

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de la reacción de Povarov aza-viníloga.
Aplicación a la síntesis de nuevos ligandos multidiana
con actividad neuroprotectora**

**Development of the aza-vinyllogous Povarov reaction.
Application to the synthesis of new multitarget-
directed ligands with neuroprotective activity**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Clerigué Louzado

Directores

**José Carlos Menéndez Ramos
María Teresa Ramos García**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de la reacción de Povarov aza-viníloga. Aplicación a la síntesis de nuevos ligandos multidiana con actividad neuroprotectora.

Development of the aza-vinylogous Povarov reaction. Application to the synthesis of new multitarget-directed ligands with neuroprotective activity.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Clerigué Louzado

DIRECTORES

José Carlos Menéndez Ramos

María Teresa Ramos García

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Unidad Docente de Química Orgánica y Farmacéutica,
Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de la reacción de Povarov aza-viníloga.
Aplicación a la síntesis de nuevos ligandos multidiana
con actividad neuroprotectora.

Development of the aza-vinylogous Povarov reaction. Application to the
synthesis of new multitarget-directed ligands with neuroprotective activity.

José Clerigué Louzado

Directores:

José Carlos Menéndez Ramos

María Teresa Ramos García

Madrid, 2021

La ciencia sería superflua si la
aparición de las cosas coincidiese
exactamente con su esencia.

Karl Marx

La ciencia es algo maravilloso si uno no
tiene que vivir de ella.

Albert Einstein

Agradecimientos

Después de cinco años y medio de aventuras (y desventuras), esta fase de mi vida me ha permitido conocer muchísimas personas que, de uno u otro modo, han puesto su granito de arena para la consecución de este gran momento. A todos ellos, y también a todos los que han tenido el (dudoso) honor de acompañarme desde antes de este periodo, me gustaría dedicarles unas palabras.

Por supuesto, las dos primeras personas a las que quiero dar las gracias son mis directores de tesis, José Carlos y Maite. José Carlos, infinitas gracias por haberme aceptado en tu laboratorio. Sin apenas conocerme, me abriste las puertas de tu grupo y me confiaste parte de tu trabajo, lo cual para mí tiene mucho valor. El increíble ambiente que se respira en el laboratorio, sin presiones ni competitividad, es algo que es muy difícil de encontrar y creo que es gracias a la actitud con la que nos diriges. Siempre has tenido la puerta del despacho abierta para cualquier necesidad que tengamos, pero también nos dejas equivocarnos y gestionar nuestro trabajo al ritmo y de la manera que nosotros creemos que es la más adecuada. El hacer que sea nuestra motivación, y no la presión, el motor de nuestro trabajo es un valor que tendremos para siempre y por el que hay que agradecerte como corresponde. Además, tampoco se pueden olvidar las cañas y tapas a las que nos has invitado cada vez que había algo que celebrar, que no sólo de trabajo vive el hombre. Maite, muchísimas gracias por la manera en que me has dirigido y acompañado durante este periodo. Desde el punto de vista laboral, por tus enormes conocimientos de resonancia, tu habilidad para encontrar un artículo clave en el momento en que todo parece más atascado y, sobre todo, por tu ojo omnipotente del que ningún acento, errata o cifra equivocada pueden escapar. Por otra parte, quisiera también agradecerte la suavidad en el trato, siendo de las pocas directoras de tesis capaces de transmitir tranquilidad en un momento agobiante. Muy pocos jefes anteponen a las preguntas sobre el trabajo un ¿qué tal estás?, mostrando que el lado humano es tanto o más importante para ti que el laboral. Ha sido toda una fortuna tenerte como directora.

Hay otros profesores del Departamento a quien también me gustaría dedicar unas palabras. En primer lugar, a Pilar. Sin duda, eres la artífice de que yo haya terminado

escribiendo esta Tesis Doctoral, pues fuiste la persona que me invitó a conocer el laboratorio y me animó después a pedir una beca para hacer la tesis aquí, lo cual nunca podré agradecerte lo suficiente. Además de una excelente docente que sabe enseñar y transmitir el gusto por la química (como prueba la cantidad de gente que hemos acabado aquí “por tu culpa”) eres una gran persona, siempre preocupada por nuestro estado de ánimo y dispuesta a desvivirse en la marea burocrática que generamos los doctorandos (de manera involuntaria, créeme). Mercedes, muchas gracias por tu dicharachería, tu buen humor y tu enorme capacidad para organizar de la nada unas cañas. Siempre estás dispuesta a echarnos una mano con todo aquello que podamos necesitar, y cuántos work-up o tardes aburridas me habrás amenizado con tus charlas de muy diversa índole (entre las que destacan las quejas compartidas por el funcionamiento de la universidad). Nieves, a ti me gustaría agradecerte el trato directo, sincero y, sobre todo, humano, siempre preocupada por nuestras necesidades y por dignificar el trato que recibimos los doctorandos. Aunque seas del Madrid, echo de menos cuando pasa una temporada sin oírte vociferar por el laboratorio, pues cuando eso pasa es sinónimo de pasar un rato divertido. Juancho, lo que unieron las células y el ORAC, creo que será difícil de separar. Me alegro de haberte tenido como compañero de trabajo en dos laboratorios distintos, y te quiero agradecer también tu disposición a ayudarme, especialmente en mis primeros pasos como ayudante. Me gustaría dar las gracias también a Juanfran, Elena, Giorgio, Pilar Hoyos y Almudena por su ayuda en las cuestiones del día a día y las conversaciones en las comidas; y a María por su aporte inagotable de chocolate.

El trabajo del día a día hubiera sido mucho más complicado, por no decir imposible, sin la ayuda de los técnicos de laboratorio. Muchas gracias a Marisa, Jesús y Rocío por la labor que desempeñáis o habéis desempeñado en el departamento. Especialmente quiero agradecer a Marisa su increíble disponibilidad y capacidad para solucionar todos los “fregados”, además de tu socarronería y tu simpatía que te convierten en una compañera de trabajo genial.

Durante estos años he tenido la suerte de compartir laboratorios con un grupo de auténticos fuera de serie, que no sólo me han enseñado muchísimo sobre química sino que también han sido los protagonistas de uno de los mejores periodos de mi vida.

A Giulia quiero agradecerle mi etapa de iniciación en el laboratorio: te tocó el “premio” de enseñarme y pasarme tu proyecto en tu periodo “pretésico”, por lo que la paciencia que mostraste para enseñarme todo lo que sabías (que es mucho) tiene un doble valor. Marco, compartimos laboratorio durante tres años y he de decir que fuiste el compañero de laboratorio que todo el mundo querría tener. A pesar del acoso laboral y las burlas constantes a que me sometías, tu alegría contagiosa, tu carácter tranquilo y ese punto necesario de pasotismo hicieron que te ganases un hueco en mi corazón. Lo que más me alegra de todo es que, aunque te marchases, seguimos compartiendo momentos de cañas y planchas de pladur en los que nos ponemos al día y donde puedo seguir aprendiendo de tu fantástica personalidad.

Qué sería del laboratorio sin nuestro querido Ángel, de pequeño tamaño pero alta concentración en rabia. Por un lado, tengo que agradecerte la ayuda incalculable que me has prestado para realizar el trabajo de esta tesis, pues eres uno de los tíos más brillantes que he conocido en el mundo de la investigación y supones una fuente de aprendizaje y motivación continuas para los que tenemos la suerte de trabajar contigo (si exceptuamos el lanzamiento de objetos y las putadas ocasionales). Si a esto le sumas las innumerables conversaciones sobre el sentido de la vida (sólo cuando no hay nadie delante, y habitualmente interrumpidas por una parida enorme), viajes, noches palaciegas, y otro sinfín de experiencias que hemos compartido, puedo decir que de este periodo me llevo un verdadero amigo, compañero y experto oceanógrafo por herencia familiar, y que así sea por mucho tiempo.

