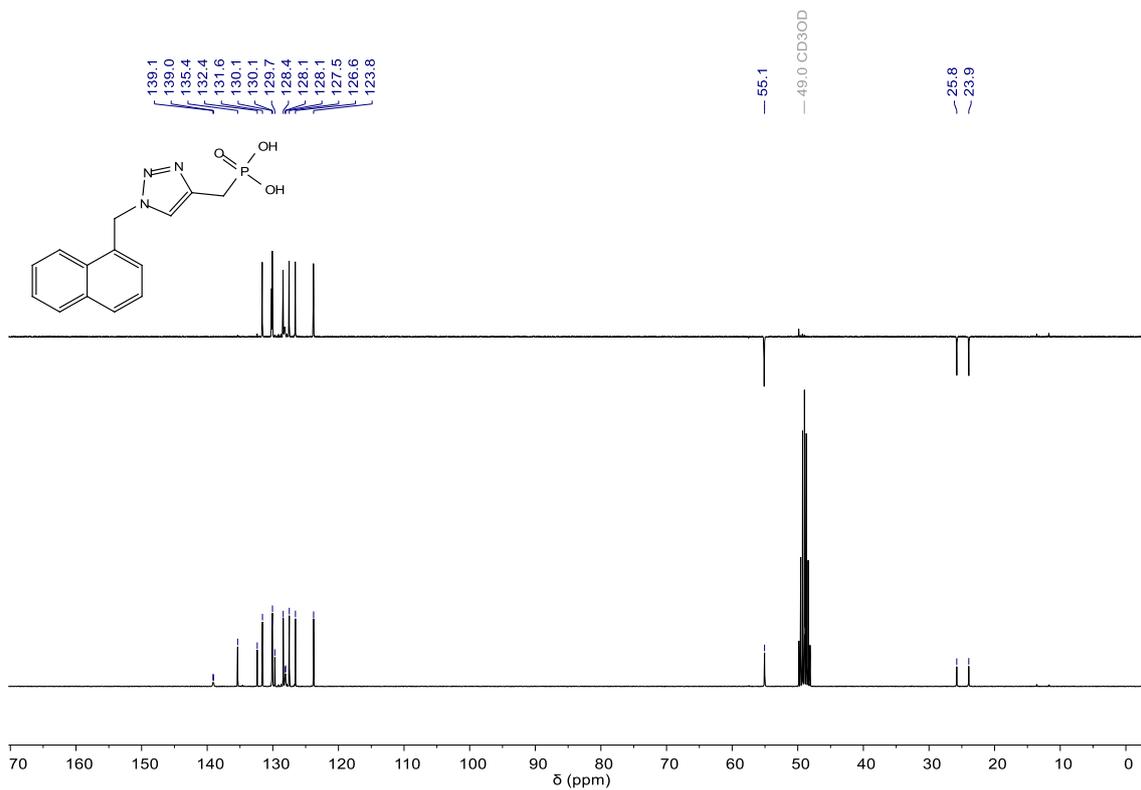


Figura III.15. Espectros DEPT-135 y ^{13}C -RMN (CD_3OD , 75 MHz) de **71**.

Espectros RMN del compuesto **102**

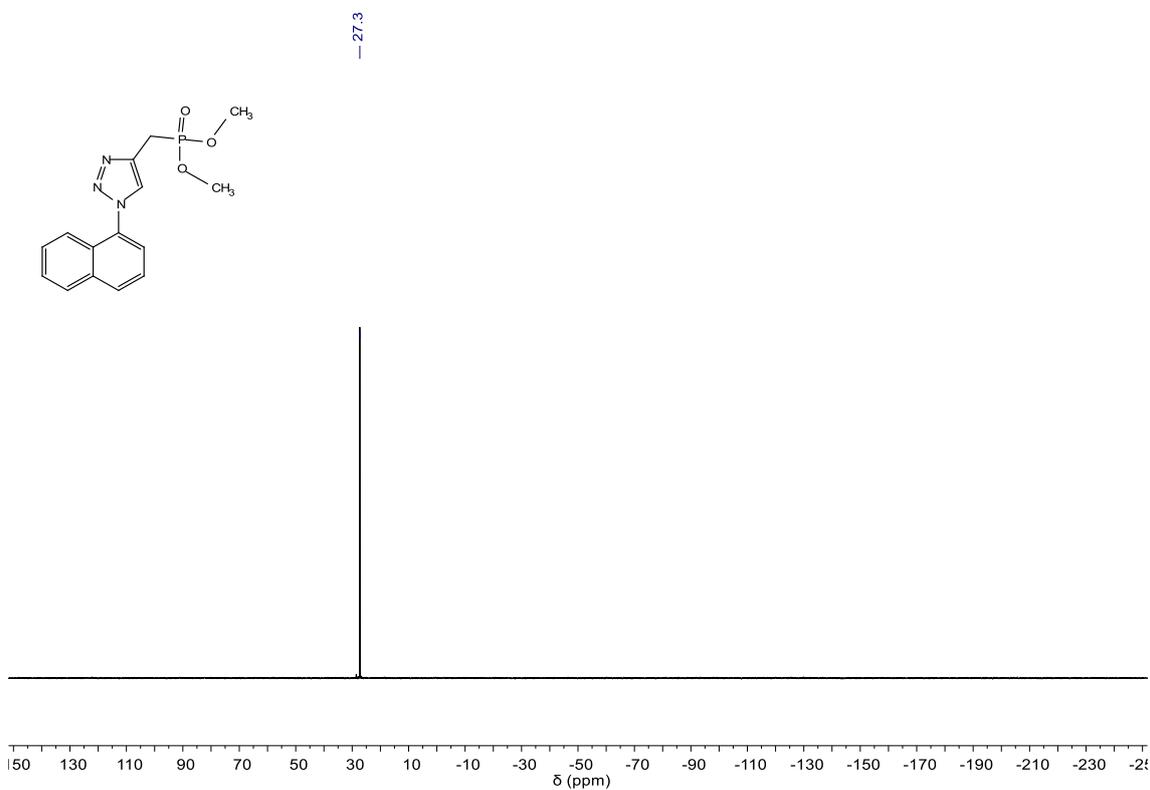


Figura III.51. Espectro de ^{31}P -RMN (CDCl_3 , 121 MHz) de **102**.

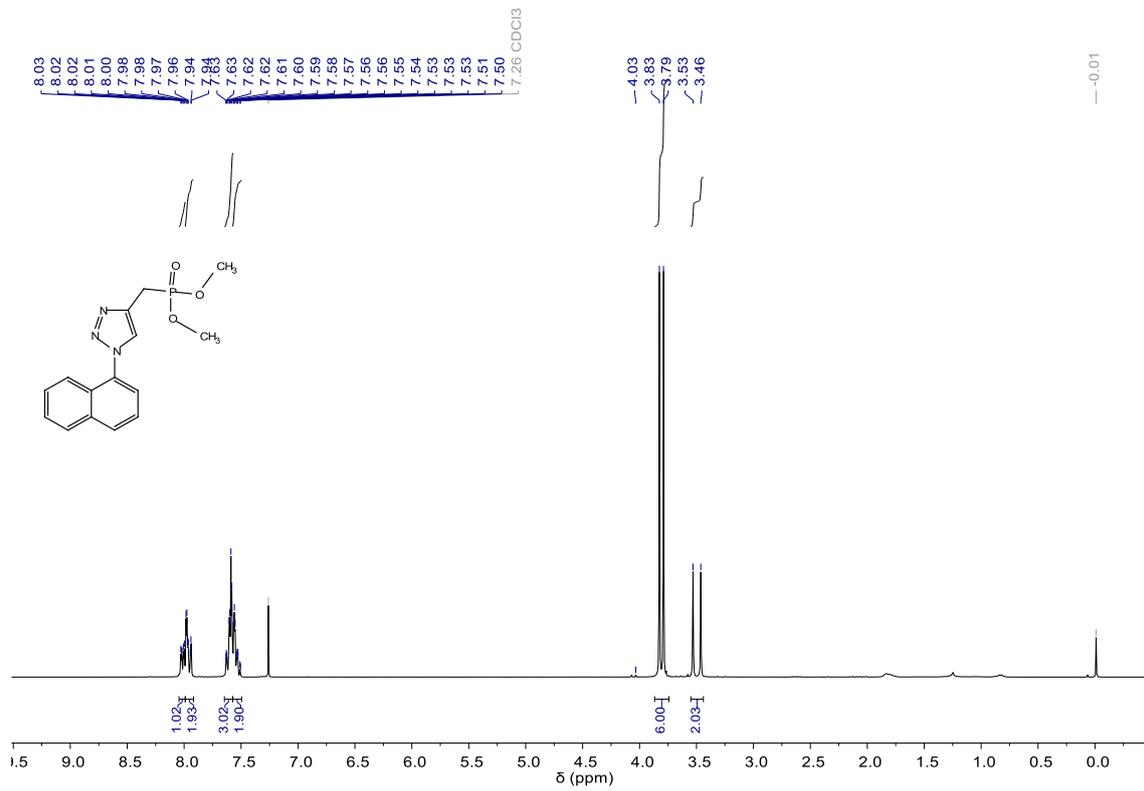


Figura III.17. Espectro de ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) de **102**.

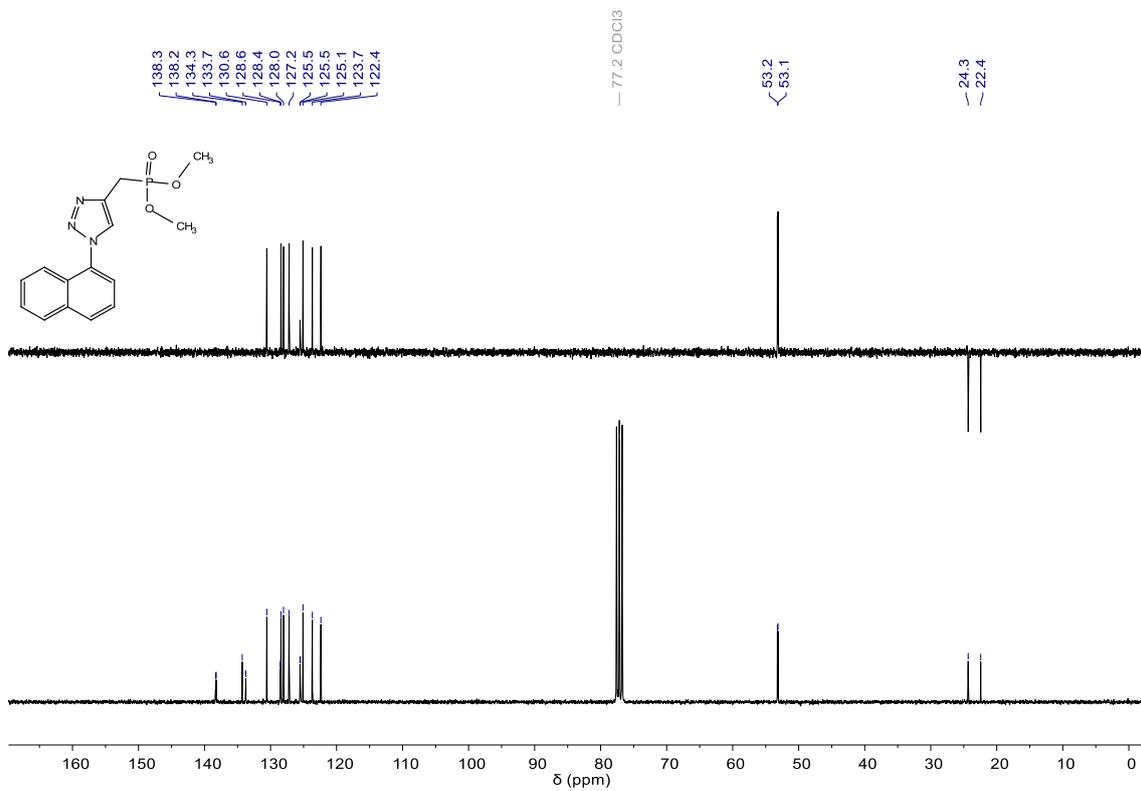


Figura III.52. Espectros DEPT-135 y ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) de **102**.

Espectros RMN del compuesto **106**

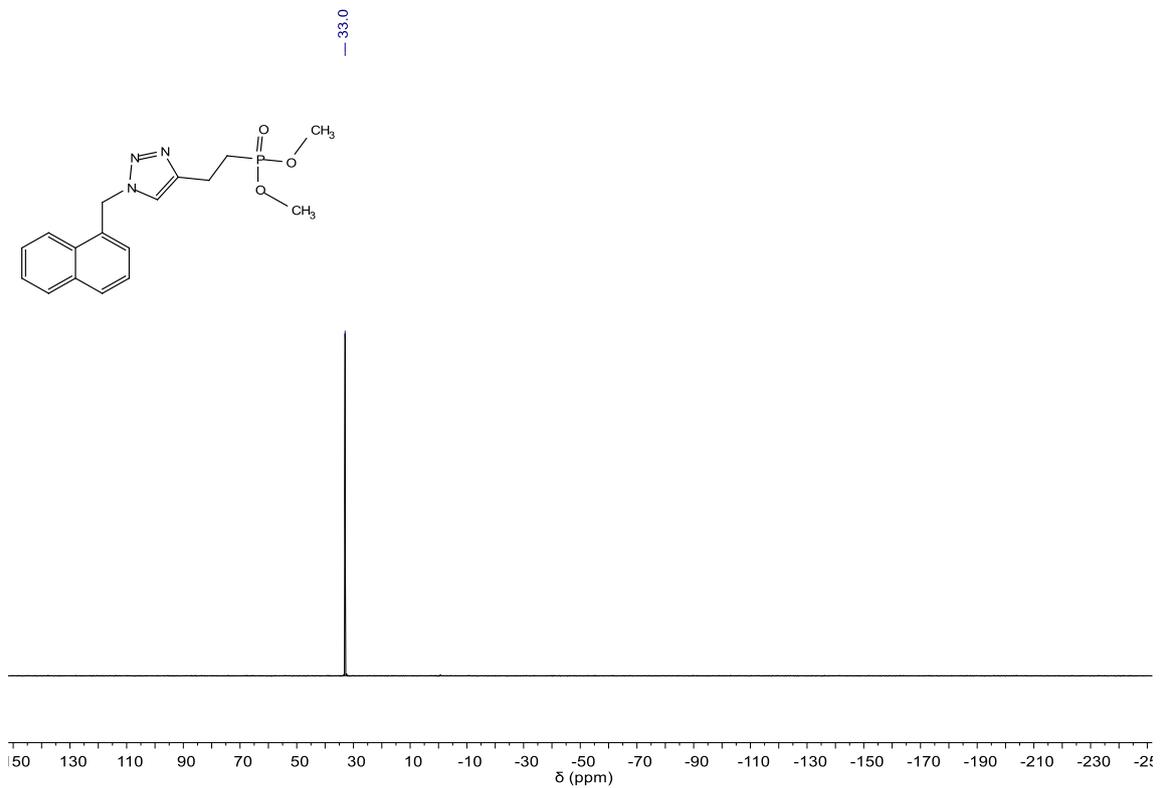


Figura III.53. Espectro de ^{31}P -RMN (CDCl₃, 121 MHz) de **106**.

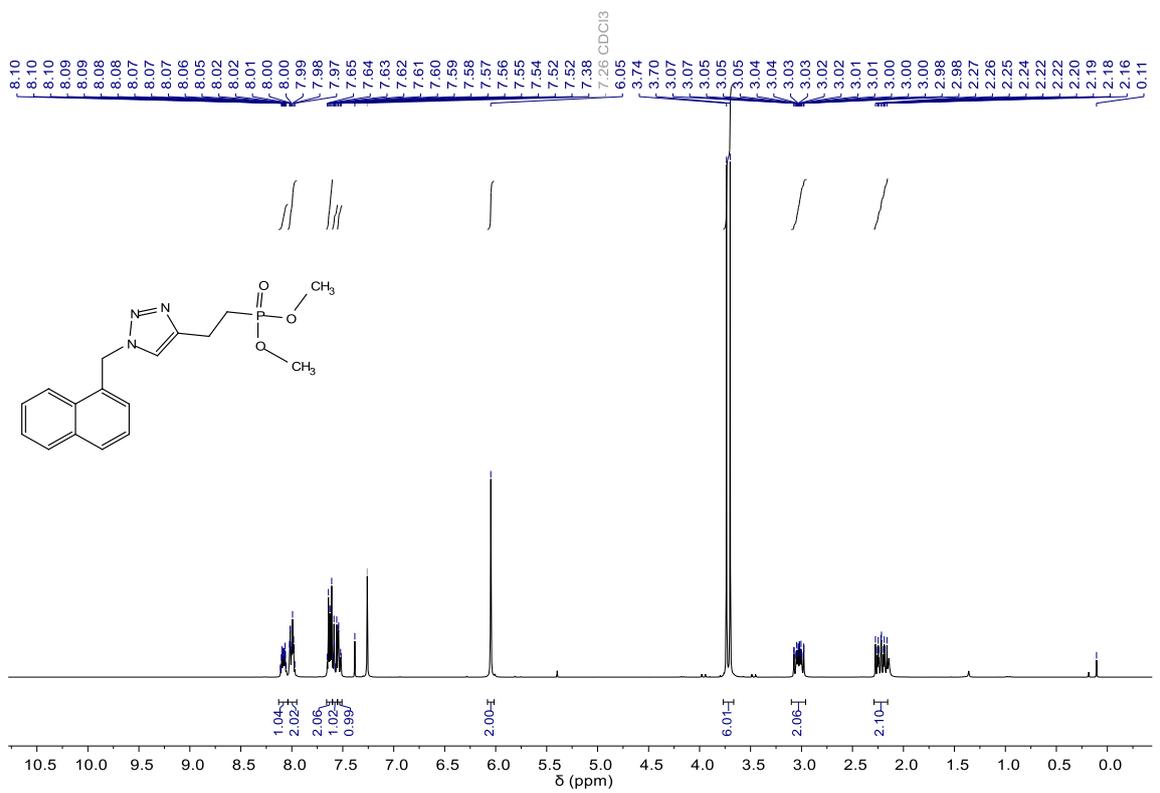


Figura III.54. Espectro de ^1H -RMN (CDCl₃, 300 MHz) de **106**.

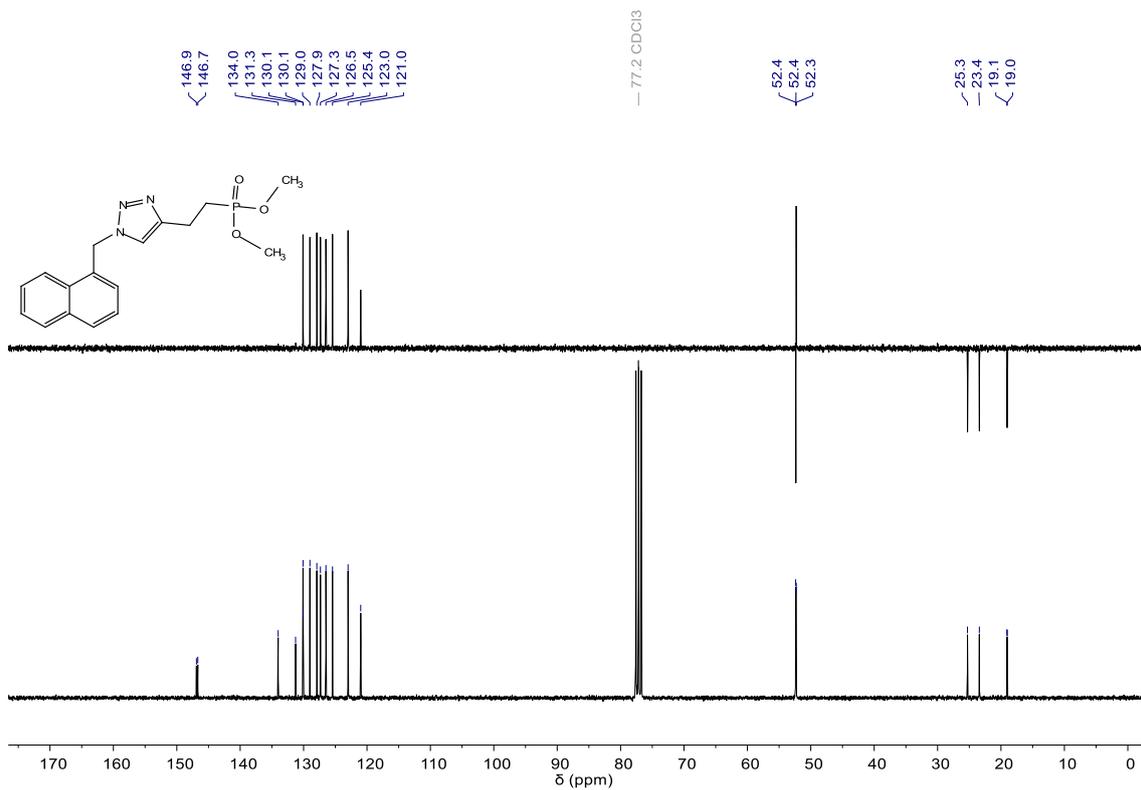


Figura III.55. Espectros DEPT-135 y ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) de **106**.

Espectros RMN del compuesto **88**

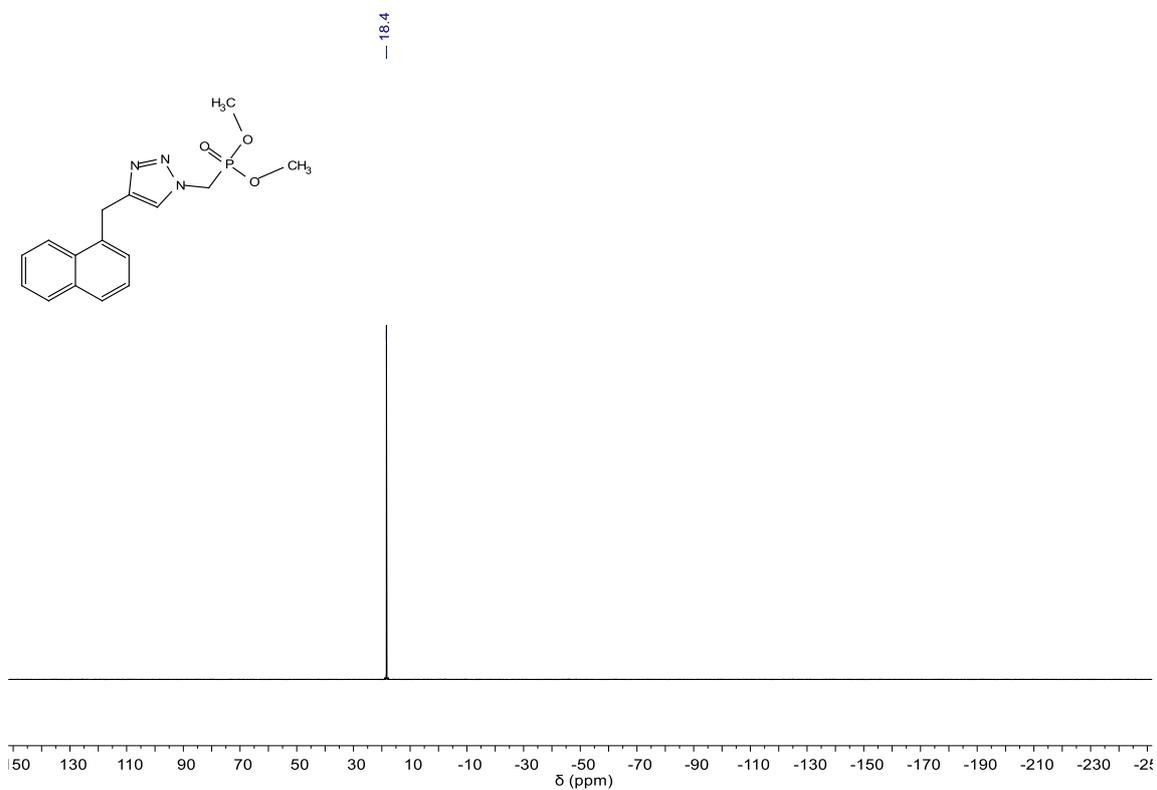


Figura III.56. Espectro de ^{31}P -RMN (CDCl_3 , 121 MHz) de **88**.

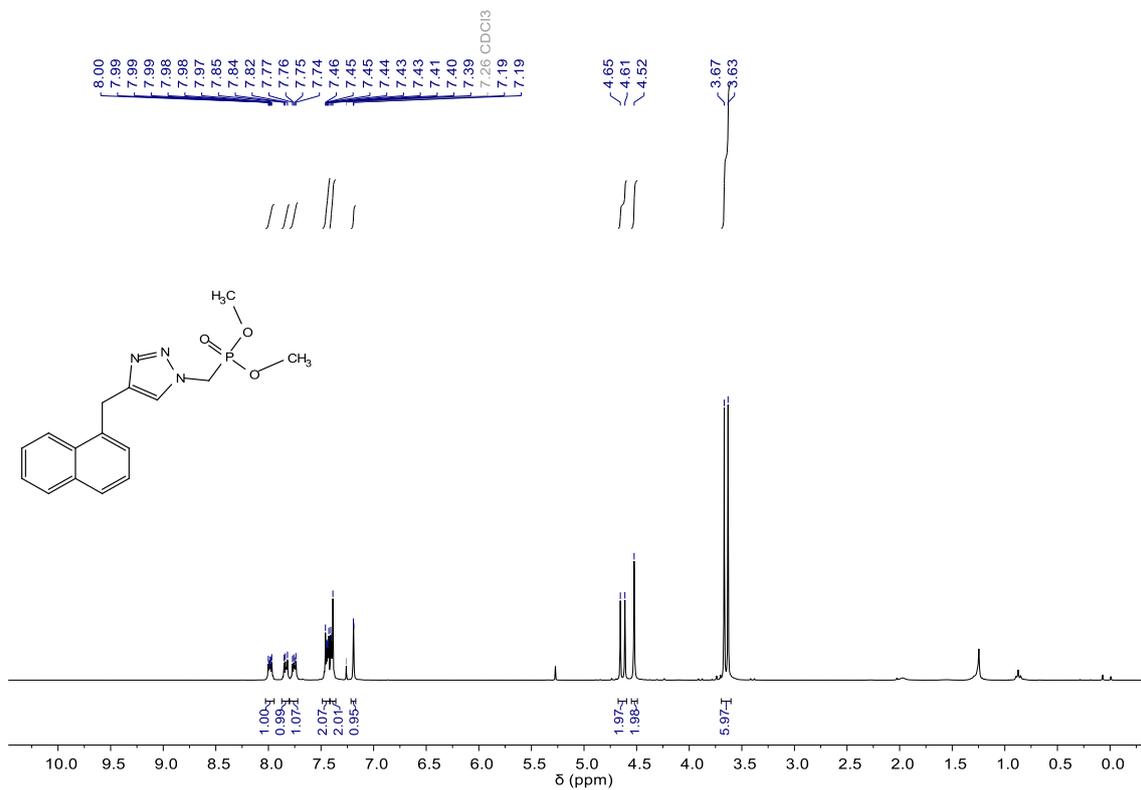


Figura III.57. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (CDCl₃, 300 MHz) de **88**.

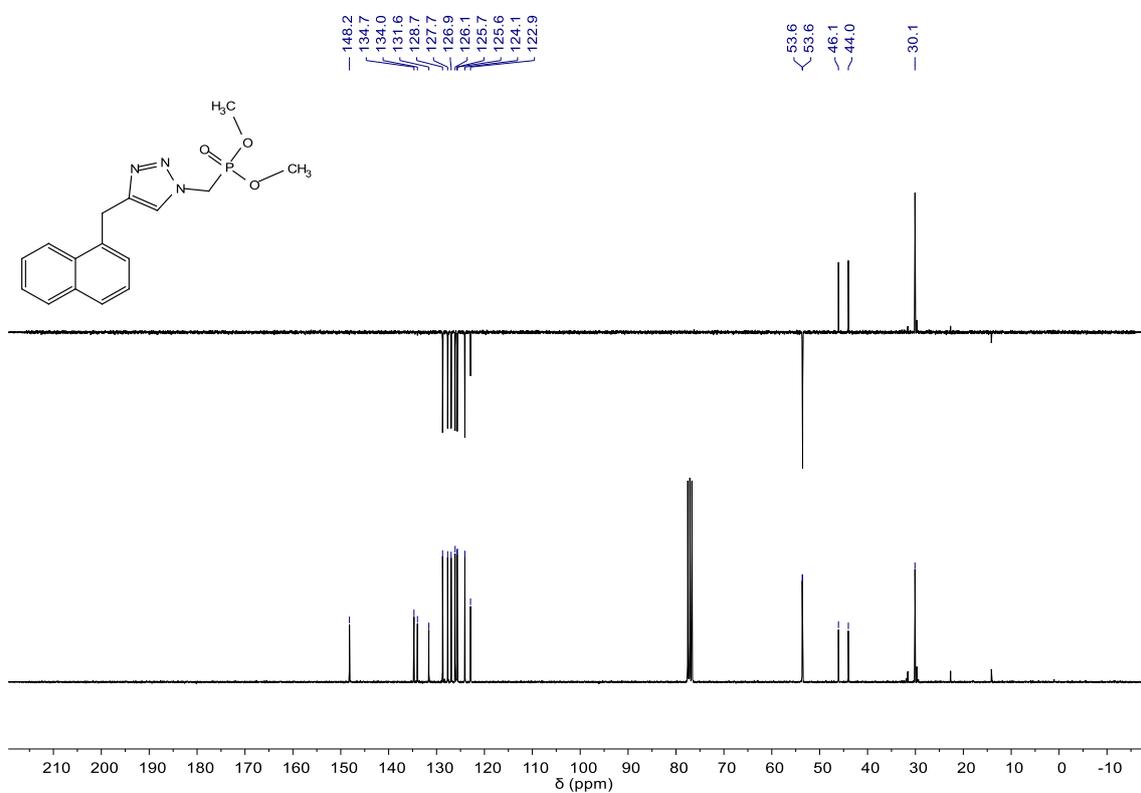


Figura III.58. Espectros DEPT-135 y $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl₃, 75 MHz) de **88**.

Espectros RMN del compuesto **119a**

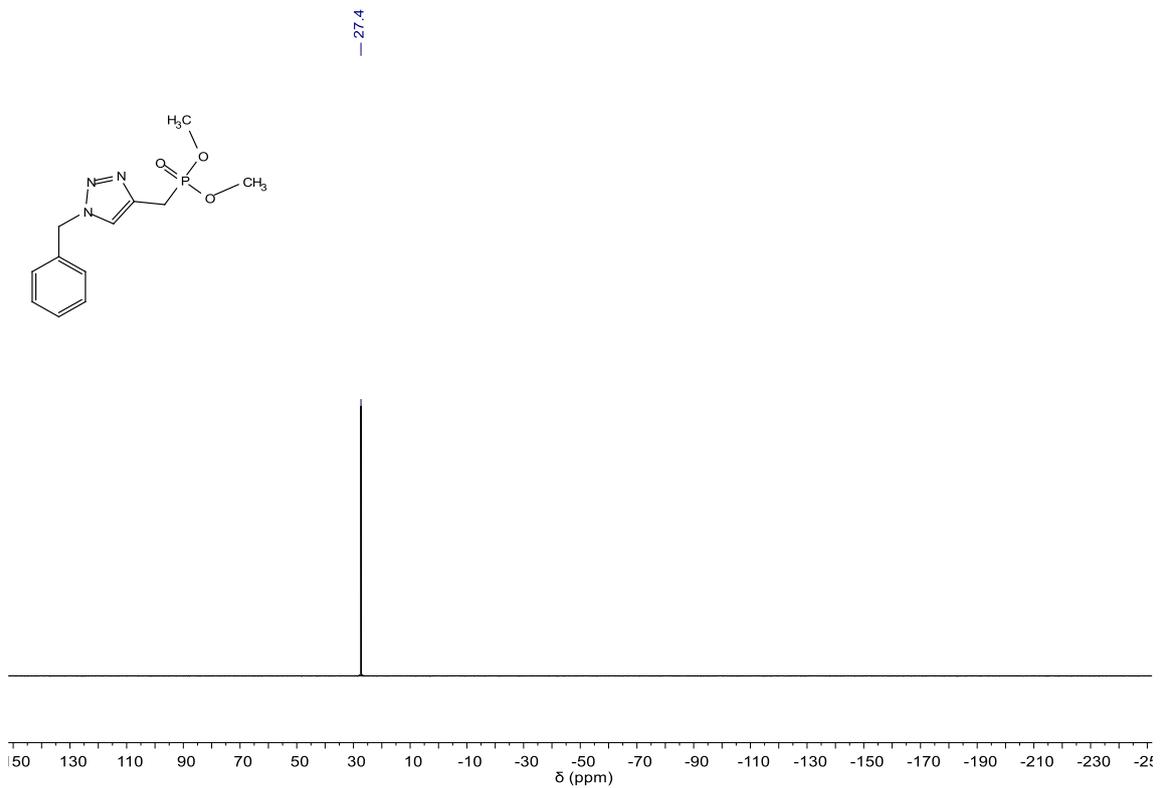


Figura III.59. Espectro de ^{31}P -RMN (CDCl₃, 121 MHz) de **119a**.

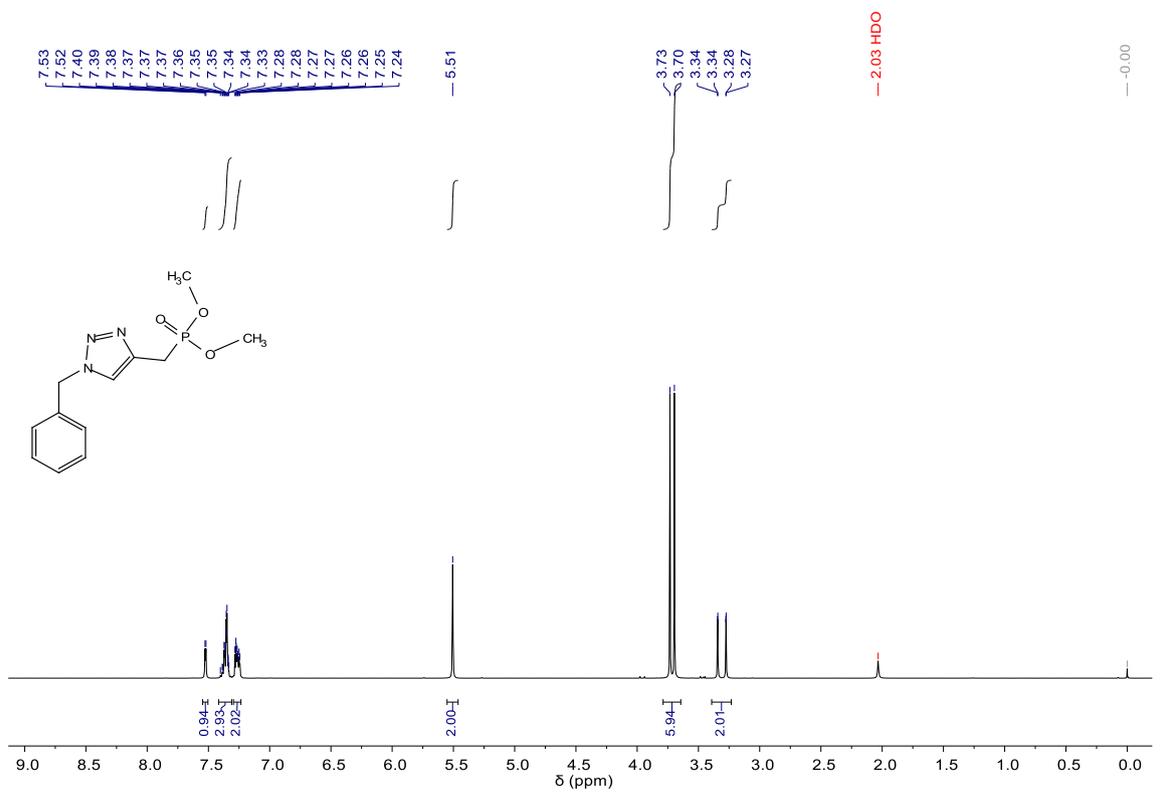


Figura III.60. Espectro de ^1H -RMN (CDCl₃, 300 MHz) de **119a**.

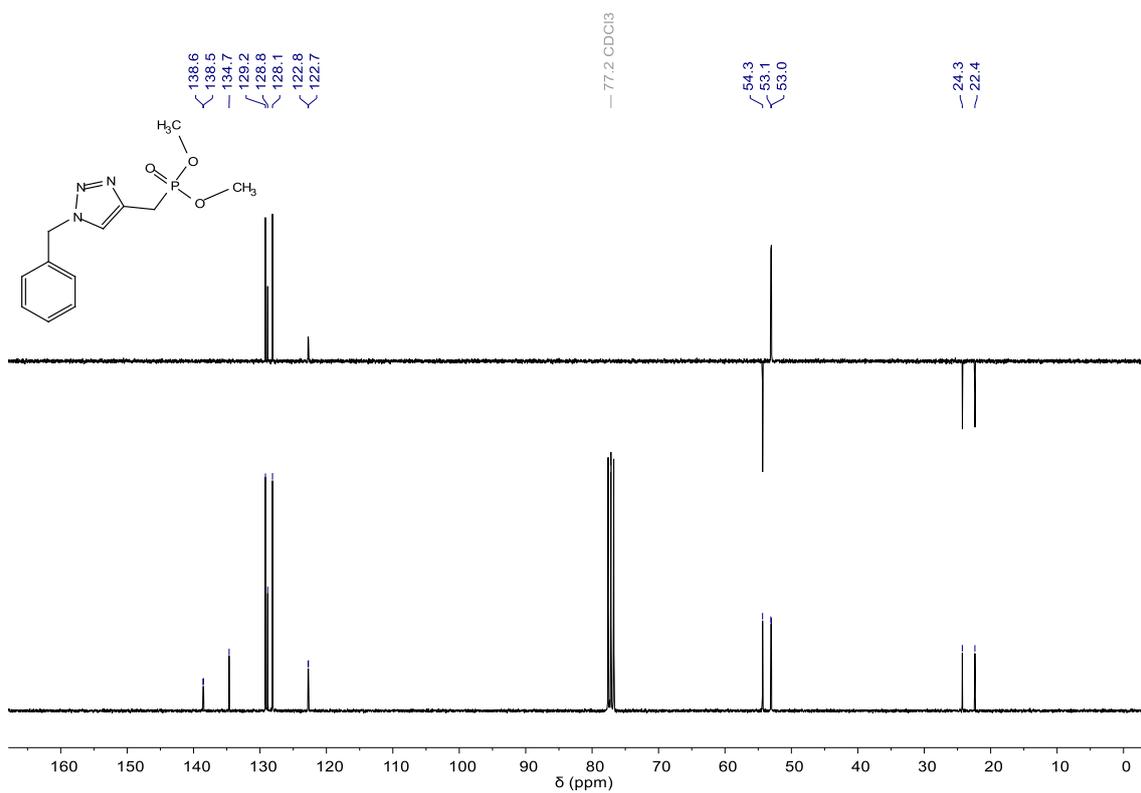


Figura III.61. Espectros DEPT-135 y ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) de **119a**.



CAPÍTULO II

SÍNTESIS DE DERIVADOS TRIAZOL- INDOL COMO INHIBIDORES DUALES DE MONOAMINO OXIDASA (MAO) Y DE LA INTERACCIÓN KEAP1-NRF2



IV. Capítulo II: Síntesis de derivados triazol-indol como inhibidores duales de monoamino oxidasa (MAO) y de la interacción KEAP1-NRF2.

IV.1. Introducción

Se denominan aminas biógenas a un tipo de neurotransmisores que se caracterizan por contener al grupo amino (**Figura IV.1**). Las mismas comprenden catecolaminas (dopamina, adrenalina, noradrenalina) e indoles (5-hidroxitriptamina, 5-HT, también llamada serotonina). La homeóstasis de las mismas en el cerebro está regulada por la oxidación llevada a cabo por enzimas denominadas monoaminooxidasas (MAOs).¹⁸²

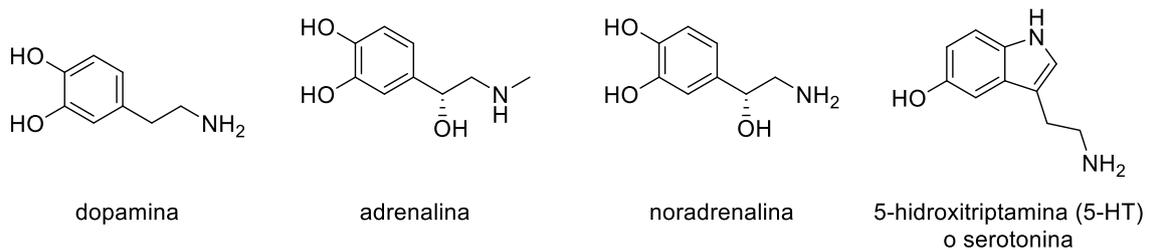


Figura IV.1. Ejemplos de neurotransmisores conteniendo grupos amino.

La rápida degradación de estas aminas en el cerebro resulta esencial para el funcionamiento correcto de la transmisión sináptica. La modulación de los estados de ánimo y emociones, el control de funciones motrices, de percepción y cognitivas, se realiza a través de mecanismos de señalización monoaminérgica.¹⁸³ Además, las MAOs son responsables del metabolismo de la 4-fenil-1-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), una neurotoxina presente en la enfermedad de Parkinson.¹⁸⁴

Las MAOs cumplen con este rol protector oxidando aminas en sangre, o impidiendo su circulación en el intestino, hígado, pulmones y placenta. Además, de forma intraneuronal protegen a las neuronas de aminas exógenas.¹⁸⁵ Si bien los aldehídos obtenidos a través de la oxidación de 5-HT o noradrenalina participan en la regulación del sueño, los subproductos NH_3 y H_2O_2 (**Figura IV.2**, p.127) resultan tóxicos a concentraciones elevadas.¹⁸⁶

Por otra parte, pacientes con EP presentan niveles reducidos de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), por lo tanto, la concentración de aldehídos provenientes de la oxidación de neurotransmisores aumenta. Esto genera que haya una acumulación de los mismos en el

¹⁸² K.J. Blackburn, P.C. French, R.J. Merrills. *Life Sci.* **1967**, *6*, 1653-1663.

¹⁸³ M. Bortolato, K. Chen, J.C. Shih. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1527-1533.

¹⁸⁴ (a) F. Chimenti, S. Carradori, D. Secci, A. Bolasco, B. Bizzarri, P. Chimenti, A. Granese, M. Yanez, F. Orallo. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 800-804. (b) R.M. Geha, K. Chen, J. Wouters, F. Ooms, J.C. Shih. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 17209-17216.

¹⁸⁵ M.B. Youdim, D. Edmondson, K.F. Tipton. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 295-309.

¹⁸⁶ L. Yang, K. Omori, J. Suzukawa, C. Inagaki. *Neurosci. Lett.* **2004**, *357*, 73-75.

cerebro, produciendo efectos citotóxicos, como neurodegeneración.¹⁸⁷ También se encontró en estos pacientes el aducto tóxico tetrahidropapaverolina (THP, **Figura IV.2-II**), formado por reacción de estos aldehídos con aminas.¹⁸⁸

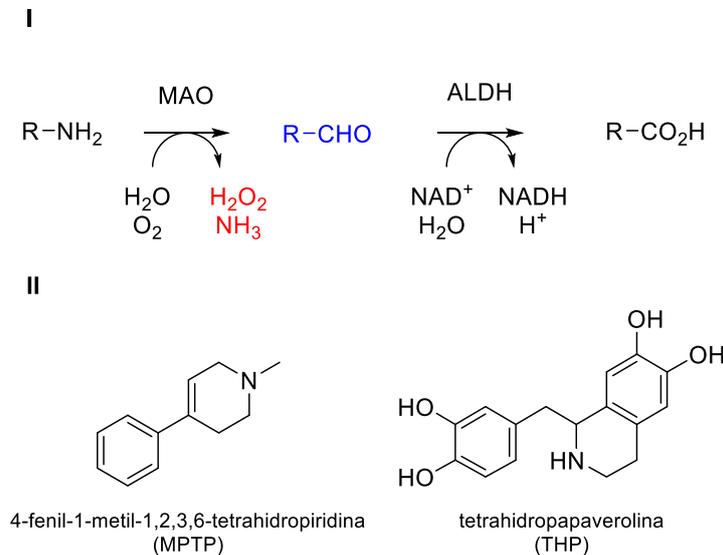


Figura IV.2. I. Desaminación oxidativa de monoaminas catalizada por MAOs. II. Neurotoxinas MPTP y THP, presentes en pacientes con EP.

La enzima MAO presenta dos isoformas, llamadas MAO-A y MAO-B. MAO-A tiene como sustrato preferente la 5-HT y la noradrenalina, mientras que la MAO-B muestra preferencia por la bencilamina y la etilfenilamina; ambas isoformas degradan a la dopamina.¹⁸⁹ Tanto en MAO-A como en MAO-B, el sitio de unión al sustrato ocurre en cavidades alargadas, en general de carácter hidrofóbico. La obtención de las estructuras cristalográficas de ambas isoformas¹⁹⁰, reveló que existen diferencias conformacionales entre las dos cavidades, siendo de mayor amplitud la correspondiente a MAO-A. Debido a esto, la isoforma MAO-A puede acomodar sustratos que presenten grupos aromáticos más grandes en su sitio de unión, por ej., pirlindol y harmina (**Figura IV.3-C, p.128**), en comparación con MAO-B.¹⁹¹ En concordancia con lo expresado anteriormente, moléculas pequeñas como isatina o tranilcipromina (**Figura IV.3-A**) resultan inhibidores no selectivos, presentando afinidades similares por ambas isoformas.¹⁹²

¹⁸⁷ I. Lamensdorf, G. Eisenhofer, J. Harvey-White, A. Nechustan, K. Kirk, I.J. Kopin. *Brain Res.* **2000**, 868, 191-201.

¹⁸⁸ M.H. Shin, J.H. Jang, Y.J. Surh. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, 36, 1185-1194.

¹⁸⁹ Martín-López, M.; Perea, J. M.; Morabet, L.; Navarro, J. F. *Psiquiatr. Biol.* **2008**, 15 (5), 175-181.