Marta, fuiste una de las personas sin las que no se podría entender este periodo de doctorado. Por un lado te agradezco tu faceta laboral, siempre dispuesta a echar una mano de forma entusiasta cuando me veías en medio de un embrollo insoluble. Por otra parte, si hay que agradecer a alguien lo bien que lo hemos pasado estos años es a ti, siempre presta a imaginar planes muy variopintos con los que hacer grupo fuera del laboratorio. Aunque alguna vez hayamos tenido nuestros más y nuestros menos, considero que hemos tenido una relación muy especial llena de momentos memorables y en la que nos lo hemos pasado genial, y espero que así siga siendo por lejos que vivamos.

¡EGUN ON PITXINNNNN! Cris, tu personalidad buenrollera y brutalmente directa me enamoró desde el principio. Aunque no hayas querido volver conmigo a la planta -5 del aparcamiento, quiero decirte que guardo con mucho cariño todos los momentos que hemos compartido, la sonrisa que me sacas todas las mañanas al llegar al trabajo, la naturalidad con la que me has abierto tus distintas casas y, especialmente, la atmósfera alegre que creas a tu alrededor. Encima, haciendo honor a tus eusko-orígenes, eres un ejemplo maravilloso de bondad y tenacidad, espero haber aprendido algo de ti en todo este tiempo. Ah, por cierto, se van a pelear...

Es difícil, Olmo, describir en unas líneas todo lo que hemos vivido juntos. Cuando empecé la tesis rodeado de otros novatos como yo, apenas podía imaginar que acababa de conocer a un chaval que me cambiaría la vida en muchos sentidos. La experiencia de irme a compartir piso contigo ha sido de las cosas más bonitas que me han sucedido nunca, un antes y un después en la vida. La infinidad de conversaciones que hemos tenido, en todo tipo de estados de ánimo y sobre todo tipo de temas, una fuente inagotable de fuerza y aprendizaje, pues no podría ser de otra manera con una persona como tú. Por no hablar de la complicidad fraternal que hemos desarrollado, los viajes, los “viajes”, el temible tándem que hacemos cuando se encienden las farolas y abren los garitos... Una pasada, tío. Si esto se ha forjado en sólo cinco años, no quiero pensar en lo que vendrá. Encima, en el laboratorio eres un excelente compañero, inteligentísimo y siempre inquieto por aprender cosas nuevas y meterte en los fregados más cenagosos. Ojalá tengas la suerte que sin duda mereces como el que más.

Jorge, qué hubiéramos hecho sin el sargento de hierro empeñado en convertir un saco de despojos en verdaderos hombres y mujeres preparados para la batalla. Gracias por tus entrenamientos, tu humor absurdo y por permitirme presenciar tus primeros pasos en el alcoholismo y la aplicación de las más depuradas técnicas de ligoteo. Al final hemos pasado buenos momentos juntos, incluso una peregrinación jacobea.

Miguelito, qué placer ha sido trabajar contigo durante más de dos años, y cuánto se te echa de menos en el laboratorio. No sólo es que todo sea muy fácil contigo porque eres un pedazo de pan, es que encima eres una persona bastante divertida y curiosa, lástima que casi nunca te lo creas. Además, has demostrado tener una gran valentía a la hora de tomar ciertas decisiones, por lo que creo que nadie se merece tanto como tú que las

cosas acaben bien y tengas oportunidad de envenenarnos desde algún servicio de farmacia hospitalaria.

Gracias al covid, que alargó imprevisiblemente mi periodo de doctorado, pude llegar a conocer a la nueva hornada de jóvenes muchachos y muchachas que, inocentes ellos, han emprendido también este camino. En primer lugar quiero agradecer a Manolito, llegado de allende los mares para traernos toneladas de dobles sentidos, buenísimos platos mexicanos y un nada despreciable caudal de licores sospechosos. Eres un tío muy inteligente, y tu sensibilidad denota lo buena persona que eres. No sólo eres un magnífico compañero de laboratorio, sino que además estoy contento de que nos haya tocado trabajar en el mismo proyecto, pues creo que puedo aprender mucho de tu habilidad y tus conocimientos. Noelia, cuántos buenos ratos nos dan tu sinceridad sin cortapisas y tu carácter. Tienes una capacidad de sacrificio y trabajo enorme de la que todos deberíamos aprender, y ahora que ya eres capaz de gestionar los malos momentos te vas a convertir en una fuera de serie. Como además te estamos desviando hacia la mala vida, te estás revelando como una divertida compañera de correrías nocturnas. En fin, que creo que el futuro nos seguirá deparando muchos buenos momentos. Álvaro, cada vez que hablo contigo me doy más cuenta de que eres todo un descubrimiento. Detrás de una personalidad suave y amable se esconde una inteligencia extraordinaria que sólo está a la par de tu ironía y tu gusto por el humor políticamente incorrecto. Es un verdadero placer hablar contigo de cualquier tema por la enorme profundidad y cultura que manifiestas, por lo que me alegra mucho saber que vamos a tener años para seguir teniendo conversaciones increíblemente enriquecedoras de las que espero aprender mucho. Además, también compartir laboratorio contigo es un gusto por lo solidario que eres. Si Álvaro es la tranquilidad, Josemi es el torbellino. Creo que eres el tipo de persona que hace falta en cualquier grupo humano, divertido y con un dinamismo desbordante que muchas veces es necesario para abstraernos de la gris rutina. Espero que quieras compartir conmigo algo de esa faceta tuya. Pero que esto no esconda lo inteligente, válido y trabajador que eres, el mérito que tiene lo que estás haciendo y la atención que siempre muestras por las personas que te rodean. Eres un grande.

Hay otras personas que he tenido oportunidad de conocer a través del laboratorio, aunque luego esto haya sido lo de menos. En primer lugar, por supuesto, la reina del drama Cris Sayago. Bendita la casualidad que nos hizo conocernos, pues con poca gente he encontrado una afinidad tan brutal en muchos aspectos de mi personalidad. Hemos compartido infinidad de inseguridades, temores y momentos de zozobra con la enorme confianza de quien se siente escuchado y comprendido, sí; pero lo mejor de todo es que se quedan pequeños al lado de lo bien que nos lo pasamos juntos y la enorme cantidad de situaciones disparatadas que suceden cuando andamos por ahí sin control. Eres de esa gente cuya presencia necesito en mi día a día, y me alegra saber que vamos en el mismo barco en esta espiral de imprevisible decadencia. Sheila, eres otro de esos torbellinos que con su imparable dinamismo ha dejado huella en mi periodo de doctorado. Tu fuerza increíble ante todo tipo de problemas y adversidades (que no te han sido escasos) son un ejemplo para tirar adelante sin lamentarse, y tu capacidad para mover gente y organizar saraos crean situaciones que hagan que la vida merezca la pena. Por no hablar de cómo nos has abierto las puertas de tu casa, para descubrir que tu personalidad se explica en el contexto de una familia realmente maravillosa. Por último, quiero acordarme de la gracia murciana de Isa, tozuda, divertida y bonachona donde las haya. Me has demostrado mucho cuando he tenido algún mal momento en tu presencia, dándome un apoyo del que no me olvido, incluso si previamente no teníamos la mayor de las confianzas. Me alegro mucho de haber conocido a una persona tan fuerte, divertida y atenta con las personas de su entorno.

Durante estos cinco años han pasado innumerables estudiantes de muy distinta condición por el departamento. El máster del departamento nos obsequia cada año con cinco nuevos cachorros dispuestos a zambullirse en las procelosas aguas de la química farmacéutica: gracias a todos ellos por la compañía y la sangre nueva que traen cada año al laboratorio, y especialmente a Montaña por ser una excelente compañera y una no menos valerosa peregrina; a Carmen, por los buenos ratos y las fiestas compartidas dentro y fuera del laboratorio; y a Laura, por su colaboración en las primeras tomas de contacto con la mecanoquímica. También quisiera agradecer a los distintos estudiantes de grado que han colaborado conmigo a lo largo de estos años: Alejandro, Javi (espero que te esté yendo mejor que a Ciudadanos), Sandra y Javier Gómez-Martinho.

No sólo de españoles se nutre el grupo, sino que también Italia tiene a bien obsequiarnos con lo mejor de su cosecha anual para convertir el laboratorio en una *piccola Italia*. Gracias a Claudia por tus habilidades culinarias y las fiestas compartidas, a Elvis por ser un auténtico máquina (Ferrari, no Fiat) y por tus esfuerzos para salir en las fotos nocturnas, a Ilaria Agostinelli por haber sido una divertidísima compañera en nuestro decadente estilo de vida, y a tantos otros: Vincenzo, Rosita, Giulia Teseo, Ester, Sara, Chiara, Francesco, Tahra, Francesca, Giuliano, Riccardo...por su compañía en el laboratorio, los diálogos en itañol y las ganas de hacer planes que nos habéis transmitido durante vuestro periodo de Erasmus. Gracias también a Benedetta, tanto en tu periodo de Erasmus como tras tu vuelta a España hemos tenido la oportunidad de compartir momentos fantásticos, y he descubierto a una persona muy sensible e inteligente, ¡mucho suerte con el doctorado! Me dejo para el final a las tres personas con quien el vínculo establecido durante nuestro periodo al laboratorio no sólo no ha desaparecido, sino que se ha afianzado como una verdadera amistad. Gracias Alessandro por tu personalidad inimitable, tus HOOOOOLMES y DIBUEEEEEESCO son ya parte de la historia y la tradición oral del departamento. Aunque de primeras parezcas un ser absolutamente insufrible (esto es muy divertido cuando la víctima no es uno mismo) eres un tío estupendo y entrañable, y aunque no nos podamos ver con frecuencia me hace mucha ilusión que sigamos en contacto. Alessandra, tu caso es curioso, cuando estuviste en Madrid no llegamos a hacer una amistad muy profunda (supongo que eras una *gazza* de vida libre), después nuestros caminos se volvieron a cruzar en Bologna en un periodo extraño y ahí sí, descubrí que eres una persona muy divertida y con muy buen corazón, todo un descubrimiento que merece muchísimo la pena. No me olvido de que prácticamente todo lo bueno que me llevo de Bologna fue de un modo u otro gracias a ti: me diste casa, bicicleta, gente a la que conocer y, lo mejor de todo, me enseñaste el *Poco ma buono*, toda una institución de Bologna donde ahogar en alcohol las penas del laboratorio y el coronavirus. Silvia, a ti casi ni se me ocurre qué decirte. Después de tu llegada, no hizo falta mucho tiempo para darme cuenta de que tenía delante a una persona increíblemente curiosa y que encerraba muchas cosas valiosas dentro de una apariencia un poco tímida, y madre mía si tenía razón. Hemos compartido un año inolvidable en Madrid, lleno de experiencias (a veces un poco límite), momentos festivos y tristes en los que hemos forjado una relación muy especial. Si con ello no hubiera sido

suficiente, volvimos a encontrarnos en Bologna, donde nuestros paseos desafiando el frío y nuestras reuniones clandestinas en tu pisazo se elevaron a la categoría de religión. Silvi, eres una de las personas más importantes en mi vida y espero que esto no cambie jamás.

Hay otros trabajadores de la Facultad que con su simpatía y buen hacer nos han hecho el día a día más llevadero. Hablo de Lupe, Raúl, Ayid y la tropa de la cafetería: Jose, Javi, Sara y Perla. Muchas gracias a todos ellos (y a los trabajadores de la cafetería, les deseo la merecida suerte que les han negado unos miserables).

El trabajo que llevamos a cabo en nuestro grupo no sería posible sin el concurso de los CAI de RMN, microanálisis elemental y espectrometría de masas de la Universidad Complutense, por lo que aprovecho la ocasión para agradecerles su colaboración y su disponibilidad ante cualquier necesidad.

La Tesis Doctoral me ha llevado dos veces fuera de los dominios de la Facultad de Farmacia, habiéndome brindado la oportunidad de tomar contacto con el fascinante y desesperante mundo de la biología y de conocer gente estupenda para la que quisiera también tener unas palabras. En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Rafael León por haberme hecho un hueco en su laboratorio sin poner la más mínima pega, además de por los consejos sobre un mundo que yo apenas conocía y la colaboración directa en los experimentos cuando mis manos carecían de la fiabilidad requerida. Gracias a Kike y Pablo por la simpatía con que me habéis recibido desde el primer día y vuestra disponibilidad a la hora de ayudarme en un laboratorio en el que estaba un poco perdido, sin olvidar las clases de asturianía basadas en el Recluta Cachopo. Me gustaría darte las gracias especialmente, Paloma, porque si ha habido una persona que se comió el "marrón" de ayudar al novato fuiste tú, y no sólo lo hiciste de buen grado y con la máxima profesionalidad, sino que encima me he terminado llevando una amiga. Eres una profesional como la copa de un pino, un talento tuyo que sólo es equiparable al de encontrarte famosas por la calle. Espero al menos haberte devuelto parte de tu ayuda enseñándote el Madrid "peligroso".

Vorrei ringraziare a Barbara Monti per la accoglienza nel suo laboratorio della Università di Bologna, anche se sapevi che non avevo nessuna esperienza nel mondo della biologia mi hai ammesso nel tuo gruppo e mi hai fatto imparare molto grazie ai tuoi consigli.

Anche voglio avere qualche parole per Francesca: grazie per la tua gentilezza, anche se hai dovuto lavorare in più per insegnarmi e per tirare avanti il lavoro sempre l'hai fatto con un sorriso, e devo dire che ho imparato tantissimo da te. Sono contento di aver preso i miei primi passi nel mondo della farmacologia sotto la tua supervisione. Ilana, è stato un onore lavorare con te, abbiamo dovuto imparare insieme e questo periodo è stato più divertente grazie alle tue occorrenze e la tua vitalità. Fuori dal laboratorio ho condiviso il mio tempo un gruppo di gente incredibile, che mi ha reso molto felice nun periodo strano e, purtroppo, bruttissimo. Ernesto, da tempo che non avevo una connessione subita così forte con una persona, ci siamo capiti bene dal primo momento. Abbiamo fatto una amicizia che è di un valore inestimabile per me, e dobbiamo continuare a ritrovarci sia in Puglia che a Madrid, abbiamo tante cose da vivere insieme (se uno non muore, questo stilo di vita é un po' tosto). Eleonora, in realtà vorrei oddiarti ma non posso, tante conversazioni sul senso della vita (mai trovato), tante ironie e tanto disagio condiviso ci hanno fatto diventare amici (purtroppo). Scherzo, ti voglio bene Ele, sei una persona molto intelligente e curiosa, un vero tesoro da scoprire, e sono contentissimo di averti conosciuto. Dobbiamo anche continuare a fare cassini dove ci troviamo (prossimo, a Madrid). Virginia, mi manca tanto il tuo carattere gioioso, sempre pronta con un sorriso a renderci più felice la giornata. Hai un cuore d'oro, sempre atenta a quello che gli altri possiamo aver bisogno. Devo dire che tante volte ho apprezzato la tua puntualità, visto che non è un talento molto frequente in Italia. Ti spero anche a Madrid, posso essere sicuro che almeno tu verrai! Ovviamente anche qua devo menzionare a Silvia e Alessandra: tutto quello che vi volevo dire lo ho già scritto prima, ma anche qua ho una bella oportunitá per dirvi che siete stati fondamentali per il mio periodo a Bologna, e che vi voglio bene!!!