¹⁹⁰ H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 235-242.

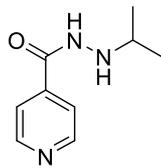
¹⁹¹ G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30, 2785-2791.

¹⁹² Glover, V., Halket, J., Watkins, P., Clow, A., Goodwin, B., Sandier, M. *J. Neurochem.* **1988**, 51, 656-659.

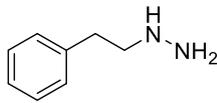
IV.1.1. Inhibidores de MAOs

El desarrollo de inhibidores de monoaminooxidasas (IMAO) se inició de manera fortuita, al observarse los efectos antidepresivos, manifestados como euforia, en pacientes que recibían tratamiento con iproniazida (**Figura IV.3-A**), un agente antituberculoso. Posteriormente, en 1952, se encontró que el mismo es un inhibidor de MAOs tanto *in vitro* como *in vivo*, postulando de esta manera el potencial que tendrían estos inhibidores para el tratamiento de la depresión, potenciando la acción de aminas cuyo metabolismo se encuentra catalizado por MAO.¹⁹³

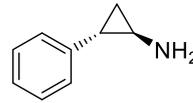
A. IMAOs - 1era generación (Irreversibles, no selectivos)



Iproniazida
(Antidepresivo)

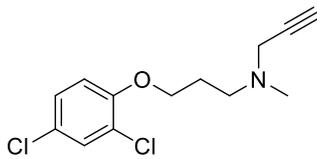


Fenzilina
(Antidepresivo-Ansiolítico)

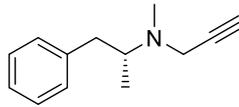


Tranilcipromina
(Antidepresivo-Ansiolítico)

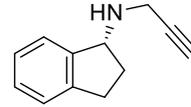
B. IMAOs - 2da generación (Irreversibles, selectivos)



Clorgilina
(MAO-A - Antidepresivo)

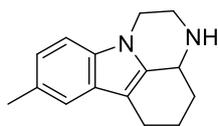


Selegilina
(MAO-B - Antiparkinsoniano)

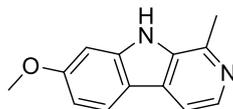


Rasagilina
(MAO-B - Antiparkinsoniano)

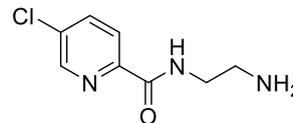
C. IMAOs - 3era generación (Reversibles, selectivos)



Pirlindol
(MAO-A - Antidepresivo)



Harmina
(MAO-A - Antidepresivo)



Lazabemida
(MAO-B - Antiparkinsoniano)

Figura IV.3. Evolución del desarrollo de IMAO.

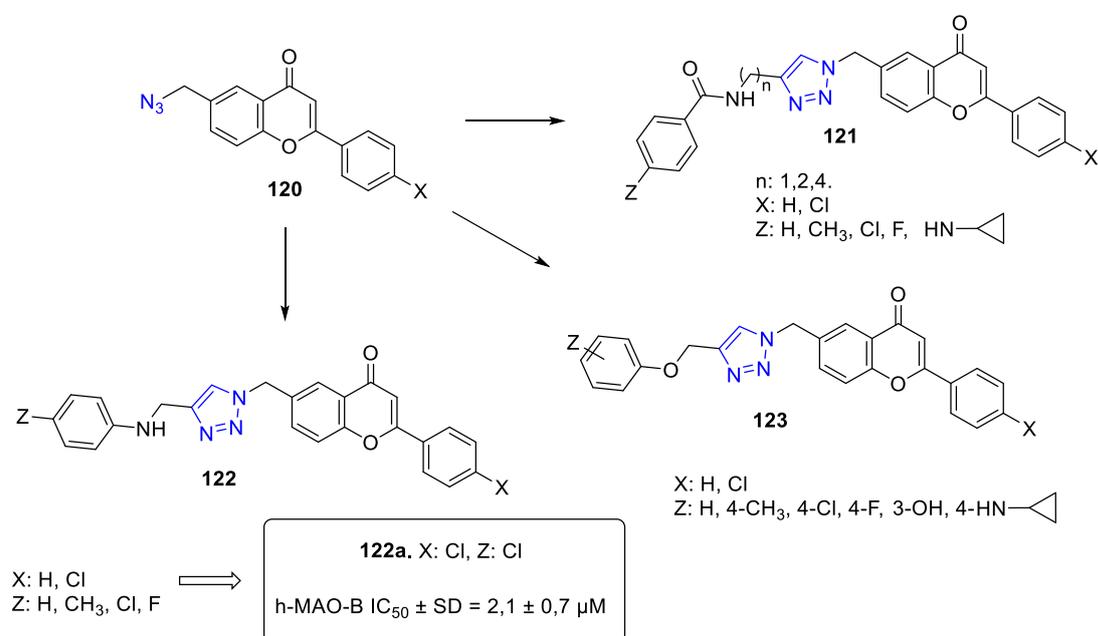
A raíz de estos descubrimientos se desarrolló una primera generación de antidepresivos, como la fenzilina (**Figura IV.3-A**), la cual aún se utiliza para tratar los síntomas de la depresión atípica en adultos, cuando otras medicinas no resultan eficaces. Estos inhibidores se caracterizan por ser no selectivos e irreversibles, dando lugar a efectos adversos no deseados, como toxicidad hepática e interacción con alimentos (principalmente con la tiramina presente en quesos,

¹⁹³ E.A. Zeller, J. Barsky. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1952**, *81*, 459-461.

generando ataques de hipertensión).¹⁹⁴ Esto llevó al desarrollo de una segunda generación de IMAO, irreversibles, pero selectivos hacia una de las dos isoformas de MAO, destacándose las propargilaminas (**Figura IV.3-B**). Sin embargo, los efectos de hipertensión persistieron, por lo que finalmente se desarrollaron inhibidores selectivos y reversibles de MAO-A (**Figura IV.3-C**).¹⁹⁵

IV.1.1.i. Empleo de triazoles e indoles en el desarrollo de inhibidores de MAO

La química *click* se ha utilizado como herramienta para el desarrollo y diseño de nuevos fármacos con actividad inhibitoria de MAO-B. Jia y colaboradores sintetizaron una serie de triazoles, empleando azidas derivadas de flavona (**120**, **Esquema IV.1**), que presentaron inhibición de *h*-MAO-B en el rango micromolar.¹⁹⁶ La mayoría de los compuestos de tipo **121-123** no presentaron gran selectividad, dado que también inhiben MAO-A (para el compuesto más activo, **122a**, MAO-A IC₅₀ = 1.6 μM).



Esquema IV.1. Derivados triazol-flavona como inhibidores de *h*-MAO-B.

Para esta misma actividad biológica, se evaluaron triazoles conteniendo propargilaminas (**Figura IV.4**, p.130), que resultaron ser inhibidores moderadamente potentes de *h*-MAO-B. Los compuestos más activos, **124-127**, presentaron valores de IC₅₀ en el rango μM, pero no todos fueron selectivos a MAO-B.¹⁹⁷ Los autores postulan que los sustituyentes en posición 1 del anillo

¹⁹⁴ C.S. Brown, T.A. Kent, S.G. Bryant, R.M. Gevedon, J.L. Campbell, A.R. Felthous, E.S. Barratt, R.M. Rose. *Psychiatry Res.* **1989**, *27*, 5-12.

¹⁹⁵ D.S. Robinson. *Psychopharmacol. Bull.* **2002**, *36*, 124-138.

¹⁹⁶ Jia, W. Z.; Cheng, F.; Zhang, Y. J.; Ge, J. Y.; Yao, S. Q.; Zhu, Q. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *89* (1), 141-151.

¹⁹⁷ Di Pietro, O.; Alencar, N.; Esteban, G.; Viayna, E.; Szałaj, N.; Vázquez, J.; Juárez-Jiménez, J.; Sola, I.; Pérez, B.; Solé, M.; et al. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24* (20), 4835-4854.

de 1,2,3-triazol deben ser apolares, para contrarrestar la polaridad conferida por este heterociclo, dado que el sitio de unión a la enzima es hidrofóbico.

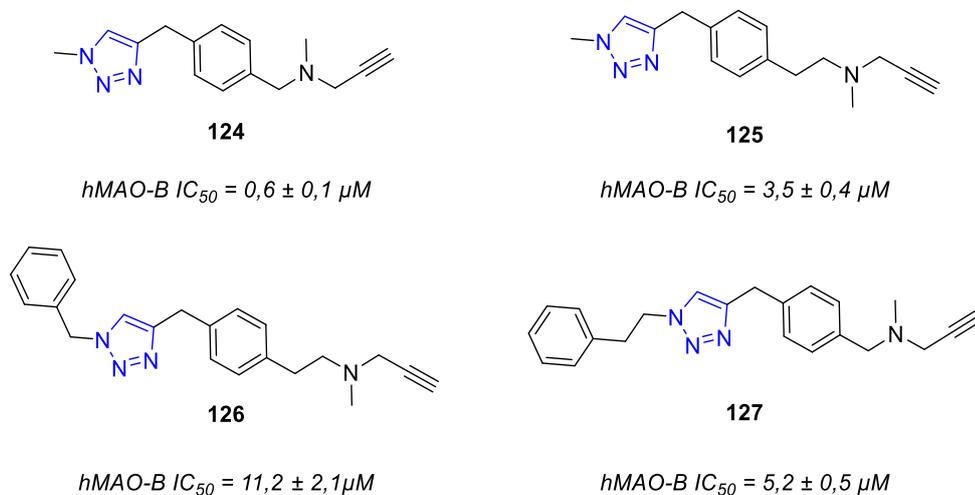


Figura IV.4. Derivados de triazol conteniendo propargil aminas como inhibidores de hMAO-B.

Respecto a los indoles, se destacan aquellos conteniendo propargilaminas (compuestos de la familia **128**, **Figura IV.5**), que fueron sintetizados en el marco del desarrollo de neurofármacos multidiana, entre los que se cuenta la inhibición de MAO-B. La inhibición resultó irreversible, con IC_{50} en el rango nM para los compuestos más activos. El compuesto denominado Contilisant resultó además ser inhibidor de acetil y butirilcolinesterasa, y del receptor de histamina H3.¹⁹⁸

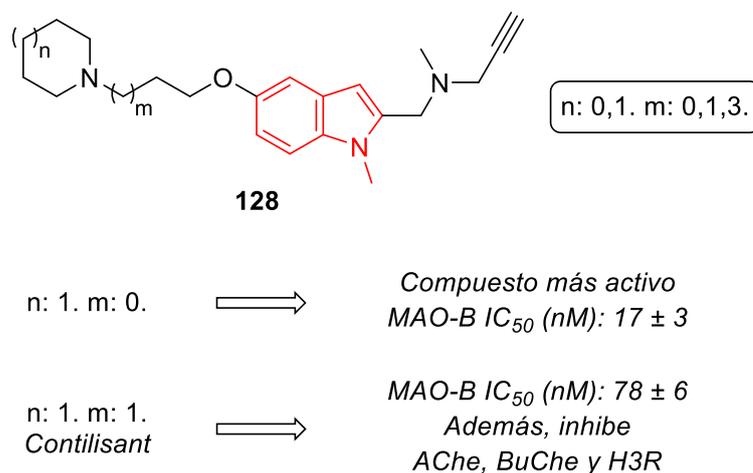
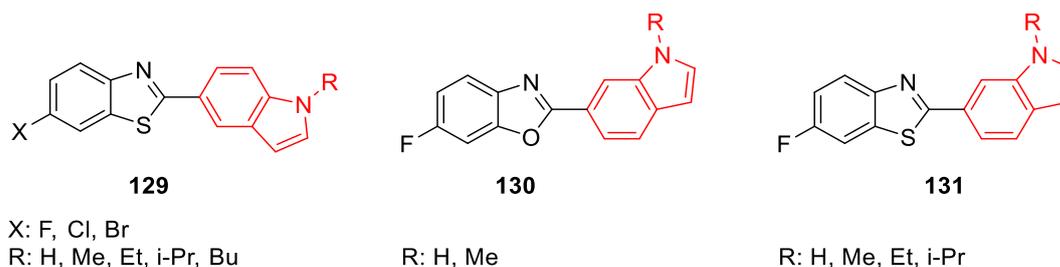


Figura IV.5. Derivados de indol, conteniendo propargil aminas, como inhibidores de MAO-B.

¹⁹⁸ Bautista-Aguilera, O. M.; Hagenow, S.; Palomino-Antolin, A., et al. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2017**, 56(41), 12765-12769.

Por otra parte, compuestos híbridos benzotiazol-indol y benzoxazol-indol (**129-131**, **Figura IV.6**), inhiben MAO-B, de manera selectiva, en el rango nanomolar.¹⁹⁹ Puede observarse que los compuestos más activos son los derivados benzotiazol-indol, en los cuales el indol se encuentra sustituido en posición 5 (**129**). Otra característica de los compuestos más activos es que el nitrógeno del indol se encuentra libre (**131a**), o en su defecto sustituido con un grupo metilo (**129a** y **130a**), ya que cadenas alquílicas de mayor longitud actúan en detrimento de la actividad inhibitoria. Finalmente, se determinó que la inhibición es de tipo reversible.



Compuesto más activo de la serie

129a. X: F. R: Me. <i>h</i> -MAO-B IC_{50} (nM): 28 ± 1 .	130a. R: Me. <i>h</i> -MAO-B IC_{50} (nM): 217 ± 11 .	131a. R: H. <i>h</i> -MAO-B IC_{50} (nM): 437 ± 11 .
---	---	--

Figura IV.6. Híbridos indol-benzotiazol e indol-benzisoxazol como inhibidores de MAO-B.

Otros derivados de interés para el estudio de inhibidores de MAO son indoles sustituidos con amidas en posición 5 (**Figura IV.7**), destacándose la actividad del bloque estructural N-(3,4-diclorofenil)carboxamida, **133**. Estos compuestos son inhibidores potentes de MAO-B, con gran selectividad, dado que no inhiben MAO-A de forma apreciable. Los indazoles con el mismo patrón de sustitución también presentan inhibición de MAO-B en el rango nM.²⁰⁰

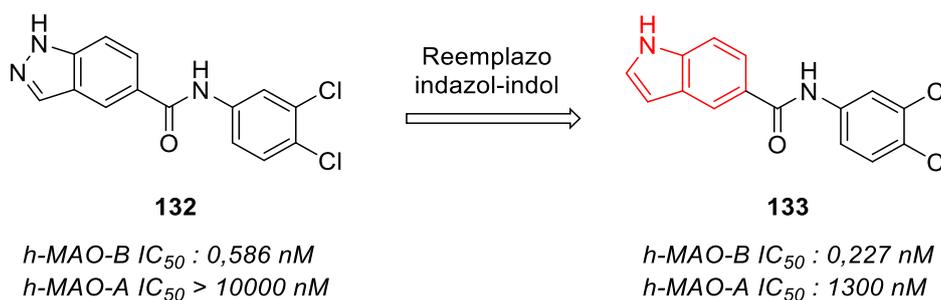


Figura IV.7. Indoles e indazoles sustituidos con amidas como inhibidores de *h*-MAO-B.

¹⁹⁹ Nam, M. H.; Park, M.; Park, H.; Kim, Y.; Yoon, S.; Sawant, V. S.; Choi, J. W.; Park, J. H.; Park, K. D.; Min, S. J.; et al. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8* (7), 1519–1529.

²⁰⁰ Tzvetkov, N. T.; Hinz, S.; Küppers, P.; Gastreich, M.; Müller, C. E. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (15), 6679–6703.

IV.1.2. Inhibición de la interacción KEAP1-NRF2

NRF2 (*Nuclear erythroid 2-related factor*) es un factor de transcripción nuclear que regula la activación de genes de supervivencia, y la producción de enzimas antioxidantes y antiinflamatorias. En condiciones no patológicas, NRF2 se localiza en el citosol, donde se encuentra en una baja concentración basal mediante su unión a su principal regulador negativo, la proteína represora KEAP1, a través de su dominio Kelch.²⁰¹ Para contrarrestar los efectos nocivos generados por diferentes condiciones patológicas (estrés oxidativo, agresiones tóxicas externas o internas, etc.), la maquinaria celular protectora activa la vía de transcripción de NRF2, uno de cuyos primeros pasos consiste en la ruptura de la unión de NRF2 al motivo Kelch de KEAP1. A continuación, NRF2 migra al núcleo celular, donde se une a componentes de la respuesta antioxidante endógena (*Antioxidant Response Elements*, AREs), que son promotores comunes de muchos genes citoprotectores, induciendo la expresión de proteínas de defensa tales como NAD(P)H-quinona oxidorreductasa 1 (NQO1), glutatión-S-transferasa y hemoxigenasa-1 (HO-1), entre otros.²⁰² Por este motivo, se ha propuesto la activación farmacológica de la vía de señalización celular NRF2 / AREs para el tratamiento de numerosas enfermedades, incluyendo las de tipo neurodegenerativo (Alzheimer, Parkinson, etc.).²⁰³ Uno de los mecanismos más explorados ha sido el desarrollo de inhibidores de la interacción proteína-proteína (PPIs) entre NRF2 y el dominio Kelch de KEAP1. Hasta el momento, se han realizado numerosas patentes sobre estos PPIs, por parte de grandes compañías farmacéuticas y grupos de investigación académicos.^{204,205}

²⁰¹ Kang, M.I.; Kobayashi, A.; Wakabayashi, N.; Kim, S.G.; Yamamoto, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 2046-2051.

²⁰² Johnson, J.A.; Johnson, D.A.; Kraft, A.D.; Calkins, M.J.; Jakel, R.J.; Vargas, M.R.; Chen, P.C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1147*, 61-69.

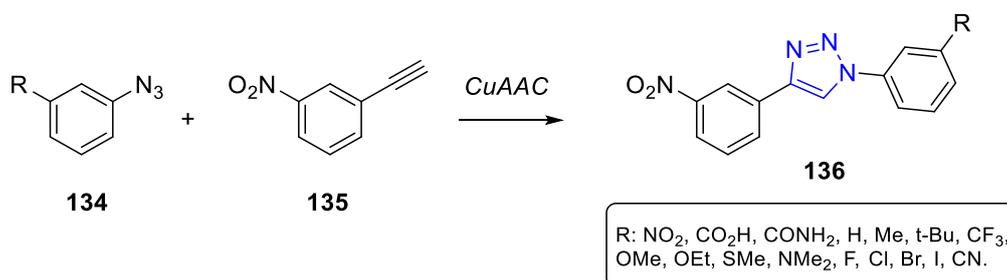
²⁰³ Cuadrado, A.; Manda, G.; Hassan, A.; Alcaraz, M. J.; Barbas, C.; Daiber, A.; Ghezzi, P.; León, R.; López, M. G.; Oliva, B. *Pharmacol. Rev.* **2018**, *70* (2), 348–383.

²⁰⁴ Sun, H.; Zhu, J.; Lin, H.; Gu, K.; Feng, F. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, *27* (7), 763–785.

²⁰⁵ Zhou, H.; Wang, Y.; You, Q.; Jiang, Z. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2020**, *30* (3), 209–225.

IV.1.2.i. 1,4-diaril triazoles como inhibidores de la interacción KEAP1-NRF2

A partir de estudios *in silico*, Wells y colaboradores propusieron 1,4-diaril triazoles como posibles candidatos para la inhibición de la interacción KEAP1-NRF2. Este tipo de compuestos presentaría interacciones con los residuos más importantes del dominio Kelch de KEAP1: el anillo de 1,2,3-triazol con el residuo Ser602, y los grupos $-\text{NO}_2$ o $-\text{CO}_2\text{H}$, presentes en los sustituyentes arílicos, con Arg483, Arg415, Arg380 y Asn382. Tras llevar a cabo la síntesis de estos triazoles (**136**, Esquema IV.2), concluyeron que los compuestos más activos presentan un grupo nitro en posición meta en uno de los anillos, y grupos $-\text{Cl}$, $-\text{I}$ o $-\text{Me}$ como sustituyentes en posición meta del otro anillo.²⁰⁶



Esquema IV.2. 1,4-diaril triazoles como inhibidores de la interacción KEAP1-NRF2.

Además de la buena actividad del grupo nitro en inhibidores de la interacción KEAP1-NRF2, esta funcionalidad también se encuentra presente en inhibidores de MAO-B²⁰⁷, lo que refuerza su elección para el diseño de inhibidores duales MAO / KEAP1-NRF2. Algunos ejemplos de inhibidores de MAO-B con grupos nitro se muestran en la **Figura IV.8**: Furazolidona (comercializado como antibacteriano)²⁰⁸, 1,2,4-triazinas tricíclicas (**138**)²⁰⁹, oxadiazoles (**139**)²⁰⁹ y 3-antracencil-NH-pirazolinas (**140**).²¹⁰

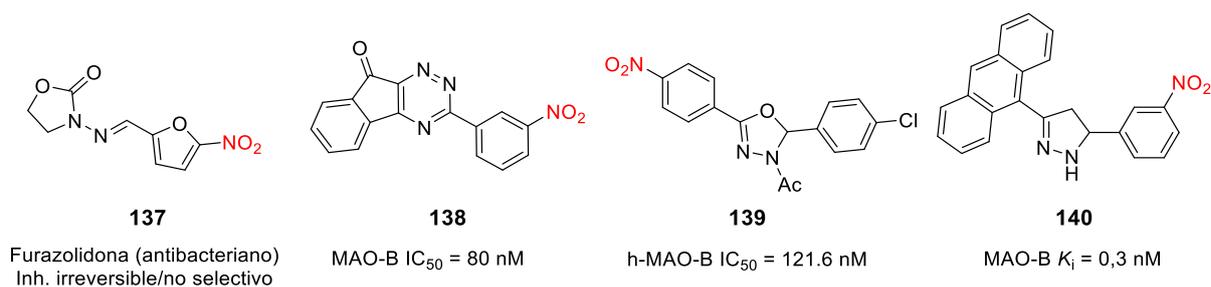


Figura IV.8. Ejemplos de inhibidores de MAO con grupos nitro en su estructura.

²⁰⁶ Bertrand, H. C.; Schaap, M.; Baird, L.; Georgakopoulos, N. D.; Fowkes, A.; Thiollier, C.; Kachi, H.; Dinkova-Kostova, A. T.; Wells, G. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (18), 7186–7194.

²⁰⁷ Carradori, S.; Silvestri, R. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (17), 6717–6732.

²⁰⁸ Powers, M. D.; Good, A. L.; Czarnecki, C. M.; Evanson, O. A. *Poult. Sci.* **1983**, *62* (9), 1850–1855.

²⁰⁹ Carotti, A.; Catto, M.; Leonetti, F.; Campagna, F.; Soto-Otero, R.; Méndez-Álvarez, E.; Thull, U.; Testa, B.; Altomare, C. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (22), 5364–5371.

²¹⁰ Mishra, N.; Sasmal, D. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (7), 1969–1973.

IV.1. Capítulo II: Objetivos específicos

En función de los antecedentes descritos previamente, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar el diseño y la síntesis de derivados triazol-indol como posibles neurofármacos multidiana, a fin de evaluar su actividad tanto en la inhibición de MAO como de la interacción KEAP1-NRF2 (**Figura IV.9**).

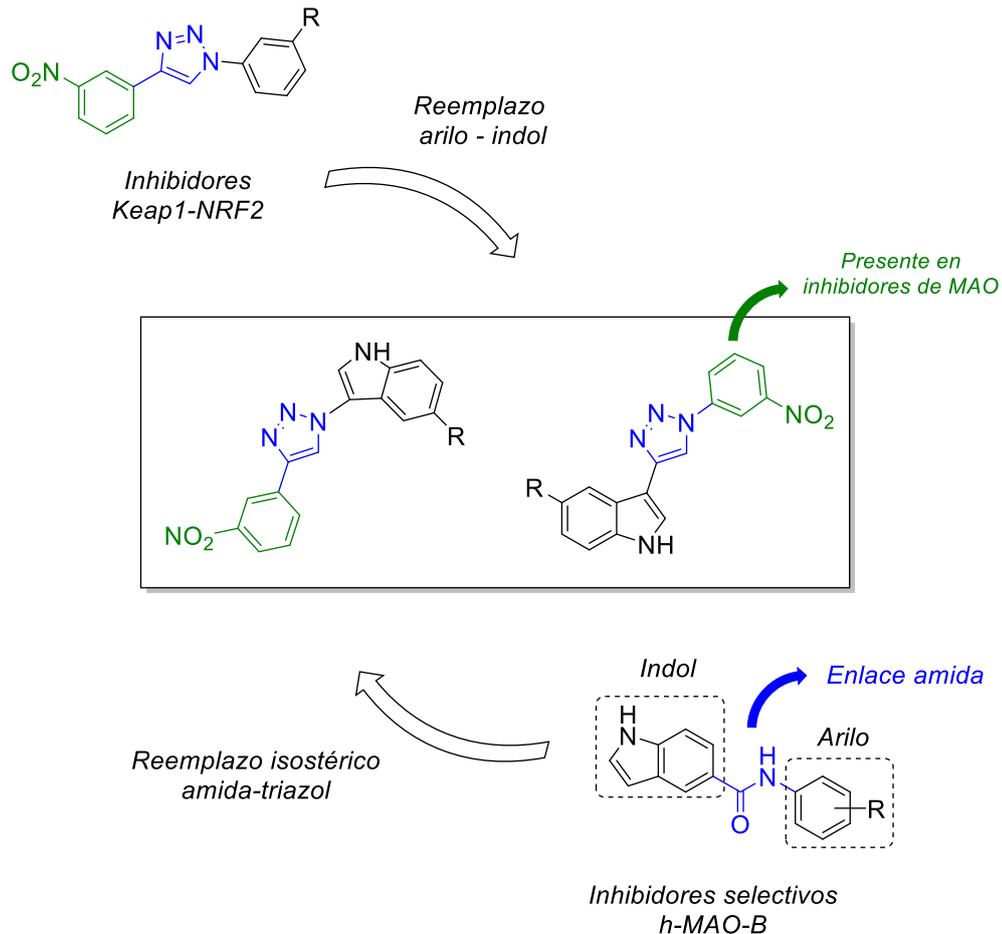


Figura IV.9. Derivados triazol-indol como posibles inhibidores duales MAO / KEAP1-NRF2.

Puede observarse que se mantendrá el anillo de 1,2,3-triazol unido al grupo *m*-nitrofenil (presente en inhibidores de la interacción KEAP1-NRF2 y de MAO), reemplazando al otro grupo arilo por indoles sustituidos. Este heterociclo forma parte de distintas moléculas con acción inhibitoria de la enzima MAO, que también contienen arilamidas, como se observa en la **Figura IV.7**. Además, como se describió previamente, otros derivados híbridos conteniendo indoles y heterociclos como benzoxazoles y benzotiazoles también son inhibidores de MAO. Sin embargo, derivados híbridos triazol-indol no han sido evaluados en esta actividad.

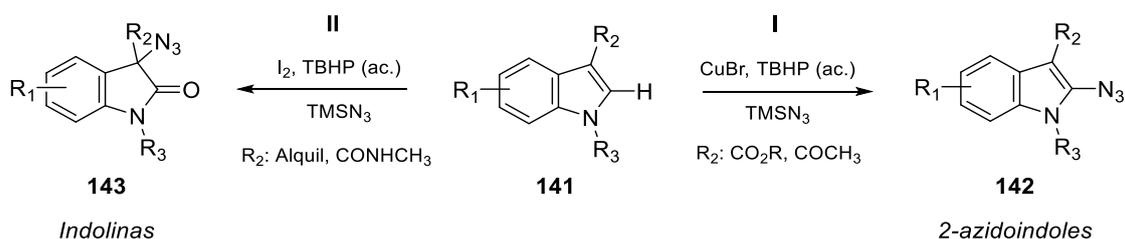
2. Evaluar métodos para la obtención de los derivados triazol-indol, a través de la introducción de azidas, o alquinos terminales, en indoles. Una vez obtenidos los precursores, se procederá a optimizar las condiciones de reacción para la CuAAC catalizada por CuNPs/C.
3. Cuantificar la actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados frente a MAO-A y MAO-B, determinando si presentan inhibición selectiva hacia alguna de las dos isoformas.
4. Determinar si los derivados triazol-indol presentan inhibición de la interacción KEAP1-NRF2, mediante ensayos de resonancia de plasmones superficiales (SPR).

IV.2. Resultados y discusión

IV.2.1. Obtención de derivados triazol-indol a partir de la azidación de indoles

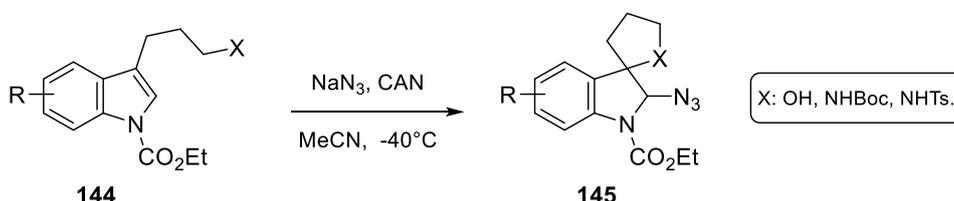
IV.2.1.i. Descripción de antecedentes en la obtención de azidoindoles

Para la síntesis de los precursores, en primer lugar se estudiaron los escasos métodos reportados para llevar a cabo la azidación de indoles. La azidación en posición C-2 puede realizarse bajo catálisis con CuBr (**Esquema IV.3-I**), pero solamente para sustratos específicos (**141**), los cuales deben presentar sustituyentes con grupos carbonilos en posición C-3, mientras que en otras condiciones de reacción se obtienen indolinas (**143**, **Esquema IV.3-II**).²¹¹



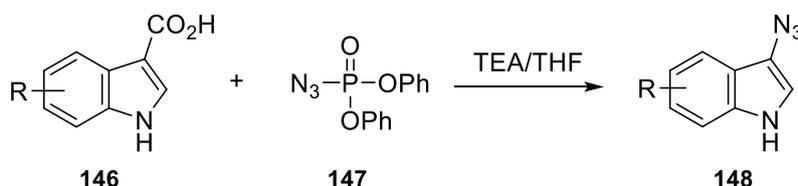
Esquema IV.3. Azidación de indoles catalizada por CuBr o I₂.

La azidación en C-2 también puede lograrse empleando el oxidante nitrato de amonio cérico (CAN) sobre derivados de tipo **144**, pero en este caso se pierde la aromaticidad del anillo de indol, generándose indolinas (**145**, **Esquema IV.4**) como producto de la reacción.²¹²



Esquema IV.4. Azidación de indoles empleando CAN.

También se pueden obtener 3-azidoindoles (**148**, **Esquema IV.5**) a partir de los correspondientes ácidos carboxílicos, **146**, empleando azidofosfato de difenilo (**147**).²¹³



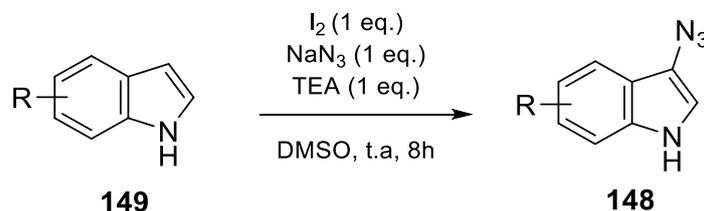
Esquema IV.5. Azidación de indoles a partir de ácidos carboxílicos.

²¹¹ Dhineshkumar, J.; Gadde, K.; Prabhu, K. R. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (1), 228–235.

²¹² Li, J.; Liu, M.; Li, Q.; Tian, H.; Shi, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (48), 9769–9772.

²¹³ Salvati, M.; Balog, J.; Shan, W.; Giese, S.; Harikrishnan, L. US 20040077606, **2005**.

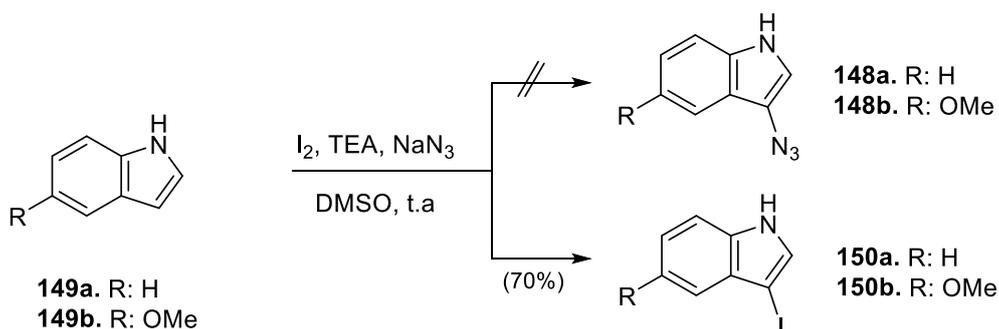
Finalmente, la azidación en posición C-3 fue reportada empleando I_2 , en condiciones de reacción sencillas, y para una amplia gama de indoles (**149**, Esquema IV.6), por el grupo de Sudalai.²¹⁴



Esquema IV.6. Azidación de indoles promovida por I_2 .

IV.2.1.ii. Síntesis de 3-azidoindoles

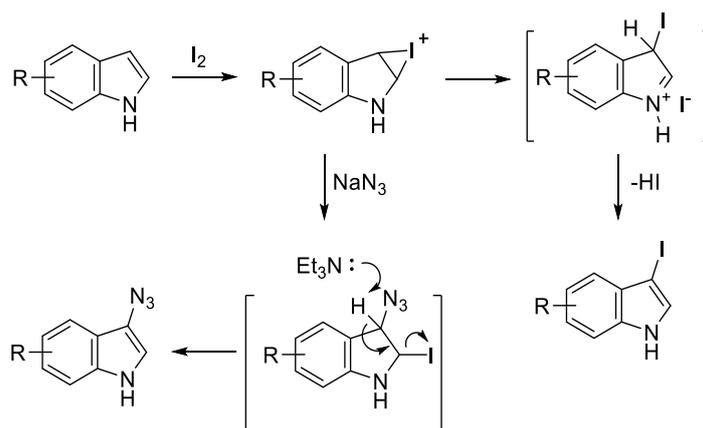
De los métodos propuestos, consideramos que este último presenta las condiciones de reacción más sencillas, permitiendo trabajar con indoles sustituidos en C-5, sin previa funcionalización de C-3 del anillo. Se evaluó esta reacción empleando indol (**148a**, Esquema IV.7) y 5-metoxiindol (**148b**), pero no se obtuvo el producto esperado, sino que se aislaron los correspondientes 3-iodoindoles, **150**, con rendimientos cercanos al 70%.



Esquema IV.7. Azidación de indoles en posición C-3.

Analizando el mecanismo de reacción propuesto por los autores^{214b} (Esquema IV.7, p.138), se puede observar que en primer lugar se produce la adición de iodo sobre el anillo de indol, y posteriormente el ataque nucleofílico de la azida sobre el intermediario iodonio, con la subsecuente abstracción de un protón por parte de la base para restituir la aromaticidad. Considerando esto, se varió el orden de agregado (adicionando TEA luego de la azida de sodio), y se aumentó la cantidad de azida de sodio agregada, empleando DMSO seco, pero en ningún caso se logró obtener el producto esperado.

²¹⁴ (a) Prasad, P. K.; Kalshetti, R. G.; Reddi, R. N.; Kamble, S. P.; Sudalai, A. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (11), 3027–3030. (b) Prasad, P. K.; Kalshetti, R. G.; Reddi, R. N.; Kamble, S. P.; Sudalai, WO 2017163263, (2017).



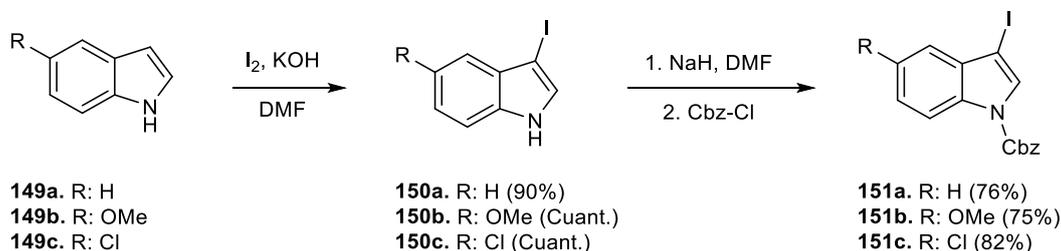
Esquema IV.7. Mecanismo propuesto para la azidación de indoles (Sudolai et al.).^{214b}

IV.2.2. Obtención de derivados triazol-indol a partir de 3-etinilindoles

Considerando las dificultades encontradas a la hora de obtener 3-azidoindoles, y teniendo en cuenta el mayor número de reportes bibliográficos referidos a la obtención de alquinilindoles, se decidió proceder a la síntesis de los derivados triazol-indol a partir de 3-etinilindoles. Para ello se decidió emplear el acoplamiento de Sonogashira sobre una serie de 3-iodoindoles, usando trimetilsililacetileno como alquino.

IV.2.2.i. Obtención de 3-etinilindoles protegidos con Cbz

Los 3-iodoindoles (**150**, **Esquema IV.8**), se obtuvieron por tratamiento de los correspondientes indoles, **149**, con I_2 en medio básico, con rendimientos excelentes, tras lo cual el NH del indol fue inmediatamente protegido con el grupo carboxibencil (Cbz), para dar **151**. Esto se debe a que los 3-iodoindoles sin proteger son inestables, y se descomponen fácilmente.²¹⁵ Además, el grupo protector sobre el indol suele ser un requerimiento para efectuar el acoplamiento de Sonogashira.²¹⁶

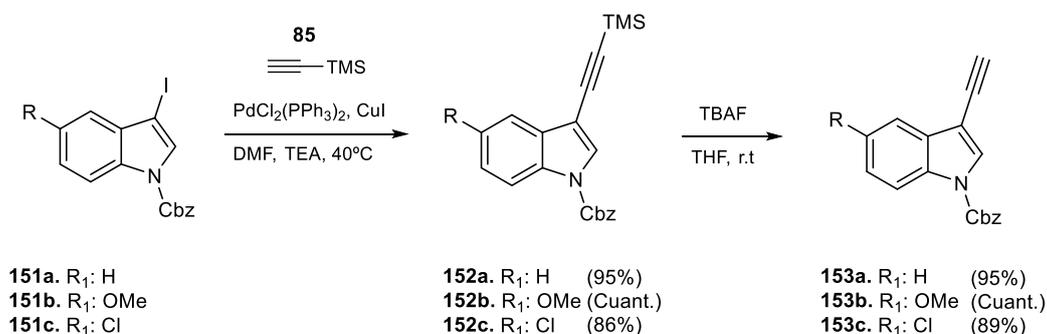


Esquema IV.8. Síntesis de 3-iodoindoles protegidos (**151**).

²¹⁵ Mandal, A.; Mandal, S. M.; Jana, S.; Bag, S. S.; Das, A. K.; Basak, A. *Tetrahedron* **2018**, *74* (27), 3543–3556.

²¹⁶ (a) Arunrungvichian, K.; Boonyarat, C.; Fokin, V. V.; Taylor, P.; Vajragupta, O. *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6* (8), 1331–1340. (b) Taylor, P.; Yamauchi, J.; Talley, T.T.; Arunrungvichian, K.; Vajragupta, O.; Fokin, V. WO 2016154434 (**2016**). (c) Chen, L; Li, Y. WO 2017173604, (**2016**).

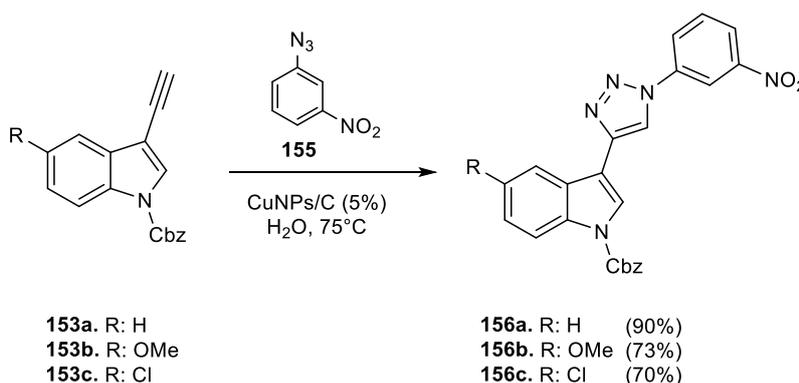
Una vez obtenidos los precursores (**151**), se efectuó el acoplamiento de Sonogashira con trimetilsililacetileno, empleando $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ como catalizador, y CuI como co-catalizador, en presencia de TEA como base (**Esquema IV.9**).^{216a} Posteriormente, se realizó el clivaje del grupo sililo empleando TBAF en THF a temperatura ambiente. En estas condiciones, se lograron obtener los 3-etinilindoles deseados (**153a-c**) con muy buenos rendimientos.²¹⁷



Esquema IV.9. Síntesis de 3-etinilindoles vía acoplamiento de Sonogashira.

IV.2.2.ii. CuAAC empleando 3-etinilindoles protegidos con Cbz

La cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen se llevó a cabo empleando CuNPs/C como catalizador, en H_2O a 75°C . La elección de las condiciones de reacción, y el catalizador empleado, se basó en los buenos resultados obtenidos previamente para la síntesis de PAMs de $\alpha 7$ (**Sección III.3.1.ii**). La azida empleada, **155**, se sintetizó a partir de la correspondiente anilina (**154**, véase **Sección IV.4.3**) Se aislaron los correspondientes triazoles, **156**, con rendimientos buenos a excelentes (**Esquema IV.10**).



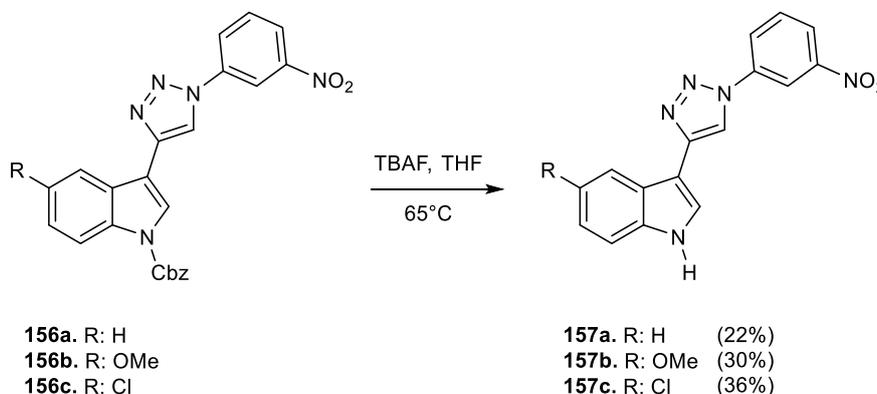
Esquema IV.10. CuAAC, promovida por CuNPs, empleando 3-etinilindoles.

Usualmente, la desprotección del grupo Cbz se llevaría a cabo por hidrogenólisis, reacción que procede con rendimientos excelentes y sin necesidad de purificación en columna cromatográfica.²¹⁸ Sin embargo, el empleo del sistema $\text{H}_2\text{-Pd/C}$ daría lugar también a la

²¹⁷ Xu, H. D.; Zhang, R. W.; Li, X.; Huang, S.; Tang, W.; Hu, W. H. *Org. Lett.* **2013**, *15* (4), 840–843.

²¹⁸ Fra, L.; Millán, A.; Souto, J. A.; Muñiz, K. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (28), 7349–7353.

reducción del grupo nitro²¹⁹, por lo cual se evaluaron otras alternativas para la desprotección. Se conoce que ácidos de Lewis, como el BBr_3 , promueven la desprotección del grupo Cbz²²⁰, sin embargo, esta estrategia no rindió el producto esperado. Finalmente, se realizó la desprotección empleando TBAF a reflujo de THF (**Esquema IV.11**).²²¹

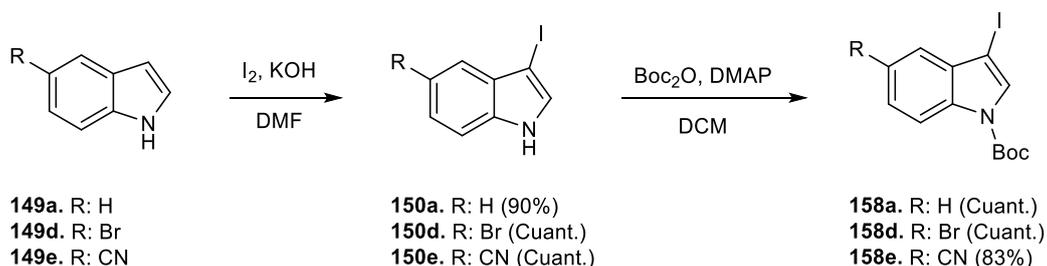


Esquema IV.11. Desprotección del grupo Cbz empleando TBAF.

La desprotección del grupo Cbz en estas condiciones permitió obtener los productos deseados, **157**, sin embargo, los rendimientos fueron bajos. Se decidió entonces cambiar el grupo protector empleado para llevar a cabo la síntesis de nuevos derivados.

IV.2.2.iii. Síntesis de 3-etinilindoles empleando Boc como grupo protector

Se llevó a cabo la síntesis de 3-etinilindoles, protegidos con *tert*-butoxicarbonilo (Boc) en lugar de Cbz (**158**, **Esquema IV.12**). La síntesis de 3-iodoindoles se realizó en las mismas condiciones empleadas anteriormente (véase [Sección IV.2.2.i](#)), mientras que la protección con Boc procedió con rendimientos mayores a los observados al emplear Cbz.²²²



Esquema IV.12. Síntesis de 3-iodoindoles protegidos con Boc.

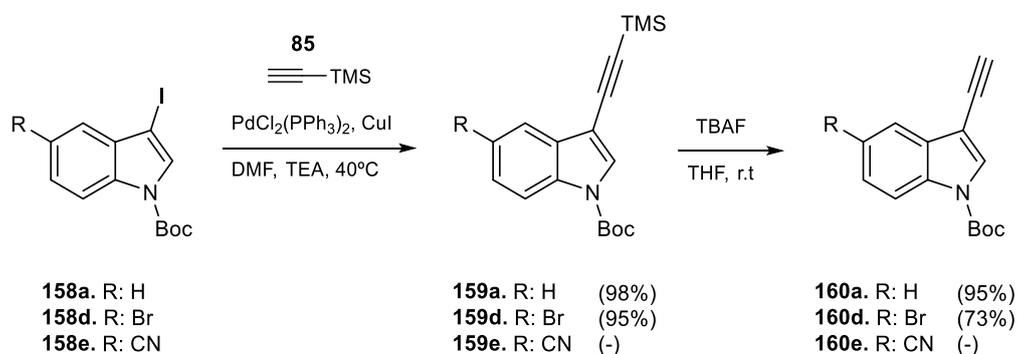
²¹⁹ Liu, Y. H.; Zhang, L.; Xu, X. N.; Li, Z. M.; Zhang, D. W.; Zhao, X.; Li, Z. T. *Org. Chem. Front.* **2014**, 1 (5), 494–500.

²²⁰ Felix, A. M. *J. Org. Chem.* **1974**, 39 (10), 1427–1429.

²²¹ Jacquemard, U.; Bénéteau, V.; Lefoix, M.; Routier, S.; Mérour, J. Y.; Coudert, G. *Tetrahedron* **2004**, 60 (44), 10039–10047.

²²² Farahat, A. A.; Paliakov, E.; Kumar, A.; Barghash, A. E. M.; Goda, F. E.; Eisa, H. M.; Wenzler, T.; Brun, R.; Liu, Y.; Wilson, W. D.; et al. *Bioorganic Med. Chem.* **2011**, 19 (7), 2156–2167.

El acoplamiento de Sonogashira, y la posterior desprotección del TMS, también se llevaron a cabo en las mismas condiciones (Véase **Esquema IV.9**, p.139). Se observó un leve descenso del rendimiento para el derivado bromado (**160d**, **Esquema IV.13**), presumiblemente a causa de la formación de una pequeña cantidad de alquino en posición C-5. Esto se debe a la reactividad del bromuro en estas condiciones, a pesar de emplear un menor exceso de alquino.²²³ Por otra parte, solo se logró obtener una pequeña cantidad del derivado **159e**. Esto pudo deberse al carácter electroattractor del grupo -CN, ya que el resto de los sustratos empleados poseían grupos donores por resonancia. La baja reactividad de derivados de indol con grupos -CN también fue reportada en el caso de emplear catálisis por oro para introducir alquinos protegidos en posición C-3, evidenciando una mayor reactividad del indol sin sustituir, o con grupos electrodonadores.²²⁴



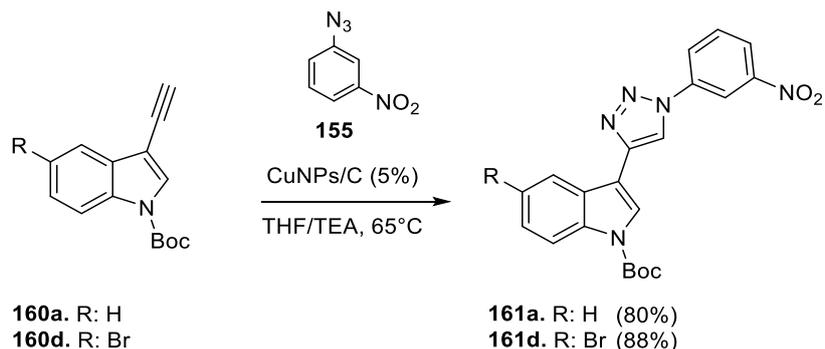
Esquema IV.13. Síntesis de 3-etinilindoles protegidos con Boc.

²²³ Kim, M.; Hwang, Y. S.; Cho, W.; Park, S. B. *ACS Comb. Sci.* **2017**, *19* (6), 407–413.

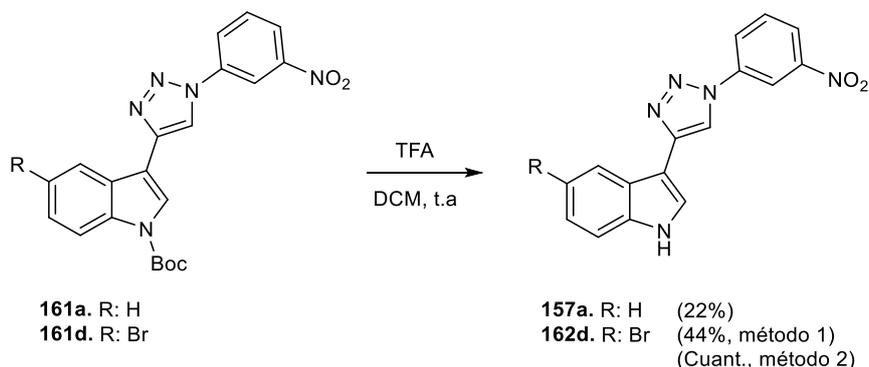
²²⁴ Brand, J. P.; Chevalley, C.; Scopelliti, R.; Waser, J. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18* (18), 5655–5666.

IV.2.2.iv. CuAAC empleando 3-etinilindoles protegidos con Boc

En este caso, la reacción se llevó a cabo en THF/TEA, dado que en agua ocurre la desprotección del grupo Boc del indol.²²⁵ Además, se observó que la cicloadición no ocurre en caso de que el indol este desprotegido, recuperándose azida sin reaccionar y subproductos derivados del alquino. En cambio, empleando THF como solvente, y 1 eq. de TEA (condiciones previamente empleadas en el caso de tener azidas preformadas, [Sección III.3.1.i](#)), se obtuvieron los productos esperados (**161a** y **161d**) con muy buenos rendimientos.

**Esquema IV.14.** Reacción click sobre derivados de indol protegidos con Boc.

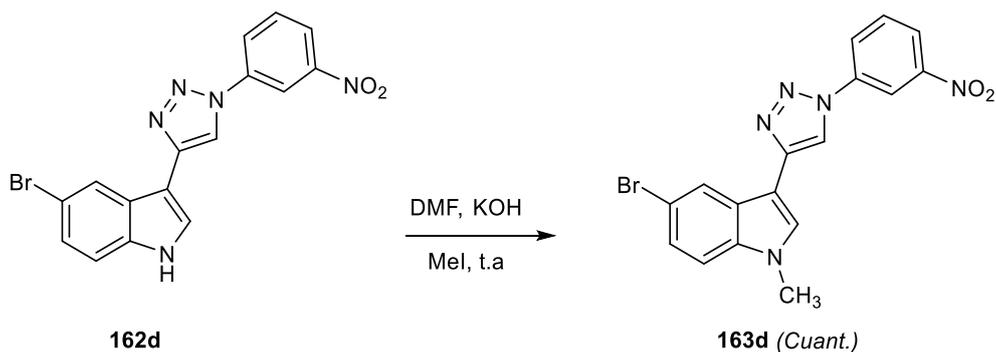
Inicialmente, la desprotección se realizó empleando ácido trifluoroacético (TFA, **Esquema IV.15, método 1**), y nuevamente se observaron rendimientos menores a los esperados.²²⁶ Consideramos que los productos de reacción pueden quedar retenidos en la sílica y/o siendo degradados durante la purificación por cromatografía, por lo cual se optó por dopar la columna con TEA, pero los resultados no mejoraron sustancialmente. También se evaluó la purificación por recristalización, pero no se obtuvieron los compuestos con la pureza necesaria para ser evaluados biológicamente.

**Esquema IV.15.** Desprotección del grupo Boc para dar lugar a los productos finales.

²²⁵ Wang, J.; Liang, Y. L.; Qu, J. *Chem. Commun.* **2009**, No. 34, 5144–5146.

²²⁶ Kumar, N. S.; Dullaghan, E. M.; Finlay, B. B.; Gong, H.; Reiner, N. E.; Jon Paul Selvam, J.; Thorson, L. M.; Campbell, S.; Vitko, N.; Richardson, A. R.; et al. *Bioorganic Med. Chem.* **2014**, 22 (5), 1708–1725.

Posteriormente, se evaluó realizar la desprotección con K_2CO_3 en una mezcla MeOH: THF: H_2O (**Esquema IV.15, método 2**).²²⁷ Se logró obtener el derivado **162d** con rendimientos cuantitativos, sin necesidad de purificación y con una mínima cantidad de impurezas. Finalmente, el derivado **162d** fue metilado, a fin de evaluar las diferencias en la actividad biológica de ambos compuestos, ya que en otros casos discutidos previamente (**Sección IV.1.1.i, Figura IV.6**, p.131), los derivados metilados presentaron mayor actividad inhibitoria. Para la metilación se empleó MeI como agente metilante, y KOH como base.²²⁸



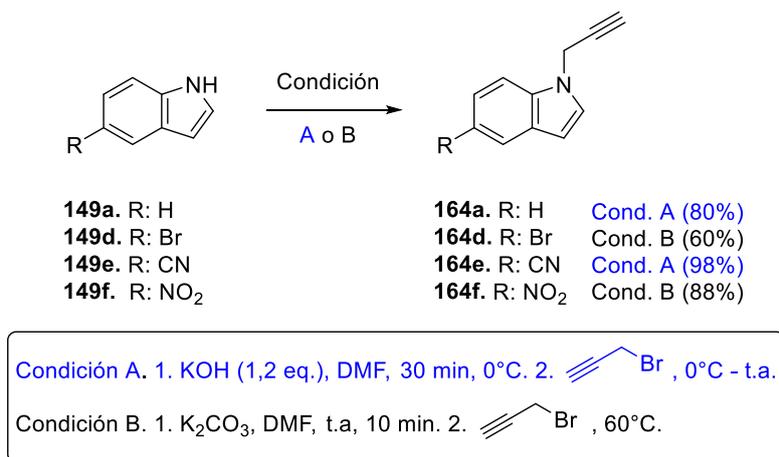
Esquema IV.16. Obtención del *N*-metilindol **163d**.

²²⁷ Chakrabarty, M.; Kundu, T.; Harigaya, Y. *Commun.* **2006**, 36 (14), 2069–2077.

²²⁸ Xu, S. M.; Wei, L.; Shen, C.; Xiao, L.; Tao, H. Y.; Wang, C. J. *Nat. Commun.* **2019**, 10 (1).

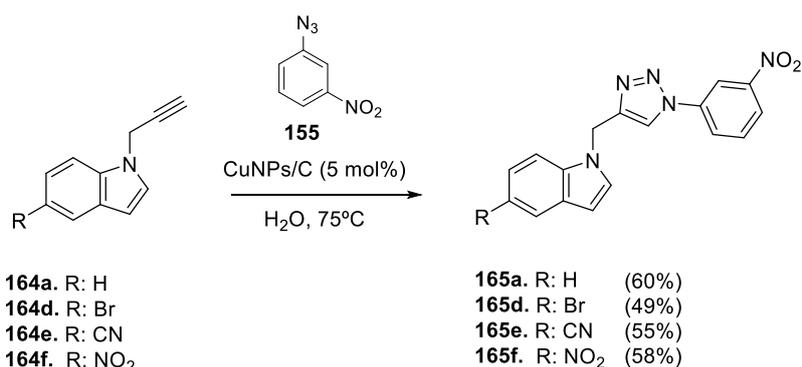
IV.2.3. Síntesis de derivados triazol-indol vía propargilación de indoles

Se sintetizó una segunda serie de compuestos vía propargilación de indoles (**Esquema IV.17**), y posterior CuAAC. La base más común para llevar a cabo esta reacción es NaH, aunque para ciertos sustratos los rendimientos resultan moderados, por ej., en indoles que presenten grupos $-\text{NO}_2$ como sustituyente.²²⁹ Es por ello que se decidió emplear bases más débiles, como K_2CO_3 ²³⁰, o bien KOH.²³¹ En este último caso, se optimizó la cantidad de base empleada, siendo 1,2 eq. la cantidad que permite obtener un mayor rendimiento del producto **164**.



Esquema IV.17. N-propargilación de indoles sustituidos.

La CuAAC se realizó en agua, obteniéndose los triazoles deseados, **165**, con rendimientos moderados. Nuevamente se observó que los productos quedan retenidos en la columna, observándose una leve mejora en los rendimientos empleando mezclas Hexano-AcOEt-TEA como eluyente.



Esquema IV.18. Reacción click sobre derivados de indol propargilados.

²²⁹ Li, T.; Yang, P. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (23), 14751–14757.

²³⁰ Festa, A. A.; Zalte, R. R.; Golantsov, N. E.; Varlamov, A. V; Eycken, E. V. Van Der; Voskressensky, L. G. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 9305–9311.

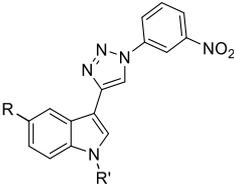
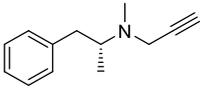
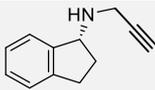
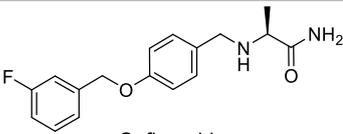
²³¹ Turnu, F.; Luridiana, A.; Cocco, A.; Porcu, S.; Frongia, A.; Sarais, G.; Secci, F. *Org. Lett.* **2019**, *21* (18), 7329–7332.

IV.2.4. Evaluación biológica

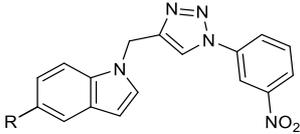
La evaluación de la actividad inhibitoria sobre MAO de las dos familias de triazoles-indoles se realizó a través de un ensayo de fluorescencia basado en la producción de H₂O₂ por parte de la *p*-tiramina, empleando el kit enzimático Amplex® Red MAO.²³² Detalles del ensayo en [Sección IV.4.2.i.](#)

IV.2.4.i. Evaluación de la inhibición de MAO de los derivados triazol-indol

Los compuestos sintetizados fueron evaluados como inhibidores de las enzimas *h*-mao-A y *h*-MAO-B; los resultados de los ensayos se muestran en la **Tabla IV.1.**

Primera serie de derivados triazol-indol			
Compuesto	MAO-A IC ₅₀ (nM)	MAO B IC ₅₀ (nM)	I.S ^a
157a (R: H, R': H)	> 50000	8,25 ± 2,80	> 6000
157b (R: OMe, R': H)	> 50000	5150 ± 260	> 9.7
157c (R: Cl, R': H)	> 50000	2,87 ± 0,63	> 17000
162d (R: Br, R': H)	> 50000	7,13 ± 1,27	> 7000
163d (R: Br, R': Me)	> 50000	3,40 ± 0,27	> 14000
Inhibidores comerciales			
 Selegilina	1700	6,59 ± 1,09	> 250
 Rasagilina	710	14,0	> 50
 Safinamida	45000	5,18 ± 0,04	> 8000

²³² Zhou, M.; Panchuk-Voloshina, N. A. *Anal. Biochem.* **1997**, 253 (2), 169–174.

Segunda serie de derivados triazol-indol			
165d (R: Br)	> 50000	2330 ± 530	> 21
165e (R: CN)	> 50000	830 ± 200	> 60
165f (R: NO ₂)	> 50000	5410 ± 160	> 9
^a Índice de selectividad (I.S) = IC ₅₀ MAO-A / IC ₅₀ MAO-B			
Tabla IV.1. Resultados de la evaluación de los derivados triazol-indol como inhibidores de <i>h</i> -mao.			

IV.2.4.ii. Estudio de unión al dominio Kelch de KEAP1 por SPR

Como se explicó en la introducción (véase [Sección IV.1.2](#)), la activación de NRF2 podría producirse mediante cambios conformacionales en KEAP1 que imposibilitan la unión entre ambas proteínas, y estimulan la expresión de enzimas citoprotectoras por parte de NRF2. Para evaluar la capacidad de nuestras moléculas para interactuar con el dominio Kealch de KEAP1, se llevó a cabo un experimento de resonancia de plasmón de superficie (SPR), siguiendo protocolos descritos.²³³ El dominio Kelch de KEAP1, expresado en *Escherichia coli* (detalles en [Sección IV.1](#)), se inmovilizó en un chip sensor de carboximetilcelulosa (CM5) y luego se hizo fluir una solución de la molécula correspondiente (100 μM) sobre el sensor para detectar un cambio en la señal SPR, resultante de la interacción entre los compuestos y el dominio Kelch. Como referencia interna se empleó ML334, un conocido ligando de KEAP1 (K_d por SPR = 0.8 μM),²³⁴ que en nuestro ensayo produjo un cambio en la señal SPR de 19,6 unidades de resonancia. Los resultados de la evaluación se resumen en la **Figura IV.10**.

²³³ Chen, Y.; Inoyama, D.; Kong, A. N. T.; Beamer, L. J.; Hu, L. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, 78 (6), 1014–1021.

²³⁴ Tran, K. T.; Pallesen, J. S.; Solbak, S. M.; Narayanan, D.; Baig, A.; Zang, J.; Aguayo-Orozco, A.; Carmona, R. M. C.; Garcia, A. D.; Bach, A. *J. Med. Chem.* **2019**, 62 (17), 8028–8052.

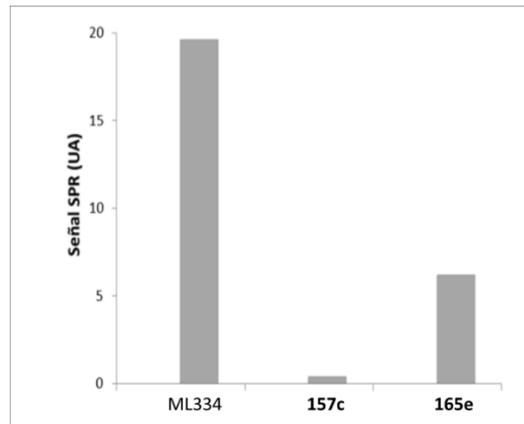


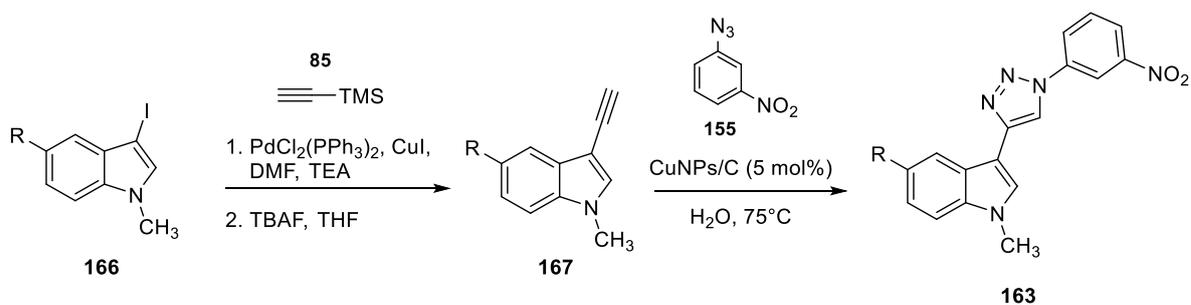
Figura IV.10. Unión de los compuestos **157c** y **165e** al dominio Kelch de KEAP1 inmovilizado, en comparación con ML334, determinado por SPR.

De los productos ensayados sólo los derivados **157c** y **165e** dieron señales apreciables, de 0,3 y 6,2 respectivamente (**Figura IV.10**), mientras que en los derivados **157b**, **162d** y **163d** no se apreciaron cambios en la señal de SPR (datos no mostrados).

IV.3. Conclusiones

Respecto a la primera serie de derivados triazol-indol, todos los compuestos evaluados resultaron ser potentes inhibidores de la enzima *h*-MAO-B, presentando un IC₅₀ en el rango nanomolar, a excepción del compuesto **157b**, el cual inhibe a concentraciones más altas (5,15 μM). La particularidad del compuesto **157b** es que presenta un grupo dador de electrones en el C-5 del indol, mientras que el resto de los compuestos contiene un halógeno en esa posición (**157c**, **162d**), o bien ningún sustituyente (**157a**). El inhibidor más potente es el compuesto **157c**, que contiene un -Cl en posición 5.

También es importante destacar que el grupo -NH del indol no resulta crucial para la actividad inhibitoria. La metilación del derivado **162d** (IC₅₀: 7,13 nM), produjo un aumento en la inhibición (**163d**, IC₅₀: 3,40 nM). Esto no solo presenta relevancia a nivel biológico, sino que permitiría plantear rutas sintéticas más sencillas para la obtención de estos compuestos, sin la necesidad de emplear grupos protectores (**Esquema IV.19**).



Esquema IV.19. Ruta de síntesis para derivados que presentan indoles metilados (**163**), sin necesidad de emplear grupos protectores.

A fines comparativos, se muestran los valores de IC₅₀ de los inhibidores de MAO-B Rasagilina, Safinamida y Selegina, drogas comerciales empleadas en el tratamiento de la EP. A excepción del compuesto **157b**, los derivados triazol-indol de la primera serie resultaron más potentes que la droga de referencia Rasagilina. Los derivados halogenados **157c** y **163d** fueron más potentes que los inhibidores Safinamida y Selegilina. Además, cabe destacar que ninguno de los compuestos evaluados inhibió la enzima MAO-A en concentraciones iguales o menores a 50 μM, por lo cual se puede aseverar que esta familia de inhibidores es altamente selectiva a la isoforma MAO-B, tal como lo reflejan los elevados índices de selectividad (I.S, **Tabla IV.1**).

Los derivados de la segunda serie resultaron ser inhibidores menos potentes de la enzima MAO-B, presentando valores de IC₅₀ en el rango micromolar. En particular, esto se evidencia para los compuestos que presentan los mismos sustituyentes en posición 5 del indol, el compuesto **165d** (IC₅₀: 2330 ± 530 nM), en relación a **162d** (IC₅₀: 7,13 ± 1,27 nM), presentan diferencias de tres órdenes de magnitud en su actividad inhibitoria.

Por otra parte, se evaluaron los derivados que presentan grupos $-\text{NO}_2$ y $-\text{CN}$, que no habían sido sintetizados en la primera serie. El derivado nitrado (**165f**, IC_{50} : $5,41 \pm 0,16 \mu\text{M}$) fue el menos activo de la serie, mientras que el derivado con un grupo nitrilo fue el compuesto más potente (**165e**, IC_{50} : $0,83 \pm 0,20 \mu\text{M}$). Respecto a la actividad sobre la isoforma MAO-A, se observaron los mismos resultados que para los compuestos de la primera serie, es decir, ninguno de los compuestos inhibió la enzima MAO-A en concentraciones iguales o menores a $50 \mu\text{M}$. Esto determina que los compuestos de la segunda serie también son selectivos a la isoforma MAO-B (véase I.S, **Tabla IV.1**).

Respecto a los ensayos de SPR, es notable que los únicos derivados que producen aumentos significativos en la señal, es decir que logran inhibir la interacción KEAP1-NRF2, corresponden a los compuestos más potentes de cada serie para la inhibición de *h*-MAO-B (**157c**, serie 1, y **165e**, serie 2). Aunque estos datos son preliminares, y es necesario realizar experimentos adicionales para confirmar el efecto del derivado **165e** en la activación de la vía de señalización NRF2-ARE, podemos considerar a este compuesto como un punto de partida para el desarrollo de nuevos inhibidores duales de *h*-MAO-B, y de la interacción proteína-proteína NRF2-KEAP1.

IV.4. Sección experimental

IV.4.1. Instrumentos y equipos

La separación cromatográfica automatizada se realizó en un equipo IsoleraOne (Biotage), empleando distintos cartuchos de sílica Biotage ZIP KP-Sil 50m. Para los análisis HPLC-MS se utilizó el cromatógrafo Waters analytical HPLC-MS (Alliance Watters 2690), equipado con una columna SunFire C18 4.6 _50 mm, un detector de matriz de fotodiodos ($1 \frac{1}{4}$ 214e274 nm), y un espectrómetro de masas cuadrupolo (Micromass ZQ). Los espectros de RMN se realizaron empleando un espectrómetro Varian INOVA-300 (300 MHz), o Varian Unity-500 (500 MHz). Los espectros de masa de alta resolución (HRMS), se obtuvieron usando un equipo Agilent 1200 Series LC, acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo (QTOF).

IV.4.2. Ensayos biológicos

IV.4.2.i. Inhibición enzimática de MAO

Para realizar los ensayos se utilizó MAO humana recombinante comercial (Aldrich). La producción de H_2O_2 , catalizada por ambas isoformas de MAO, se detectó empleando 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (reactivo Amplex Red). Este reactivo, no fluorescente, es altamente sensible a la presencia de H_2O_2 , reaccionando con el mismo en presencia de peroxidasa de rábano picante (HRP, *horseradish peroxidase*), para producir un producto fluorescente (Resorufina). La fluorescencia se midió en un lector de microplacas, FLUOstar Optima (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Germany) Ex5340 Em590. Los experimentos se llevaron a cabo en buffer 50 mM fosfato potásico (pH = 7,4), a 27°C durante 30 minutos. La mezcla de reacción contiene 0,5 mU/ml MAO B o 2 mU/ml MAO A, 1 mM p-tiramina, 1U/ml HRP y 200 μ M Amplex red.

IV.4.2.ii. Expresión de KEAP1

IV.4.2.ii.a. Construcción del dominio Kelch pET15b-6xHis

El fragmento de dominio Kelch humano del vector pcDNA3.1-KEAP1-HA se subclonó en pET15b-6xHis usando los siguientes oligonucleótidos, que introducen un sitio de restricción NdeI en ambos extremos (*Forward*: 5'-TCGACATATGCAGGCAGTGCCCTGCCGCCGC-3') y BamHI (*Reverse*: 5'-TGACGGATCCTTAGGTGACGGCCACACCCAC-3').

IV.4.2.ii.b. Expresión del dominio Kelch recombinante pET15b-6xHis

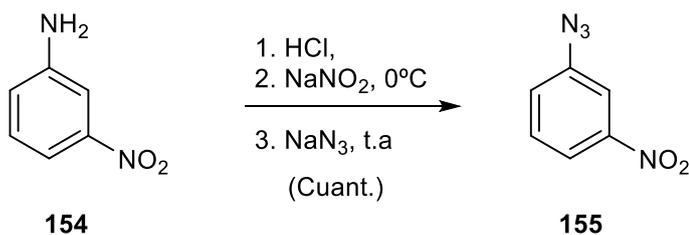
El vector de expresión Kelch-pET15b-6xHis se usó para expresar el dominio de Kelch de KEAP1 como una proteína de fusión 6xHis en la cepa BL21-DE3 de *Escherichia coli*, cultivada durante la noche a 37 ° C en medio LB. La expresión se indujo a una densidad óptica A550 = 0,4

añadiendo isopropil-1-tio- β -d-galactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 0,5 mM. Después de 3 h 37°C de temperatura, las células se lisaron y la proteína de fusión 6xHIS se purificó utilizando el sistema de purificación ProBond (Invitrogen), tal como lo describe el fabricante.

IV.4.2.iii. Ensayos de resonancia de plasmones superficiales (SPR)

Los experimentos de SPR se realizaron a 20°C con un aparato Biacore X-100 (Biacore, GE) en PBS-T, con DTT 1 mM y 2% de DMSO (tampón de funcionamiento) a 25°C. La proteína del dominio Kelch KEAP1 se inmovilizó en un chip sensor CM5 (Biacore, GE) siguiendo el método estándar de acoplamiento de amina.²³⁵ La superficie de carboximetil dextrano de la celda de flujo 2 se activó con una inyección de 7 min de EDC 0,4 M y NHS 0,1 M (proporción 1 : 1). La proteína se acopló a la superficie con una inyección de 7 min, a 100 μ g / ml, en acetato de sodio 10 mM, pH 5,0. Los ésteres de N-hidroxisuccinimida sin reaccionar se inactivaron mediante una inyección de 7 min de etanolamina-HCl 0,1 M (pH 8,0). El nivel de inmovilización fue de 7000 RU. Se usó como referencia la celda de flujo 1, tratada como una celda de flujo 2 sin proteína (procedimiento de acoplamiento de amina). Antes de su uso, se diluyeron varias veces soluciones madre de compuestos (10 mM) hasta una concentración final de 100 μ M en el tampón de ejecución. Típicamente, se inyectó una serie de compuestos diferentes en el chip sensor a un caudal de 45 μ l / min durante un período de 1 minuto, seguido de un período de disociación de 1 minuto. Después del proceso de disociación, se realizó un tratamiento de lavado adicional sobre las celdas de flujo, con una solución de DMSO al 50%. No se necesitó regeneración. Los datos de los sensogramas fueron doblemente referenciados, y corregidos con solvente usando el software Biaevaluation X-100 (Biacore, GE).

²³⁵ Johnsson, B.; Löfås, S.; Lindquist, G. *Anal. Biochem.* **1991**, *198* (2), 268–277.

IV.4.3. Síntesis de 3-nitrofenilazida (**155**)

Se disolvió 3-nitroanilina, **154** (1,38 g, 10 mmoles) en HCl 6M (10 mL) en baño de hielo a 0°C. Posteriormente se adicionó por goteo una solución de NaNO₂ (1,035 g, 15 mmoles) en H₂O (15 mL). Se dejó reaccionar la mezcla durante 30 min, tras lo cual se agregó, también por goteo, una solución de NaN₃ (2,6 g, 40 mmoles) en H₂O (50 mL). Se dejó la mezcla bajo agitación por 2h a t.a. Se extrajo con AcOEt (3 x 30 mL), y se lavó con H₂O (20 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄, y se concentró a presión reducida, obteniéndose la azida **155** (1,64 g, cuant., sólido naranja, p.f: 55-56°C).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.01 (dd, *J* = 2.1, 1.0 Hz, 1H), 7.89 (t, *J* = 2.2 Hz, 2H), 7.54 (t, *J* = 8.1, 0.4 Hz, 2H), 7.34 (ddd, *J* = 8.1, 2.2, 0.9 Hz, 2H).

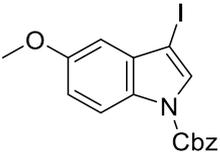
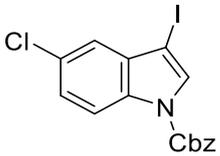
IV.4.4. Procedimiento general para la síntesis de 3-iodoindoles protegidos con Cbz



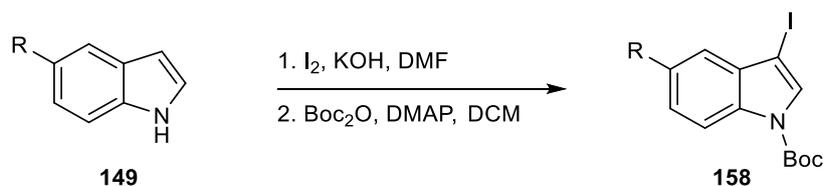
Sobre una solución del indol (**149**, 2 mmoles), en DMF seca (5 mL), se adicionó KOH (4 mmoles), y se dejó bajo agitación durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó una solución de I₂ (2 mmoles) en DMF (2 mL), y se dejó bajo agitación durante 1h, observándose la progresiva decoloración de la solución. Una vez finalizada la reacción, se volcó la mezcla sobre H₂O/hielo, y el precipitado resultante se filtró sobre placa porosa, lavando con agua. Finalmente, el sólido se secó por destilación azeotrópica con tolueno, obteniéndose de esta manera los correspondientes 3-iodoindoles (**150**), que fueron empleados inmediatamente en la siguiente reacción, sin previa purificación.

Protección con Cbz

Sobre una solución del 3-iodoindol (**150**, 2 mmoles) en DMF (10 mL), se adicionó NaH (60% en aceite mineral, 0,120 g, 3 mmoles) a 0°C, y se dejó reaccionar durante 20 min. Posteriormente, se agregó cloroformiato de bencilo (CbzCl, 0,57 mL, 4 mmoles), y se agitó a temperatura ambiente durante 3h. Sobre la mezcla de reacción se agregó H₂O (10 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (10 mL) y NaCl (sat.) (10 mL), se secaron y concentraron. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (AcOEt/Hexano, 5-15 %), obteniéndose los correspondientes 3-iodoindoles protegidos (**151**).

	<p>N-Cbz-3-iodoindol (151a) (0,550 g, 76%)</p> <p>$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.51 – 7.28 (m, 8H), 5.45 (s, 2H).</p> <p>HPLC-MS (Agua-MeCN 15→95%, g.t. 10 min), tiempo de retención: 11,73 min, $m/z = 378.041$ [M + H]⁺, calculado para [C₁₆H₁₂INO₂ + H]⁺ 377,999.</p>
	<p>N-Cbz-3-iodo-5-metoxiindol (151b) (0,610 g, 75%)</p> <p>$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H), 7.65 (s, 1H, 2-H), 7.29-6.71 (m, 8H), 5.45 (s, 2H).</p> <p>HPLC-MS (Agua-MeCN 15→95%, g.t. 10 min), tiempo de retención: 10,74 min, $m/z = 408.334$ [M + H]⁺, calculado para [C₁₆H₁₂INO₂ + H]⁺ 408,009.</p>
	<p>N-Cbz-5-cloro-3-iodoindol (151b) (0,675 g, 82%)</p> <p>$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.50 – 7.40 (m, 5H), 7.40 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J = 8.8, 2.1$ Hz, 1H), 5.45 (s, 2H).</p>

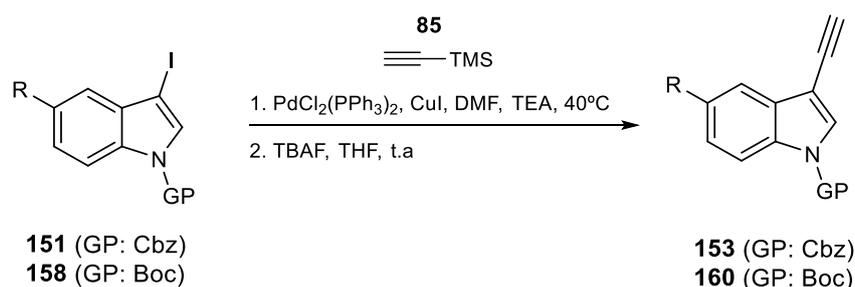
IV.4.5. Procedimiento general para la síntesis de 3-iodoindoles protegidos con Boc



Obtención de 3-iodoindoles, véase **Sección IV.4.4**, p.152. Sobre una solución del correspondiente 3-iodoindol (**150**, 2 mmoles), en DCM (10 mL) y DMAP (0,012g, 0,05 mmoles), se adicionó Boc_2O (0,480 g, 2,2 mmoles) a 0°C, y se dejó reaccionar durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó NH_4Cl (sat.) (10 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron y concentraron. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (AcOEt/Hexano, 5-15 %), obteniéndose los correspondientes 3-iodoindoles protegidos (**158**).

	<p style="text-align: center;">N-Boc-3-iodoindol (158a) (0,686 g, cuant.)</p> $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.63 – 7.18 (m, 3H), 1.67 (s, 9H).
	<p style="text-align: center;">N-Boc-5-bromo-3-iodoindol (158d) (0,840 g, cuant.)</p> $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.04 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, 1H), 1.63 (s, 9H).
	<p style="text-align: center;">N-Boc-5-ciano-3-iodoindol (158e) (0,611 g, 83%)</p> $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.33 (s, 1H), 8.27 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.85 (dd, $J = 8.4, 1.9$ Hz, 1H), 1.62 (s, 9H).

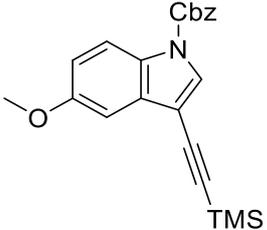
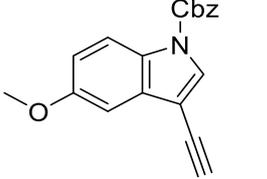
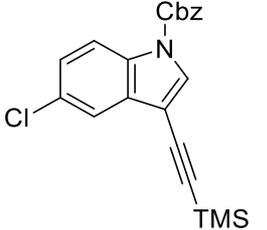
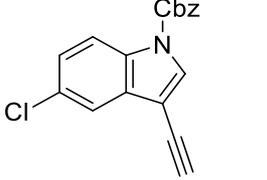
IV.4.6. Procedimiento general para el acoplamiento de Sonagashira

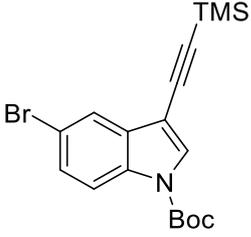
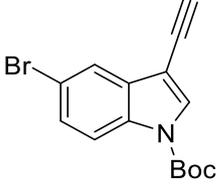
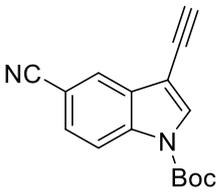


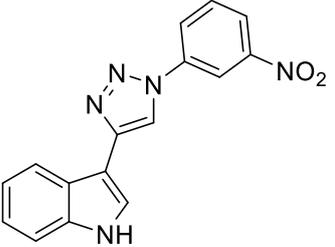
Sobre una solución del 3-iodoindol protegido (**151** o **158**, 1,5 mmol), en DMF/TEA (4:1, 8 mL), se adicionó $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0,052 g, 5 mol%), CuI (0,014 g, 5 mol%), y trimetilsililacetileno (0,640 mL, 4,5 mmoles). Se dejó reaccionar la mezcla a 40°C , bajo atmósfera de N_2 , durante 3h. Posteriormente, se agregó H_2O (10 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H_2O (10 mL) y NaCl (sat.) (10 mL), se secaron y concentraron. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (AcOEt/Hexano , 5-20%), obteniéndose los correspondientes productos de acoplamiento (**152** o **159**).

Posteriormente, estos intermediarios fueron disueltos en THF (10 mL) y tratados con TBAF (1M en THF, 2 mL). Se dejó reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min, tras lo cual se concentró y se retomó con AcOEt (10 mL). Se agregó H_2O (10 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron y concentraron. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (AcOEt/Hexano , 5-20 %), obteniéndose los correspondientes alquinos (**153** o **160**).

	<p style="text-align: center;">N-Cbz-3-(2-(trimetilsilil)etinil)indol (152a) (0,495 g, 95%)</p> $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.51 – 7.28 (m, 8H), 5.45 (s, 2H).
	<p style="text-align: center;">N-Cbz-3-etinilindol (153a) (0,372 g, 95%)</p> $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.73 – 7.65 (m, 1H), 7.51 – 7.29 (m, 6H), 5.46 (s, 2H), 3.25 (s, 1H).

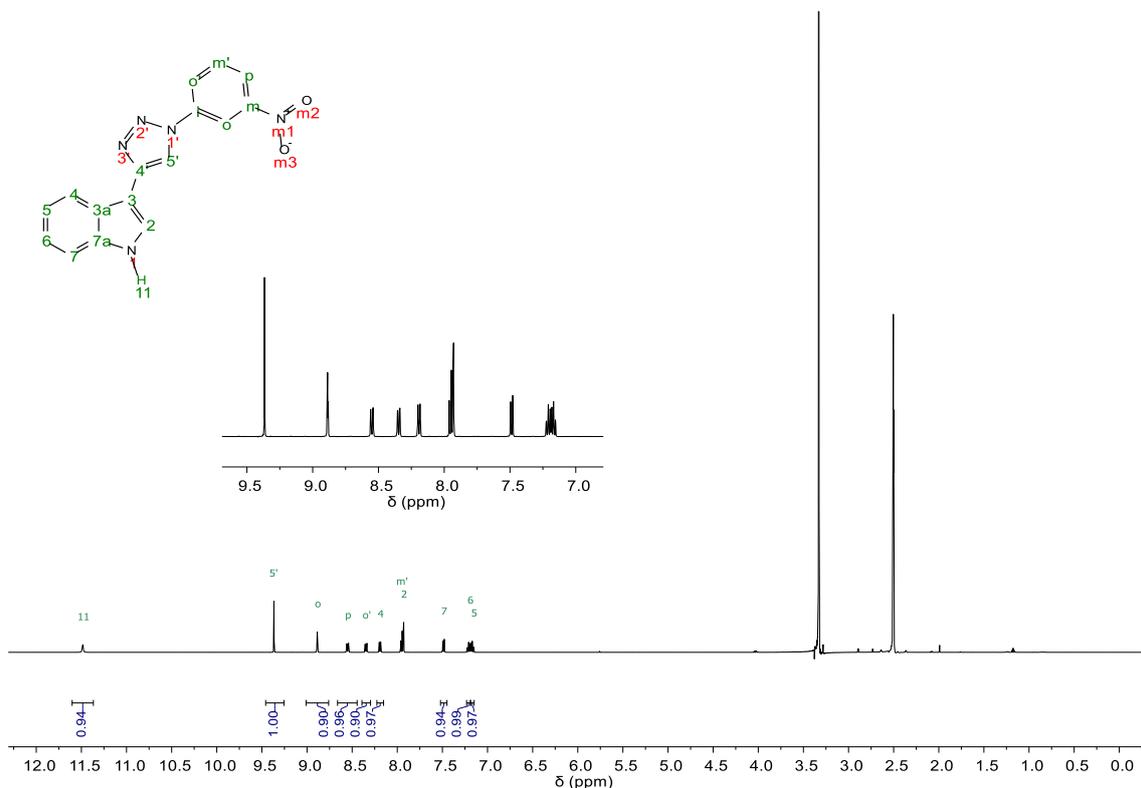
	<p>N-Cbz-5-metoxi-3-(2-(trimetilsilil)etinil)indol (152b) (0,566 g, cuant.)</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.51 – 7.32 (m, 5H), 7.11 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H), 7.01 – 6.93 (m, 1H), 5.44 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.25 (s, 1H), 0.25 (s, 9H).</p>
	<p>N-Cbz-3-etinil-5-metoxiindol (153b) (0,458 g, cuant.)</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.51 – 7.33 (m, 5H), 7.11 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H), 6.97 (dd, <i>J</i> = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 5.44 (s, 2H), 3.88 (s, 4H), 3.25 (s, 1H).</p>
	<p>N-Cbz-5-cloro-3-(2-(trimetilsilil)etinil)indol (152c) (0,573 g, cuant.)</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.62 (dd, <i>J</i> = 2.1, 0.6 Hz, 1H), 7.50 – 7.38 (m, 3H), 7.31 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 5.44 (s, 2H), 0.28 (s, 9H).</p>
	<p>N-Cbz-5-cloro-3-etinilindol (153c) (0,464 g, cuant.)</p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.65 (dd, <i>J</i> = 2.1, 0.5 Hz, 1H), 7.50 – 7.38 (m, 5H), 7.33 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 5.45 (s, 2H), 3.25 (s, 1H).</p>

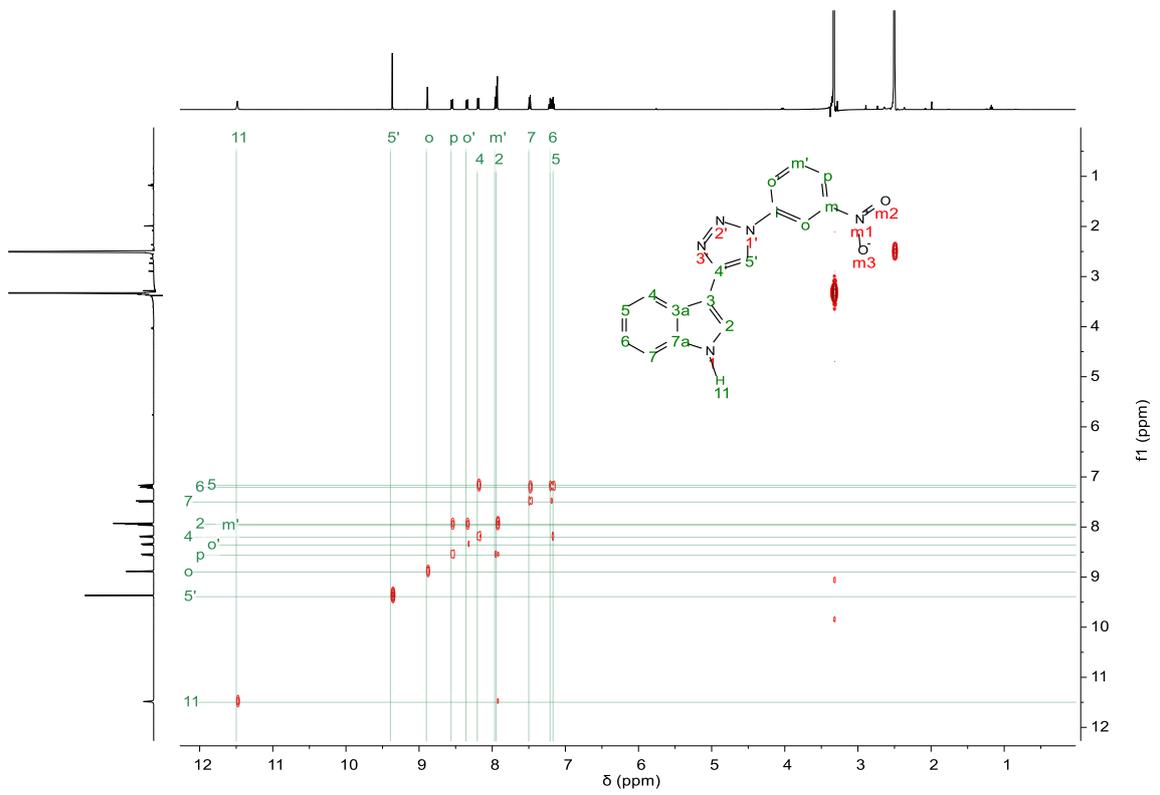
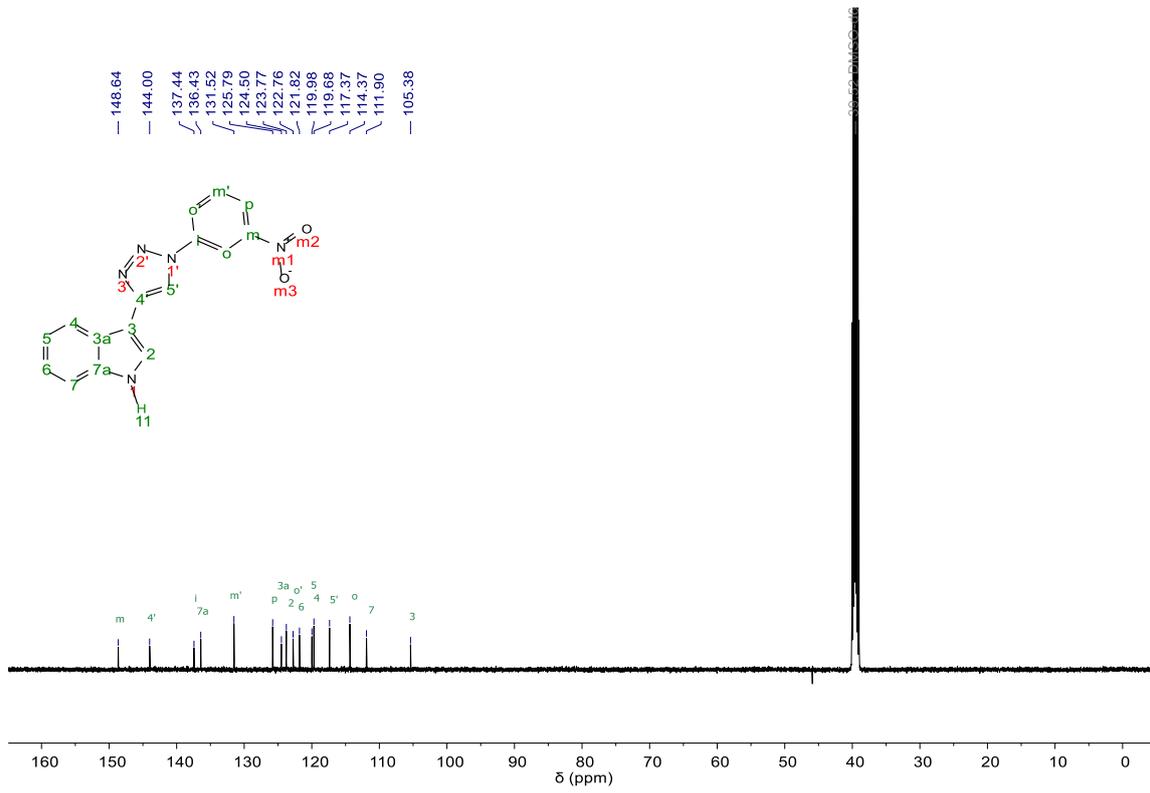
	<p>N-Boc-5-bromo-3-(2-(trimetilsilil)etnil)indol (159d) (0,560 g, 95%)</p> <p>^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.77 (dt, J = 2.3, 1.1 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.44 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 1.65 (s, 9H), 0.29 (s, 9H).</p>
	<p>N-Boc-5-bromo-3-ethnilindol (160d) (0,333 g, 73%)</p> <p>^1H-RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.82 – 7.79 (m, 1H), 7.79 (s ancho, 1H), 3.24 (s, 1H), 1.66 (s, 9H).</p>
	<p>N-Boc-ciano-3-ethnilindol (160e) (0,012 g, 3%)</p> <p>^1H-RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8.25 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.02 (dd, J = 1.6, 0.7 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.61 (dd, J = 8.7, 1.6 Hz, 1H), 3.29 (s, 1H), 1.68 (s, 9H).</p> <p>HPLC-MS (Agua-MeCN 30→95%, t.g 5 min), tiempo de retención: 6,03 min, m/z = 267,847 [M + H]⁺, calculado para [C₁₆H₁₄N₂O₂ + H]⁺267,113.</p>
<p>t.g: tiempo de gradiente. Cálculo de m/z: https://www.chemcalc.org/?ionizations=&mf=C22H24NO3Si%2B</p>	