Voy a ir remontándome hacia atrás en la vida, para acordarme de la gente que me acompaña desde antes de iniciar el doctorado. En primer lugar, me querría acordar de mis amigos del periodo Erasmus en Estrasburgo. Gracias a Gabri, Fernán, Javi, Dani y Salva por un periodo que fue inolvidable, que marcó un antes y un después en mi vida y que no podría entender sin el extraño cóctel de filosofía, aventurerismo y alcoholismo extremo que se originaba en vuestra compañía. En segundo lugar, cómo no, mis amigos de la universidad. A ti Pablo qué decirte, no nos decimos muchas cosas bonitas pero sentarme al lado tuyo el primer día de la facultad es una de las coincidencias más

geniales que me han ocurrido nunca. Llevas más de diez años siendo una de las personas fundamentales de mi vida, un manantial inagotable de risas y momentos absurdos pero también de inteligencia y de conversaciones que me han ido modulando como persona. Espero que podamos seguir haciendo el ridículo por la vida juntos durante muchos más años. Alberto, cuántas cosas hemos vivido también contigo, gracias por todos esos momentos y por permitirme pintar tu casa a mi estilo. Aunque ahora nos has abandonado en el macarrismo y te has convertido en un padrazo como pocos hay, me llena de alegría ver que has conseguido formar una familia tal y como querías, y más aún poder de vez en cuando ir a Salamanca y secuestrarte un rato para revivir todo aquello que nos convirtió en buenos amigos. Marian, muchas gracias por todos los momentos y risas que hemos compartido durante la carrera y aún compartimos en nuestros reencuentros, y especialmente por haberme invitado a venir contigo al laboratorio cuando hacías la beca de colaboración, pues gracias a eso he acabado haciendo aquí la tesis (y perdido un ojo por disparo de acetona). Vicky, qué hubiera sido de mi periodo universitario sin tus ocurrencias y tu risa alocada, que espero me sigan acompañando en el futuro. Gracias también a Lorena, aunque hayamos pasado de vivir a “un metro” a estar en países diferentes, eso no quita un ápice de la alegría que me da cuando nos vemos y sabemos el uno del otro.

Si me remonto más atrás, me encuentro con toda la tropa del colegio. Empiezo por Rafa, aunque no te guste mucho la palabrería. Realmente tú vienes de la guardería, nada menos que 25 años como compañeros de viaje: normal que a veces hablando contigo me asuste de hasta qué punto me conoces. Ya lo hemos vivido todo juntos, alegrías, malos momentos, múltiples cambios de etapa, y sin embargo como hermanos bien avenidos seguimos al pie del cañón. Aunque ahora te deje solo en este camino del doctorado, seguiré compartiendo gustoso infinitas tardes de charla profunda y mandándote memes de doctorandos, eso no lo dudes. En cuanto a Elenita, aunque nos conocemos desde el colegio, paradójicamente ha sido en estos últimos años cuando te he conocido y me he dado cuenta de lo increíble que eres, de modo que te has convertido en una persona imprescindible en mi día a día. Eres una compañera inigualable en todo tipo de situaciones: desde las fiestas más desmadradas hasta las tardes de crisis vital en que sólo necesitamos alguien con quien compartir nuestros miedos y nuestras dudas. Por si fuera poco, eres de las personas más divertidas que

conozco, aunque eso vaya con tu condición de payasa. Por supuesto me gustaría dar las gracias también a Coke, otro de esos compañeros de vida con los que he podido contar desde los tres años en las buenas y en las malas, y con quien da igual el tiempo que pase y lo que cambien nuestras vidas que seguimos siendo igual de imbéciles cuando nos juntamos; a Laura, sin cuyo punto de organización (en cajas) y de excentricidad nos hubiéramos perdido muchos de los buenos momentos de estos años; y a Canoura, Utri, Marta, Andrés, Martín y los demás por los buenos momentos y anécdotas vividas desde tiempos remotos.

Lógicamente, sin el sostén de mi familia hubiera sido muy difícil llegar hasta aquí, por lo que quiero dar las gracias a mi familia por haberme apoyado siempre en todas mis decisiones relativas a mi carrera profesional, y especialmente por haberme enseñado una serie de valores que me han conformado tal y como soy hoy en día (aunque no sé si eso es bueno o malo). A mi padre quiero agradecerle el empeño que ha mostrado desde que era pequeño para dotarme de todas las herramientas necesarias para formarme intelectualmente y como persona, habiéndome inculcado el hábito por la lectura y el interés por la política, la historia y el saber en general, intereses todos ellos sin los que no sería lo que soy hoy en día. Además, nunca olvidaré nuestra fantástica convivencia durante tantos años, tan cómoda y divertida que diríase que convivía más con un amigo que con un padre. De mi madre quiero destacar el respeto y el cariño con que siempre has acompañado todas las decisiones relacionadas con mi vida: ya desde pequeñito te preocupaste en enseñarme a leer en casa, y desde ahí siempre me has acompañado siempre dispuesta a compartir todas tus experiencias (que no son pocas) pero dejando que fuese yo el que tomase las decisiones, con una abnegación que supongo que sólo una madre puede tener, y esto siempre a pesar de las situaciones nada fáciles que nos ha tocado vivir. A mi hermana Paula le querría decir que, a pesar de que siempre hemos parecido el perro y el gato, eres una magnífica compañera en esta aventurera familia que nos ha tocado vivir, y significa mucho para mí la alegría y el orgullo que percibo de tu parte cuando las cosas me van bien (y que es mutuo, que lo sepas) Aunque no valores tus logros estoy orgulloso de tu inteligencia, tu sentido práctico y tu carácter firme (aunque a veces algo delicado). A mi abuela Tola creo que nunca le podré devolver ni la centésima parte de todo lo que ha hecho por mí, apareciendo como una segunda madre siempre que ha hecho falta, has sido siempre una referencia única y una fuente de cariño

inagotable para mí, sin olvidar esos arroces con pollo que han sido el combustible ideal para poder hacer la tesis. Por supuesto gracias a mis tíos y a mis primos por el orgullo que me transmiten y todos los momentos vividos, y por último gracias a mis abuelos Beni y Pepe y mi abuela Juli: me da una rabia tremenda no poder compartir este momento con vosotros porque sé lo orgullosos que estabais de mí y lo que os hubiera gustado ir fardando de nieto, pero de algún modo estáis porque habéis sido una parte fundamental en este camino.

Rocío (a.k.a. peloseta), no pensarás que me iba a olvidar de ti. Son ya casi nueve años compartiendo nuestro camino vital, a pesar de los distintos cambios de etapa que nos ha tocado vivir en todo este tiempo. Es muy bonito que además hayamos hecho la tesis a la vez y sobre un tema parecido, no sólo por las conversaciones interesantísimas que hemos tenido, sino también porque eso nos ha ayudado a empatizar profundamente el uno con el otro. Eres de esas personas tan buenas que, aunque quieras, no se te puede sacar ni una sola pega, y sin tu infinita paciencia, tu apoyo incondicional y el interés que muestras por mis cosas este camino hubiera sido mucho más difícil. Además, que este periodo haya sido tan bonito también es gracias a los viajesos que nos hemos pegado, las risas que nos echamos juntos y nuestros momentos cinéfilos (o al menos los míos en tu inerte compañía). Mil gracias por todo ello, y espero que todo se quede pequeño en comparación con lo que está por venir.

Por último, y a pesar de la desesperante burocracia y el mar de inexplicables decisiones que suelen ir en contra de los doctorandos, querría agradecer a la Universidad Complutense, pues sin la financiación otorgada a través de una beca doctoral no estaría ahora escribiendo estos agradecimientos.

No me alargo más, creo que con esta enorme y pesada parrafada ha sido suficiente. Seguro que me he dejado a alguien, pero los que me conocéis sabéis que mi talento para el despiste es legendario: a todos los que he mencionado, y a los que pueda haber olvidado, ¡muchísimas gracias!