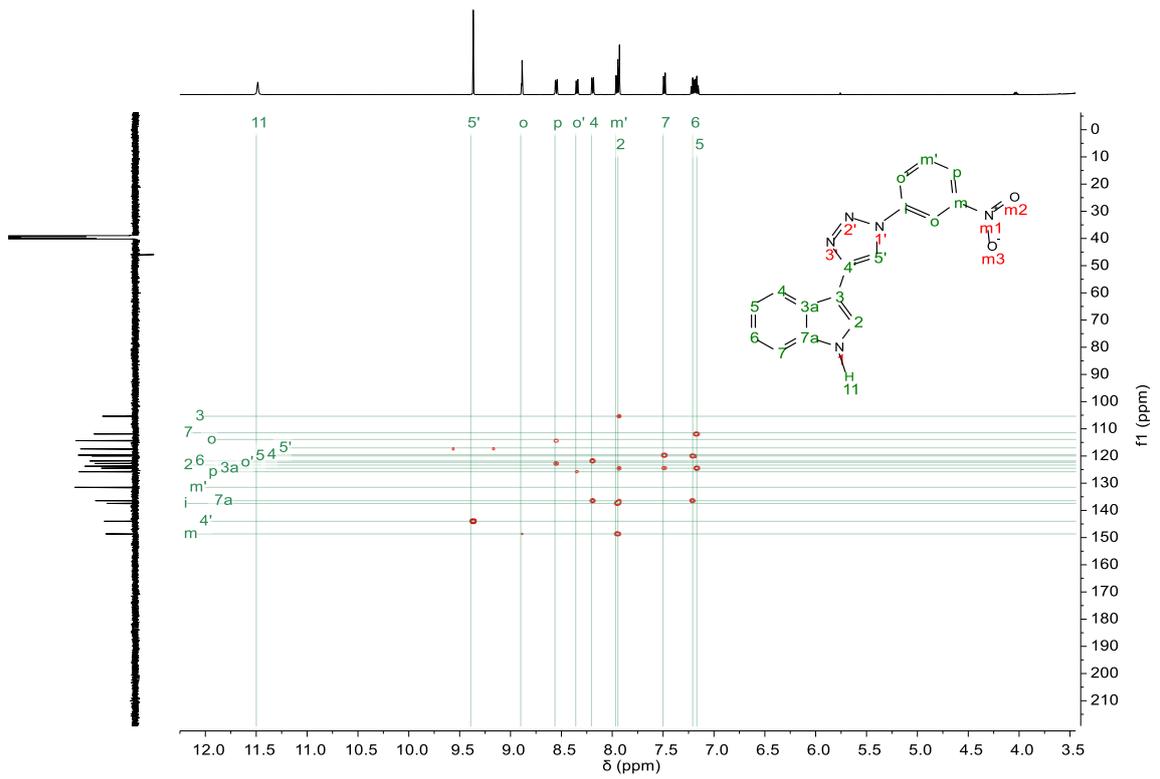
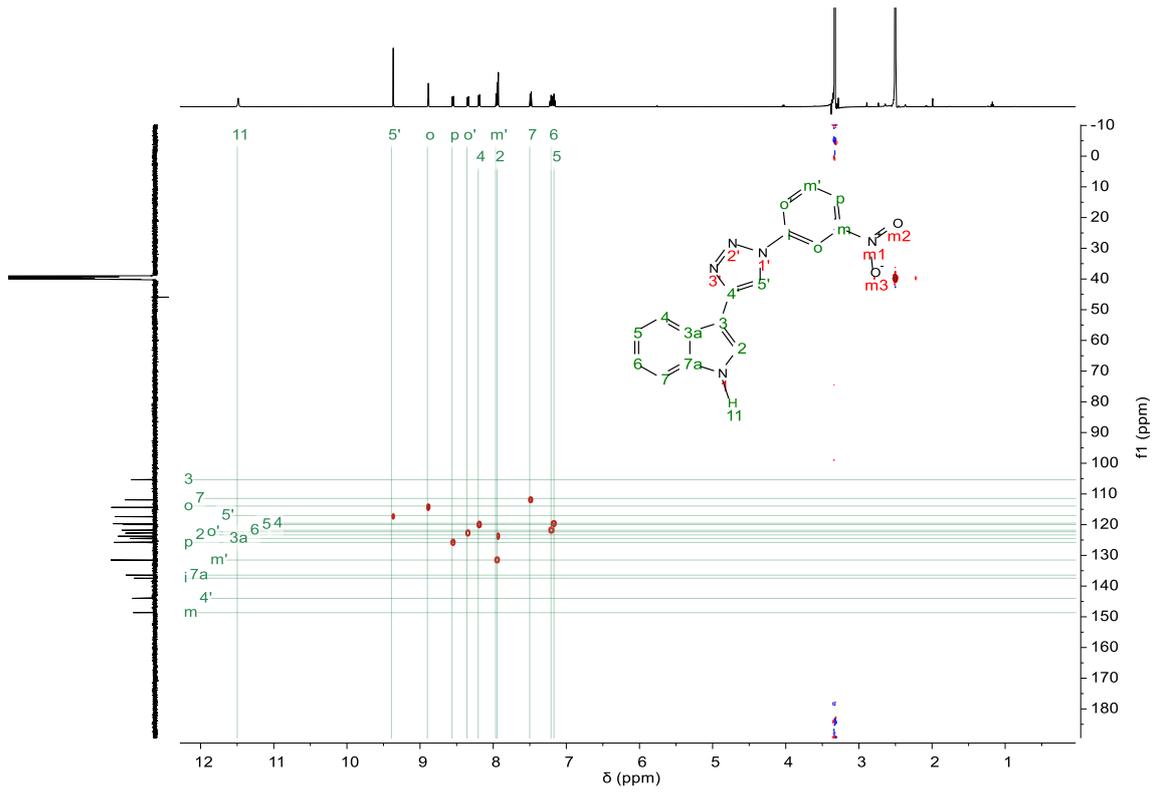
	<p>3-(1-(3-nitrofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1H-indol (157a)</p> <p><i>CuAAC: Método A (198 mg, 90%). Desprotección (30 mg, 22%)</i> <i>CuAAC: Método B (162 mg, 80%). Desprotección (27 mg, 22%)</i></p> <p>HRMS (ESI+): m/z: 305.09253 [M]⁺. Calculado para [C₁₆H₁₁N₅O₂]⁺: 305.09127.</p> <p>Sólido naranja. p.f: 227-228,6 °C.</p>
<p>¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.49 (s, 1H), 9.37 (s, 1H), 8.89 (t, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H), 8.55 (ddd, <i>J</i> = 8.2, 2.2, 1.0 Hz, 1H), 8.35 (ddd, <i>J</i> = 8.2, 2.2, 1.0 Hz, 1H), 8.22 – 8.16 (m, 1H), 7.95 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.93 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H), 7.50 – 7.47 (m, 1H), 7.21 (ddd, <i>J</i> = 8.1, 7.0, 1.4 Hz, 1H), 7.17 (ddd, <i>J</i> = 8.1, 7.0, 1.4 Hz, 1H).</p> <p>¹³C-RMN (126 MHz, DMSO-d₆) δ 148.6, 144.0, 137.4, 136.4, 131.5, 125.8, 124.5, 123.8, 122.8, 121.8, 120.0, 119.7, 117.4, 114.4, 111.9, 105.4.</p>	

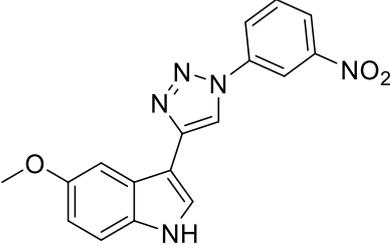
Los productos finales se caracterizaron mediante RMN (¹H- y ¹³C-) y RMN bidimensional (COSY, HSQC, HMBC).

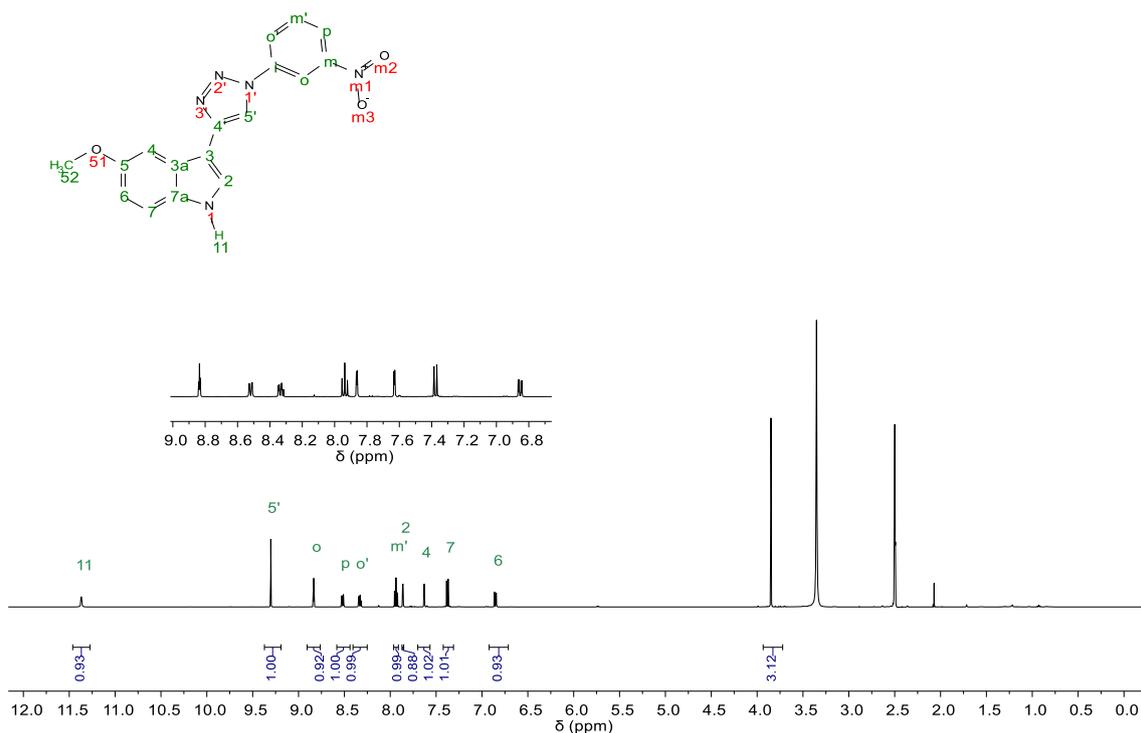
Espectros RMN (500 MHz) de **157a**

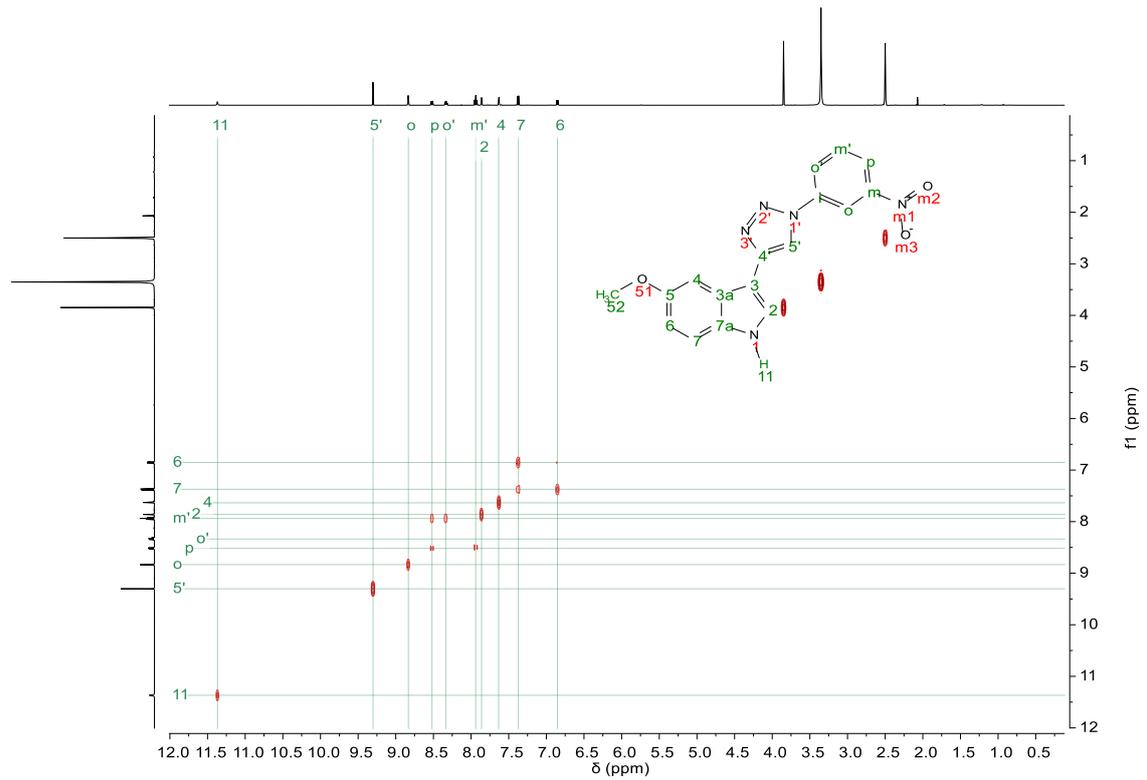
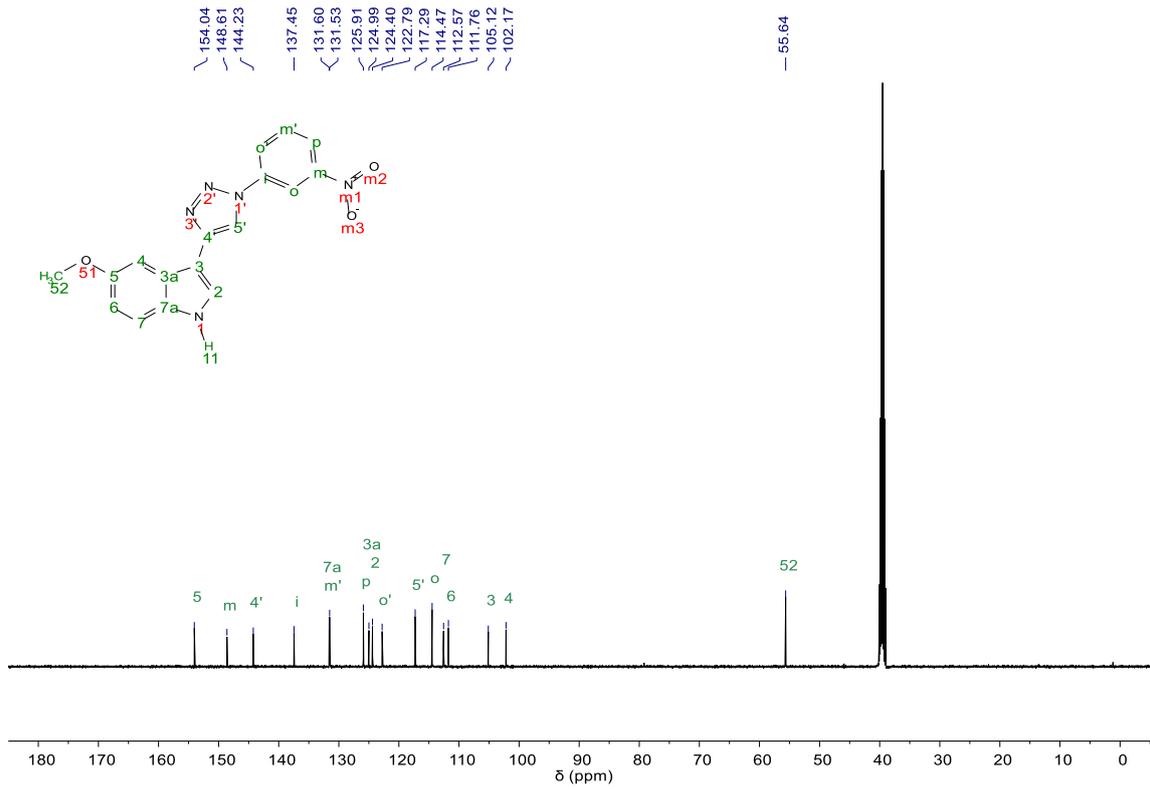


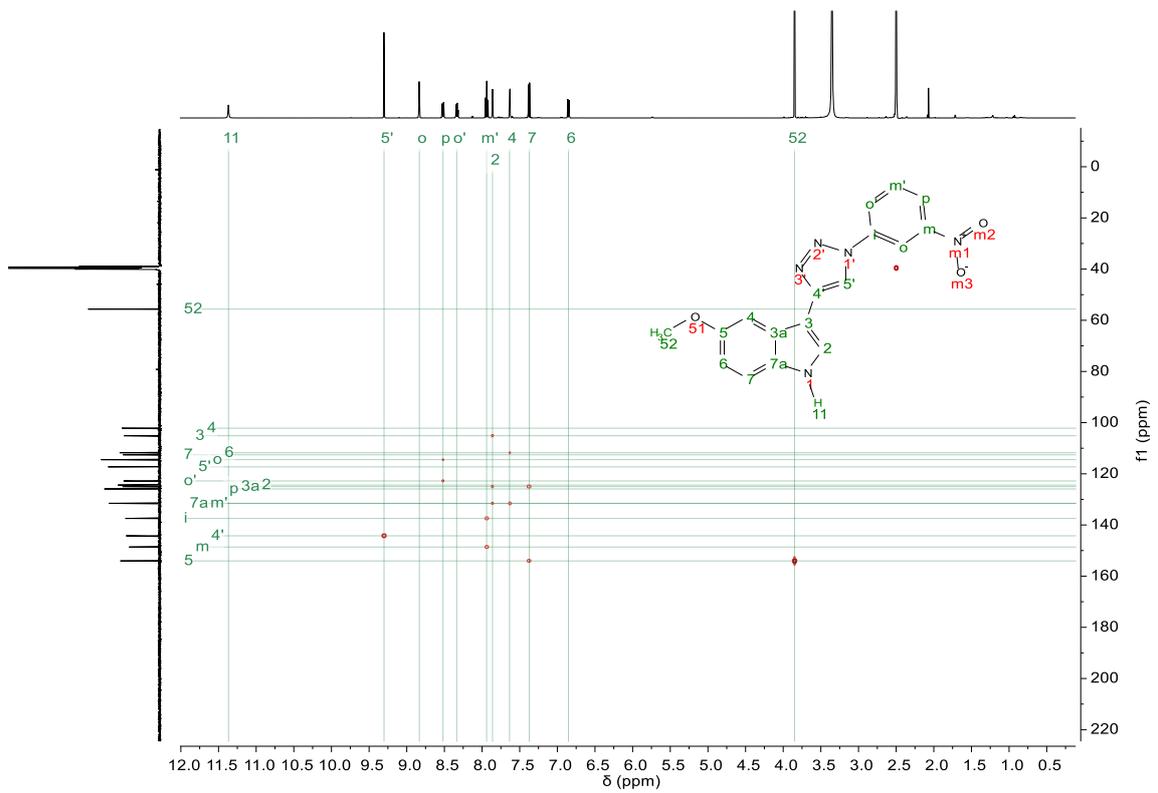
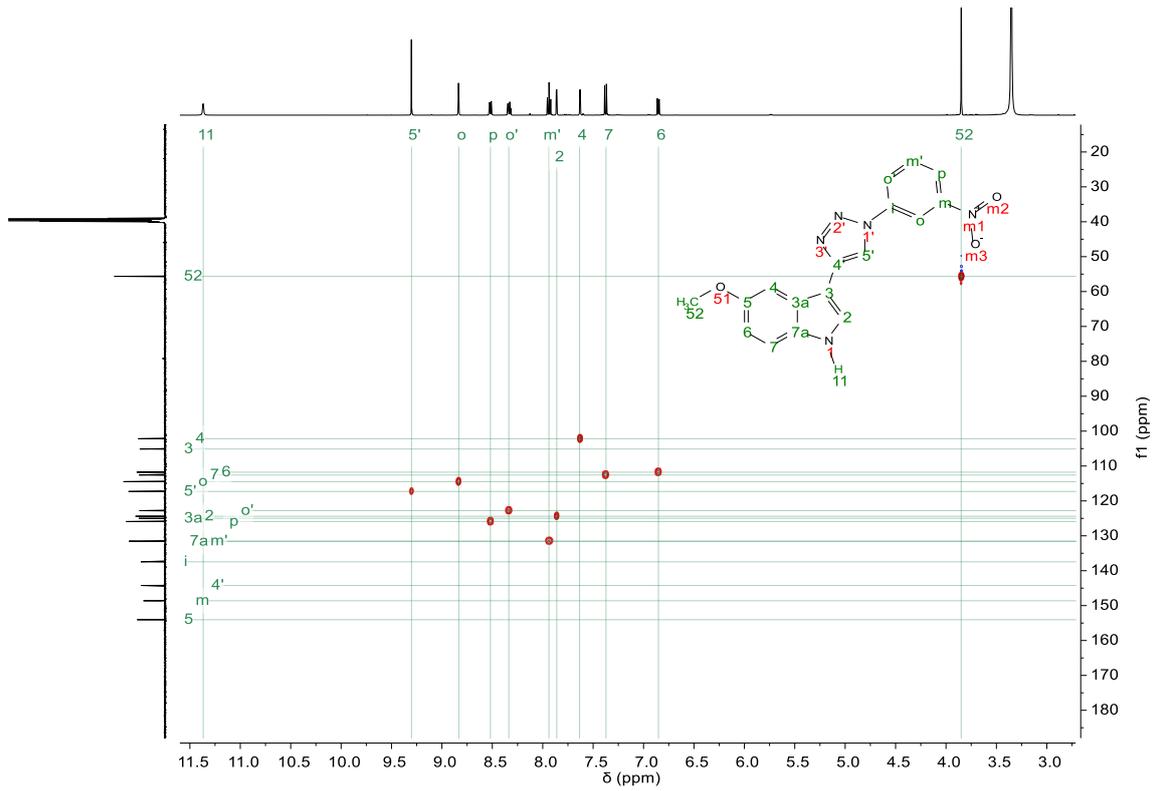


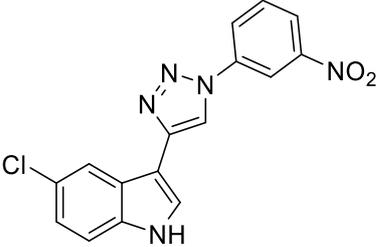


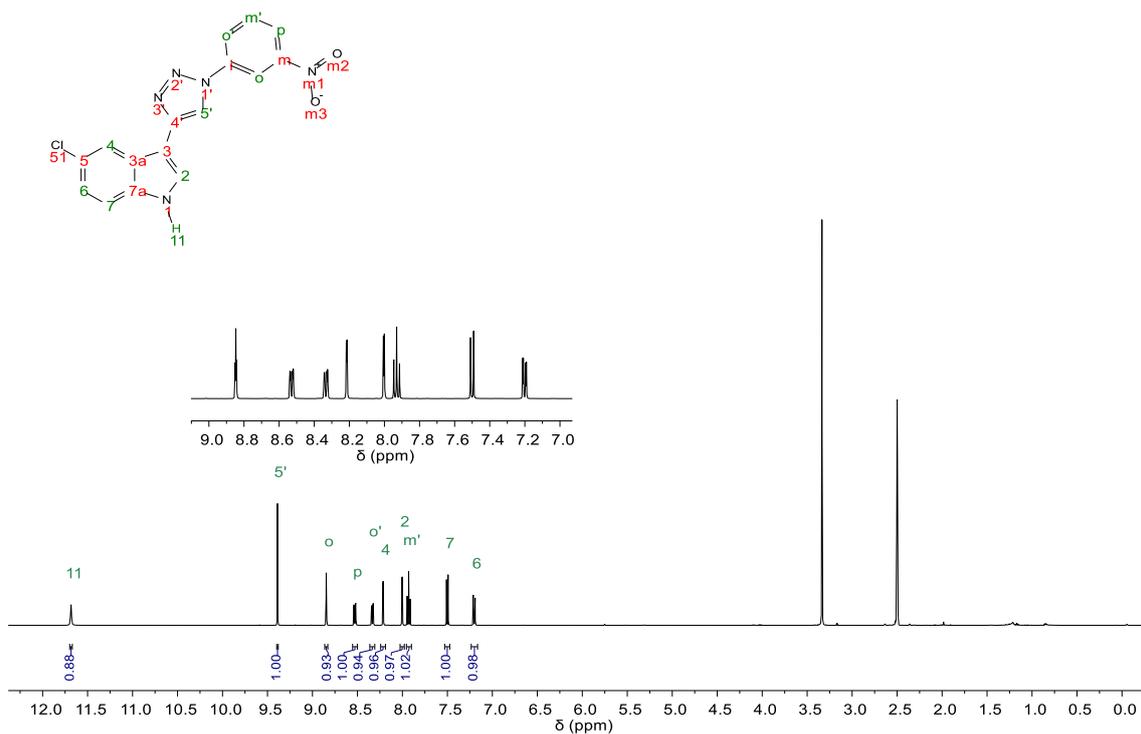
	<p>5-metoxi-3-(1-(3-nitrofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1H-indol (157b)</p> <p><i>Método A (171 mg, 73%). Desprotección (37 mg, 30%)</i></p> <p>HRMS (ESI+): m/z: 335.10222 [M]⁺. Calculado para [C₁₇H₁₃N₅O₃]⁺: 335.10184.</p> <p>Sólido naranja. p.f: 226-228 °C.</p>
<p>¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.37 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H), 9.30 (s, 1H), 8.84 (t, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H), 8.52 (ddd, <i>J</i> = 8.2, 2.2, 0.9 Hz, 1H), 8.34 (ddd, <i>J</i> = 8.2, 2.2, 0.9 Hz, 1H), 7.94 (t, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.86 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H), 7.63 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 7.38 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 6.85 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H).</p> <p>¹³C-RMN (126 MHz, DMSO-d₆) δ 154.0, 148.6, 144.2, 137.5, 131.6, 131.5, 125.9, 125.0, 124.4, 122.8, 117.3, 114.5, 112.6, 111.8, 105.1, 102.2, 55.6.</p>	

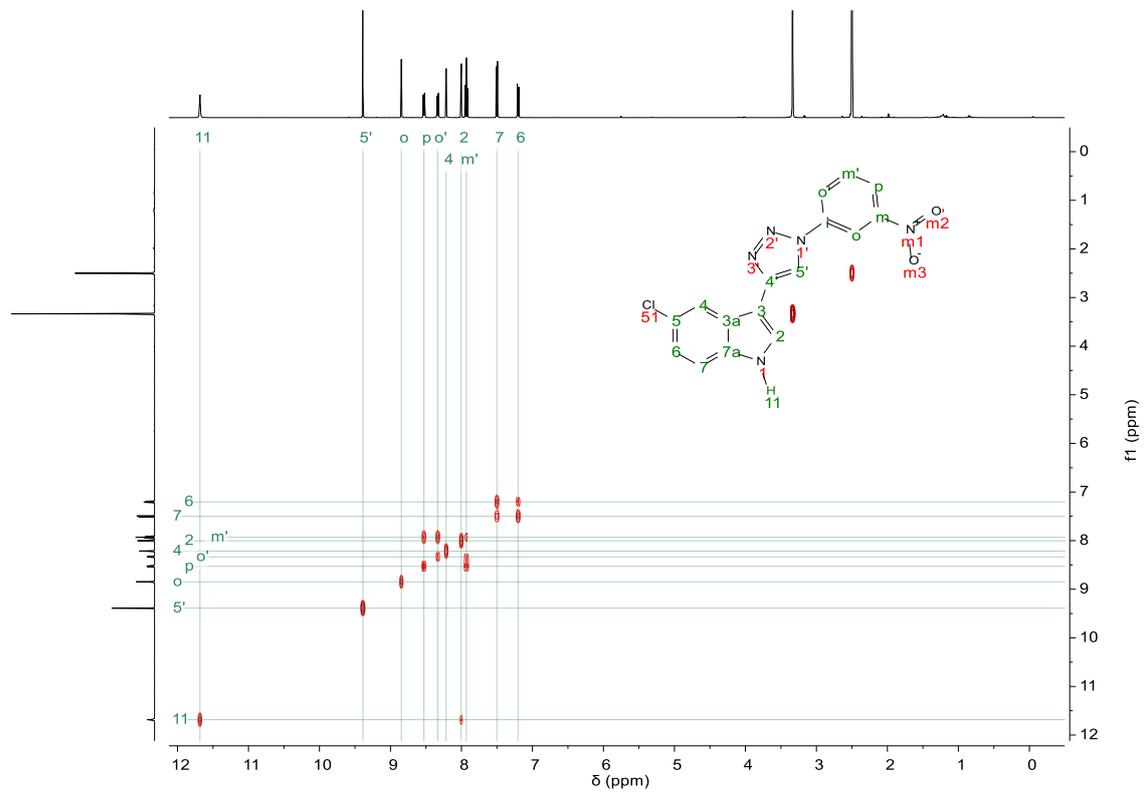
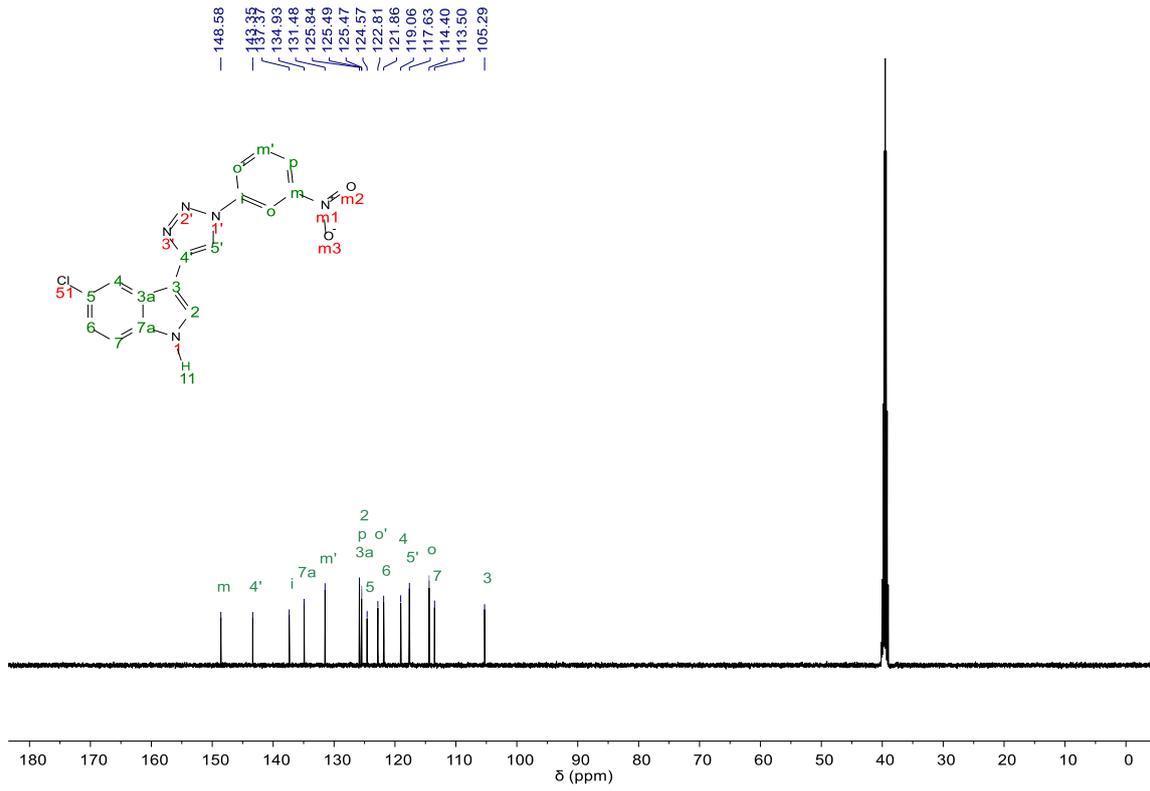
Espectros RMN (500 MHz) de **157b**

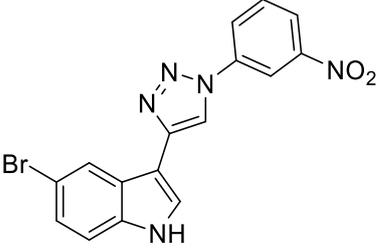


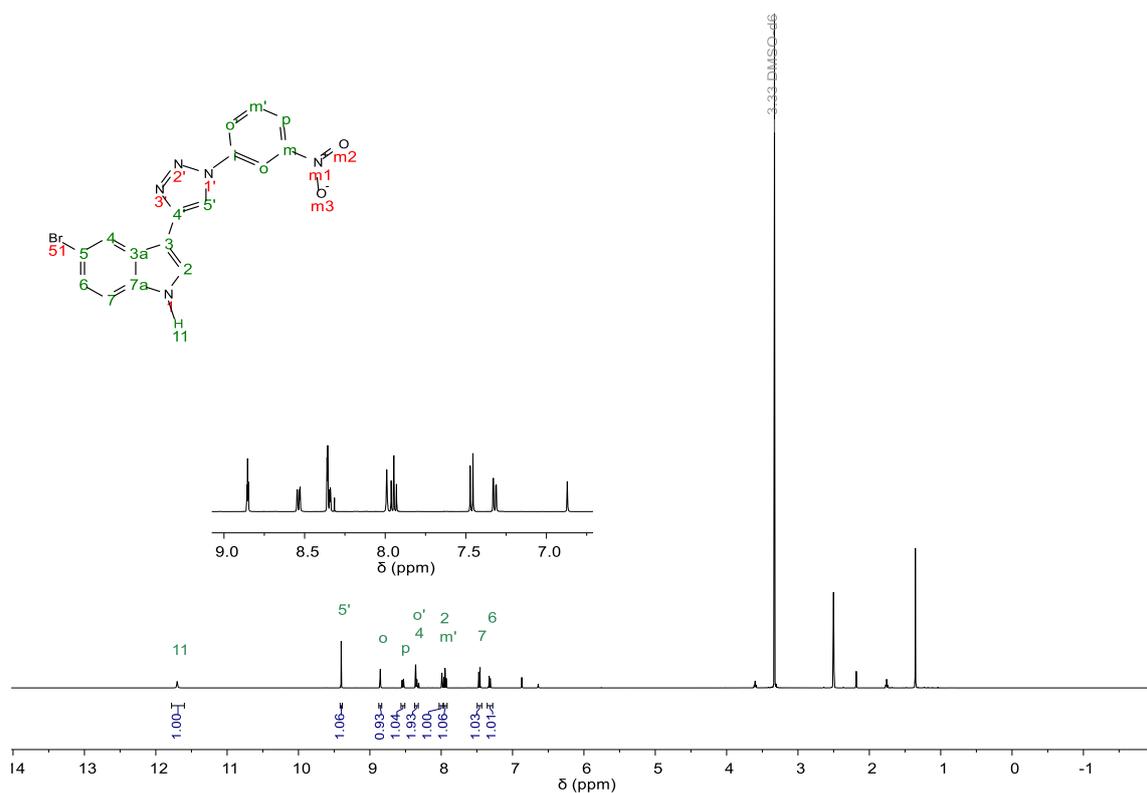


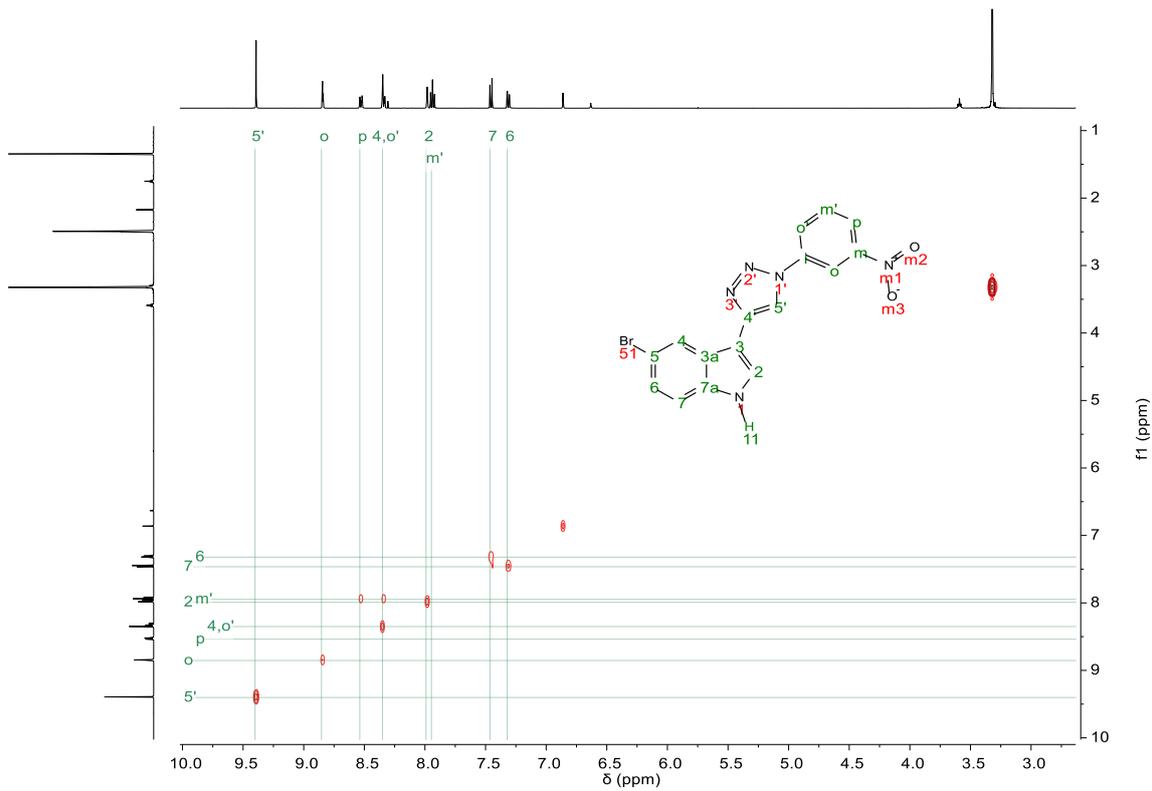
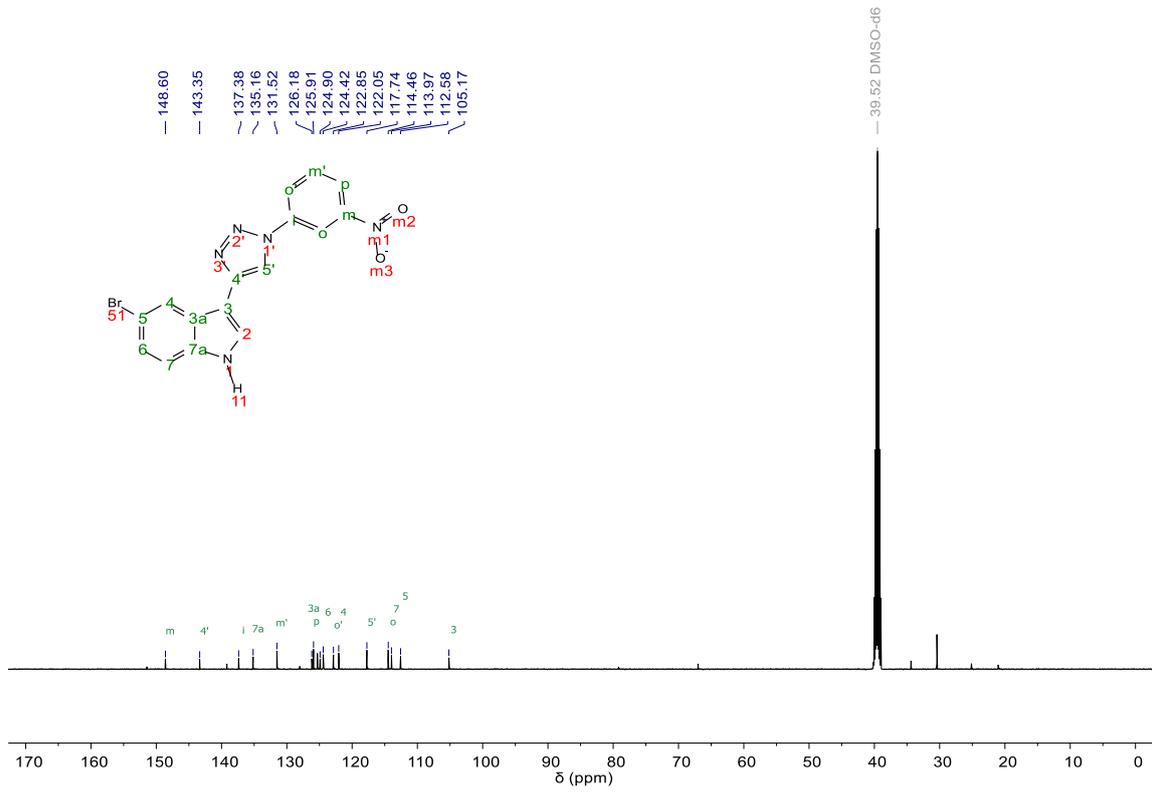
	<p>5-cloro-3-(1-(3-nitrofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1H-indol (157c)</p> <p><i>Método A (166 mg, 70%). Desprotección (43 mg, 36%)</i></p> <p>HRMS (ESI+): m/z: 339.0523 [M]⁺. Calculado para [C₁₆H₁₀ClN₅O₂]⁺: 339.0523.</p> <p>Sólido amarillo. p.f: 256,7-258 °C.</p>
<p>¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.68 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 9.39 (s, 1H), 8.85 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 8.53 (ddd, J = 8.2, 2.2, 0.9 Hz, 1H), 8.33 (ddd, J = 8.2, 2.2, 0.9 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.93 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.20 (dd, J = 8.6, 2.0 Hz, 1H).</p> <p>¹³C-RMN (126 MHz, DMSO-d₆) δ 148.6, 143.4, 137.4, 134.9, 131.5, 125.8, 125.5, 125.5, 124.6, 122.8, 121.9, 119.1, 117.6, 114.4, 113.5, 105.3.</p>	

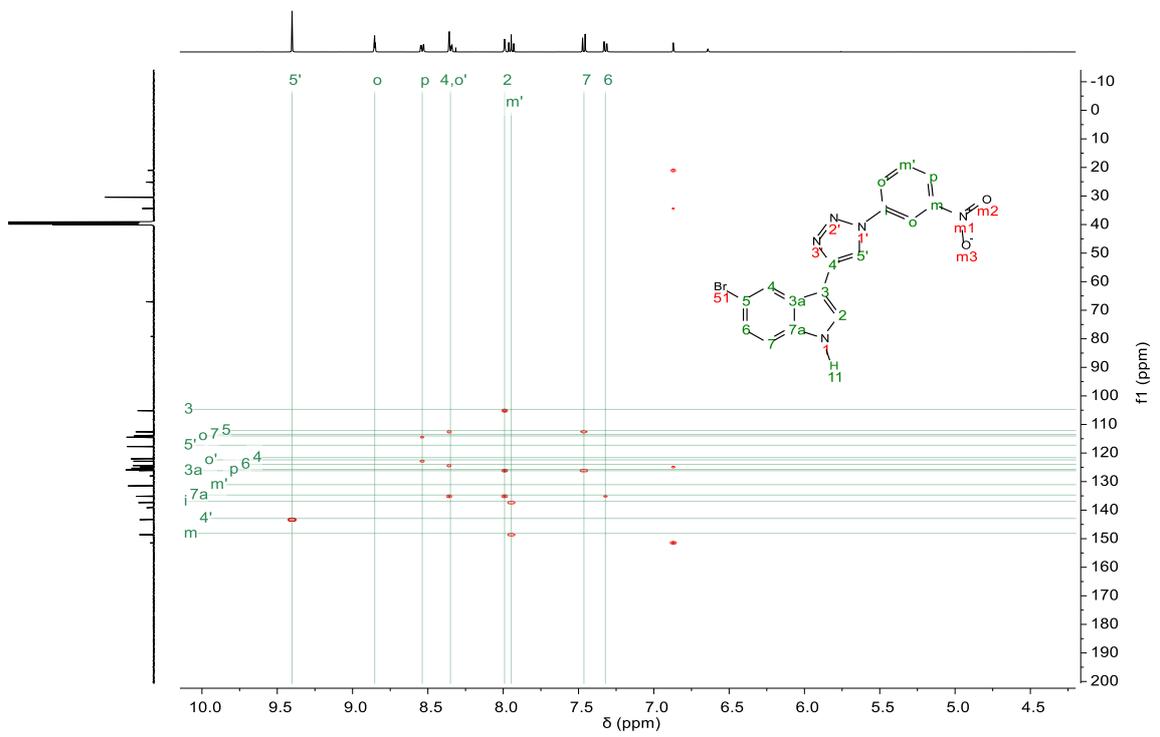
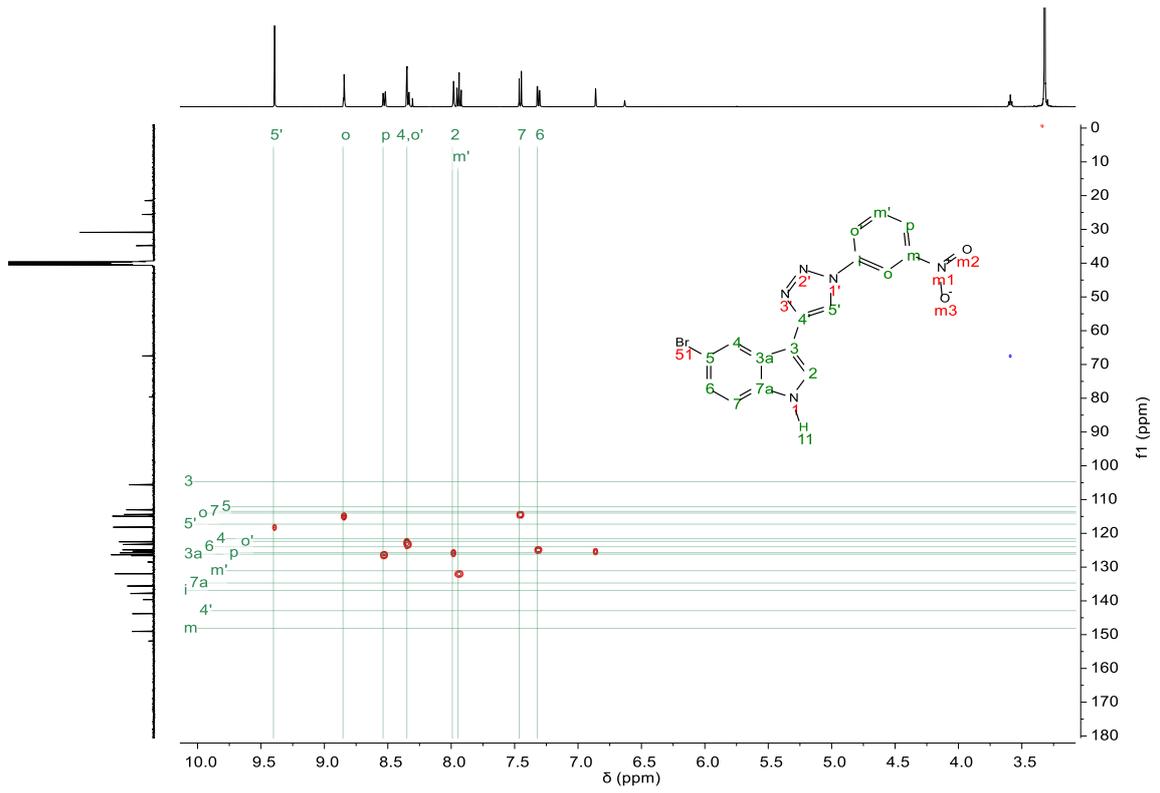
Espectros RMN (500 MHz) de **157c**

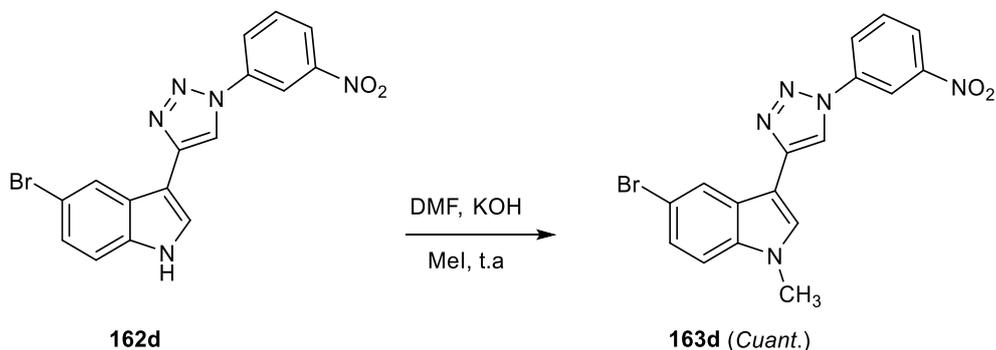


	<p>5-bromo-3-(1-(3-nitrofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1H-indol (161d)</p> <p><i>Método B (213 mg, 88%). Desprotección (74 mg, 44%)</i></p> <p>HRMS (ESI+): m/z: 383.00179 [M]⁺. Calculado para [C₁₆H₁₀BrN₅O₂]⁺: 383.00078.</p> <p>Sólido amarillo. p.f: 256,5-258 °C.</p>
<p>¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.68 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H), 9.39 (s, 1H), 8.85 (t, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H), 8.53 (ddd, <i>J</i> = 8.2, 2.2, 0.9 Hz, 1H), 8.33 (ddd, <i>J</i> = 8.2, 2.2, 0.9 Hz, 1H), 8.22 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 8.00 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H), 7.93 (t, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.50 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 7.20 (dd, <i>J</i> = 8.6, 2.0 Hz, 1H).</p> <p>¹³C-RMN (126 MHz, DMSO-d₆) δ 148.6, 143.4, 137.4, 134.9, 131.5, 125.8, 125.5, 125.5, 124.6, 122.8, 121.9, 119.1, 117.6, 114.4, 113.5, 105.3.</p>	

Espectros RMN (500 MHz) de **161d**



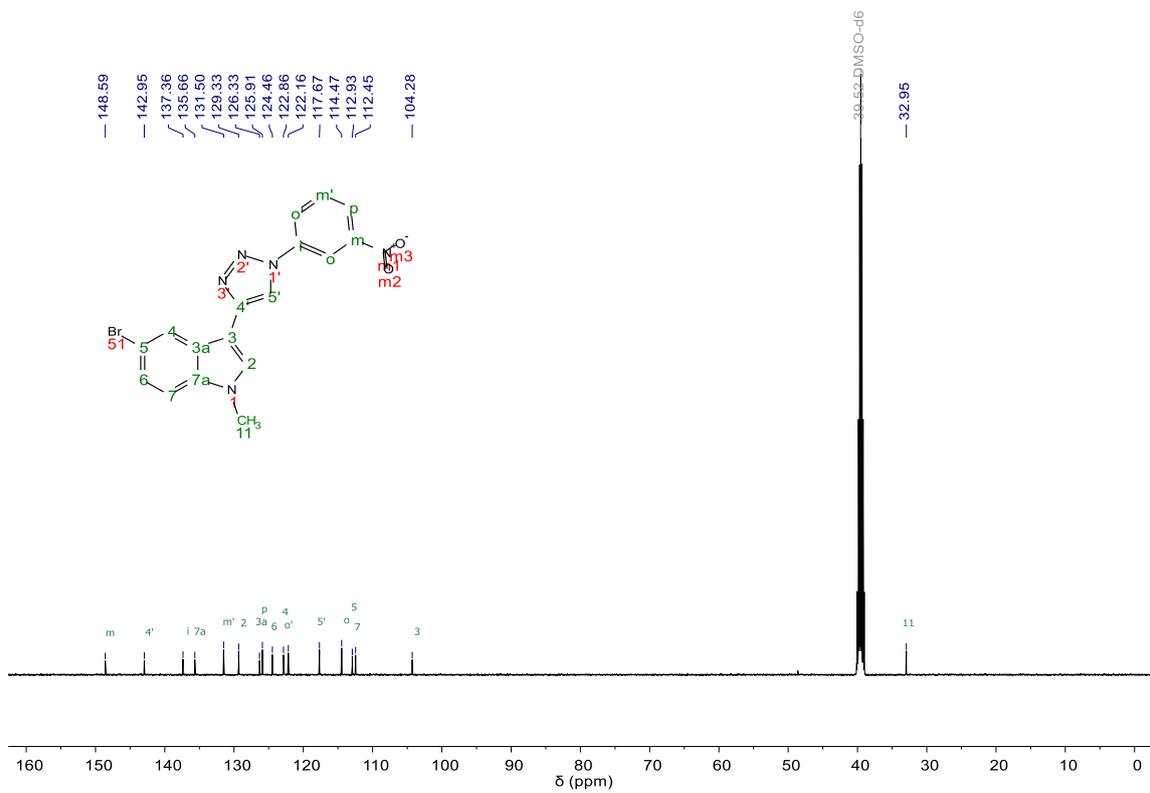
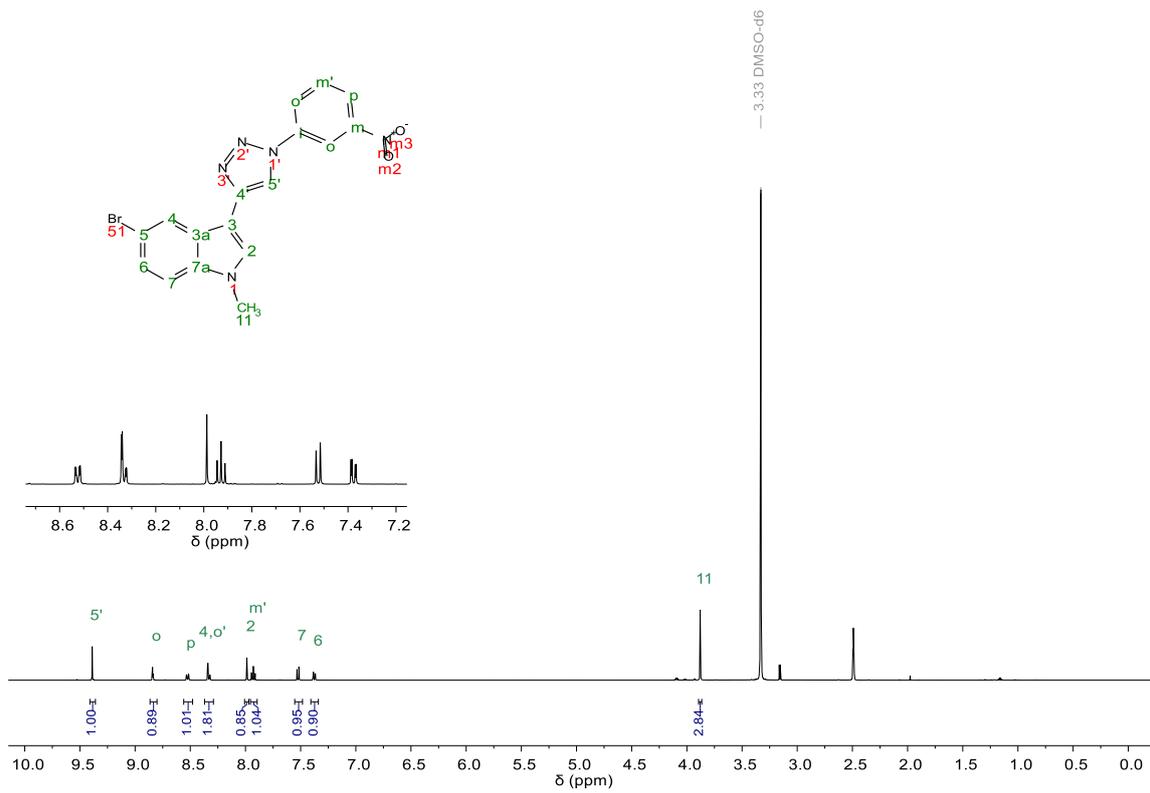


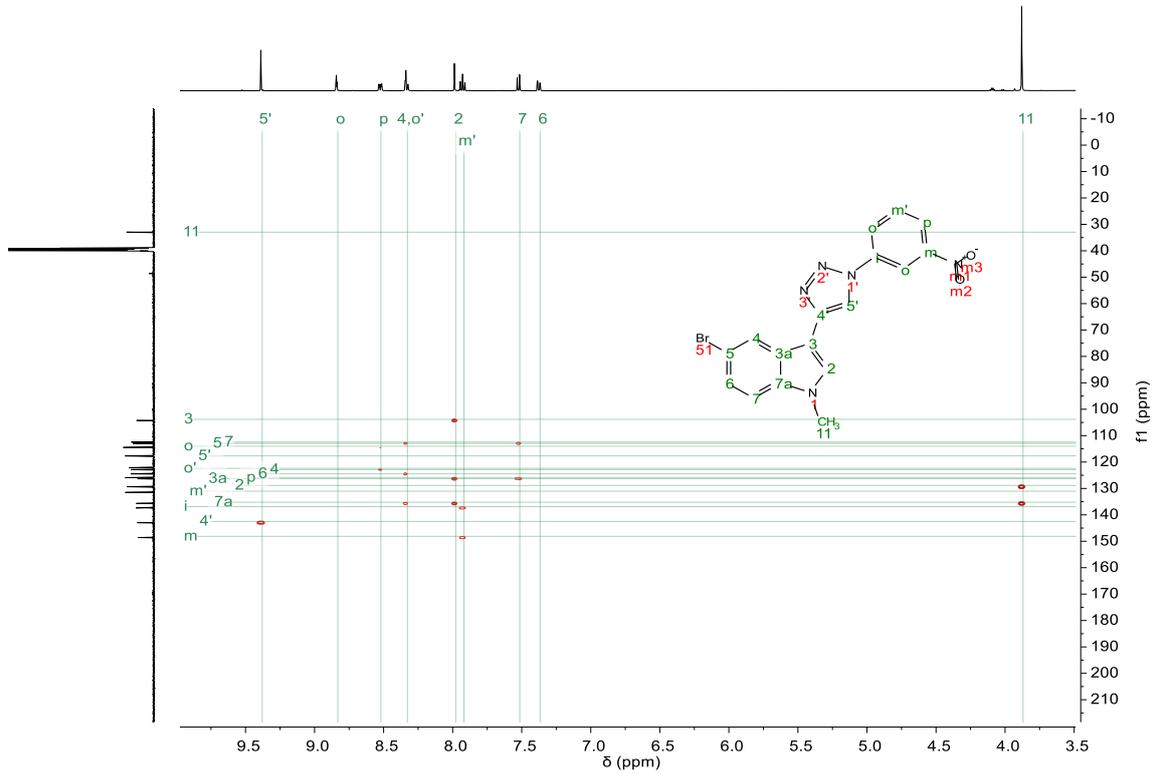
I.1.1.1. Metilación de indoles – Síntesis del derivado **163d**

Sobre una solución del compuesto **162d** (30 mg, 0,078 mmoles) en DMF seca (2 mL) se adicionó KOH (9 mg, 0,16 mmoles). Luego de 15 min de reacción a temperatura ambiente se adicionó por goteo MeI (0,010 mL, 0,078 mmoles). Transcurridos 30 min la reacción finalizó. Se adicionó H₂O (5 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaCl (sat.) (5 mL), se secaron y concentraron, obteniéndose el compuesto **163d** (31 mg, sólido naranja pálido, cuant.).

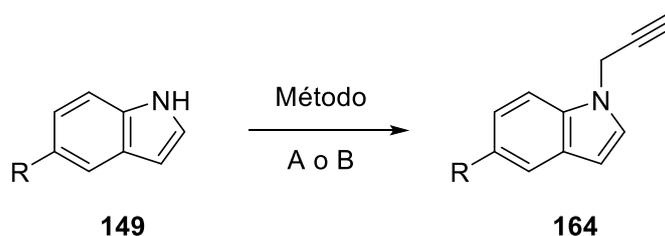
5-bromo-1-metil-3-(1-(3-nitrofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1H-indol (163d)	
	HRMS (ESI+): m/z: 397.01744 [M] ⁺ . Calculado para [C ₁₇ H ₁₂ BrN ₅ O ₂] ⁺ : 397.0161. p.f: 227,5-228,5°C (sólido naranja).
¹ H-RMN (500 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.39 (s, 1H), 8.84 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 8.52 (ddd, J = 8.2, 2.2, 1.0 Hz, 1H), 8.35 – 8.31 (m, 2H), 7.99 (s, 1H), 7.93 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 8.7, 1.9 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H).	
¹³ C-RMN (126 MHz, DMSO-d ₆) δ 148.6, 143.0, 137.4, 135.7, 131.5, 129.3, 126.3, 125.9, 124.5, 122.9, 122.2, 117.7, 114.5, 112.9, 112.5, 104.3, 32.9.	

Espectros RMN (500 MHz) de **163d**





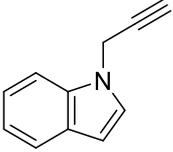
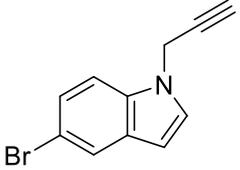
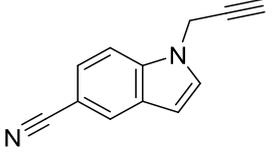
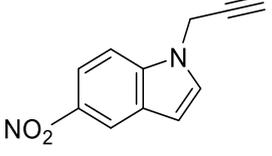
IV.4.8. Procedimiento general para la propargilación de indoles

**Método A**

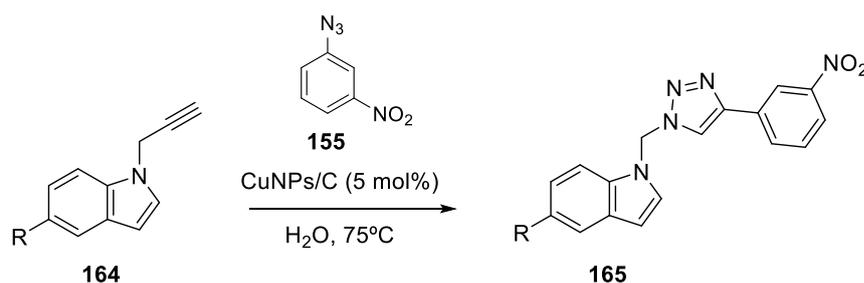
Sobre una solución del indol (**149**, 1 mmol) en DMF anhidra (5 mL), se adicionó KOH (0,067 g, 1,2 mmoles), agitándose bajo atmósfera de nitrógeno durante 10 min a 0°C. Posteriormente, se adicionó por goteo una solución de bromuro de propargilo (0,124 mL, 80% en tolueno, 1,2 mmoles) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 6h. Una vez finalizada la reacción, se agregó H₂O (20 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (10 mL) y NaCl (sat.) (10 mL), se secaron y concentraron. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (AcOEt: Hexano, 5-25 %) obteniéndose los correspondientes indoles propargilados (**164**).

Método B

Sobre una solución del indol (**149**, 1 mmol) en DMF anhidra (5 mL), se adicionó K₂CO₃ (0,207 g, 1,5 mmoles), agitándose bajo atmósfera de nitrógeno durante 10 min. Posteriormente, se adicionó por goteo una solución de bromuro de propargilo (0,124 mL, 80% en tolueno, 1,2 mmoles) y se dejó reaccionar a 60°C durante 3h. Una vez finalizada la reacción, se agregó H₂O (20 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (10 mL) y NaCl (sat.) (10 mL), se secaron y concentraron. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (AcOEt: Hexano, 5-25 %) obteniéndose los correspondientes indoles propargilados (**164**).

	<p style="text-align: center;">1-(2-propinil)-1H-indol (164a) <i>Método A (0,124 g, 80%)</i></p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) 7.56 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.31 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 7.19- 7.14 (m, 1H), 7.11 (d, <i>J</i> = 3.1 Hz, 1H), 7.09 -7.03 (m, 1H), 6.45 (d, <i>J</i> = 3.1 Hz, 1H), 4.76 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 2H), 2.32-2.27 (m, 1H).</p>
	<p style="text-align: center;">5-bromo-1-(2-propinil)-1H-indol (164d) <i>Método B (0,140 g, 60%)</i></p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (dd, <i>J</i> = 1.5, 0.9 Hz, 1H), 7.34 (dd, <i>J</i> = 8.7, 1.5 Hz, 1H), 7.28 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 7.21 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 1H), 6.48 (d, <i>J</i> = 3.2, 1H), 4.84 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 2H), 2.46 – 2.40 (m, 1H).</p>
	<p style="text-align: center;">5-ciano-1-(2-propinil)-1H-indol (164e) <i>Método A (0,177 g, 98%)</i></p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.00 – 7.96 (m, 1H), 7.48 – 7.46 (m, 2H), 7.33 (d, <i>J</i> = 3.3 Hz, 1H), 6.62 (d, <i>J</i> = 3.3 Hz, 1H), 4.91 (d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 2H), 2.46 (t, <i>J</i> = 2.6 Hz, 1H).</p>
	<p style="text-align: center;">5-nitro-1-(2-propinil)-1H-indol (164f) <i>Método B (0,176 g, 88%)</i></p> <p>¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.59 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H), 8.15 (dd, <i>J</i> = 9.1, 2.2 Hz, 1H), 7.44 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H), 7.37 (d, <i>J</i> = 3.3 Hz, 1H), 6.71 (d, <i>J</i> = 3.3 Hz, 1H), 4.93 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 2H), 2.48 (t, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H).</p>

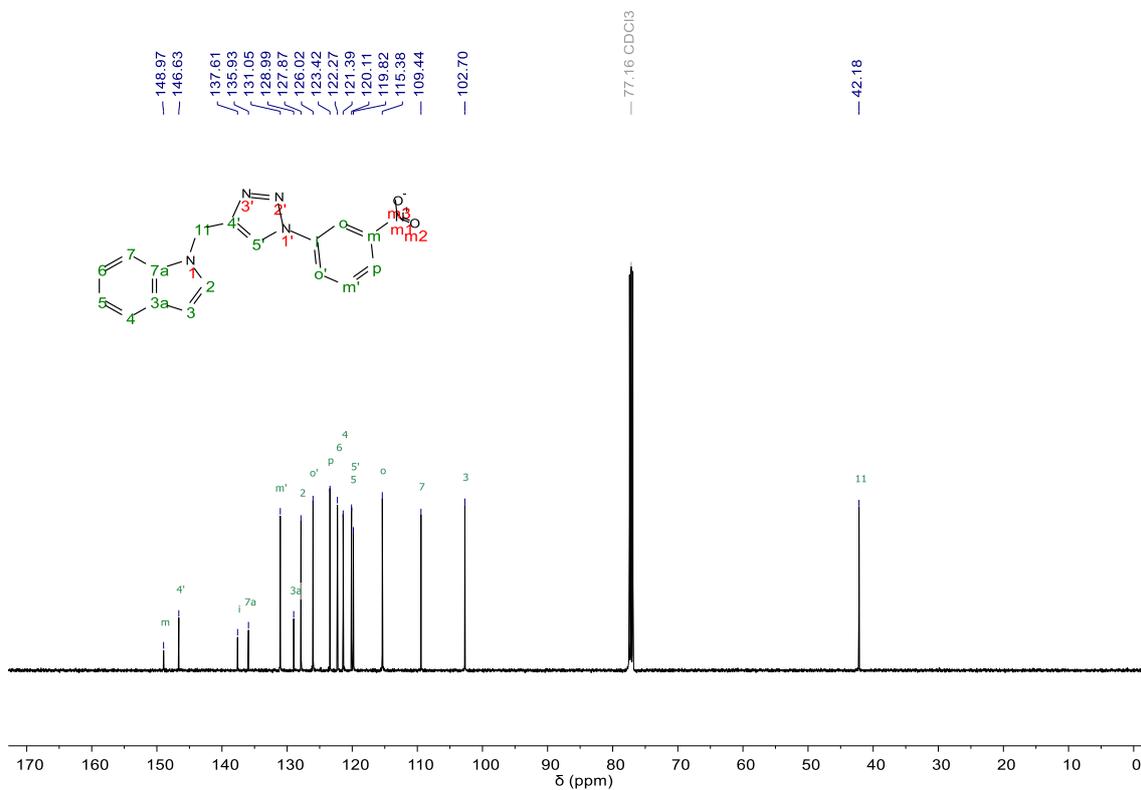
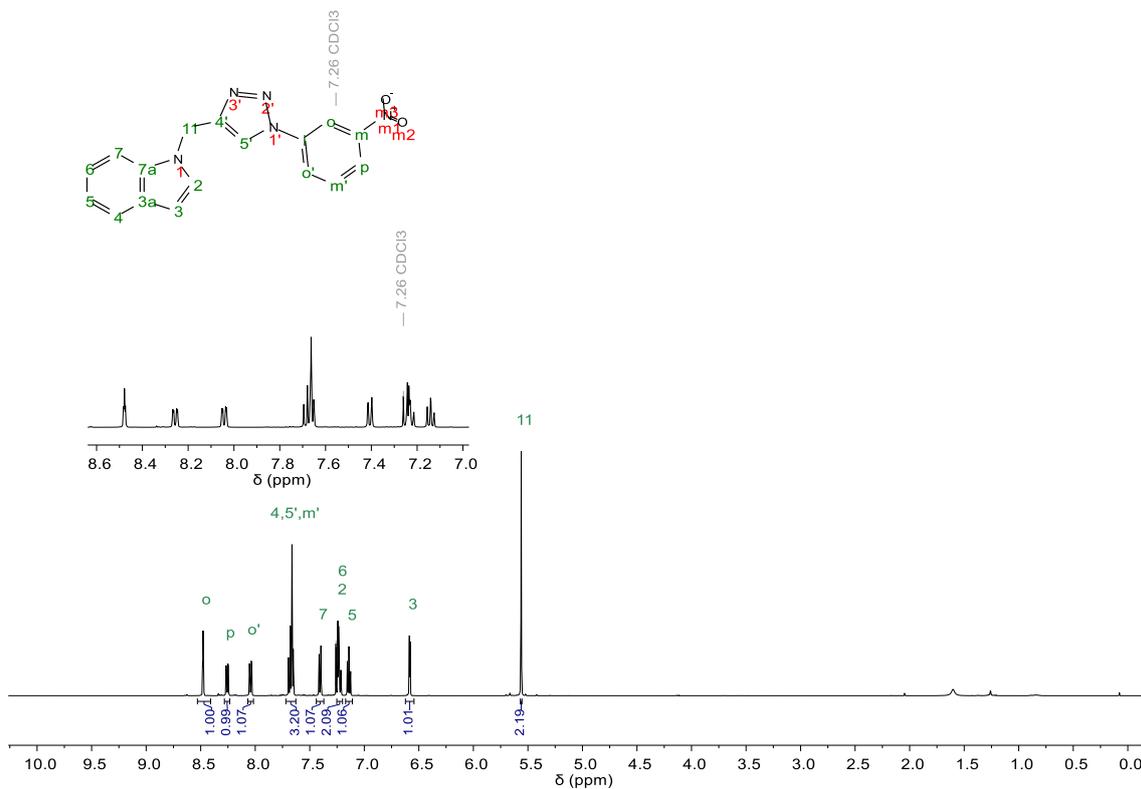
IV.4.9. Procedimiento general para la CuAAC empleando indoles propargilados

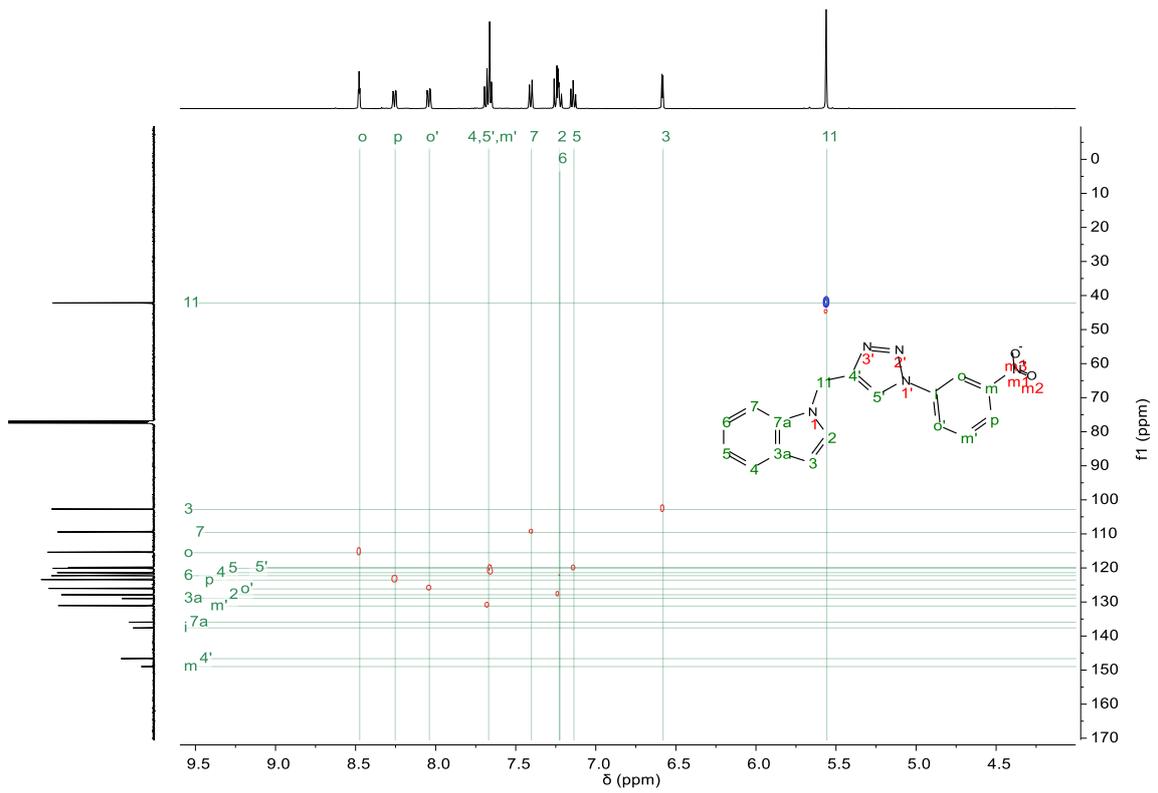
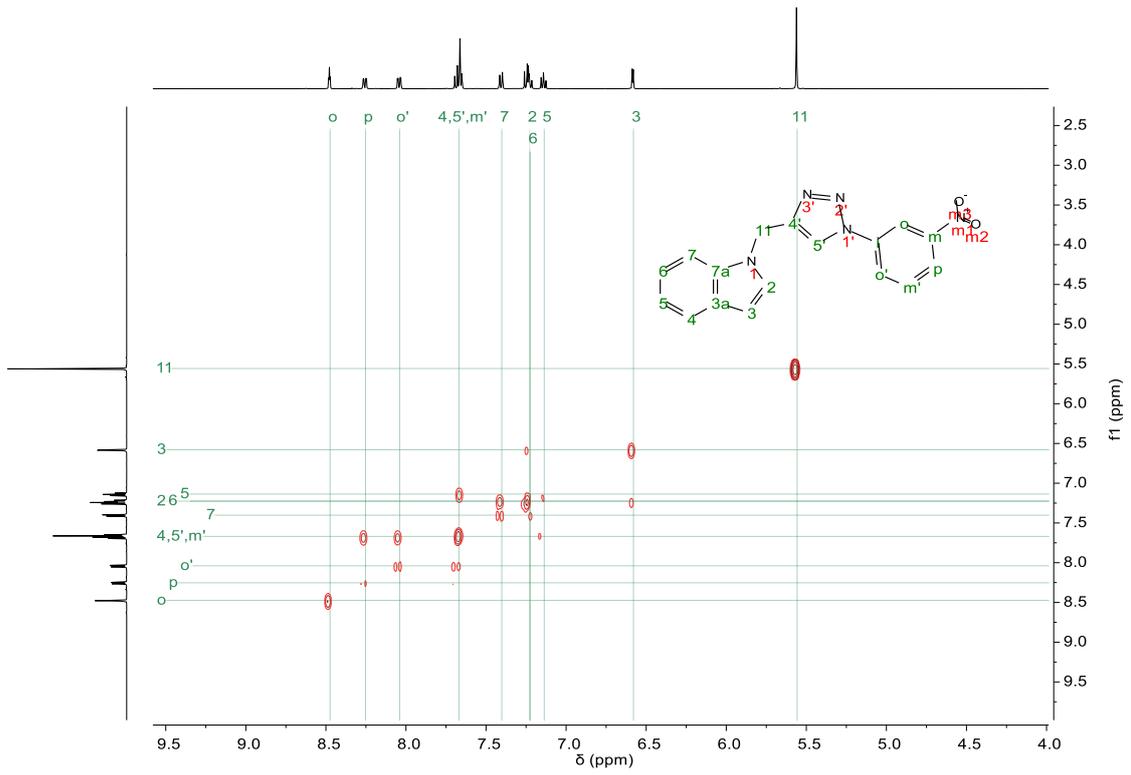


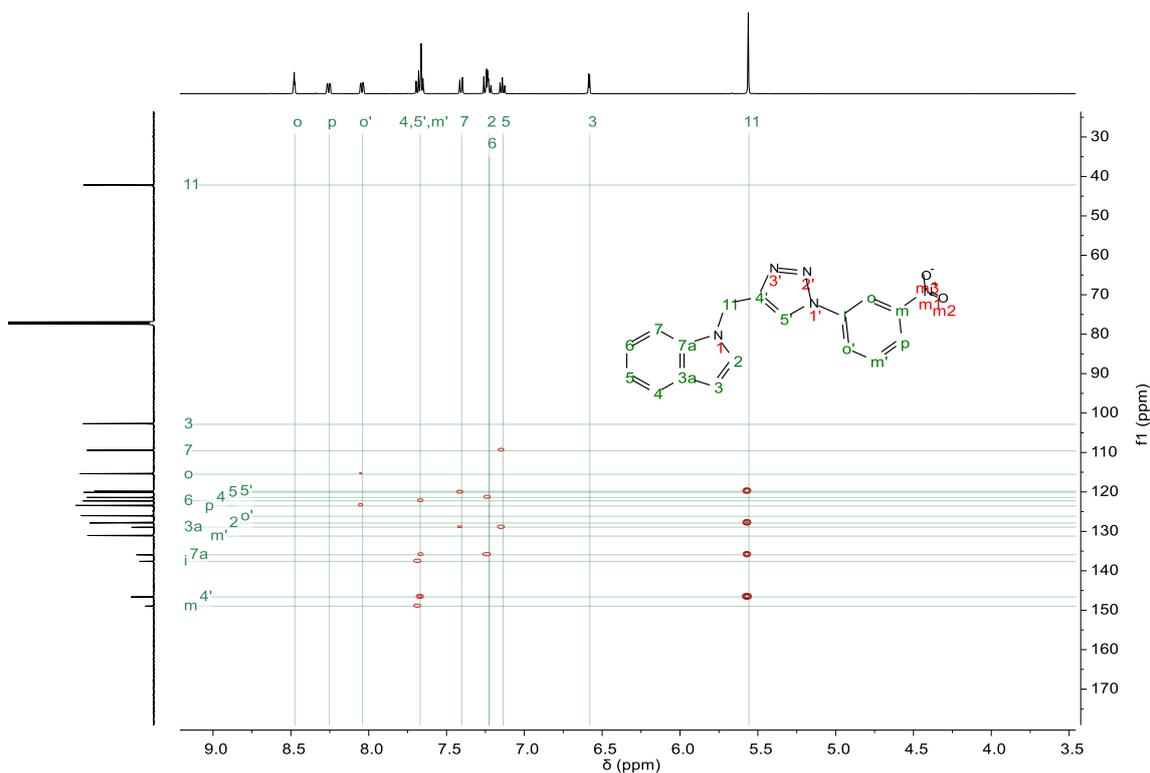
Sobre una suspensión de CuNPs/C (5 mol% Cu) en H₂O (3 mL), se adicionó 3-nitrofenil azida (**155**, 0,082 g, 0,5 mmol), y el alquino (0,5 mmol). La mezcla de reacción se dejó bajo agitación a 70°C durante toda la noche. Una vez finalizada la misma, se agregó H₂O (5 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna. Sobre la columna se hizo pasar una mezcla Hexano: TEA (100: 1), y luego de sembrar el producto impuro, se eluyó con una mezcla (AcOEt/Hexano) de polaridad creciente. Se obtuvieron los correspondientes triazoles (**165**).

	<p>1-((4-(3-nitrofenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)-1H-indol (165a)</p> <p>(160 mg, 60%)</p> <p>HRMS (ESI+): m/z: 319.10692 [M]⁺. Calculado para [C₁₇H₁₃N₅O₂]⁺: 319.1074.</p> <p>Sólido amarillo. p.f: 172,5-173,5°C.</p>
<p>¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8.48 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 8.26 (ddd, J = 8.2, 1.9, 0.9 Hz, 1H), 8.04 (ddd, J = 8.2, 1.9, 0.9 Hz, 1H), 7.71 – 7.64 (m, 3H), 7.41 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.25 – 7.21 (m, 3H), 7.17 – 7.08 (m, 1H), 6.58 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 5.56 (s, 2H).</p>	
<p>¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃) δ 149.0, 146.6, 137.6, 135.9, 131.0, 129.0, 127.9, 126.0, 123.4, 122.3, 121.4, 120.1, 119.8, 115.4, 109.4, 102.7, 42.2.</p>	

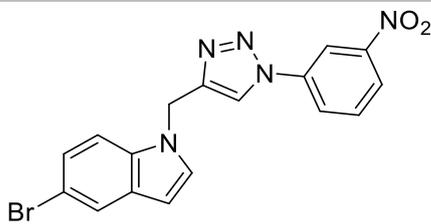
Espectros RMN (500 MHz) de **165a**







5-bromo-1-((4-(3-nitrofenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)-1H-indol (165d) (97 mg, 49%)



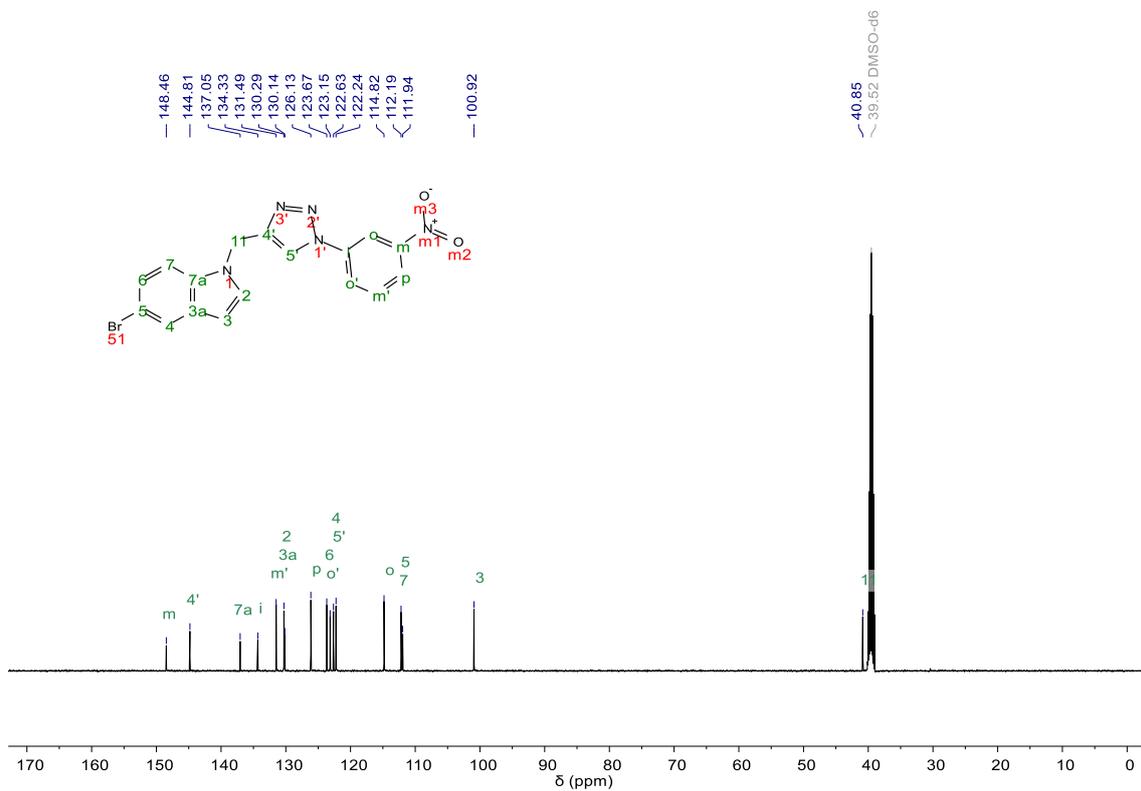
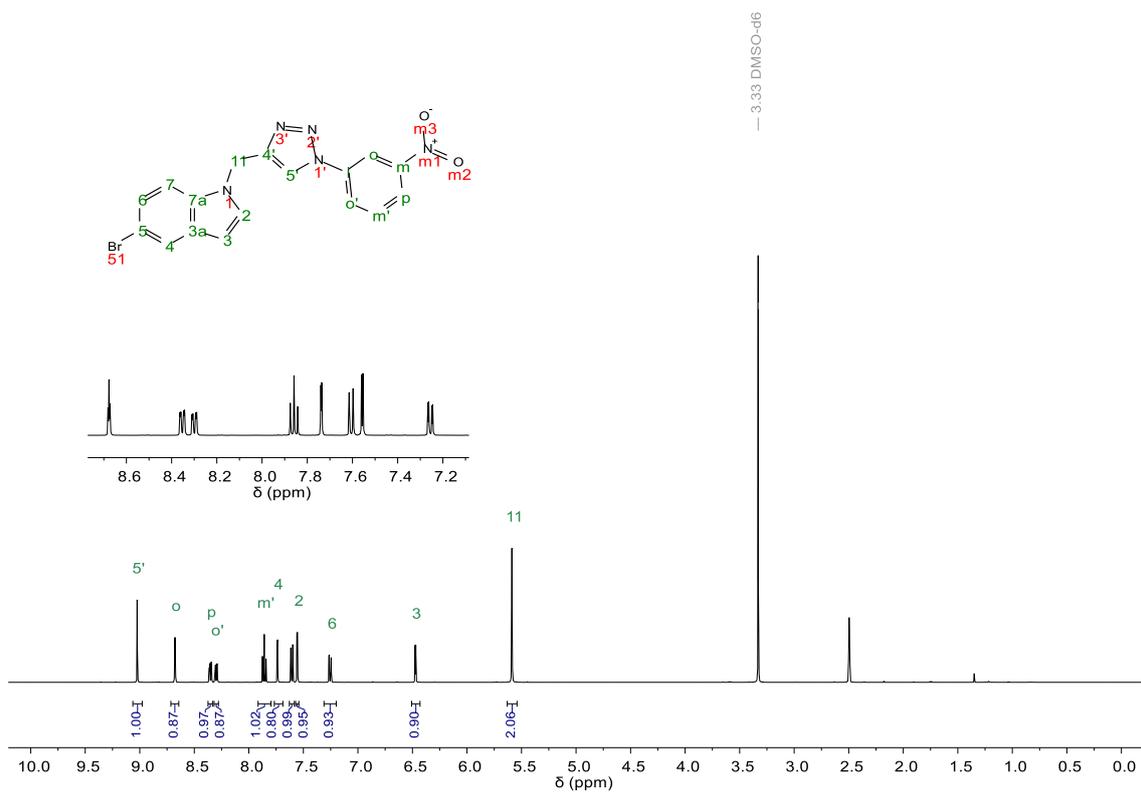
HRMS (ESI+): m/z : 397.01744 $[M]^+$. Calculado para $[C_{17}H_{12}BrN_5O_2]^+$: 397.01727.