Índice

Abreviaturas.....	XXV
RESUMEN DE LA TESIS	XXXI
SUMMARY OF THE THESIS	XXXVII
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Enfermedades neurodegenerativas	3
1.1.1 Definición y clasificación	3
1.1.2 Epidemiología.....	5
1.1.3 Etiología.....	7
1.1.4 Patogenia	14
1.1.5 Evolución, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas	44
1.2 La reacción de Povarov	50
1.2.1 Importancia de los derivados de 1,2,3,4-tetrahidroquinolina.....	50
1.2.2 Definición y reseña histórica.....	52
1.2.3 Diversidad de la reacción de Povarov	53
1.2.4 Mecanismo y estereoquímica de la reacción de Povarov	74
1.2.5 Aplicación de la reacción de Povarov a la síntesis de compuestos con actividad antineurodegenerativa.....	81
Capítulo 2. Objetivos	85
Capítulo 3. Adaptación de la reacción de Povarov aza-viníloga a condiciones de mecanoquímica	91
3.1 Introducción.....	93
3.1.1 Mecanoquímica: concepto y evolución.	93
3.1.2 Aspectos técnicos de la mecanoquímica. Ventajas e inconvenientes.....	95
3.1.3 Aspectos mecanísticos	100
3.1.4 La reacción de Povarov en condiciones de mecanoquímica: antecedentes.	101
3.1.5 Reacción de Povarov aza-viníloga. Ventajas de su adaptación a condiciones de mecanoquímica.	103
3.2 Síntesis de 2-aciltetrahidroquinolinas mediante la reacción de Povarov aza-viníloga en condiciones de mecanoquímica	106
3.3 Tentativas para extender la metodología mecanoquímica a la síntesis de 2-ariltetrahidroquinolinas y hexahidropirrolo[3,2- <i>b</i>]indoles.....	116
3.4 Aplicaciones sintéticas de los productos de la reacción de Povarov aza-viníloga en condiciones de mecanoquímica.	121
3.5 Experimental section	124
Capítulo 4. Aplicaciones de la reacción de Povarov aza-viníloga: síntesis de quinolinas polisustituidas y derivados de pirroloquinolina.	151
4.1 Introducción.....	153

4.1.1	Quinolinas: relevancia y métodos de obtención.	153
4.1.2	Pirrolo[3,4- <i>b</i>]quinolinas: relevancia y métodos de obtención.	156
4.1.3	Antecedentes en el grupo de obtención de quinolinas por transposiciones térmicas y oxidativas. Certezas y dudas sin resolver sobre el mecanismo.....	158
4.2	Síntesis de quinolinas 2,3,4-trisustituidas a través de un proceso dominó de deshidrogenación /transposición C4-C3/deshidrogenación.	163
4.3	Síntesis de derivados de pirrolo[3,4- <i>b</i>]quinolina	176
4.4	Experimental section	182
Capítulo 5. Diseño y síntesis de compuestos diazabíclicos análogos de citisina con actividad neuroprotectora.		
5.1	Introducción.....	203
5.1.1	Estrés oxidativo y Nrf2	205
5.1.2	Modulación terapéutica de la actividad de Nrf2	208
5.1.3	Papel neuroprotector y regulador de Nrf2 de los receptores nicotínicos de acetilcolina	214
5.2	El alcaloide citisina como base para el diseño de nuevos agentes moduladores de los receptores nicotínicos	220
5.2.1	Citisina: un alcaloide con actividad nicotínica. Diseño de análogos con actividad neuroprotectora.	220
5.2.2	Diseño de los análogos de citisina: contexto y antecedentes.	225
5.3	Síntesis de una familia de metanobenzodiazocinas con analogía estructural con el alcaloide citisina.....	228
5.4	Intentos de funcionalización de los compuestos 19	234
5.5	Ensayo farmacológico de los compuestos 20a-q.....	239
5.6	Experimental section	250
Capítulo 6. Diseño y síntesis de ligandos multidiana análogos de citisina para el tratamiento de la neurodegeneración.		
6.1	Introducción.....	265
6.1.1	Diseño de ligandos multidiana: una nueva aproximación para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.	267
6.1.2	Melatonina: una hormona endógena, un neuroprotector pleiotrópico.	274
6.1.3	Compuestos antioxidantes naturales derivados del ácido cinámico	284
6.1.4	Ácido α -lipoico	287
6.2	Diseño de tres familias de ligandos multidiana derivados de citisina.....	292
6.3	Síntesis de derivados híbridos de metanodibenzoazocina-melatonina (familia A)	295
6.4	Síntesis de derivados híbridos de metanobenzodiazocina-melatonina (familia B)	303
6.5	Síntesis de derivados híbridos de metanobenzodiazocina-ácidos cinámicos/ácido lipoico (familia C)	309
6.6	Caracterización farmacológica de las familias A, B y C de ligandos multidiana	315

6.7 Experimental section	339
Capítulo 7. Conclusiones/Conclusions	383
Anexo: Espectros representativos	393

ABREVIATURAS

Ach: Acetilcolina

AchE: Acetilcolinesterasa

ACP: *Acyl carrier protein*

AGE: *Advanced glycation end-product*

AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados

Akt: *Protein kinase B*

ALDH: *Aldehyde dehydrogenase*

AMPA: *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

AO: Ácido okadaico

AOX: Antioxidante

ARE: *Antioxidant response element*

ATP: Adenosina trifosfato

BACE-1: *Beta-site APP cleaving enzyme 1*

BACH-1: *BTB domain and CNC homolog 1*

Bad: *BCL2 associated agonist of cell death*

BchE: Butirilcolinesterasa

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*

BHE: Barrera hemato-encefálica

BINOL: 1,1'-Bi-2-naftol

CAN: Nitrato cérico amónico

COX-2: Ciclooxygenasa 2

DAM: *Damage-associated microglia*

DAMP: *Damage-associated molecular pattern*

DAT: *Dopamine active transporter*

DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

DCC: *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida

DDQ: 2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

DIA: *Direct imine acylation*

DIPEA: Diisopropiletilamina

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo

dr: *Diastereomeric ratio*

EAAT-2: *Excitatory amino acid transporter 2*

EDCI: *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida

ee: exceso enantiomérico

ELA: Esclerosis lateral amiotrónica
EMA: *European Medicines Agency*
ERK: *Extracellular signal-regulated kinase*
ERO-1: *Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1*
FC: Farmacocinética
FD: Farmacodinámica
FDA: *Food and Drug Administration*
FDG: Fluorodesoxiglucosa
FKHRL-1: *Forkhead-like protein-1*
FOXO: *Forkhead box protein*
FUS: *Fused in sarcoma*
GABA: *Gamma aminobutyric acid*
GPR: *G protein-coupled receptor*
GPX: Glutación peroxidasa
GSH: Glutación
GSK-3 β : *Glycogen synthase kinase 3 beta*
GST: *Glutathione S-transferase*
HAT: *Hydrogen atom transfer*
HNE: 4-Hidroxinonenal
HOAt: 1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
HO-1: Hemooxigenasa 1
HRD-1: *Synoviolin 1*
HSVM: *High speed vibratory milling*
IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*
IKK: *I κ B kinase*
IL: Interleucina
IPOD: *Insoluble protein deposit*
IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*
I3PR: *Inositol triphosphate receptor*
JAK-2: *Janus kinase 2*
JNK: *c-Jun N-terminal kinase*
ICAM-1: *Intercellular adhesion molecule 1*
ILAG: *Ion and liquid assisted grinding*
IL-AG: *Ionic liquid-assisted grinding*
JUNQ: *Juxta nuclear quality control compartment*
Keap-1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*
LAG: *Liquid assisted grinding*
LCR: Líquido cefalorraquídeo
LOX: Lipooxigenasa

LPS: Lipopolisacárido
Maf: *Musculoaponeurotic fibrosarcoma protein*
MAM: *Mitochondria-associated membrane*
MAO-A/B: Monoaminoxidasa A/B
MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*
MARCO: *Macrophage receptor with collagenous structure*
MCA: Mecamilamina
MCU: *Mitochondrial calcium uniporter*
MLA: Metilicaconitina
MMPP: Monoperoxiftalato magnésico
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
nNOS/iNOS: *Neuronal/inducible nitric oxide synthase*
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCX: *Sodium-calcium exchanger*
NF- κ B: *Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*
NFH: *Neurofilament heavy chain*
NFL: *Neurofilament light polypeptide*
NGF: *Nerve growth factor*
NLR: *NOD-like receptor*
NMDA: *N-methyl-D-aspartate*
NOE: *Nuclear Overhauser effect*
NOESY: *Nuclear Overhauser effect spectroscopy*
NQO1: *NAD(P)H quinone oxidoreductase 1*
Nrf2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
OMS: Organización Mundial de la Salud
ORAC: *Oxygen radical absorbance capacity*
PAIN: *Pan-assay interference compound*
PAM: *Positive allosteric modulator*
PAMP: *Pathogen-associated molecular pattern*
PAMPA: *Parallel artificial membrane permeability assay*
PBL: *Porcine brain lipid*
PBM: *Planetary ball milling*
PDI: Proteína disulfuro isomerasa
PET: *Positron Emission Tomography*
PGC-1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
PIKK: *Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase*
PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase*
PINK-1: *PTEN induced kinase 1*

PKC: *Protein kinase C*
PMCA: *Plasma membrane calcium pump*
POLAG: *Polymer-assisted grinding*
PPA: *Proteína precursora amiloidea*
PP2A: *Protein phosphatase 2*
PRDX: *Peroxirredoxina*
PrP: *Proteína priónica*
PRR: *Pattern Recognition Receptor*
PTPm: *Poro de transición de permeabilidad mitocondrial*
RE: *Retículo endoplásmico*
RMIM: *Rapid mode image matching*
RMN: *Resonancia magnética nuclear*
RNS: *Reactive nitrogen species*
ROC: *Receptor-operated calcium channel*
ROCK: *Rho-associated protein kinase*
ROS: *Reactive oxygen species*
RXRA: *Retinoid X receptor alpha*
RyR: *Ryanodine receptor*
RZR/ROR α : *Retinoid Z receptor/RAR-related orphan receptor alpha*
R/O: *Rotenona/Oligomicina A*
SBM: *Surface based morphometry*
SERCA: *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*
SET: *Single electron transfer*
SIB: *Swiss Institute of Bioinformatics*
SNC: *Sistema nervioso central*
SN2: *Sustitución nucleófila de tipo 2*
SOC: *Store-operated calcium channel*
SOD-1: *Superóxido dismutasa 1*
SPINOL: *1,1'-Espiropiindano-7,7'-diol*
SQSTM-1: *Sequestosome 1*
STAT-3: *Signal transducer and activator of transcription 3*
TDP-43: *Transactive response DNA binding protein 43*
TEMPO: *(2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-il)óxido*
TGF- β : *Transforming Growth factor beta*
THF: *Tetrahidrofurano*
TLC: *Thin-layer chromatography*
TLR: *Toll-like receptor*
TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*
T3P: *Anhídrido propilfosfónico*

β -Trcp: *Beta-transducin repeat-containing protein*

UDP: *Uridine 5'-diphosphate*

UPR: *Unfolded Protein Response*

VDAC: *Voltage-dependent anion channel*

VOC: *Voltage-operated calcium channel*

RESUMEN DE LA TESIS

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas, debido a su carácter inequívocamente asociado a la edad, se están convirtiendo en uno de los problemas más acuciantes para los sistemas públicos de salud a medida que las sociedades actuales envejecen. Los enigmas que aún rodean al funcionamiento del sistema nervioso central, unidos a la compleja etiología multifactorial que está detrás de estas patologías, han provocado que el diagnóstico de estas enfermedades sea demasiado tardío, mientras que los tratamientos disponibles se limitan a un efecto paliativo sin ser capaces de actuar sobre las causas verdaderas del proceso patológico. Es por ello esencial que el incipiente conocimiento sobre los verdaderos orígenes de la neurodegeneración sea trasladado al diseño de fármacos orientados hacia esas nuevas dianas, así como deben ensayarse nuevas estrategias terapéuticas más adecuadas para el tratamiento de enfermedades de etiología multifactorial, como podría ser el empleo de fármacos multidiana.

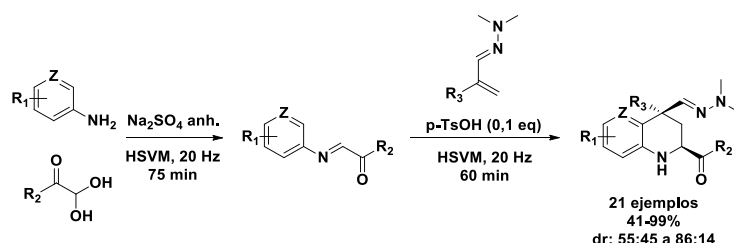
La reacción de Povarov constituye un procedimiento sencillo y versátil para la síntesis de 1,2,3,4-tetrahidroquinolinas, un esqueleto con una amplia presencia en diversos productos naturales y sintéticos de interés farmacéutico, orgánico e industrial. La versión aza-viníloga desarrollada hace unos años por nuestro grupo de investigación resulta particularmente interesante, pues el patrón de funcionalización de los productos resultantes permite su transformación en otros compuestos cuyo acceso resulta más complejo a través de los métodos convencionales, como pueden ser los derivados de 2-acilquinolina o de 2,6-metanobenzo[e][1,4]diazocina. Una vez estudiada pormenorizadamente la nueva reacción de Povarov aza-viníloga, se hacía necesario valorar su potencial para contribuir a algunos de los desafíos de la química moderna, como puede ser el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas en el ámbito de la química médica, o el desarrollo de procesos más seguros y sostenibles desde el punto de vista medioambiental, en el campo de la química orgánica convencional.

Objetivos

1. Adaptación de la reacción de Povarov aza-vinílica a las condiciones de síntesis mecanoquímica.
2. Estudio de la versatilidad y el mecanismo de la oxidación de 2-aryl/2-aciltetrahidroquinolinas con la transposición concomitante C₄-C₃ del grupo dimetilhidrazonometilo, mediante el tratamiento con DDQ.
3. Aplicación de los derivados de 2-acil-3-dimetilhidrazonometilquinolina a la síntesis de pirrolo[3,4-*b*]quinolinas.
4. Síntesis y evaluación farmacológica de una familia de derivados de 2,6-metanobenzo[*e*][1,4]diazocina, análogos estructurales de la citisina, con una potencial actividad antioxidante y neuroprotectora.
5. Diseño, síntesis y evaluación farmacológica de tres nuevas familias de ligandos multidiana, en las que un fragmento análogo de la citisina se combina con distintos productos naturales, como nuevos agentes neuroprotectores para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

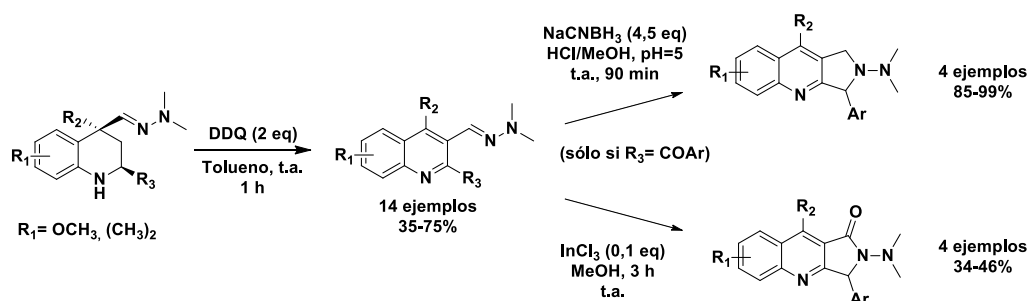
Resultados y discusión

Se consiguió poner a punto la síntesis de 2-acil-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas en condiciones de mecanoquímica mediante la reacción de Povarov aza-vinílica, en un protocolo *one-pot* que prevé inicialmente la síntesis de las α -cetoiminas que desempeñan el papel de dieno en la cicloadición, y después la reacción de Povarov en sí misma tras la adición del dienófilo y el catalizador ácido. Aunque con ciertas diferencias, la eficacia global del proceso es comparable a la del procedimiento convencional en disolución. En cambio, este éxito no se pudo trasladar a la síntesis mecanoquímica de 2-aryl-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas.