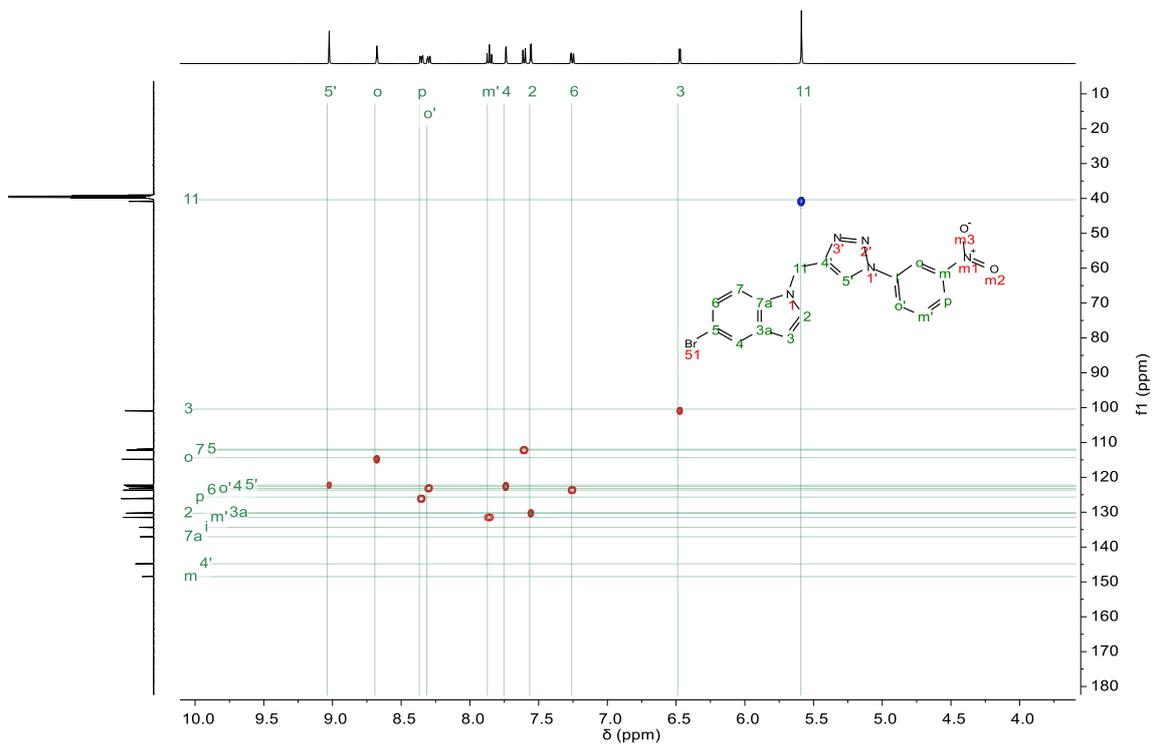
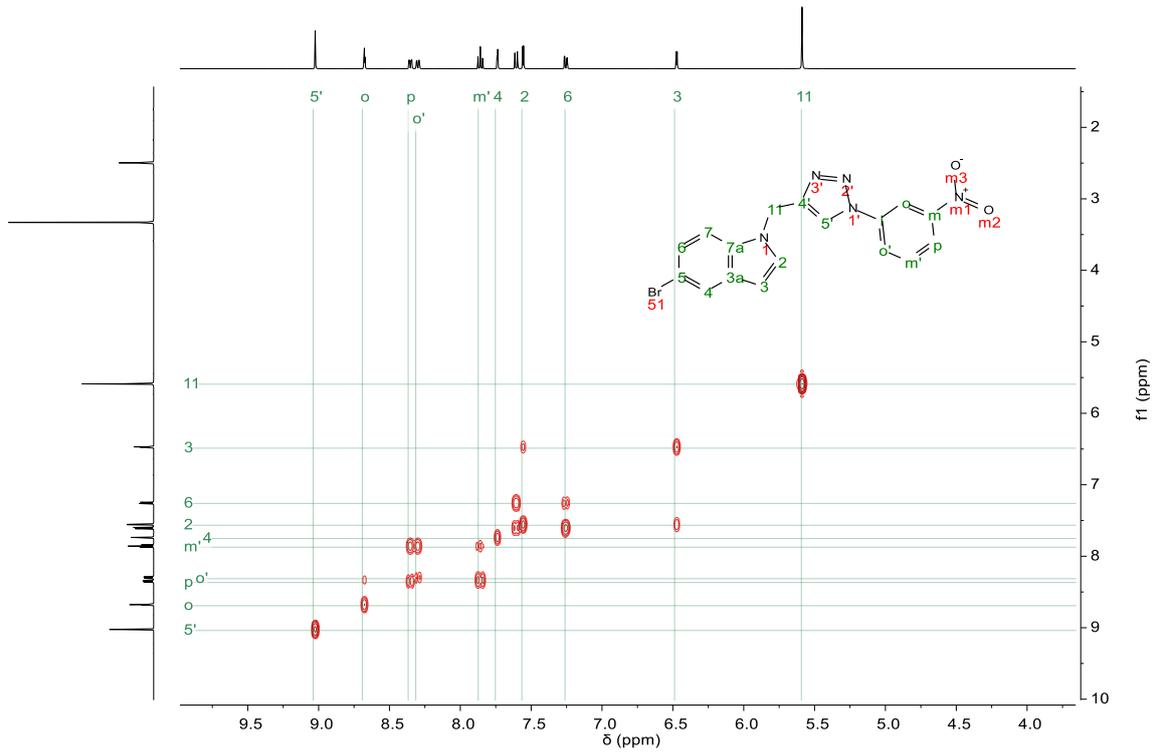
Sólido amarillo. p.f: 211,5-212,5°C.

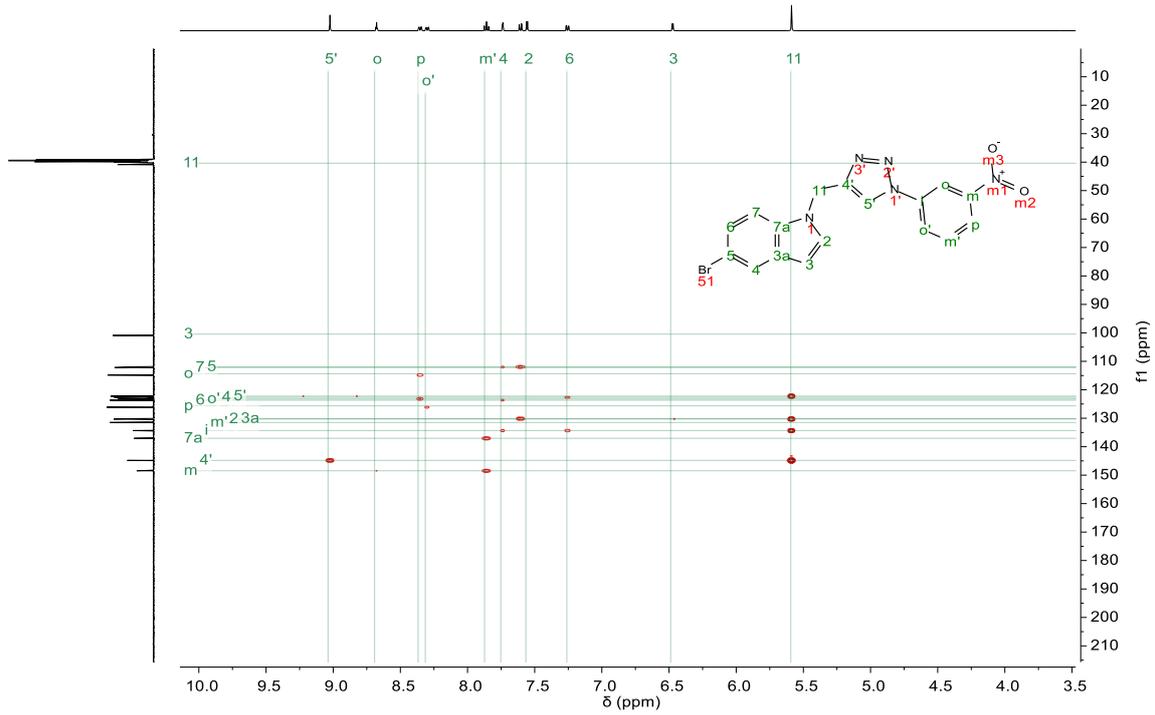
^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.02 (s, 1H), 8.68 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.35 (dd, $J = 8.1, 2.2$ Hz, 1H), 8.30 (dd, $J = 8.1, 2.2$ Hz, 1H), 7.86 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.26 (dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 1H), 6.47 (d, $J = 3.2$, 1H), 5.59 (s, 2H).

^{13}C -RMN (126 MHz, DMSO- d_6) δ 148.5, 144.8, 137.1, 134.3, 131.5, 130.3, 130.1, 126.1, 123.7, 123.2, 122.6, 122.2, 114.8, 112.2, 111.9, 100.9, 40.8.

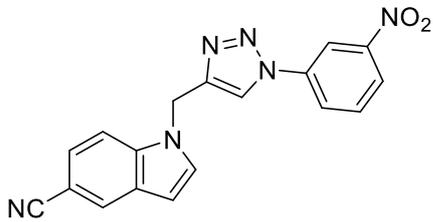
Espectros RMN (500 MHz) de **165d**





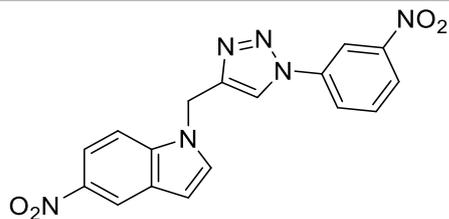


5-ciano-1-((4-(3-nitrofenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)-1H-indol (165e) (95 mg, 55%)



HRMS (ESI+): m/z: 344.10217 [M]⁺. Calculado para [C₁₇H₁₂N₆O₄]⁺: 344.10212.

Sólido crema. p.f: 194,5-195°C.

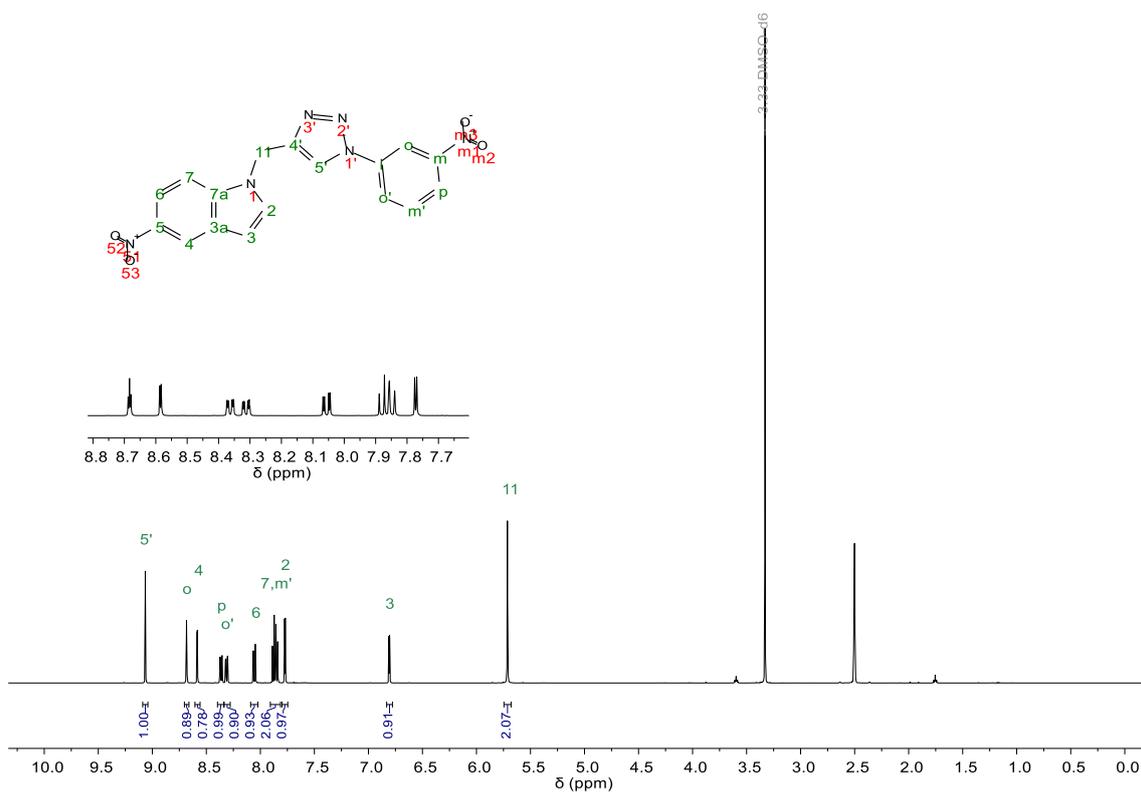
5-nitro-1-((4-(3-nitrofenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)-1H-indol (165f) (106 mg, 58%)


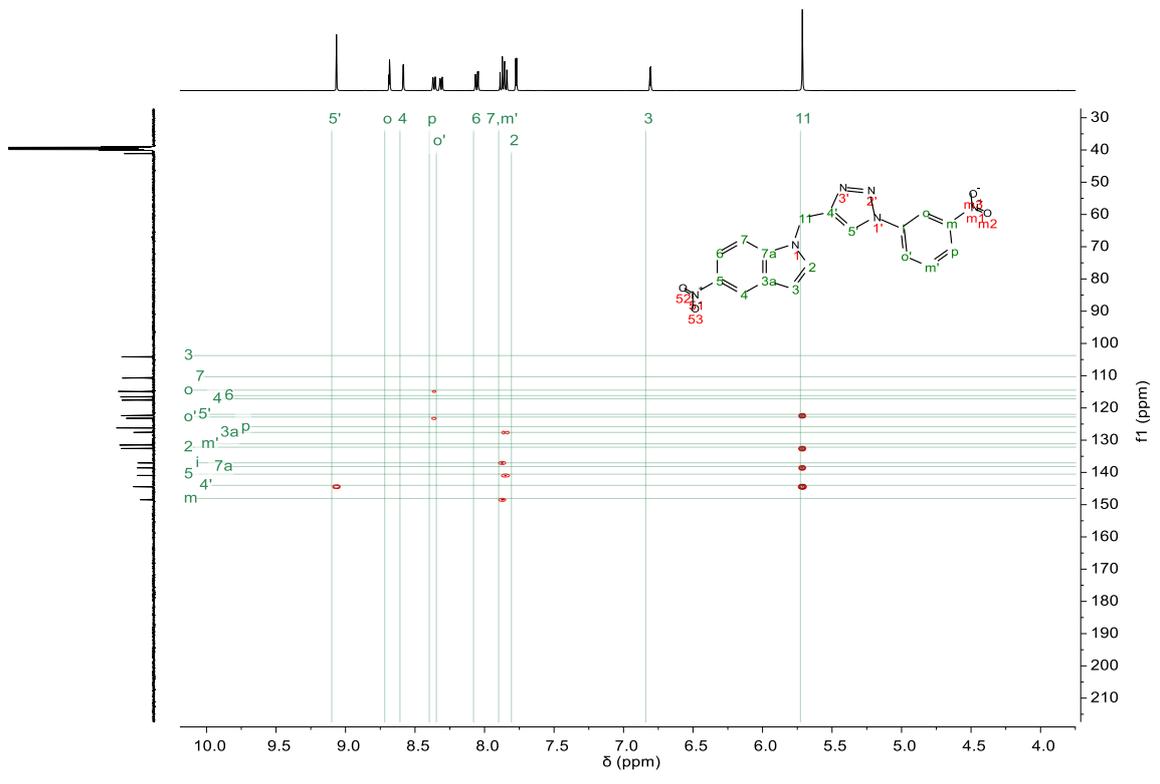
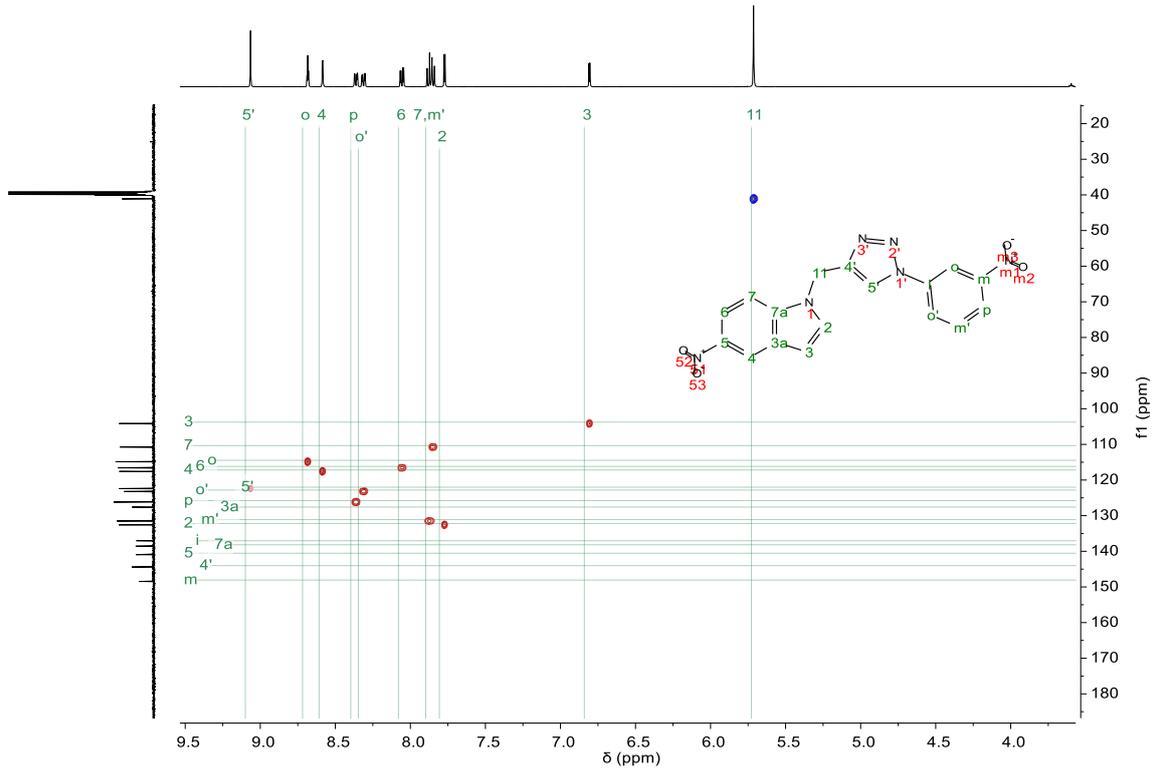
HRMS (ESI+): m/z : 364.0920 $[M]^+$. Calculado para $[C_{17}H_{12}N_6O_4]^+$: 364.0908.

Sólido marrón. p.f: 211,5-212,5°C.

1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.07 (s, 1H), 8.68 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.59 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.36 (ddd, $J = 8.2, 2.2, 1.0$ Hz, 1H), 8.31 (ddd, $J = 8.2, 2.2, 1.0$ Hz, 1H), 8.06 (dd, $J = 9.1, 2.3$ Hz, 1H), 7.90 – 7.82 (m, 2H), 7.77 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.81 (dd, $J = 3.3, 0.8$ Hz, 1H), 5.71 (s, 2H).

^{13}C -RMN (126 MHz, DMSO- d_6) δ 148.5, 144.4, 140.9, 138.6, 137.0, 132.6, 131.5, 127.6, 126.2, 123.2, 122.4, 117.6, 116.6, 114.9, 110.7, 104.2, 41.1.

Espectros RMN (500 MHz) de 165f






CAPÍTULO III

INCORPORACIÓN DEL ANILLO DE 1,2,3-TRIAZOL EN DERIVADOS DE VITAMINA D NO ESTEROIDALES



V. Capítulo III: Incorporación del anillo de 1,2,3-triazol en derivados de Vitamina D no esteroidales

V.1. Introducción

V.1.1. Vitamina D: estructura y funciones clásicas

La vitamina D es una prohormona que presenta dos isoformas, vitamina D₃ (**171**, colecalciferol), y vitamina D₂ (**174**, ergocalciferol), las cuales difieren únicamente en su cadena lateral (**Figura V.1**). Ambas se consideran *seco*-B-esteroides, dado que provienen de la ruptura del anillo B de un esteroide, 7-deshidrocolesterol y ergosterol, para las vitaminas D₃ y D₂ respectivamente.

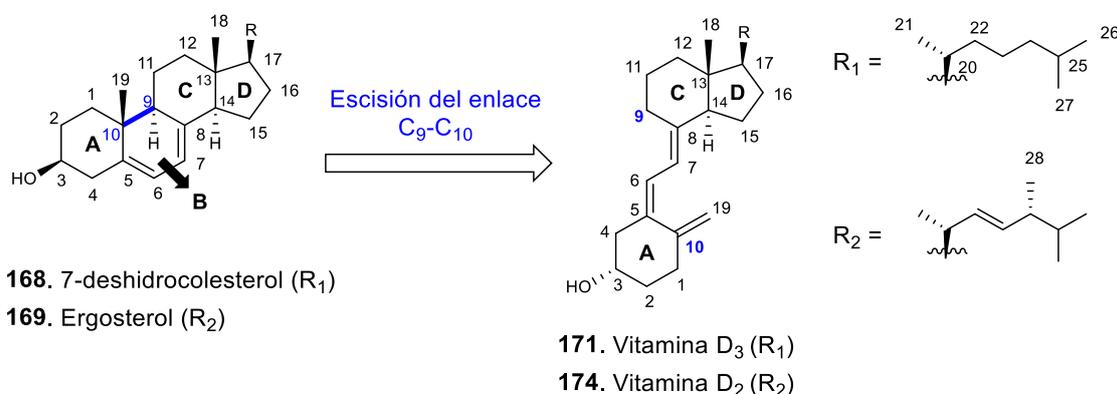


Figura V.1. Estructura de la vitamina D y sus precursores esteroidales.

La numeración original del esteroide se mantiene en la vitamina D y sus metabolitos, conservando además la denominación α o β para los grupos situados por debajo y por encima del plano de los anillos, respectivamente, de acuerdo a la orientación de los mismos en el esteroide precursor.²³⁶

La vitamina D, en la forma de vitamina D₃, es producida en la piel a partir del 7-deshidrocolesterol, **168**, por exposición a la luz ultravioleta en el rango de 290-320 nm (**Figura V.2**, p.189). Se cree que este proceso es puramente fotoquímico, y no requiere de enzimas.²³⁷ El paso inicial es la apertura electrocíclica del anillo B por ruptura del enlace C₉-C₁₀ para producir la previtamina D₃ (**170**). En una segunda etapa se produce la isomerización térmica espontánea de la previtamina D₃, vía desplazamiento sigmatrópico antarafacial [1,7] de hidrógeno,²³⁸ dando lugar a la vitamina D₃ (**171**) en su forma 6-*s-cis* (**cis-171**), que rápidamente rota alrededor del enlace C₆-C₇ para dar lugar a su conformero más estable 6-*s-trans* (**trans-171**).²³⁹

²³⁶ IUPAC-IUB (JCBN), *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1783-1822.

²³⁷ Holick, M. F. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *60*, 619-630.

²³⁸ DeLuca, H. F.; Holick, M. F.; Schnoes, H. K.; Suda, T.; Cousins, R. J. *Biochem.* **1971**, *10*, 2799-2804.

²³⁹ Holick, M. F.; Tian, X. Q.; Allen, M. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3124-3126.

La vitamina D₃ sintetizada en la piel, o en menor proporción ingerida en la dieta, no tiene ninguna función biológica conocida en el organismo, por lo cual se une a una proteína específica, VDBP (*vitamin D-binding protein*, por sus siglas en inglés), y es transportada a través del torrente sanguíneo, para su almacenamiento en el tejido adiposo o hacia las células diana para su futura bioactivación. La activación metabólica de la vitamina D₃ comienza con la hidroxilación en la cadena lateral, en posición C25, que ocurre en el hígado por acción de las enzimas CYP27A1 y CYP2R1, dando lugar a la 25-hidroxivitamina D₃ o Calcidiol (**172**, **Figura V.1**). El Calcidiol es la especie predominante en el suero sanguíneo, ya que esta transformación está pobremente regulada.²⁴⁰ Posteriormente, el calcidiol se hidroxila en posición 1 α a través de la enzima CYP27B1, ubicada principalmente en los túbulos renales, produciéndose la forma hormonalmente activa de la vitamina D₃, 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25-D) o Calcitriol (**173**).

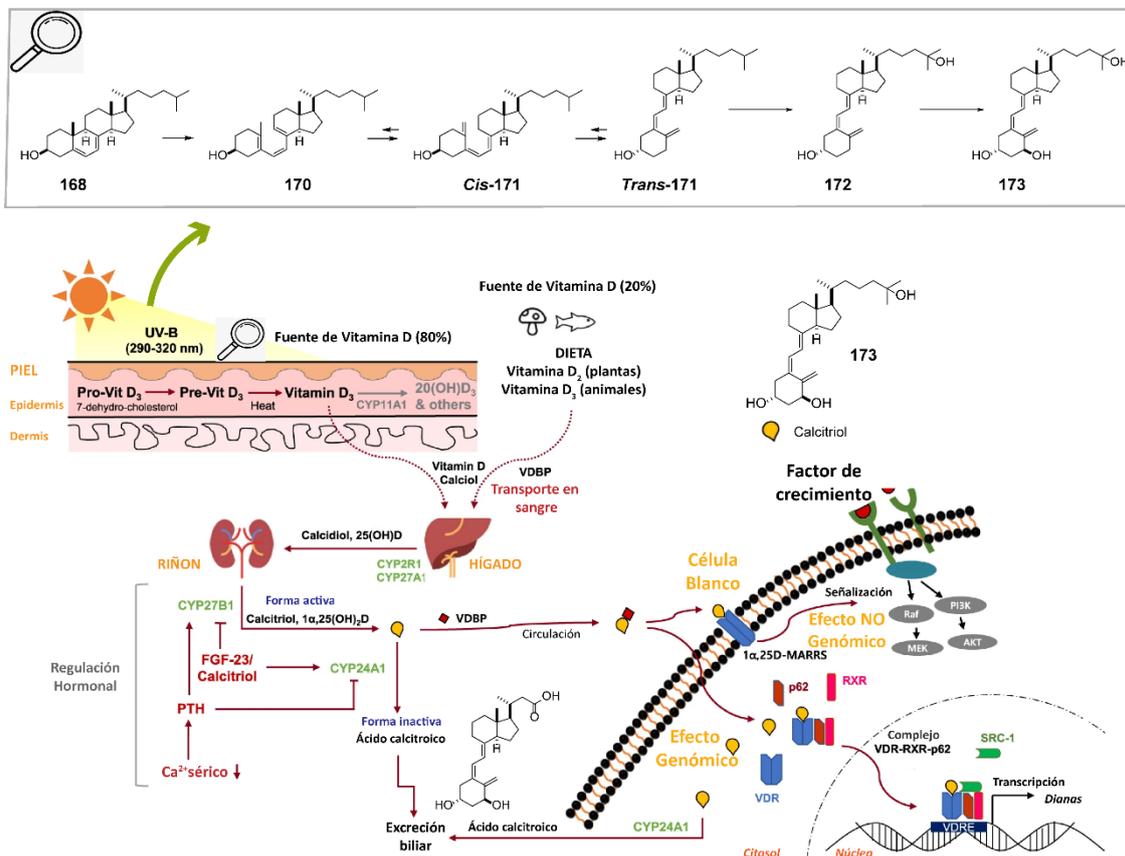


Figura V.2. Metabolismo de la vitamina D. Adaptado de (Jeon y Shin., 2018).²⁴¹

El Calcitriol es una hormona muy potente, por lo cual este último paso está estrechamente regulado, principalmente por la hormona paratiroidea (PTH), el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23), el calcio, el fósforo, y la misma 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃

²⁴⁰ Jones, G., Prosser, D. E. & Kaufmann, M. J. *Lipid Res.* **2014**, *55*, 13–31.

²⁴¹ Jeon, S. M.; Shin, E. A. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50* (4):20.

(173).²⁴² La glándula paratiroidea controla la concentración de calcio en sangre, y segrega PTH en respuesta a una hipocalcemia. El calcitriol presenta una vida corta en las células blanco o diana, debido a su degradación por parte de la enzima 24-hidroxilasa (CYP24A1). Esta enzima es responsable de la degradación metabólica de la hormona, a través de múltiples oxidaciones en la cadena lateral, en primera instancia por hidroxilación en C24, para dar lugar a una amplia variedad de metabolitos con polaridad creciente, y eventual pérdida de su actividad hormonal, como el ácido calcitroico.

La regulación de la concentración en sangre de la hormona $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 es fundamental para la homeostasis del calcio, ya que esta hormona ejerce una intensa acción en la absorción de calcio a nivel del intestino, regulando el depósito y la reabsorción del calcio óseo.²⁴³ La regulación de la concentración de calcio y fósforo en sangre se denominan *acciones clásicas* del Calcitriol.

V.1.2. Mecanismos de acción del Calcitriol

Las respuestas biológicas generadas por el calcitriol ocurren a través de dos mecanismos diferentes de transducción de señales: el mecanismo genómico, que modula la transcripción de genes mediante un receptor nuclear para la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 (VDR); y el mecanismo no genómico que regula las respuestas biológicas rápidas a través de la interacción con un receptor de membrana.

V.1.2.i. Mecanismo genómico

La $1,25$ -D llega a las células diana unida a la VDBP. Una vez que atraviesa la membrana plasmática, la hormona se une con elevada afinidad al VDR (**Figura V.2**, p.189), perteneciente a una familia de receptores nucleares de factores de transcripción activados por ligando. Luego de la unión del ligando, el VDR sufre un cambio conformacional, que promueve la asociación con el receptor retinoico X (RXR), y posteriormente, la translocación de este complejo al núcleo.²⁴⁴

Una vez en el núcleo, el heterodímero se une con una alta afinidad a secuencias específicas de ADN, denominadas elementos de respuesta a la vitamina D (VDRE), en las regiones promotoras de los genes que regula.²⁴⁵ El control de la transcripción de genes requiere del reclutamiento adicional de co-activadores o co-represores.

²⁴² Schuster, I. *Biochim Biophys. Acta.* **2011**, 1814, 186–199.

²⁴³ Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. *Nat Rev Cancer.* **2014**, 14, 342-57.

²⁴⁴ Pike, J. W. & Meyer, M. B. *J. Steroid Biochem Mol. Biol.*, **2014**, 144(Pt A), 5–11.

²⁴⁵ (a) Rachez, C.; Freedman, L. P. *Gene* **2000**, 246, 9-21. (b) Sutton, A. L.; MacDonald, P. N. *Mol. Endocrinol.* **2003**, 17, 777–791.

V.1.2.ii. Mecanismo no genómico

La unión de 1,25-D al VDR de membrana, denominado 1,25-D-MARSS (Membrane Associated Rapid Response Steroid-binding), promueve efectos rápidos que no son bloqueados por inhibidores de transcripción. Estos efectos incluyen cambios transitorios en el flujo transmembrana de iones (calcio y cloruro)²⁴⁶, o en las vías de señalización intracelular (tales como cambios en cAMP, proteinquinasa A y C, fosfolipasa C, fosfoinositol-3 quinasa, y en la vía MAP quinasa), a través de interacciones proteína-proteína.²⁴⁷

Una diferencia importante entre el modo de acción genómico y el no genómico es la especificidad que muestran los receptores respecto a los requerimientos estructurales de los ligandos. Estudios de relación estructura-actividad realizados con varios análogos de calcitriol, restringidos en una conformación particular, por ej. Lumisterol (**175**), sugieren que la conformación preferida para el receptor de membrana asociado a respuestas rápidas es la 6-s-cis (**Figura V.3**), mientras que la conformación 6-s-trans media preferentemente respuestas genómicas a través del VDR nuclear.²⁴⁸

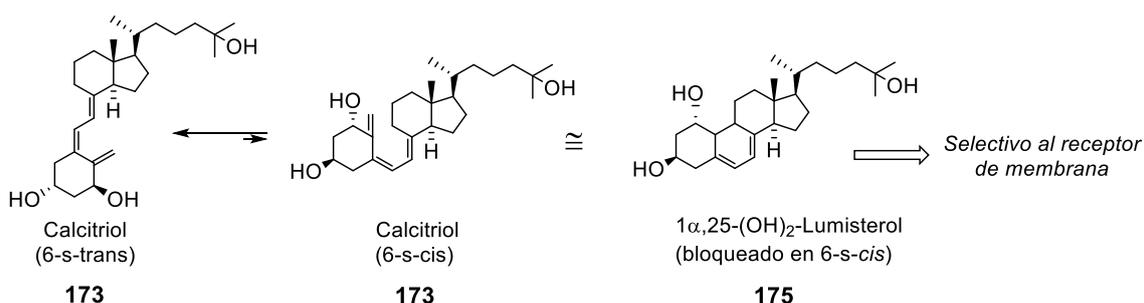


Figura V.3. Selectividad del calcitriol y análogos hacia el VDR nuclear o de membrana.

V.1.3. Vitamina D y cáncer

Además del rol clásico en la regulación del metabolismo de calcio y fósforo, durante las últimas décadas se descubrió una relación entre la deficiencia de vitamina D, ocasionada por baja exposición solar, y la incidencia de cáncer, en particular, de colon y próstata.²⁴⁹ En particular, se determinó que bajos niveles de 25-hidroxivitamina D (Calcidiol) en suero

²⁴⁶ Cancela, L.; Nemere, I.; Norman, A. W. *J. Steroid Biochem.* **1988**, *30*, 33-39.

²⁴⁷ (a) Farach-Carson, M. C.; Ridall, A. L.; *Am. J. Kidney Dis.* **1998**, *31*, 729-742. (b) Boyan, B. D.; Schwartz, Z. *Steroids* **2004**, *69*, 591-597. (c) Nemere, I., Safford, S. E., Rohe, B., DeSouza, M. M. & Farach-Carson, M. C. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *89-90*, 281-285.

²⁴⁸ Norman, A. W.; Henry, H. L.; Bishop, J. E.; Song, X. D.; Bula, C.; Okamura, W. H. *Steroids* **2001**, *66*, 147-158.

²⁴⁹ (a) Garland, C. F. & Garland, F. C. *Int J. Epidemiol.* **1980**, *9*, 227-231. (b) Hanchette, C. L. & Schwartz, G. G. *Cancer*.**1992**, *70*, 2861-2869.

sanguíneo²⁵⁰ están asociados a cáncer de mama, colon, próstata y gástrico, entre otros. Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron los efectos antitumorales de la vitamina D.²³⁸

La hormona $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 puede además interferir en pasos específicos para inhibir la progresión del cáncer, bloqueando la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos),²⁵¹ inhibiendo la invasión de células cancerosas²⁵² y moderando las respuestas inmunes (autofagia). Los múltiples mecanismos por los que actúa la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 son complejos y parecen depender del tipo de célula y del ambiente de crecimiento de éstas. El receptor de la vitamina D, detectado en la mayoría de las células y tejidos, probablemente juega un rol general en el control del crecimiento celular.

A pesar de esto, el empleo de Calcitriol para el tratamiento de cáncer se encuentra limitado por la aparición de hipercalcemia como efecto secundario tóxico, y potencialmente mortal.²⁵³ Es por ello que es relevante el estudio de análogos de calcitriol que presenten actividad anticancerígena, sin inducir hipercalcemia.

V.1.3.i. Análogos de Vitamina D para el tratamiento de cáncer

La síntesis de análogos presenta distintas aproximaciones, en función de qué parte de la estructura original del Calcitriol se modifica (**Figura V.4**). Como puede observarse, la mayoría de las modificaciones ocurre en la cadena lateral, por ej. introduciendo insaturaciones en C24.

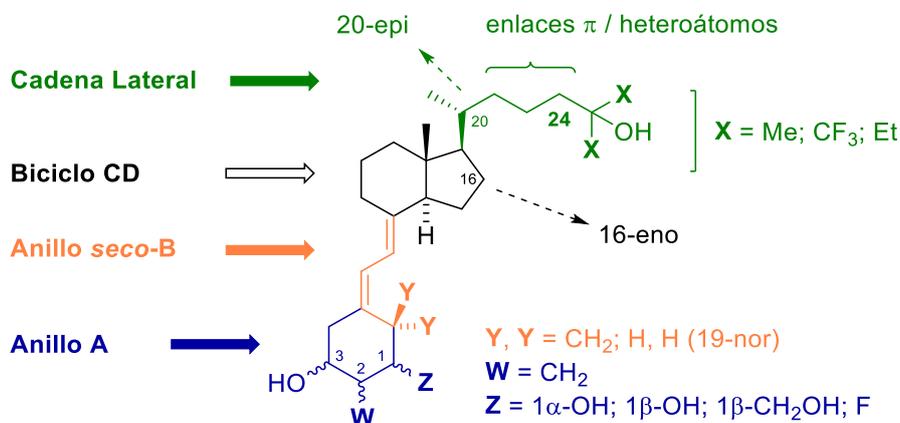


Figura V.4. Análogos de Calcitriol empleados en el tratamiento de cáncer.

De este modo se restringe la libertad conformacional, como así también se inhibe parcialmente la actividad de la enzima 24-hidroxilasa, la cual degrada al calcitriol y sus

²⁵⁰ Se mide la concentración de Calcidiol, y no Calcitriol, en sangre dado que este último presenta menor vida media, debido al elevado control de su metabolismo por la PTH, entre otros.

²⁵¹ Hansen, C. M.; Frandsen, T. L.; Brunner, N.; Binderup, L. *Clin. Exp. Metastasis* **1994**, *12*, 195-202.

²⁵² Koli, K.; Keski-Oja, J. *Cell Growth Differ.* **2000**, *11*, 221-229.

²⁵³ Ma, Y., Trump, D. L. & Johnson, C. S. *J. Cancer.* **2010**, *1*, 101-107. (b) Mehta, R. G., Peng, X., Alimirah, F., Murillo, G. & Mehta, R. *Cancer Lett.* **2013**, *334*, 95-100.)

análogos.²⁵⁴ Otros análogos presentan modificaciones en el biciclo CD, introduciendo un doble enlace en C16-C17, o bien variaciones en el anillo A, principalmente sobre C1.

En la **Figura V.5** se muestran los análogos más relevantes que han sido estudiados para el tratamiento del cáncer. Los compuestos Seocalcitol (EB1089), Inecalcitol y Paracalcitol continúan siendo evaluados en estudios clínicos con pacientes. Sin embargo, se encontraron efectos secundarios adversos. El tratamiento con EB1089 produjo hipercalcemia en todos los pacientes que recibieron dosis de 17,5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ por día, por lo cual su dosificación debe ser estrictamente regulada. Lo mismo ocurrió con Inecalcitol: en ensayos clínicos, 2 de los 4 pacientes que recibieron la dosis máxima (8 mg diarios) desarrollaron hipercalcemia. Se determinó que la dosis máxima que no produce hipercalcemia son 4 mg diarios.²⁵⁵

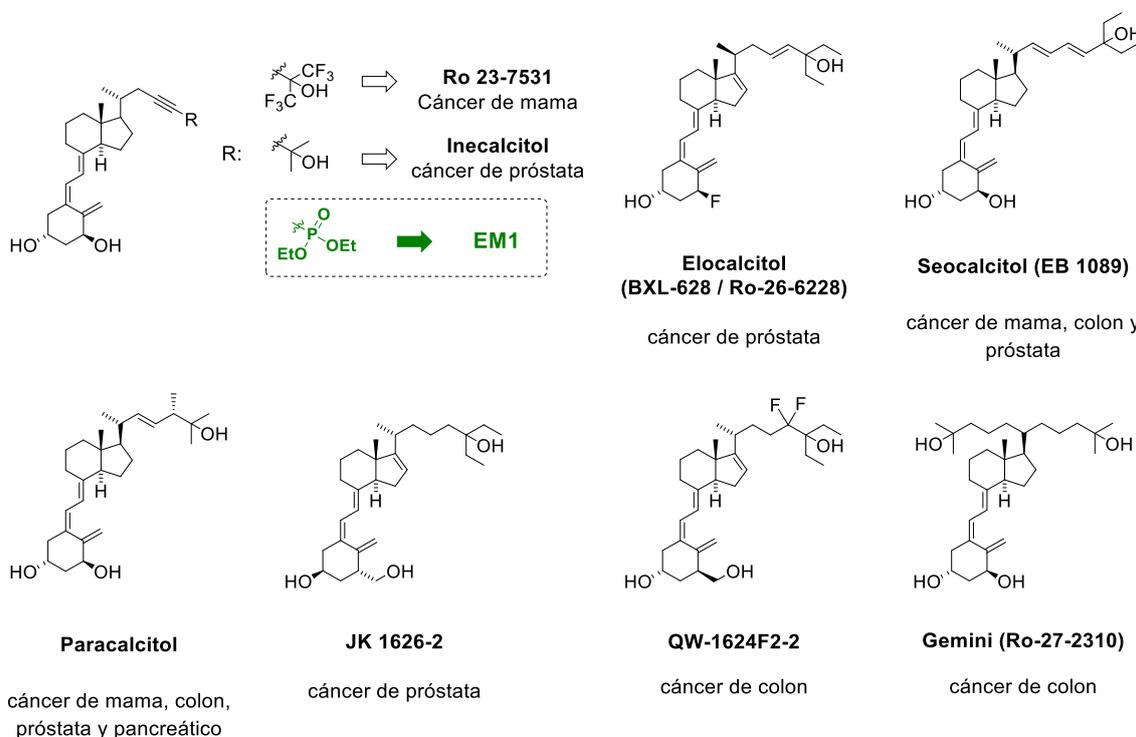


Figura V.5. Análogos de Calcitriol empleados en el tratamiento de cáncer.

En cambio, el análogo EM1, desarrollado en nuestro grupo de investigación, es un excelente candidato para el tratamiento del cáncer.²⁵⁵ Este alquilfosfonato presenta dos características principales. En primer lugar, no presenta efectos hipercalcemiantes, en concordancia con otros análogos que presentan fosfonatos y bisfosfonatos en su estructura.²⁵⁶

²⁵⁴ Uskokovic, M.R.; Norman, A.W.; Manchand, P.S.; Studzinski, G.P.; Campbell, M.J.; Koeffler, H.P.; Takeuchi, A.; Siu-Caldera, M.L.; Rao, D.S.; Reddy, G.S. *Steroids*. **2001**, *66*(3-5), 463-471.

²⁵⁵ Duffy, M. J.; Murray, A.; Synnott, N. C.; O'Donovan, N.; Crown, J. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2017**, *112*, 190-197.

²⁵⁶ Steinmeyer, A.; Schwarz, K.; Haberey, M.; Langer, G.; Wiesinger, G. *Steroids* **2001**, *66*, 257-266.

Por otra parte, EM1 presenta efectos antiproliferativos en distintas líneas de cáncer y, en modelos animales de cáncer de mama, redujo la formación de metástasis.^{147b} Estructuralmente, la introducción de un triple enlace entre C23 y C24 le confiere mayor estabilidad metabólica, sin restarle afinidad por el VDR, como sí ocurre en otro análogo que hemos reportado recientemente, que consta de un vinilfosfonato en su cadena lateral.²⁵⁷

V.1.4. Derivados aromáticos de calcitriol: arocalciferoles

Se denominan arocalciferoles a los análogos aromáticos del calcitriol. La introducción de anillos aromáticos u heterociclos puede ocurrir en distintas partes de la estructura de la vitamina D, por ende, se analizarán los casos más representativos de cada tipo de análogo.

V.1.4.i. Modificación de la cadena lateral

El primer reporte de arocalciferoles se realizó en 1991, como parte de un estudio de análogos rígidos, con menor libertad conformacional en la cadena lateral (**Figura V.6**).²⁵⁸ Este trabajo apuntó a establecer relaciones estructura-actividad respecto a la posición espacial del grupo -OH en C-25.

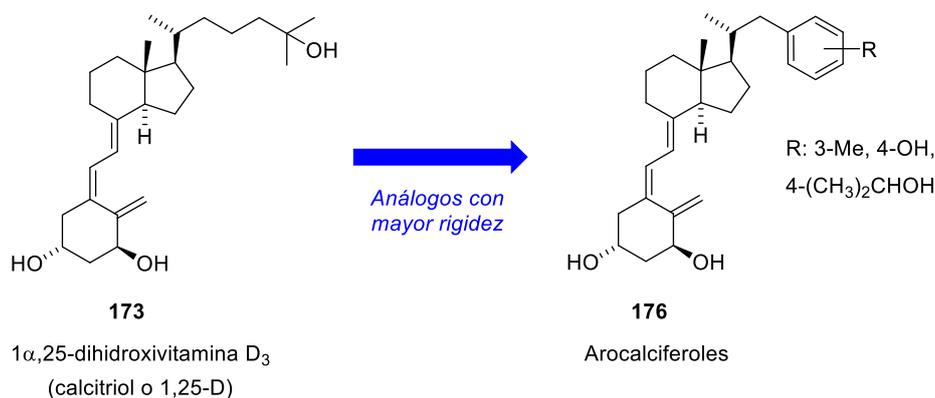


Figura V.6. Estructura de los primeros análogos aromáticos del calcitriol.

Los análogos fueron evaluados en la línea celular HL-60 (*Human promyelocytic leukemia cells*).²⁵⁹ El compuesto más activo corresponde a R: (CH₃)₂CHOH, es decir, el que asemeja en mayor medida al patrón de sustitución de C-25 del calcitriol.

Este compuesto presentó prácticamente la misma potencia que 1,25-D para inducir la diferenciación, e inhibir la proliferación de las células de leucemia HL-60. Estos resultados

²⁵⁷ Grioli, S. M.; Alonso, E. N.; Mascaró, E.; Stabile, S. A.; Ferronato, M. J.; Quevedo, M. A.; Radivoy, G.; Facchinetti, M. M.; Curino, C. A.; Vitale, C.A. *Medicinal Chemistry*. **2021**, *17*, 230–246.

²⁵⁸ Figadère, B.; Norman, A. W.; Henry, H. L.; Koeffler, H. P.; Zhou, J. Y.; Okamura, W. H. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (8), 2452–2463.

²⁵⁹ En esta línea de leucemia, 1,25-D induce diferenciación celular, resultando útil en el estudio de análogos.

alentaron a la síntesis de nuevos derivados aromáticos, aumentando en mayor medida la rigidez de la cadena lateral (**Figura V.7**).²⁶⁰

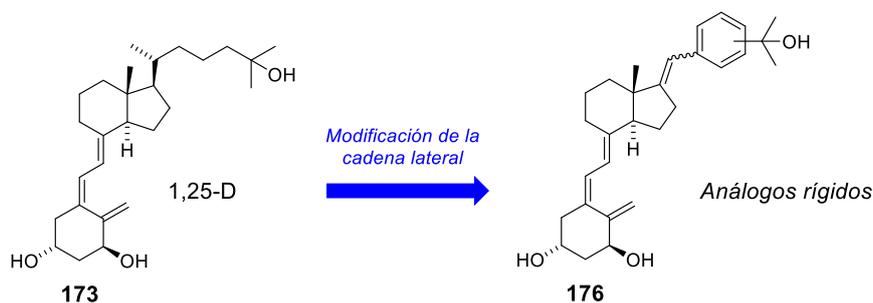


Figura V.7. Análogos de calcitriol con restricciones conformacionales en la cadena lateral.

Estos análogos presentaron menor afinidad por el VDR que el calcitriol, sin embargo, uno de estos análogos, *m*-CH(CH₃)₂OH, promovió la diferenciación celular en HL-60 con la misma potencia que el calcitriol.