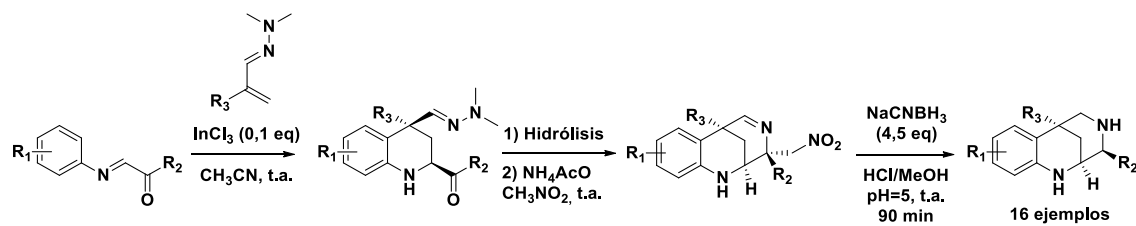


Se sintetizó una quimioteca de 14 productos de oxidación/transposición C₄-C₃ mediante el tratamiento de los productos de la reacción de Povarov aza-vinílica con DDQ a temperatura ambiente, siendo un procedimiento válido tanto para 2-aryl

como para 2-aciltetrahidroquinolinas. No obstante, se comprobó que el anillo de la tetrahidroquinolina debe presentar sustituyentes con un fuerte carácter electrodonador para que dicha transformación sea viable. El estudio teórico-experimental parece indicar que el mecanismo de la reacción transcurre mediante un proceso de deshidrogenación/transposición/deshidrogenación, catalizado por DDQ a temperatura ambiente en el caso de los compuestos sintetizados en este capítulo. Los derivados de 2-acil-3-dimetilhidrazonometilquinolina pudieron ser transformados en pirrolo[3,4-*b*]quinolinas mediante una ciclación reductora intramolecular mediada por NaCNBH₃, o bien en pirrolo[3,4-*b*]quinolin-1-onas cuando fueron tratados con InCl₃ a temperatura ambiente.

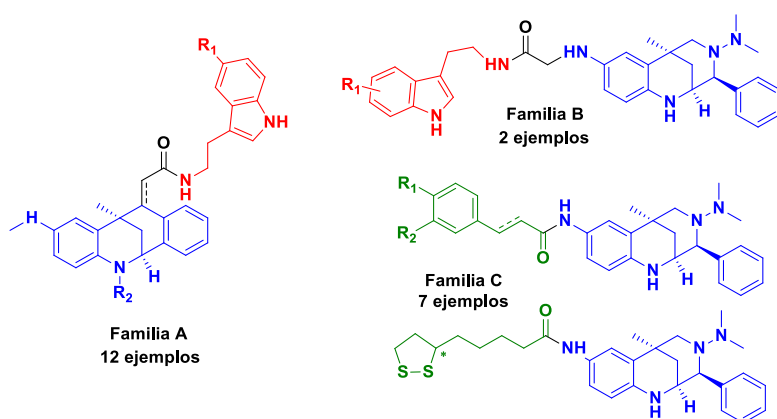


La reacción de Povarov aza-viníloga aplicada a la obtención de 2-aciltetrahidroquinolinas supuso también un punto de partida idóneo para la preparación de una familia de 2,6-metanobenzo[*e*][1,4]diazocinas mediante una ruta sintética sencilla y versátil. Los compuestos obtenidos demostraron tener una cierta actividad antioxidante intrínseca, así como una notable actividad neuroprotectora en distintos modelos de neurotoxicidad por estrés oxidativo y hiperfosforilación. Este efecto neuroprotector podría radicar en su capacidad para inducir el factor de transcripción Nrf2, una actividad que a su vez podría estar relacionada con la modulación de determinados subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina.



- Actividad antioxidante (ORAC)
- Efecto neuroprotector frente a estrés oxidativo y AO
- Capacidad inductora del factor de transcripción Nrf2
- Actividad moduladora sobre los receptores nicotínicos de Ach

La experiencia acumulada con los análogos de citisina descritos anteriormente se aprovechó para diseñar y sintetizar tres nuevas familias de ligandos multidireccionales, que combinan un fragmento análogo de citisina con productos naturales, entre los que se encuentran triptaminas, ácidos cinámicos y el ácido lipoico. También se introdujeron algunas variantes en la estructura del esqueleto análogo de citisina, a fin de estudiar su influencia en la actividad global de los nuevos ligandos multidireccionales. Los ensayos farmacológicos avalaron su potente actividad antioxidante intrínseca, así como un prometedor perfil neuroprotector y antiinflamatorio para la mayoría de los compuestos ensayados. Los experimentos encaminados a conocer su mecanismo de acción revelaron que la mayoría de ellos exhiben una potente actividad inductora del factor de transcripción Nrf2, y que podrían modular algunos subtipos de receptores nicotínicos como el $\alpha_4\beta_2$ y el α_7 , aunque se requieren más ensayos para consolidar y concretar estos hallazgos.



- Actividad antioxidante en ensayos ORAC y DPPH
- Efecto neuroprotector frente a privación de suero y potasio
- Actividad antiinflamatoria
- Capacidad inductora del factor de transcripción Nrf2
- Actividad moduladora sobre los receptores nicotínicos de Ach
- Atraviesan BHE (PAMPA)

Conclusiones

En esta Tesis Doctoral se han explorado las posibilidades que ofrece la nueva reacción de Povarov aza-viníloga, habiéndose demostrado su adaptabilidad a las condiciones de mecanoquímica, su utilidad para la síntesis de nuevos derivados de quinolina difícilmente accesibles por los métodos convencionales y su aplicabilidad a la obtención de nuevos compuestos sencillos o multidiana con un prometedor perfil neuroprotector y antioxidante.

SUMMARY OF THE THESIS

Introduction

Neurodegenerative diseases, which have a strong connection with aging, are becoming one of the most important challenges for national health services, as societies are getting older. We are still far from fully understanding the details of the way in which central nervous system works and furthermore neurodegenerative diseases have a complex multifactorial origin, and so their diagnosis often comes too late to reverse the pathological process. Available drugs are only useful to relieve symptoms, since they do not target the real origin of the neurodegeneration. In this context, it is necessary to apply the current knowledge about the onset of neurodegeneration to the design of drugs directed to emerging targets, and to consider new therapeutic strategies able to better deal with this kind of diseases, such as the use of multitarget directed ligands.

The Povarov reaction is a simple and versatile procedure for the synthesis of 1,2,3,4-tetrahydroquinolines, a scaffold that can be found in many natural and synthetic molecules with applications in the area of synthetic methodology or in industry. The aza-vinylogous version, developed some years ago by our research group, is very interesting due to the functionalization pattern shown by the products, which makes them suitable for further transformations in order to obtain bridged structures, such as 2-acylquinoline or 2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocine derivatives, not readily available by conventional methods. Once the new aza-vinylogous Povarov reaction has been studied in depth, it remains to establish its potential to contribute to some current topics of the modern chemistry, such as the synthesis of new antineurodegenerative drugs, or the development of safer and greener synthetic procedures.

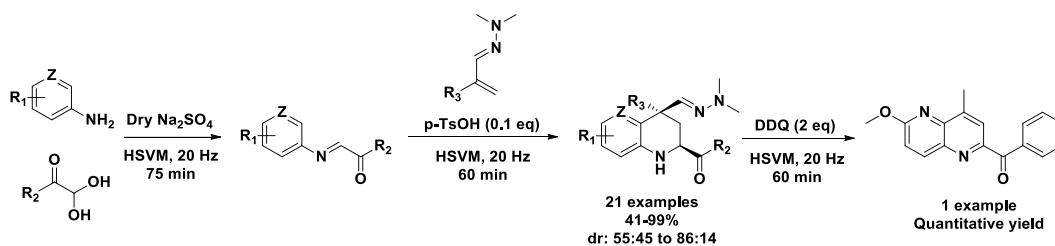
Objectives

1. Adaptation of the aza-vinylogous Povarov reaction to mechanochemical conditions.
2. Study of the scope and the mechanism of the oxidation of 2-aryl/2-acyltetrahydroquinolines with a concomitant C₄-C₃ rearrangement of the dimethylhydrazonomethyl group, in the presence of DDQ.