V.1.4.ii. Modificación del anillo A y el sistema triénico

A raíz del desarrollo de derivados de 1,25-D con anillos aromáticos en su cadena lateral (del tipo **175** y **176**), se sintetizaron análogos en los cuales el anillo A es reemplazado con fenilos sustituidos, o heterociclos.²⁶¹ Estos presentan una topología similar al calcitriol, donde la distancia entre los grupos hidroxilo en posición C1 y C25 se mantiene entre 10-12 Å, y la posición del hidroxilo en C3 se puede ajustar dependiendo del grupo R empleado (**Figura V.8**). Dado que estos compuestos carecen del doble enlace exocíclico en el anillo A, también pueden ser considerados análogos del 19-norcalcitriol (**177**). Este último, al igual que 1,25-D, presenta actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer, pero sin inducir hipercalcemia.

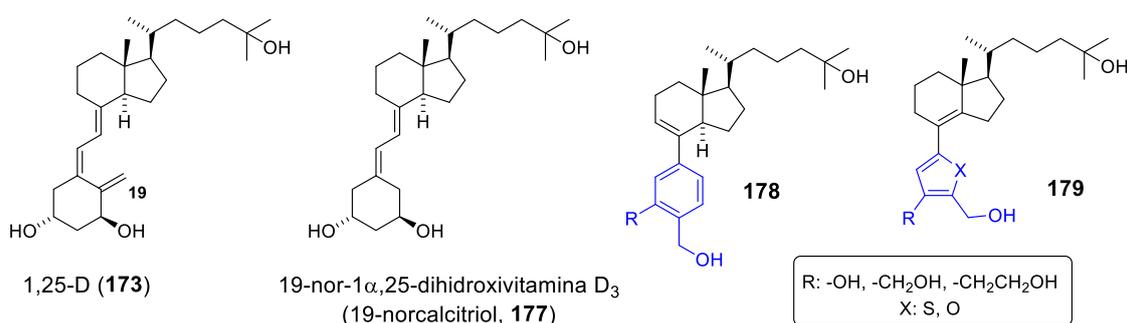


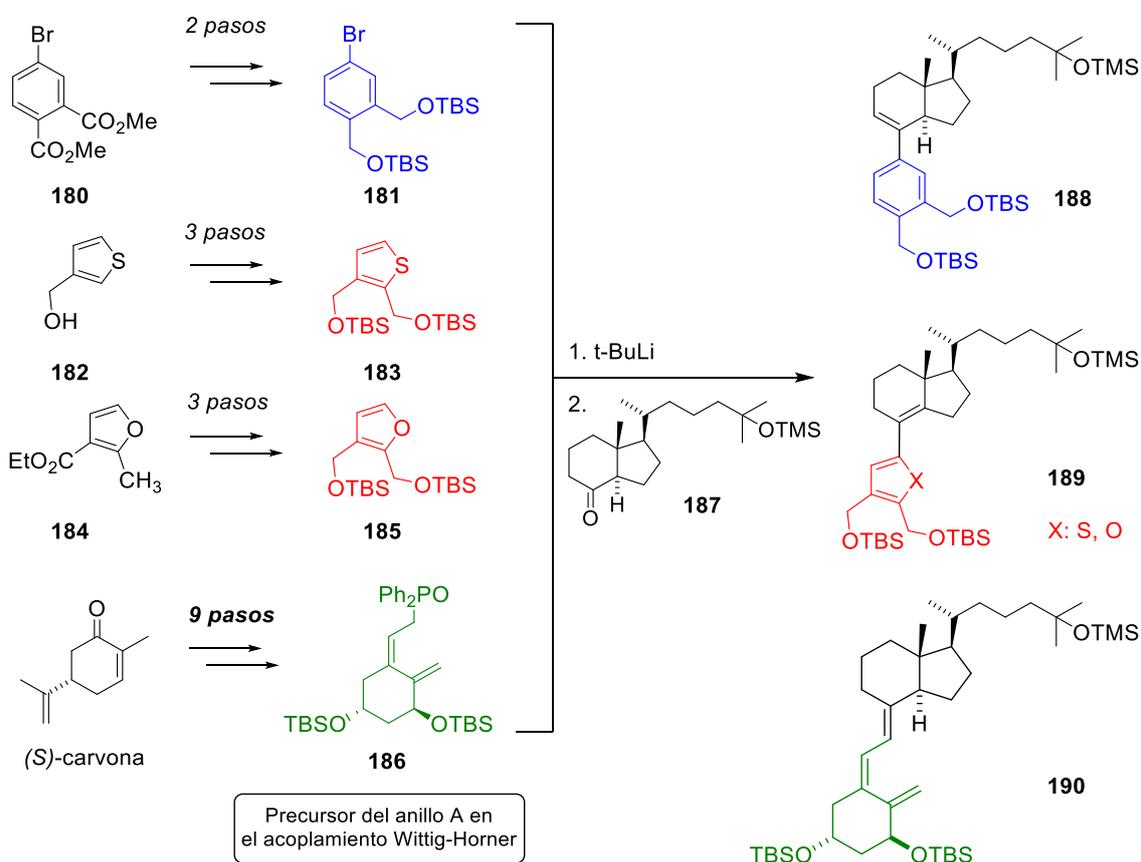
Figura V.8. Derivados aromáticos **173** y **177**, con modificaciones en el anillo A y el sistema triénico.

La alteración del Anillo A y el sistema triénico da lugar a los denominados *análogos no esteroideos*, que presentan ciertas ventajas. En primer lugar, estos no presentan equilibrios con

²⁶⁰ Fernandez-Gacio, A.; Vitale, C.; Mourino, A. *J. Org. Chem.* **2000**, 65 (21), 6978–6983.

²⁶¹ Posner, G. H.; Li, Z.; White, M. C.; Vinader, V.; Takeuchi, K.; Guggino, S. E.; Dolan, P.; Kensler, T. W. *J. Med. Chem.* **1995**, 38 (22), 4529–4537.

su forma previtamínica, al carecer del anillo A del esteroide natural. Por otra parte, desde el punto de vista sintético, su obtención resulta más sencilla. Los precursores del anillo A modificado pueden obtenerse en 2 o 3 pasos de reacción (véase formación de **181**, **183**, **185**, **Esquema V.1**), que principalmente involucran reducciones y protección de alcoholes como éteres de silicio, sin problemas de regio o estereoquímica. En contraste, para los análogos de calcitriol que mantienen el anillo A del esteroide, la ruta sintética que conduce a ese fragmento estructural es, en general, más compleja, y con un mayor número de pasos, entre los cuales se cuentan reacciones regio y estereoespecíficas. Además, los precursores del anillo A deben sintetizarse acorde al tipo de acoplamiento a efectuar. En nuestro grupo de investigación, la aproximación utilizada es la reacción de Wittig-Horner, para la cual se debe sintetizar el óxido de fosfina **186**, en 9 pasos con un rendimiento global del 25%.²⁶² Luego, este óxido de fosfina, u otros fragmentos que emulen al anillo A se hacen reaccionar con cetonas de Grundmann (**187**).



Esquema V.1. Aproximación sintética de derivados aromáticos y heterocíclicos de calcitriol.

En cuanto a la actividad biológica de estos análogos no esteroideos, se realizaron ensayos de proliferación en una línea de queratinocitos murinos. Se determinó que a

²⁶² Baggiolini, E. G.; Iacobelli, J. A.; Hennessy, B. M.; Batcho, A. D.; Sereno, J. F.; Uskokovic, M. R. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3098-3108. (b) Mascaró, Evangelina, *Tesis Doctoral*, Bahía Blanca, **2011**, p.45.

concentración 1 μM , los derivados del tipo **188** y **189** son igualmente efectivos, y con actividad comparable al calcitriol; sin embargo, a concentración 0,1 μM la actividad de estos análogos decrece considerablemente. Además, se determinó que estos compuestos presentan menor afinidad por el VDR que el calcitriol.

Continuando el estudio de análogos similares a **188**, se sintetizaron derivados en los cuales el biciclo CD y el grupo arilo están unidos a través de un doble enlace con configuración (*E*) (compuestos **191-193**, **Figura V.9**), emulando en mayor medida al sistema triénico del calcitriol.²⁶³

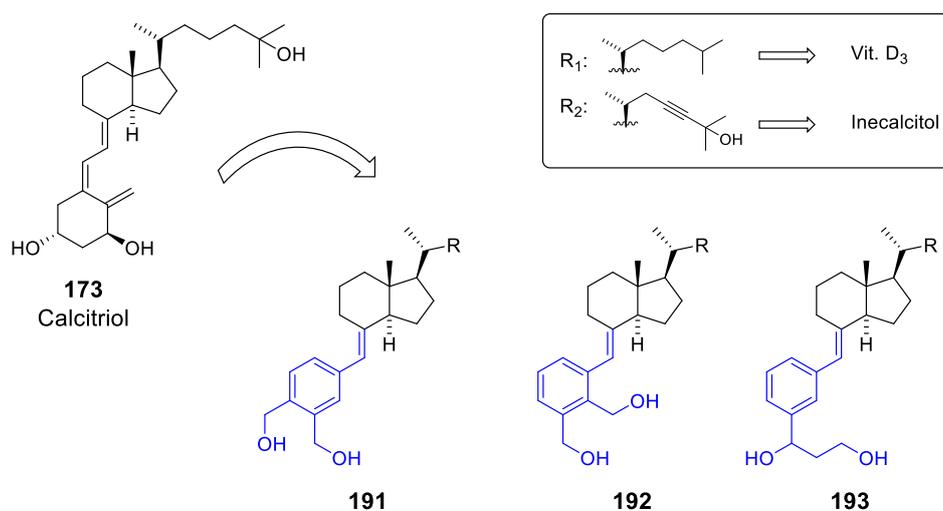


Figura V.9. Análogos de 1,25-D que incorporan estirenos, emulando al anillo A y el sistema triénico.

Todos los análogos presentaron menor afinidad por el VDR que el calcitriol. Además, al analizar la diferenciación celular que inducen sobre la línea celular HL-60, se encontró que la actividad es al menos 12 veces menor que la hormona natural, siendo **191** (con $R = R_2$) el compuesto más activo.

²⁶³ Thomas, E.; Brion, J. D.; Peyrat, J. F. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 381–393.

V.1.4.iii. Modificación del biciclo CD

Otro tipo de análogos no esteroideos surge del reemplazo del biciclo CD por un anillo aromático. Recientemente, el grupo de Mouriño sintetizó y evaluó una serie de análogos de calcitriol, en los cuales se reemplazó el biciclo CD por un grupo fenilo (**194**, **Figura V.10**).²⁶⁴ Además, sobre C-8 se adicionaron cadenas alquílicas de distinta longitud, a fin de emular las interacciones hidrofóbicas faltantes con el VDR. Esto representa una importante simplificación estructural, por un lado, no se requiere del biciclo CD (*trans*-hidrindano), con la consecuente pérdida de tres estereocentros (C-13, C-14, C-17, véase estructura de **173**, **Figura V.10**). Por otra parte, se pierde el estereocentro sobre el C-20 de la cadena lateral. En consecuencia, estos análogos pueden sintetizarse fácilmente, a partir de reactivos asequibles comercialmente.

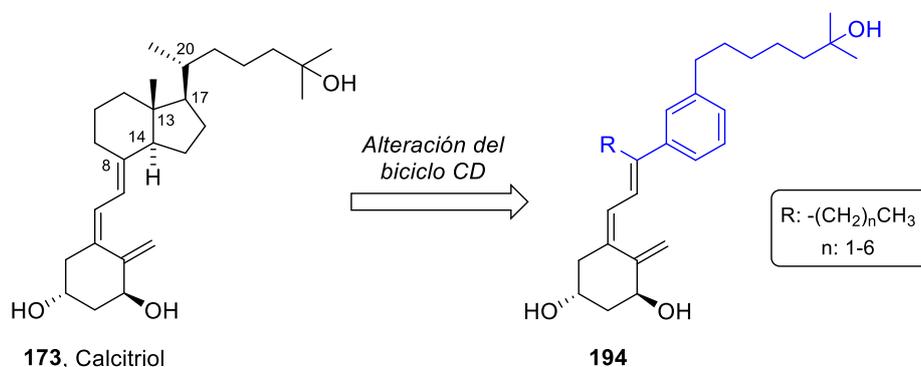


Figura V.10. Derivados no esteroideos de 1,25-D, con modificaciones sobre el biciclo CD.

En cuanto a la bioactividad promovida por esta simplificación, el derivado **194** (R: Et) presenta la misma afinidad frente al VDR que el calcitriol, posee actividad antiproliferativa en distintas líneas celulares de cáncer, y no produce hipercalcemia.

V.1.4.iv. Análogos no esteroideos completamente aromáticos

Otro tipo de análogos de 1,25-D no esteroideos son aquellos en los cuales tanto el anillo A como el biciclo CD se reemplazan por anillos aromáticos (compuestos de tipo **195** y **196**, **Figura V.11**, p.199). Los mismos contienen alcoholes alílicos y bencílicos, que emulan las interacciones de puente de hidrógeno de los hidroxilos ubicados en posición C1, C3 y C25 del calcitriol. A pesar de la gran variación estructural que supone la síntesis de estos derivados, estudios *in vitro* e *in silico* muestran que estos compuestos presentan gran afinidad por el VDR, actuando a través del mecanismo genómico, e induciendo la transcripción en el rango nM.²⁶⁵

²⁶⁴ Gogoi, P.; Seoane, S.; Sigüeiro, R.; Guiberteau, T.; Maestro, M. A.; Pérez-Fernández, R.; Rochel, N.; Mouriño, A. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (11), 4928–4937.

²⁶⁵ Ciesielski, F.; Sato, Y.; Chebaro, Y.; Moras, D.; Dejaegere, A.; Rochel, N. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (19), 8440–8449.

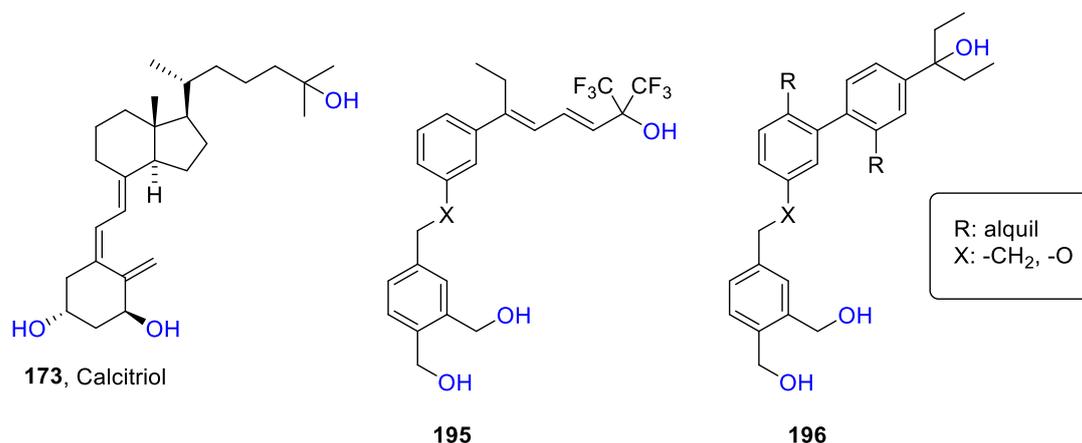


Figura V.11. Derivados no esteroidales del calcitriol, que presentan gran afinidad por el VDR.

V.1.4.v. Análogos de vitamina D₃

Entre los derivados aromáticos heterocíclicos también resultan de interés los análogos de vitamina D₃ y alcoholes de Grundmann (derivados **198**, **Figura V.12**), los cuales presentan actividad anticancerígena a través de vías de señalización independientes del VDR.²⁶⁶

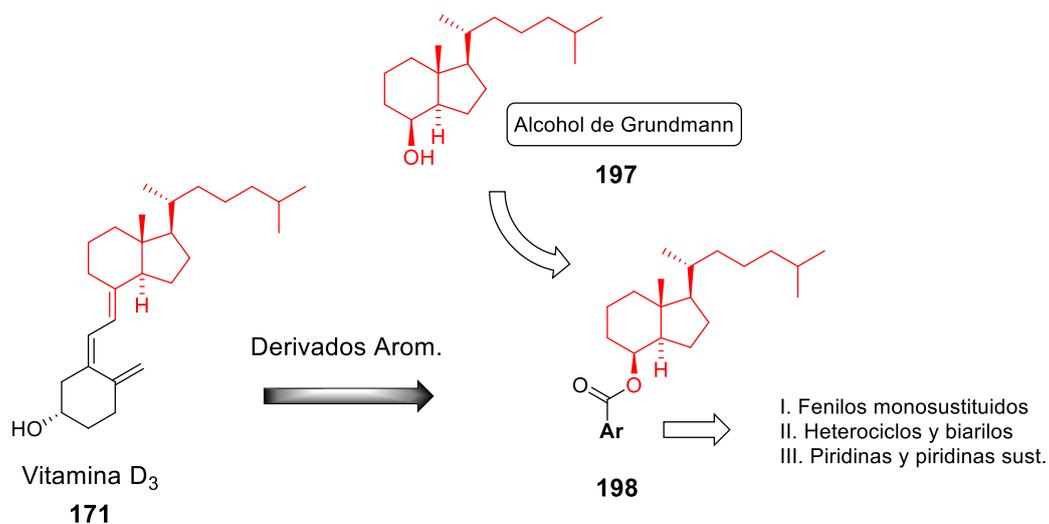


Figura V.12. Derivados aromáticos de Vit D₃ como inhibidores de la vía de señalización Hh.

A pesar de no poseer afinidad por el VDR, tanto la vitamina D₃, **171**, como el alcohol de Grundmann, **197**, son capaces de inhibir la vía de señalización Hedgehog (Hh), la cual está relacionada con la progresión de ciertos tipos de cáncer, en particular, carcinoma de células basales y meduloblastoma. Derivados de vitamina D₃, en los cuales el grupo aromático emula el anillo A, también presentan este tipo de actividad. Los compuestos de tipo **198-I**, con fenilos

²⁶⁶ Deberardinis, A. M.; Madden, D. J.; Banerjee, U.; Sail, V.; Raccuia, D. S.; De Carlo, D.; Lemieux, S. M.; Meares, A.; Hadden, M. K. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (9), 3724–3736.

monosustituidos, son los compuestos más activos, en particular aquellos que presentan un grupo hidroxilo en posición 3 o 4.

V.1.4.vi. Análogos de calcitriol con heterociclos nitrogenados

La incorporación de heterociclos nitrogenados en análogos de calcitriol solo ha sido estudiada sobre la cadena lateral. Entre los derivados sintetizados (análogos **199-201** y **205**, **Figura V.13**) se cuentan pirazoles²⁶⁷, tetrazoles²⁶⁸, isoxazoles²⁶⁹ y triazoles.²⁷⁰

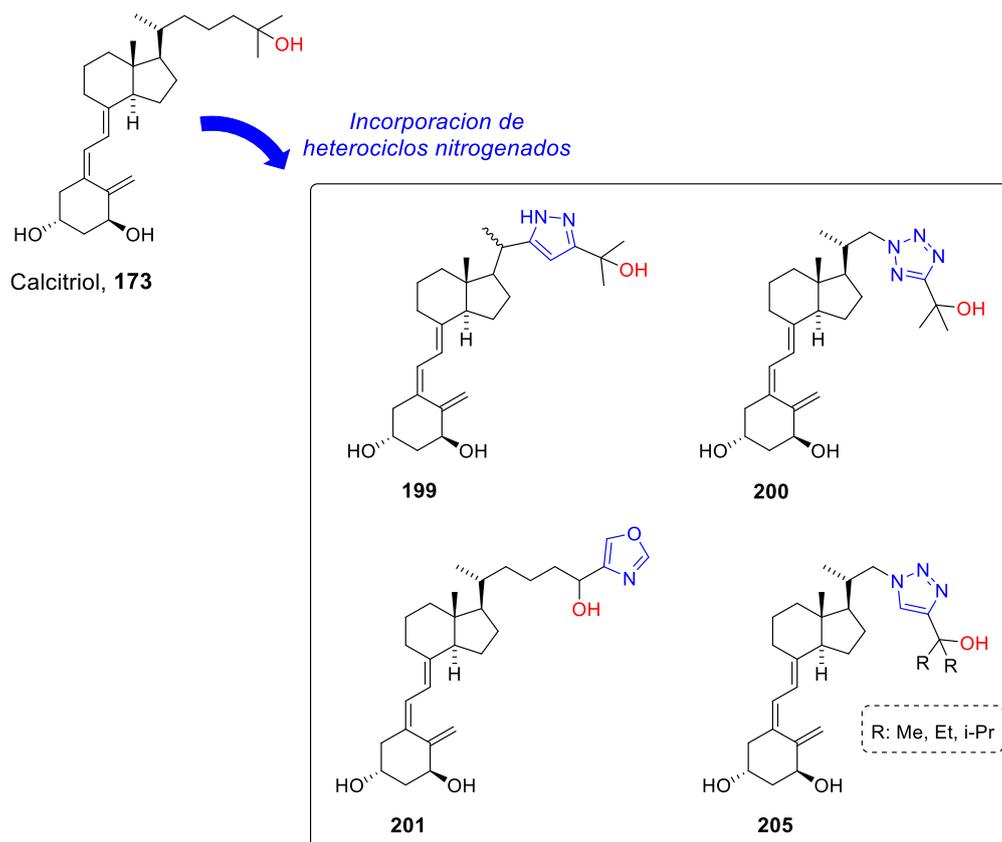


Figura V.13. Derivados de calcitriol que presentan heterociclos nitrogenados en su cadena lateral.

Respecto a los pirazoles, **199**, y tetrazoles, **200**, su actividad biológica no fue reportada, mientras que el isoxazol **201** fue patentado dentro de una familia de análogos con modificaciones sobre la cadena lateral. Se encontró que **201** presenta mayor afinidad por el VDR que el calcitriol, e induce diferenciación en la línea celular HL-60, con dosis menores a la de la hormona natural. De particular interés para esta Tesis Doctoral resultan los triazoles de la familia

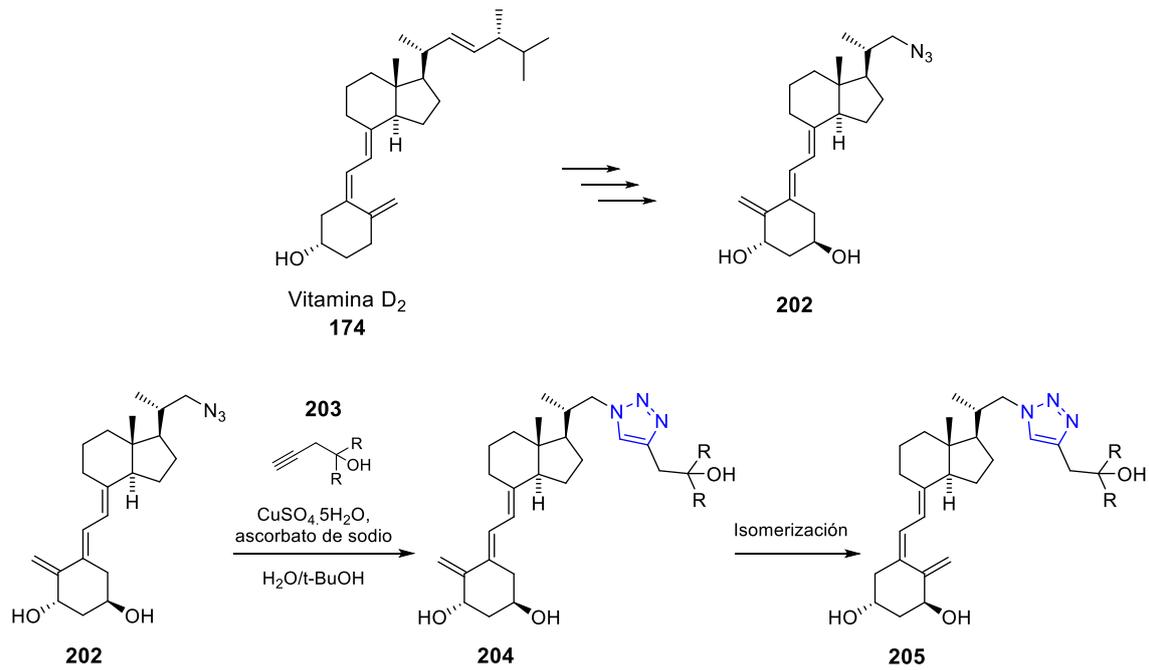
²⁶⁷ Fall, Y.; Barreiro, C.; Fernandez, C.; Mouriño, A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 1433–1436.

²⁶⁸ Gándara, Z.; Suárez, P. L.; González, M.; Gómez, G.; Fall, Y. *Synthesis (Stuttg)*. **2011**, No. 23, 3887–3893.

²⁶⁹ Steinmeyer, A.; Faenrich, M.; Giesen, C. WO 2001007405 A2 (**2000**).

²⁷⁰ (a) Suarez, P. L.; Gándara, Z.; Gómez, G.; Fall, Y. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45 (24), 4619–4621. (b) Gándara, Z.; Suárez, P.-L.; Fall, A.; Sène, M.; Diouf, O.; Gaye, M.; Gómez, G.; Fall, Y. *Mediterr. J. Chem.* **2016**, 5 (2), 423–433.

205 (Esquema V.2), que fueron sintetizados empleando la CuAAC a partir de la azida **202**, obtenida a partir de la ozonólisis parcial de vitamina D₂.^{267b}



Esquema V.2. Síntesis de análogos de vitamina D conteniendo triazoles en su cadena lateral.^{270b}

La actividad biológica de este tipo de análogos está pendiente de ser publicada, ya que está tramitando su patentamiento, lo cual sugiere resultados promisorios en su actividad antiproliferativa.

V.2. Capítulo III: Objetivos específicos

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos referidos a la síntesis de derivados no esteroidales del calcitriol, en particular aquellos que involucran la modificación del anillo A y el sistema triénico, se propone como objetivo evaluar métodos de acoplamiento de anillos de 1,2,3-triazol, emulando el anillo A en la estructura de 1,25-D. Para ello se plantea:

1. Sintetizar 1,2,3-triazoles di y trisustituídos como candidatos para reemplazar el anillo A de la vitamina D.
2. Evaluar métodos de acoplamiento con el fragmento del biciclo CD para obtener potenciales análogos no esteroidales de vitamina D del tipo **206** (Figura V.14).

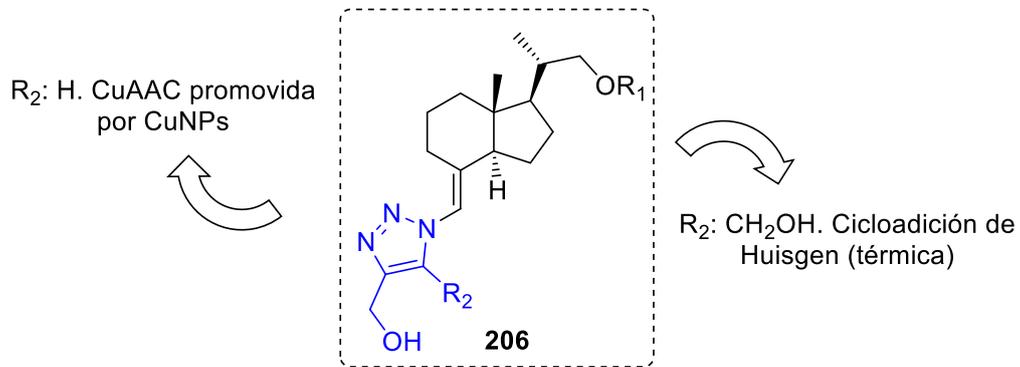
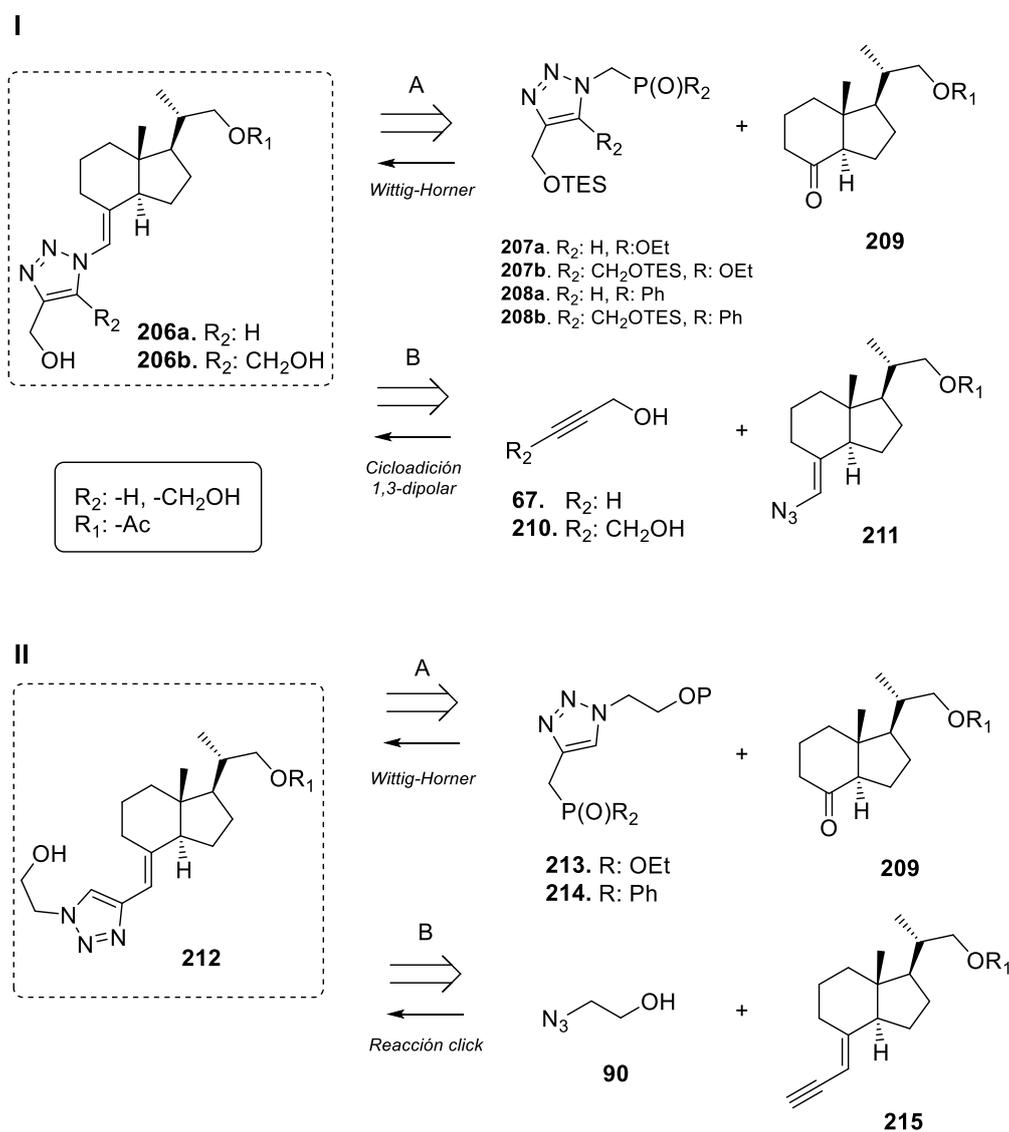


Figura V.14. Análogos de calcitriol incorporando 1,2,3-triazoles en lugar del anillo A y sistema triénico.

V.3. Resultados y discusión

V.3.1. Propuesta sintética

En el siguiente análisis retrosintético, se resumen las estrategias que permitirían obtener derivados de Vitamina D, por sustitución del anillo A con 1,2,3-triazoles. La primera implica la incorporación del triazol a través de un acoplamiento de Wittig-Horner sobre cetonas de tipo Grundmann (**209**, Esquema V.3, retrosíntesis I-A y II-A). Por otra parte, se puede realizar la CuAAC sobre azidas u alquinos que contengan al biciclo CD de Vitamina D (**211** y **215**, retrosíntesis I-B y II-B).



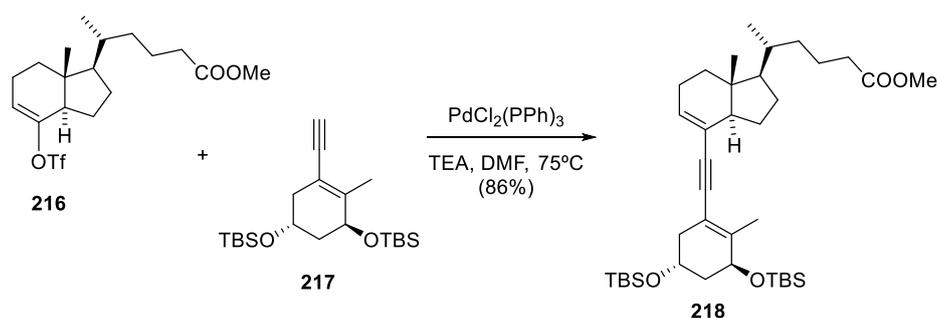
Esquema V.3. Análisis retrosintético de los análogos a sintetizar.

En primer lugar, para la obtención de análogos del tipo **206a-b**, exploramos la alternativa clásica de unir el fragmento correspondiente a un triazol (**207** o **208**), que emula el anillo A de la vitamina D, con la unidad estructural del biciclo CD **209**, vía el acoplamiento de Wittig-Horner.

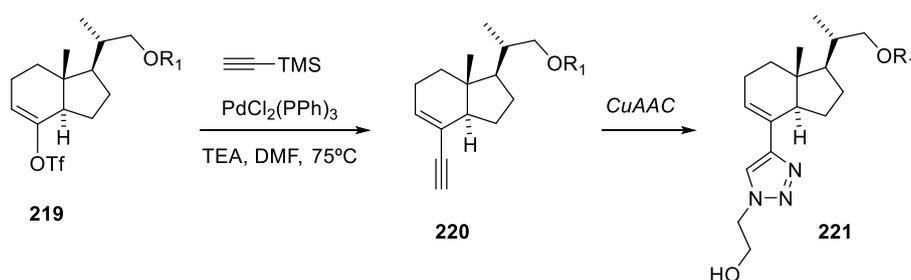
Este tipo de aproximación es comúnmente utilizada en la síntesis de análogos de 1,25-D. Siguiendo esta línea, los triazoles tipo **207** podrían obtenerse a partir de α -azidofosfonatos, cuya síntesis fue discutida previamente (véase [Sección III.3.4.ii.b](#)), y los de tipo **208** trabajando con azidas derivadas de óxido de fosfina.

Por otra parte, la obtención de vinilazidas presenta varias alternativas para sustratos aromáticos (véase [Sección III.3.4.iii.c](#)), pero en el caso de compuestos alifáticos, los escasos reportes apuntan a la obtención de vinilazidas α -sustituidas ($RN_3C=CH_2$) a partir de alquinos terminales, en lugar del producto β -sustituido deseado (**211**).²⁷¹

Respecto al derivado **212**, es importante destacar que se debería emplear 2-azidoetanol como precursor del triazol, dada la dificultad de sintetizar azidometanol (**80**, [Sección III.3.4.ii.a](#)). Esto implica que la síntesis de estos análogos está limitada al uso de azidas conteniendo grupos hidroxialquil de al menos 2 átomos de carbono. Además, el enino **215** no se encuentra reportado en bibliografía. Compuestos similares a **212** podrían obtenerse adaptando la aproximación de Mouriño para la construcción del sistema triénico a partir de eninos (**221**, [Esquema V.4](#)).²⁷²



Adaptación a la síntesis de eninos terminales



Esquema V.4. Acoplamiento entre triflatos, **219**, y alquinos terminales, que podría aplicarse a la síntesis de derivados triazol-vitamina D del tipo **221**.

²⁷¹ (a) Cao, S.; Ji, Q.; Li, H.; Pang, M.; Yuan, H.; Zhang, J.; Bi, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (15), 7083–7091. (b) Thirupathi, N.; Wei, F.; Tung, C. H.; Xu, Z. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 1–8.

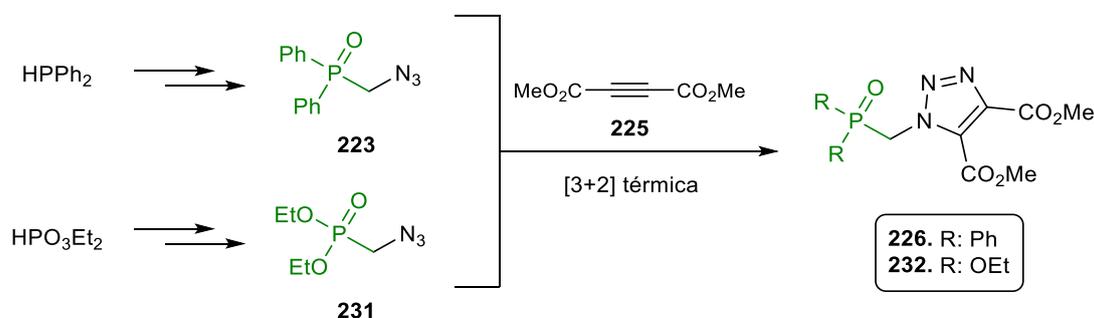
²⁷² Mascareñas, J. L.; Castedo, L.; Mouriño, A. *J. Org. Chem.* **1993**, No. 9, 118–123.

Si bien el acoplamiento empleando TMS-acetileno se encuentra reportado²⁷³, al igual que la síntesis del viniltriflato del biciclo CD²⁷², la aproximación planteada involucra al menos un par de pasos adicionales. Estos presentan rendimientos de moderados a buenos, y suman etapas a la síntesis, impactando en el rendimiento global. En cambio, el acoplamiento Wittig-Horner de triazolil derivados (del tipo **207-208** o **213-214**, Esquema V.3, p.203), no requiere derivatizaciones de las correspondientes cetonas de Grundmann, **209**.

En resumen, se descartará la síntesis de vinilazidas y eninos derivados del biciclo CD de vitamina D (es decir, los compuestos **211** y **215**), y se centrarán los esfuerzos en el estudio del acoplamiento de Wittig-Horner de α -triazolilfosfonatos u óxidos de fosfina (**207**), con cetonas de Grundmann, que permite abordar la síntesis de los análogos de tipo **206**. Por otra parte, esta estrategia aporta una mayor versatilidad, ya que permite preparar una serie de análogos variando la cadena lateral (del biciclo CD), sin la necesidad de preparar individualmente “n” vinil azidas o eninos del biciclo CD, para obtener bibliotecas vía este tipo de acoplamientos.

V.3.1. Síntesis de triazoles trisustituídos con fosfonatos u óxidos de fosfina

Para evaluar el acoplamiento de Wittig-Horner con triazoles trisustituídos, se sintetizaron derivados conteniendo fosfonatos y óxidos de fosfina (**226** o **232**, Esquema V.5). De esta manera, se podrán comparar los rendimientos obtenidos en cada caso, teniendo en cuenta que los óxidos de fosfina son comúnmente empleados en la síntesis de análogos de calcitriol.^{147a}



Esquema V.5. Aproximación sintética para la obtención de triazoles trisustituídos con fosfonatos u óxidos de fosfina.

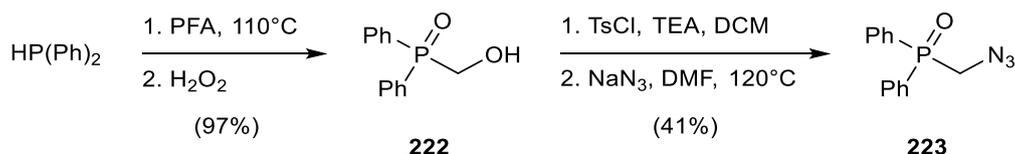
Como alquino consideramos el empleo de acetilendicarboxilato de metilo (DMAD, **225**), dado que es extensamente empleado, como dienófilo o dipolarófilo, en reacciones de cicloadición que involucran la formación de heterociclos.²⁷⁴

²⁷³ Enquist, J. A.; Virgil, S. C.; Stoltz, B. M. *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17* (36), 9957–9969.

²⁷⁴ Heravi, M. M.; Alishiri, T. *Dimethyl Acetylenedicarboxylate as a Building Block in Heterocyclic Synthesis*; Elsevier, **2014**; Vol. 113.

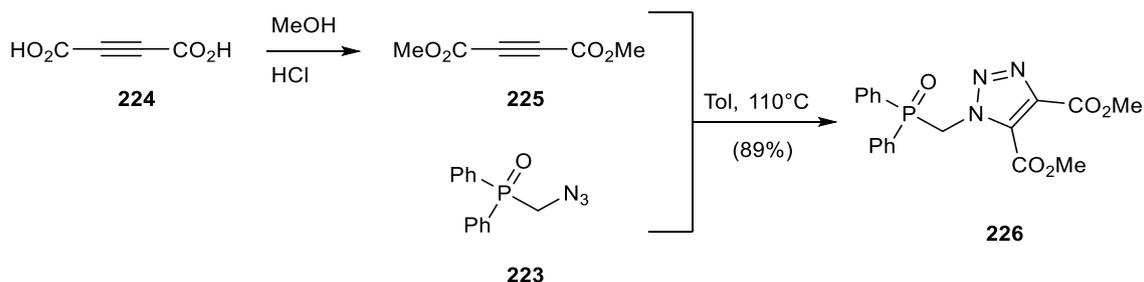
V.3.1.i. Síntesis de triazoles derivados de óxidos de fosfina

Para la obtención de la azida derivada de óxido de fosfina (**223**, Esquema V.6), se hizo reaccionar difenilfosfina con PFA, en ausencia de solvente, y luego se oxidó con peróxido de hidrógeno durante la elaboración de la reacción, para dar lugar al óxido de fosfina **222**, con rendimiento excelente.²⁷⁵ Posteriormente, se derivatizó el alcohol resultante como un tosilato, que por sustitución con azida de sodio rindió la azida deseada, **223**.²⁷⁶



Esquema V.6. Síntesis de la azida derivada de óxido de fosfina **223**.

A continuación, esta azida fue sometida a cicloadición [3+2] con DMAD, sintetizado a partir del ácido acetilendicarboxílico, (**224**, Esquema V.7).²⁷⁷ Se obtuvo el triazol **226** con muy buen rendimiento.



Esquema V.7. Síntesis del triazol **226** por cicloadición [3+2] térmica.

Para optimizar las condiciones de reacción del acoplamiento Wittig-Horner, se trabajó sobre el sustrato modelo decalona (**227**, Esquema V.8, p.207). Durante esta prueba, se observó la formación del anión coloreado tras el agregado de BuLi, para luego decolorarse rápidamente, antes de adicionar el compuesto carbonílico. Además, el espectro ³¹P-RMN del crudo de reacción mostró múltiples señales de fósforo.

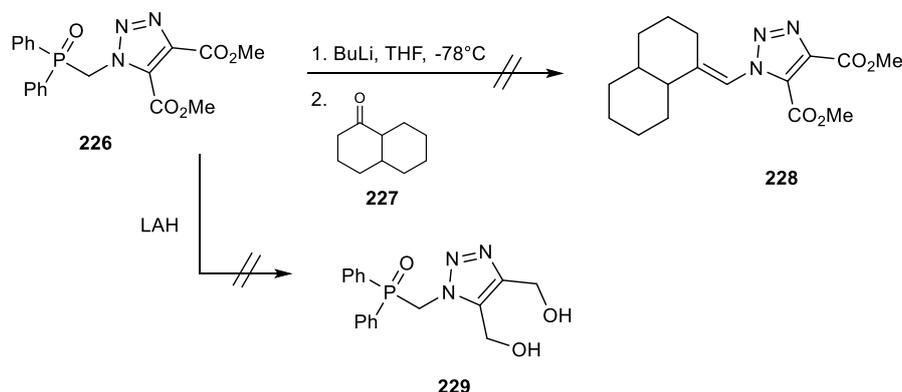
Estas observaciones sugieren que se produjo el ataque del anión, derivado del óxido de fosfina **226**, sobre los ésteres metílicos en posiciones 4 y 5 del triazol, es decir, una reacción

²⁷⁵ Monçalves, M.; Rampon, D. D. S.; Schneider, P. H.; Rodembusch, F. S.; Silveira, C. D. C. *Dye. Pigment.* **2014**, *102*, 71–78.

²⁷⁶ Schuster, E. M.; Botoshansky, M.; Gandelman, M. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (24), 4555–4558.

²⁷⁷ Huntress, E.H.; Lesslie, T.E.; Bornstein, J. *Org. Synth.* **1952**, *32*, 55.

intermolecular. Esta hipótesis cobra fuerza si tenemos en cuenta reportes sobre la adición de aniones derivados de óxidos de fosfina sobre ésteres.²⁷⁸

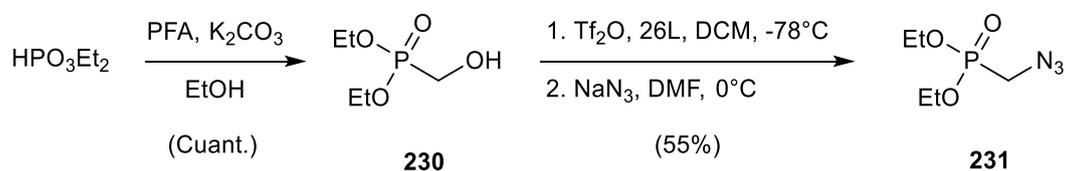


Esquema V.8. Reacciones ensayadas sobre el óxido de fosfina **226**.

Por otra parte, la reducción del diéster **226** con LAH resultó infructuosa, produciéndose la pérdida del sustrato. Se presume que pudieron ocurrir reacciones secundarias sobre el óxido de fosfina, por ej. su reducción. Este tipo de reacciones se encuentra reportada con LAH, aunque generalmente requieren aditivos como CeCl_3 .²⁷⁹ Dados los problemas y limitaciones que se presentaron con los óxidos de fosfina, se decidió trabajar con fosfonatos para el acoplamiento de Wittig-Horner.

V.3.1.ii. Síntesis del fragmento triazol-fosfonato

A fin de obtener el triazolilfosfonato deseado (**232**, **Esquema V.10**, p.208), se sintetizó la azida precursora (**231**, **Esquema V.9**), con la misma aproximación empleada anteriormente para la obtención de **84** (**Sección III.3.4.ii.b**). Esta consistió en la adición de PFA sobre dietilfosfito, en presencia de base, y la posterior derivatización del hidroximetilfosfonato **230** en su correspondiente triflato, que finalmente se sometió a sustitución con azida de sodio para dar azidometilfosfonato de dietilo, **231**.

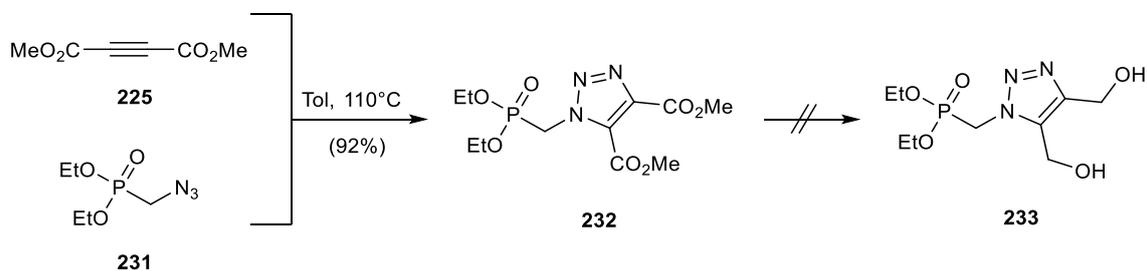


Esquema V.9. Síntesis de azidometilfosfonato de dietilo (**231**).

²⁷⁸ (a) Buss, A. D.; Mason, R.; Warren, S. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24 (47), 5293–5296. (b) Hutton, G.; Jolliff, T.; Mitchell, H.; Warren, S. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (43), 7905–7908.

²⁷⁹ Podyacheva, E.; Kuchuk, E.; Chusov, D. *Tetrahedron Lett.* **2019**, 60 (8), 575–582.

Para la síntesis del triazol **232** se emplearon los precursores previamente sintetizados, la azida **231** y el alquino **225** (DMAD). La cicloadición [3+2] térmica fue llevada a cabo en tolueno a 110°C, obteniéndose el triazol esperado con rendimiento excelente (**Esquema V.10**).



Esquema V.10. Síntesis de azidometilfosfonato de dietilo (**232**).

Nuevamente, la reducción del diéster **232** con LAH, o NaBH₄, no produjo el diol esperado. En función de estos resultados, se puede deducir que el problema de descomposición del sustrato no se debe al fosfonato u oxido de fosfina, como se propuso anteriormente, sino a la tolerancia del anillo de triazol frente a estos agentes reductores. Los escasos reportes bibliográficos sobre la reducción de este tipo de diésteres unidos al anillo de 1,2,3-triazol, indican rendimientos bajos y la aparición de productos de descomposición.²⁸⁰

A pesar de los excelentes rendimientos obtenidos realizando la cicloadición [3+2] con DMAD, los problemas referidos a la reducción del diéster evidencian que, para la síntesis del triazol **233**, se deberá emplear 2-butin-1,4-diol, a pesar de que los rendimientos de la cicloadición empleando este alquino son significativamente menores.²⁸¹

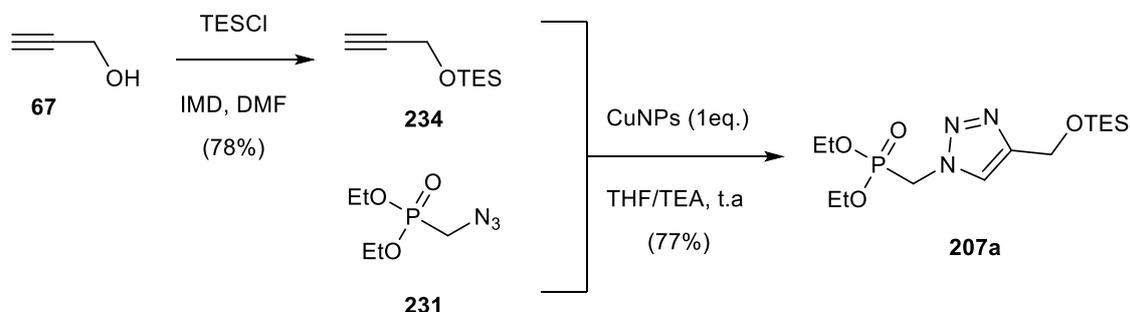
Se procedió entonces a la síntesis de triazolilfosfonatos disustituidos, empleando la CuAAC promovida por CuNPs.

²⁸⁰ Lalezari, I.; Gomez, L.A.; Khorshidi, M. *J. Heterocyclic Chem.*, **1990**, *27*, 687-689.

²⁸¹ Burakova, E. A.; Saranina, I. V.; Tikunova, N. V.; Nazarkina, Z. K.; Laktionov, P. P.; Karpinskaya, L. A.; Anikin, V. B.; Zarubaev, V. V.; Silnikov, V. N. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24* (22), 6012–6020.

V.3.2. Síntesis de triazolil fosfonatos vía CuAAC

Para la obtención del 1,2,3-triazol 1,4-disustituido **207a**, en primer lugar se protegió el alcohol propargílico **67**, transformándolo en su correspondiente éter de silicio (**234**, Esquema V.11). Esto se realizó con el fin de evitar el uso de excesos de base, y evitar problemas de quimioselectividad, durante el acoplamiento de Wittig-Horner.



Esquema V.11. Síntesis del triazol **207a** vía CuAAC.

Posteriormente, se hizo reaccionar la azida **231** con el alquino **234**. Teniendo en cuenta resultados previos, que mostraron rendimientos moderados en la CuAAC al emplear CuNPs/C en azidas derivadas de fosfonatos (Sección III.3.4.ii.b), se decidió emplear CuNPs sin soportar, dado que su mayor reactividad permite efectuar la reacción a t.a. De esta manera se obtuvo el triazol **207a**, con un rendimiento significativamente mayor al obtenido empleando CuNPs/C.

V.3.3. Estudio de la reacción de Wittig-Horner con triazolil fosfonatos

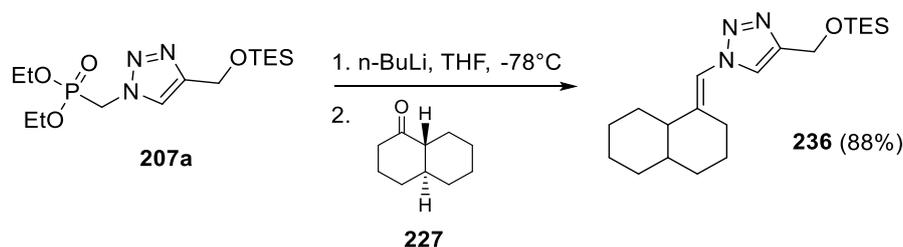
Una vez obtenido el triazol **207a**, se evaluó el acoplamiento de Wittig-Horner con sustratos modelo. La necesidad de este estudio surge del hecho de que los fosfonatos empleados en la reacción de Wittig-Horner normalmente presentan grupos electroattractores (EWG, *electron withdrawing groups*), como ésteres y nitrilos (Figura V.15), que permiten una mayor estabilización del carbanión formado.



Figura V.15. Fosfonatos comúnmente empleados en la reacción de Wittig-Horner.

Sin embargo, pese a los numerosos ejemplos que pueden encontrarse en la bibliografía, no se hallaron referencias de este tipo de reacción empleando triazolilfosfonatos.

Es por ello que se evaluó la reacción de acoplamiento empleando nuevamente *trans*-decalona como sustrato modelo (**227**, Esquema V.12).

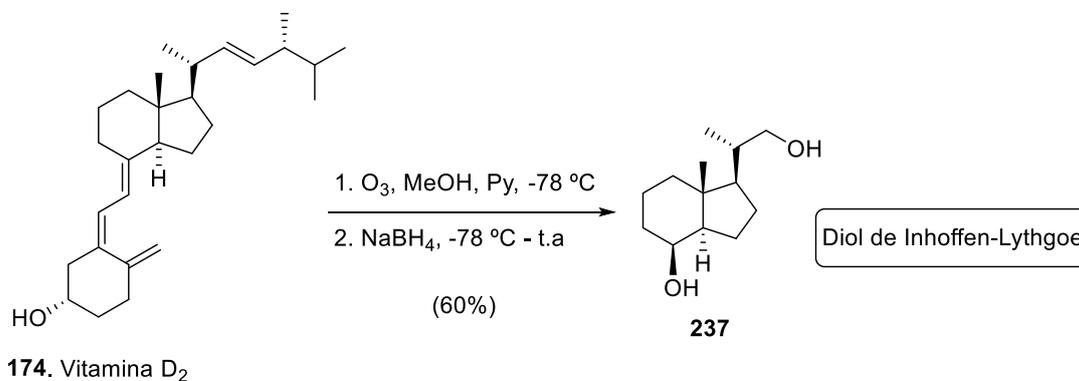


Esquema V.12. Acoplamiento de Wittig-Horner del triazol **207a** sobre sustratos modelo.

La reacción se llevó a cabo en THF seco, a -78°C , empleando *n*-BuLi como base. Se obtuvo el producto deseado (**236**) con muy buen rendimiento, demostrando que el acoplamiento de Wittig-Horner puede aplicarse exitosamente empleando triazolilfosfonatos. Considerando estos resultados, decidimos efectuar el acoplamiento con cetonas de Grundmann.

V.3.4. Síntesis de cetonas de Grundmann

Para la síntesis este tipo de cetonas, se empleó el diol de Inhoffen-Lythgoe (**237**, Esquema V.13) como sustrato de partida. El mismo se obtuvo por ozonólisis reductiva de vitamina D₂, siendo este el método usual para acceder a este bloque estructural.²⁸²

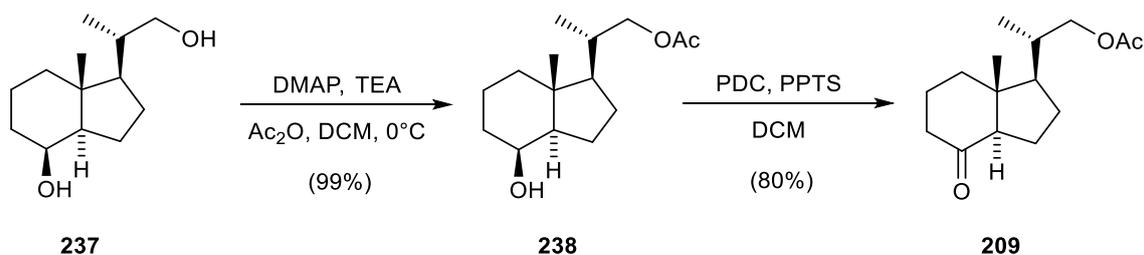


Esquema V.13. Obtención del diol de Inhoffen-Lythgoe, **237**, por ozonólisis de Vit.D₂.

Una vez obtenido **237**, se protegió selectivamente el alcohol primario mediante una acetilación, que procedió con rendimientos cuantitativos (Esquema V.14).²⁸³ Posteriormente se efectuó la oxidación del derivado **238** con PDC, para dar lugar a la cetona de Grundmann **209**.

²⁸² Mascaró, Evangelina, *Tesis Doctoral*, Bahía Blanca, **2011**, p.47.

²⁸³ Clagett-Dame, M.; Plum Lori, A.; Deluca, H.: WO 2010006129 A2 (**2010**).

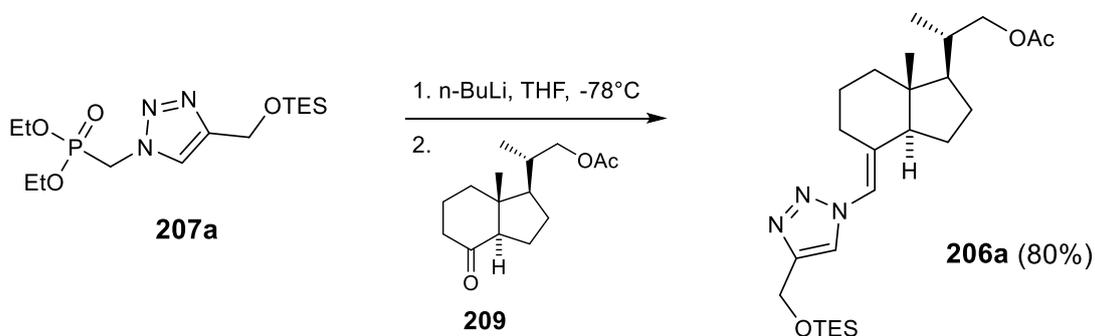


Esquema V.14. Obtención de la cetona de Grundmann **209**.

De esta manera se logró el acceso al compuesto carbonílico deseado en solo dos pasos de reacción, a fin de evaluar rápidamente la reacción de Wittig-Horner. Por otra parte, esta estrategia presentaría una gran versatilidad, con la ventaja de poder preparar bibliotecas de análogos con diferentes cadenas laterales a partir de la posición C-22, realizando una única reacción de acoplamiento.

V.3.5. Acoplamiento de Wittig-Horner con cetonas de Grundmann

La cetona **209** se hizo reaccionar con el triazolil fosfonato **207a**, en las mismas condiciones de reacción que se utilizó con el sustrato modelo (**Esquema V.12**, p.210), obteniéndose el producto esperado con muy buen rendimiento, similar al observado anteriormente.



Esquema V.15. Obtención del derivado Vit.D-triazol **206a** a partir del acoplamiento de Wittig-Horner.

A partir de **206a** se podrá continuar con la construcción de la cadena lateral del calcitriol, o de otro análogo de interés, como el EM1. Finalmente, se procederá a la desprotección del éter de silicio en posición 4 del triazol, para dar lugar a los análogos correspondientes, donde el grupo hidroximetil emula al -OH en posición 1 del Calcitriol.

Para determinar que efectivamente se obtuvo el estereoisómero (*E*) se realizaron espectros de RMN bidimensionales. En primer lugar, se asignaron las señales de interés a través del espectro HSQC (**Figura V.16-A**), y posteriormente se buscaron correlaciones espaciales entre H mediante NOESY, encontrándolas entre el H-vinílico (H-7) y H-15, mientras que H-5 (H-Triazol) se correlaciona con H-9 (**Figura V.16-B**). Esto permite aseverar que se obtuvo el isómero de configuración (*E*), que es el esperado en este tipo de reacciones.

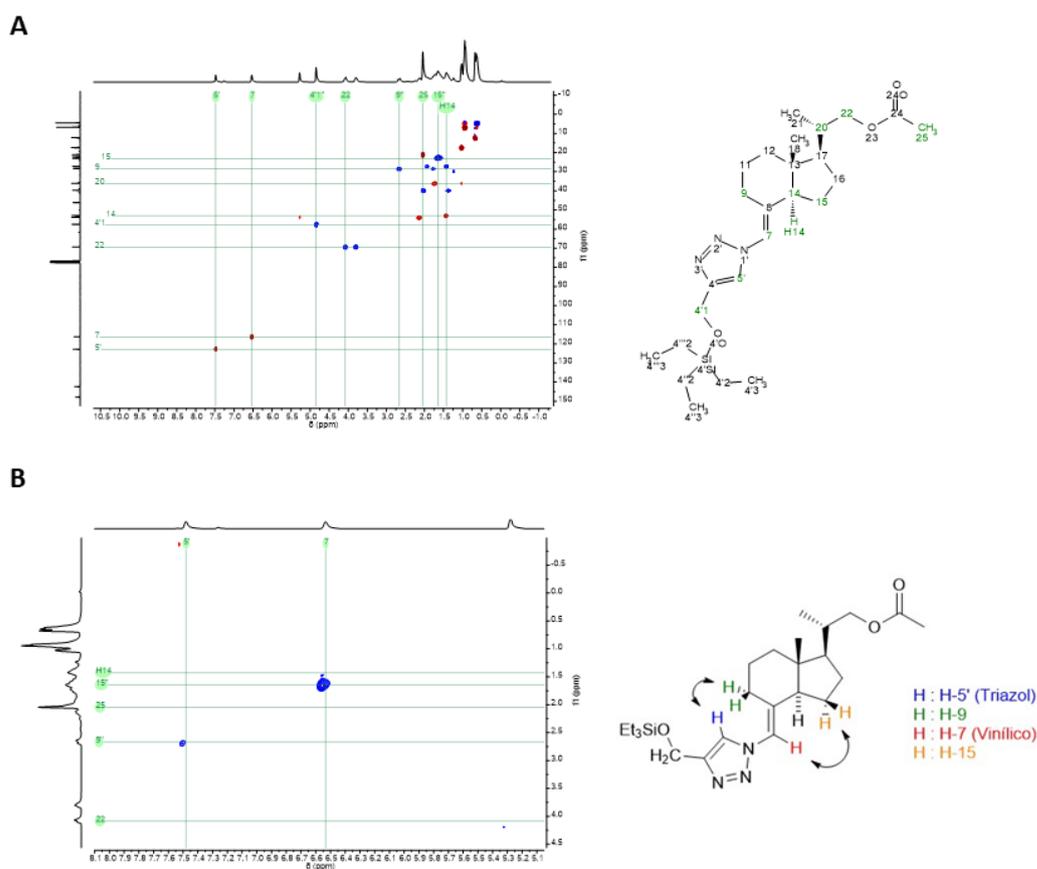


Figura V.16. Espectros HSQC (**A**) y NOESY (**B**) del compuesto **206a**. Los espectros completos se encuentran en la sección experimental de este capítulo.

No se encontraron correlaciones espaciales entre H-7 y H-14 (Véase numeración en la **Figura V.16-A**). Estos H están alejados entre sí, debido a la configuración *trans* que posee el hidrindano en el biciclo CD de la vitamina D.

V.4. Conclusiones

Se desarrolló un método eficiente para incorporar 1,2,3-triazoles en el biciclo CD, que permite la síntesis de análogos no esteroideos de Vitamina D, a través del acoplamiento de Wittig-Horner. La reacción procedió con muy buenos rendimientos, y estereoselectividad hacia el isómero (*E*).

Se efectuó la síntesis de los precursores de manera sencilla y con buenos rendimientos. En primer lugar, se desarrolló una ruta sintética para el acceso rápido a cetonas de Grundmann, en dos pasos de reacción a partir del diol de Inhoffen-Lythgoe. Por otro lado, se empleó la CuAAC, promovida por CuNPs sin soportar, para la síntesis de triazolilfosfonatos.

Para la incorporación de triazoles trisustituídos sobre cetonas de Grundmann, se deberá partir de 2-butin-1,4-diol (**240**, **Figura V.17**), en función de las dificultades encontradas al intentar reducir el diéster **232**.

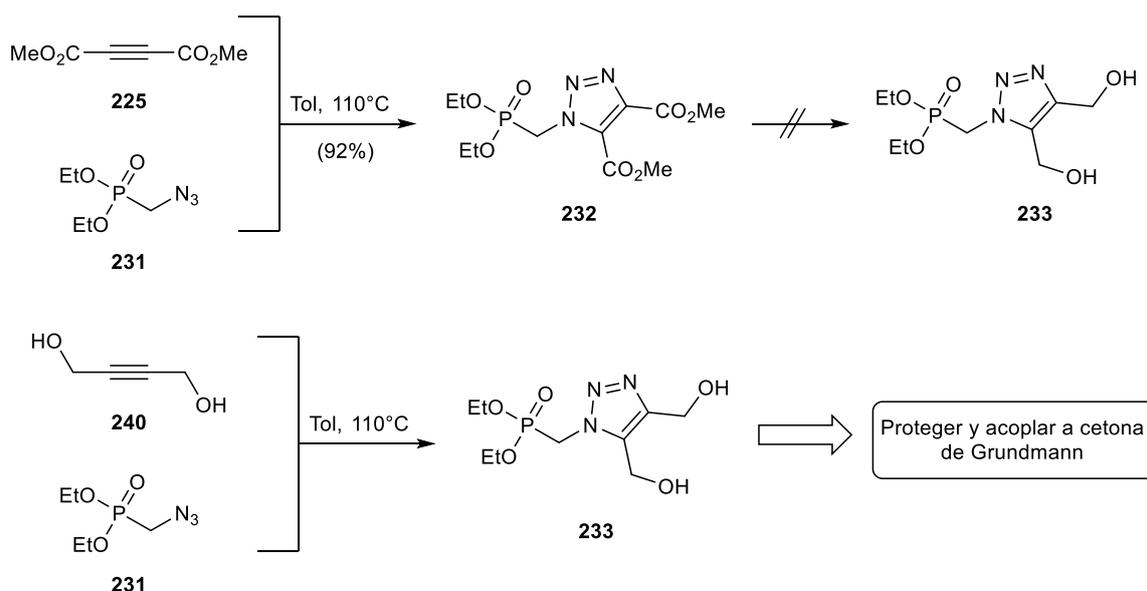
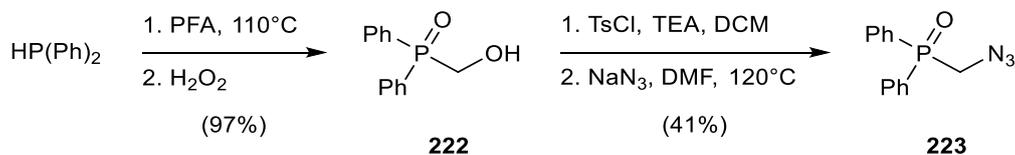


Figura V.17. Propuesta sintética para la obtención de **233**.

V.5. Parte experimental

V.5.1. Síntesis de óxido de (azidometil)difenilfosfina (**223**)

Se adicionó PFA (0,060 g, 2 mmoles) sobre difenilfosfina (0,346 mL, 2 mmoles), y se dejó reaccionar la mezcla a 110°C bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez consumido el PFA (30 min) se da por finalizada la reacción. El producto, líquido incoloro, se disuelve en DCM (5 mL) y se lava con H₂O₂ (10 mL). La fase acuosa se extrae con DCM (3 x 5 mL), y las fases orgánicas combinadas se secan y concentran, obteniéndose **222** (0,449 g, 1,93 mmoles, 97%, R_f = 0,19, AcOEt), que se empleó en la siguiente reacción sin previa purificación.

³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 30.9.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.80 – 7.71 (m, 4H), 7.57 – 7.40 (m, 6H), 4.41 (d, J = 1.0 Hz, 2H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 130.95, 130.90, 130.2, 130.1, 129.27 (d, J = 96.8 Hz), 127.5, 127.3, 60.06 (d, J = 82.3 Hz).

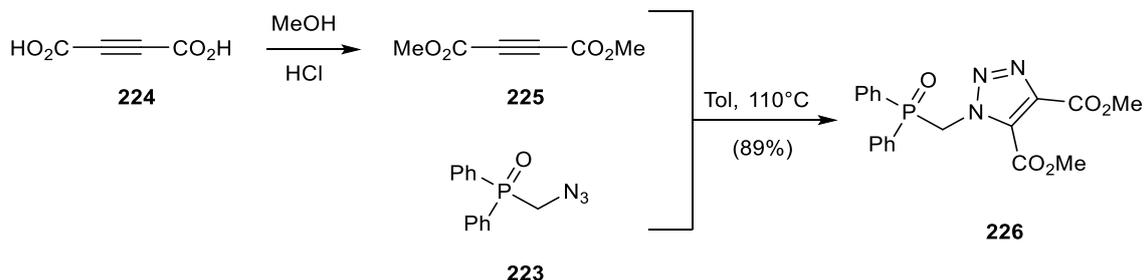
Sobre una solución de **222** (0,342 g, 1,473 mmoles) en DCM (5 mL) a 0°C, se adicionó TEA (0,225 mL, 1,62 mmoles). Tras 30 min, se agregó TsCl (0,309 g, 1,62 mmoles) y se dejó reaccionar la mezcla hasta alcanzar t.a. Una vez finalizada la reacción, se eliminó el solvente a presión reducida, y se retomó el crudo de reacción con DMF (5 mL). Se adicionó azida de sodio (0,144g, 2,2 mmoles), y se calentó a 120°C durante toda la noche. Se adicionó H₂O (20 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaCl (sat.) (10 mL) y H₂O (10 mL), se secaron y concentraron. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (AcOEt/Hexano, 80%), obteniéndose **223** (0,155 g, 0,603 mmoles, 41%, R_f = 0,5, AcOEt).

³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 27.8.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.83 – 7.65 (m, 4H), 7.58 – 7.35 (m, 6H), 3.94 (d, J = 7.4 Hz, 2H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 132.7, 132.6, 131.3, 131.2, 130.26 (d, J = 100.4 Hz), 129.0, 128.8, 49.57 (d, J = 76.4 Hz).

V.5.2. Síntesis de 1-((difenilfosfonil)metil)-1*H*-1,2,3-triazolil-4,5-dicarboxilato de metilo (**226**)



V.5.2.i. Síntesis de Acetilencarboxilato de dimetilo (**225**)

Sobre una solución de **224** (0,570 g, 5 mmoles) en MeOH (5 mL), se adicionó una cantidad catalítica de H₂SO₄, y se dejó reaccionar durante toda la noche a t.a. Finalizada la reacción se agregó H₂O (10 ml), y se extrajo con Et₂O (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron H₂O fría (5 mL) y NaHCO₃ (sat.) (5 mL), se secaron y concentraron. Se obtuvo **225** (0,654g, 4,6 mmoles, 92%, R_f = 0,89, AcOEt), que fue utilizado en la siguiente reacción sin previa purificación.

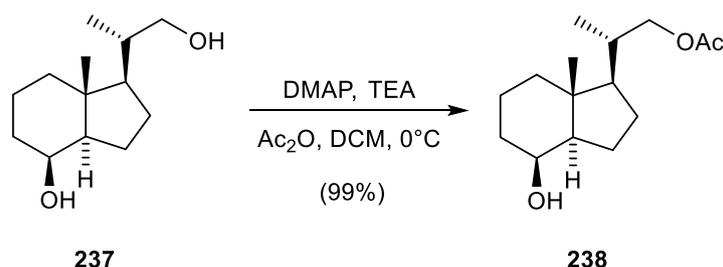
V.5.2.ii. Síntesis de 1-((difenilfosfonil)metil)-1*H*-1,2,3-triazolil-4,5-dicarboxilato de dimetilo (**226**)

Se calentó una solución de **223** (0,109 g, 0,766 mmoles) y **225** (0,197g, 0,766 mmoles) en tolueno (10 mL) a 110°C durante toda la noche. Finalizada la reacción, se dejó enfriar la solución a t.a, tras lo cual se formó un precipitado que se recolectó por filtración. Tras purificación por cromatografía flash en columna (AcOEt/Hexano, 80%) se obtuvo **226** (0,272 mg, 89%, sólido blanco, R_f = 0,62, AcOEt).

³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 25.9.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.78 – 7.63 (m, 4H), 7.61 – 7.40 (m, 6H), 5.59 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.89 (s, 3H).

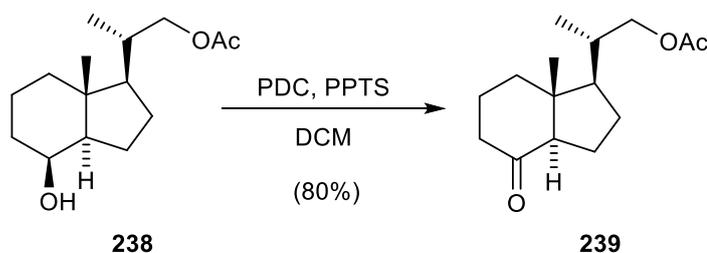
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 160.1, 159.2, 139.5, 133.1, 133.1, 131.7, 131.5, 131.3, 129.5, 129.1, 129.0, 128.1, 53.5, 52.7, 50.1, 49.2, 49.66 (d, *J* = 67.5 Hz).

V.5.3. Síntesis de Des-A,B-8β-(hidroxi)-22-acetoxi-23,24-dinorcolano (**238**)

Sobre una solución de **237** (0,160 g, 0,753 mmoles) en DCM (10 mL) a 0°C, se adicionó una cantidad catalítica de DMAP, TEA (0,136 mL, 0,98 mmoles) y Ac₂O (0,071 mL, 0,753 mmoles). Se dejó la solución en heladera, sin agitación, durante toda la noche. Posteriormente, se lavó la fase orgánica con NaHCO₃ (sat) (1 x 10 mL) y H₂O (2 x 5 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró. Se obtuvo el compuesto **238** (0,190 g, 0,747 mmoles, 99%, R_f = 0,75, Hex/AcOEt 50%), que fue utilizado en la siguiente reacción sin previa purificación.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 4.05 (dd, *J* = 10.5, 3.4 Hz, 2H, CH₂-22), 3.76 (dd, *J* = 10.7, 7.4 Hz, 1H, CH-8), 2.99 (s, 1H, -OH), 2.03 (s, 3H, CH₃CO), 2.00 – 1.91 (m, 1H), 1.88 – 1.08 (m, 10H), 0.98 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃-21), 0.94 (s, 3H, CH₃-18).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 171.5 (CO), 69.5 (C-8), 69.2 (C-22), 53.4 (C-14), 52.5 (C-17), 42.1, 40.4, 35.5 (C-19), 33.7, 26.8, 22.7, 21.1 (CH₃CO), 17.5, 17.1, 13.7.

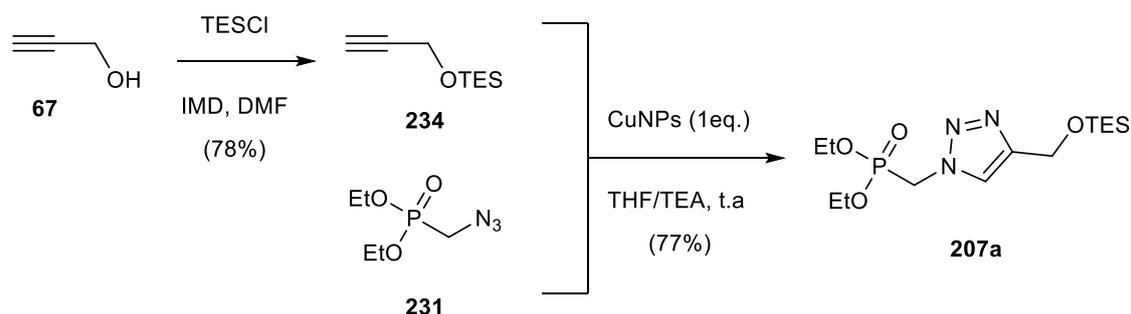
V.5.4. Síntesis de Des-A,B-8β-(oxo)-22-acetoxi-23,24-dinorcolano (**239**)

Sobre una solución de **239** (0,170 g, 0,668 mmoles) en DCM (10 mL), se adicionó PDC (0,504 g, 1,34 mmoles) y una cantidad catalítica de PPTS. La mezcla de reacción se dejó en agitación a t.a. durante 5 h. Luego, se agregó una mezcla de Hex/AcOEt al 25%, se dejó 15 min más en agitación y se filtró a través de celite® mediante una placa filtrante. Los sólidos se lavaron con Hex/AcOEt al 50% hasta arrastrar todo el producto (TLC). El filtrado se concentró y el residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (AcOEt/Hexano, 30%) Se obtuvo el compuesto **240** (0,135 g, 80%, R_f = 0,53, AcOEt/Hexano 30%, aceite incoloro).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 4.05 (dd, $J = 10.8, 3.4$ Hz, 1H, H-22), 3.79 (dd, $J = 10.8, 7.1$ Hz, 1H, H-22), 2.52 – 2.35 (m, 3H), 2.34 – 2.17 (m, 2H), 2.04 (s, 3H, CH_3CO), 2.00 – 1.95 (m, 3H), 1.94 – 1.78 (m, 2H), 1.79 – 1.62 (m, 2H), 1.62 – 1.45 (m, 3H), 1.44 – 1.29 (m, 1H), 1.03 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 0.63 (s, 3H, H-18).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 211.7 (CO), 171.4 (OCOME), 69.2 (CH_2OAc), 61.7, 53.4, 50.0 (C-13), 41.0, 38.9, 35.6, 27.1, 24.1, 21.1, 19.3, 17.3 (C-21), 12.6 (C-18).

V.5.5. Síntesis de (4-(trietilsililoxi(metil))-1H-1,2,3-triazolil)metil)fosfonato de dietilo (**207a**)



V.5.5.i. Síntesis de trietil(2-propiniloxi)silano (**234**)

Sobre una solución de **67** (0,253 mL, 4,4 mmoles) en DMF (3 mL) a 0°C , se adicionó imidazol (0,359 g, 5,28 mmoles) y TESCl (0,810 mL, 4,83 mmoles). Se dejó reaccionar la mezcla a t.a durante 1h, tras lo cual la reacción finalizó (monitoreado por TLC). Se agregó H_2O (10 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaCl (sat.) (10 mL) y H_2O (5 mL). El producto crudo se purificó por cromatografía flas en columna (AcOEt/Hexano, 30%), obteniéndose **234** (0,584 g, 78%, aceite amarillento, $R_f = 0,69$, AcOEt/Hex 20%).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 4.67 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H), 2.81 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H), 1.40 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H), 1.13 – 0.99 (m, 6H).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 83.0, 73.5, 51.7, 7.3, 5.4.

V.5.5.ii. Síntesis de (4-(trietilsililoxi(metil))-1*H*-1,2,3-triazolil)metil)fosfonato de dietilo (**207a**)

Para la obtención de la azida **231**, se aplicó el mismo procedimiento empleado en la obtención de **84** ([Sección III.5.3.i](#)), en este caso partiendo de dietilfosfito. Sobre una solución de **234** (0,170 g, 1 mmol) y **231** (0,193 g, 1 mmol) en THF seco (5 mL) a t.a, se adicionó TEA (0, 14 mL, 1 mmol), y las CuNPs sin soportar, recién preparadas partiendo de 1 mmol de CuCl, acorde al procedimiento general descripto previamente ([Sección III.5.2](#)). Tras 5 min la reacción finalizó (TLC). Se filtró el crudo sobre Celite, eluyendo con AcOEt. Para eliminar restos de cobre, se lavó con H₂O (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó y concentró, purificando el crudo por cromatografía flash en columna (AcOEt), obteniéndose el triazolilfosfonato deseado, **207a** (0,281 g, 77%, R_f = 0,34, AcOEt).

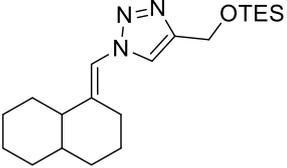
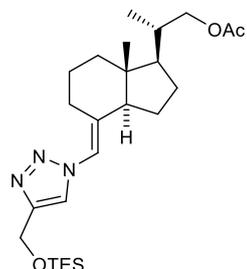
³¹P-RMN (121 MHz, CDCl₃) δ 16.0.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (s, 1H), 4.97 – 4.49 (m, 4H), 4.36 – 3.92 (m, 4H, CH₃CH₂OP), 1.44 – 1.14 (m, 6H, CH₃CH₂OP), 1.07 – 0.74 (m, 6H), 0.74 – 0.43 (m, 9H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 148.1, 122.8, 63.51 (d, *J* = 6.7 Hz, CH₂OP), 57.5, 45.89 (d, *J* = 155.5 Hz, CH₂P), 16.4, 16.3, 6.8, 4.5.

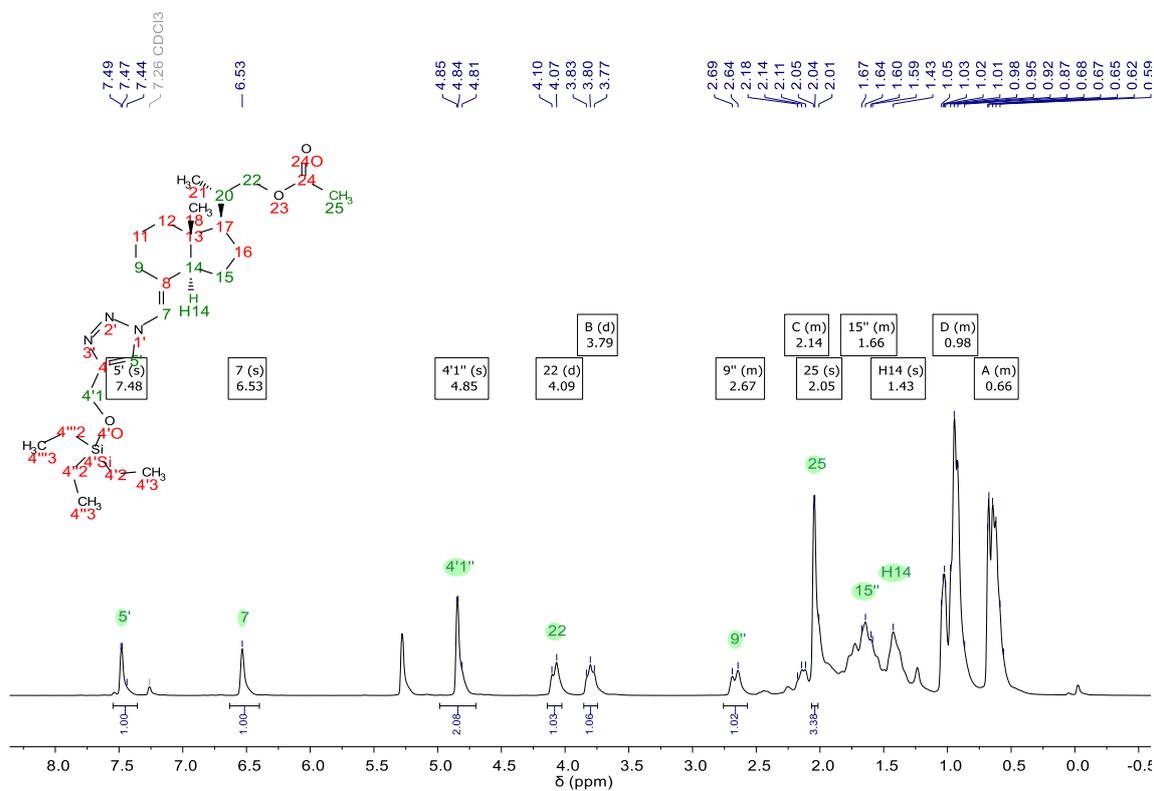
V.5.6. Procedimiento general para el acoplamiento de Wittig-Horner

Sobre una solución del triazolilfosfonato **207a** (1 eq.) en THF seco (5 mL), a -78°C y bajo atmósfera inerte, se adicionó *n*-Buli (0,3 M, 1 eq.). La solución se torna levemente amarillenta. Tras 10 min a la misma temperatura, se agregó la correspondiente cetona (1 eq.). Se dejó reaccionar la mezcla a -30°C , hasta la finalización de la reacción (monitoreado por TLC). Se agregó NH_4Cl (sat.) (5 mL), y se extrajo con AcOEt (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron y concentraron, y el crudo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (AcOEt/Hex, 10-30%), obteniéndose los correspondientes triazoles.

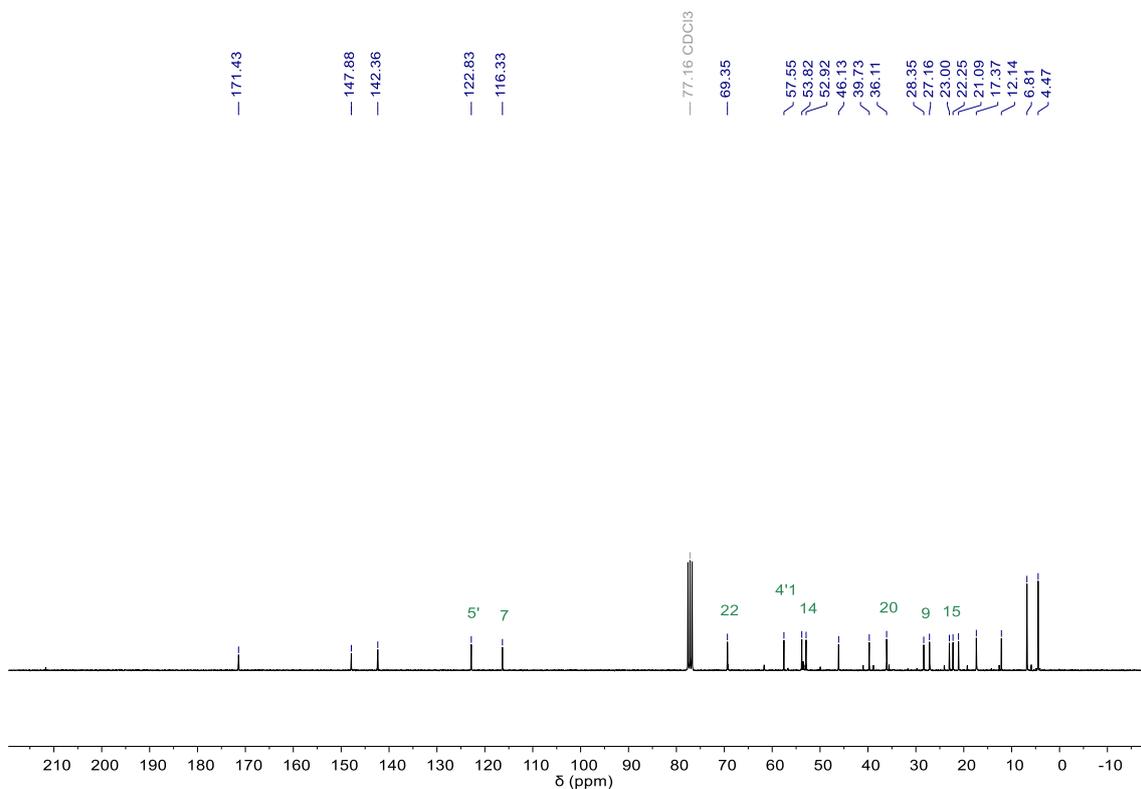
(E)-1-(octahidronaftalenilidenmetil)-4-((trietilsililoxi)metil)-1H-1,2,3-triazol (237)	
	<p>141 mg, 88%, aceite incoloro, partiendo de 0,385 mmoles de decalona.</p> <p>Rf = 0,23 (Hexano)</p>
<p>^1H-RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.48 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 4.87 (s, 2H), 2.67 – 2.48 (m, 2H), 1.99 – 1.63 (m, 6H), 1.45 – 1.06 (m, 5H), 0.97 (t, $J = 7.9$ Hz, 9H), 0.75 – 0.42 (m, 9H).</p>	
((E)-1-(Des-A,B-22-acetoxi-23,24-dinorcolanil-8β-(metiliden)-4-((trietilsililoxi)metil)-1H-1,2,3-triazol (206a)	
	<p>59 mg, 80%, aceite incoloro viscoso, partiendo de 0,16 mmoles de la cetona de Grundmann.</p> <p>Rf = 0,51 (AcOEt/Hexano 30%)</p>
<p>^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.48 (s, 1H, H-5', triazol), 6.53 (s, 1H, H-7, vinílico), 4.85 (s, 2H, CH_2OTES), 4.09 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, H-22), 3.79 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-22), 2.74 – 2.57 (m, 1H, H-9), 2.20 – 2.08 (m, 1H), 2.05 (s, 3H, CH_3CO), 1.80-1.52 (m, 6H), 1.50-1.28 (m, 4H), 1.10 – 0.80 (m, 13H), 0.76 – 0.49 (m, 10H).</p> <p>^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 171.4 (OCOMe), 147.9, 142.4, 122.8 (C-5', triazol), 116.3 (C-7, vinílico), 69.3 (C-22), 57.5 (CH_2OTES), 53.8, 52.9 (C-14), 46.1, 39.7, 36.1 (C-20), 28.4 (C-9), 27.2, 23.0 (C-15), 22.2, 21.1, 17.4, 12.1, 6.8, 4.5.</p>	

Espectros RMN de 206a

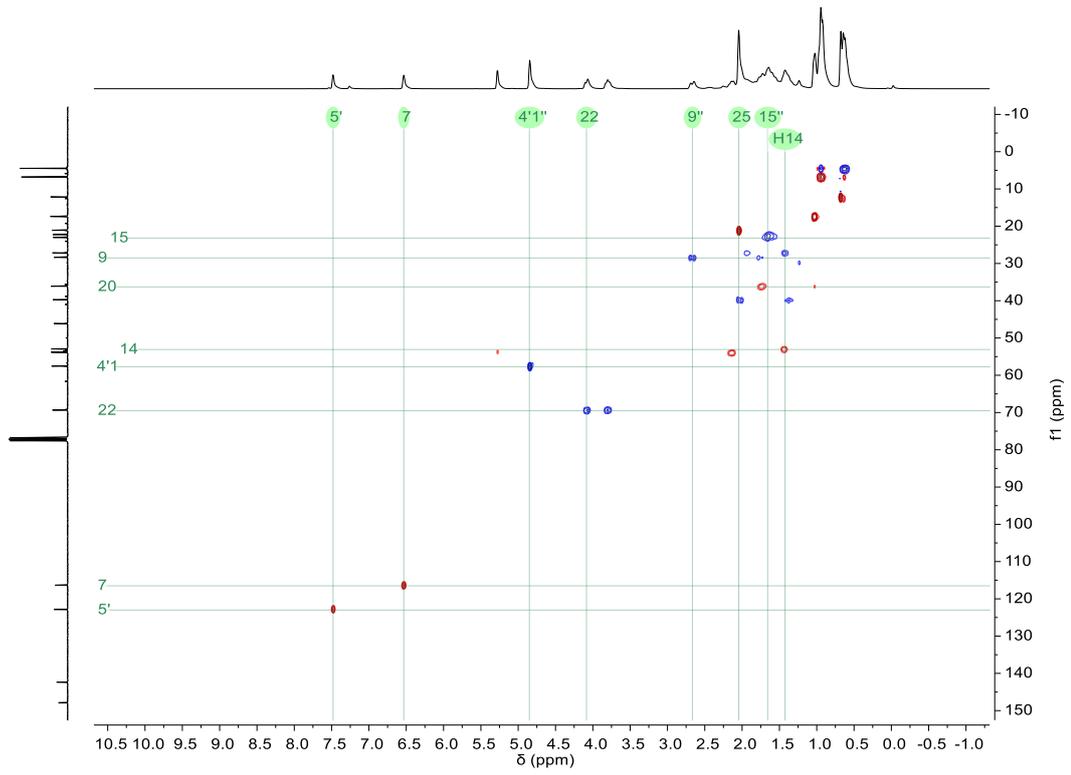
¹H-RMN



¹³C-RMN



HSQC



NOESY