3. Exploration of new methods to synthesise new pyrrolo[3,4-*b*]quinoline derivatives from 2-acyl-3-dimethylhydrazonomethylquinolines.
4. Synthesis and biological evaluation of a new library of cytosine-like 2,6-methanobenzo[*e*][1,4]diazocine derivatives, with potential antioxidant and neuroprotective activities.
5. Design, synthesis and pharmacological evaluation of three new families of multitarget directed ligands that combine a cytosine-like framework with various natural products, as new potential neuroprotective agents against neurodegenerative diseases.

Results and discussion

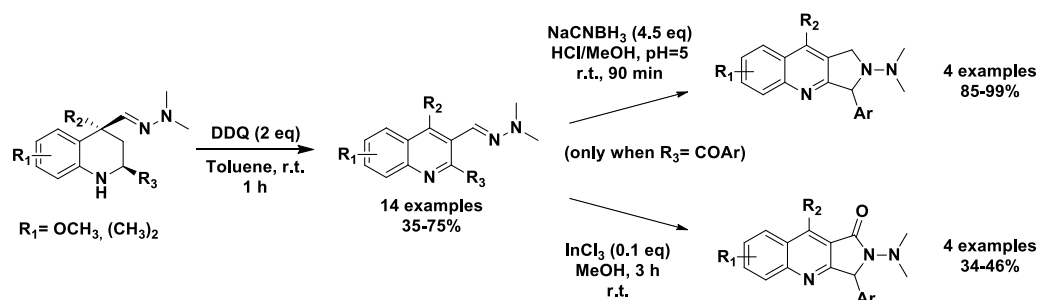
The mechanochemical synthesis of 2-acyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines by the aza-vinylogous Povarov reaction was successfully achieved through a one-pot procedure involving two steps: an initial condensation to obtain the α -ketimines that play the role of dienes in the cycloaddition, followed by the Povarov reaction once the dienophile and the acid catalyst are added to the reaction mixture. Despite some differences, the global efficiency of the process is quite similar to that observed for the conventional reaction in solution. However, this success could not be extended to the mechanochemical synthesis of 2-aryltetrahydroquinolines.



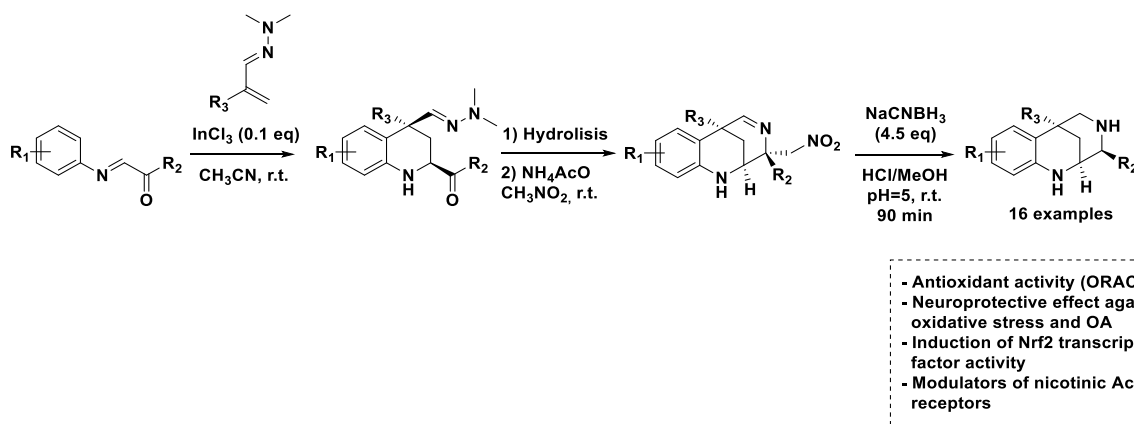
Starting from the products of the aza-vinylogous Povarov reaction, a 14-compound library was synthesised by an oxidation/ C_4 - C_3 rearrangement process catalysed by DDQ at room temperature, which worked well for both 2-aryl and 2-acyltetrahydroquinolines. Nevertheless, only compounds with strong electron-donating substituents on the tetrahydroquinoline ring were suitable substrates for this new procedure. A theoretical/experimental study allowed proposing a three-step dehydrogenation/rearrangement/dehydrogenation mechanism for this reaction.

The resulting 2-acyl-3-dimethylhydrazonomethylquinolines could be transformed into pyrrolo[3,4-*b*]quinoline derivatives through a NaCNBH_3 -mediated domino

intramolecular reductive cyclization, while a treatment with InCl_3 at room temperature furnished pyrrolo[3,4-*b*]quinolin-1-one derivatives.

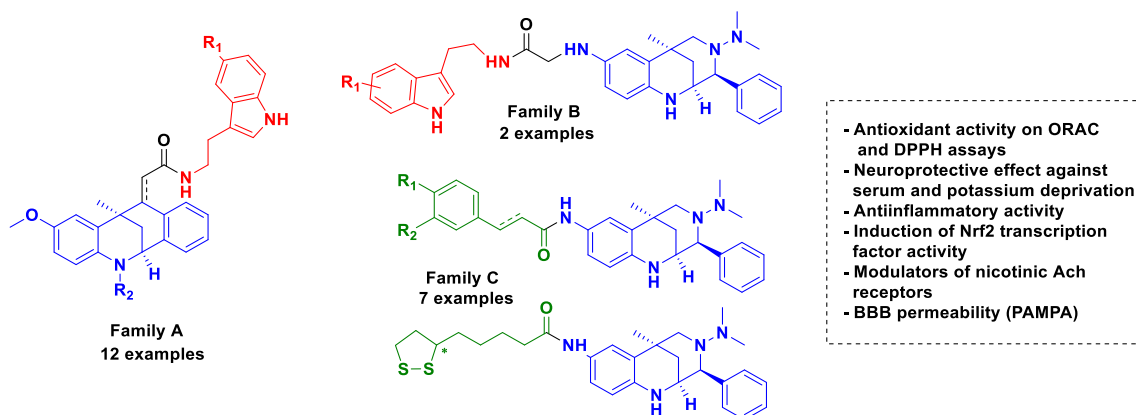


The aza-vinylogous Povarov reaction was also a suitable starting point to prepare a library of 2,6-methanobenzo[*e*][1,4]diazocines by a simple and versatile synthetic route. The pharmacological study of these compounds revealed some intrinsic antioxidant activity, as well as a powerful neuroprotective ability in some models of neurotoxicity evoked by oxidative stress or hyperphosphorylation. This protective effect could be a consequence of their capacity to induce the Nrf2 transcription factor, an activity that could be, in turn, related to the modulation of certain subtypes of nicotinic acetylcholine receptors.



Due to the promising pharmacological results displayed by the cytosine analogues, three new families of multitarget directed ligands were designed and synthesised, by combining a cytosine-like framework with various natural products: tryptamines, cinnamic acids and lipoic acid. Some structural modifications were also performed on the cytosine-like moiety, in order to study their influence on the global activity of the new chemical entities. Most compounds showed a potent intrinsic antioxidant activity, as well as a promising neuroprotective and anti-inflammatory profile. A deeper study of their mechanism of action confirmed that most ligands induced

strongly the Nrf2 transcription factor and they could also modulate $\alpha_4\beta_2$ and α_7 nicotinic acetylcholine receptors. Further experiments will be carried out to consolidate these findings.



Conclusions

In this Doctoral Thesis we have explored new possibilities provided by the aza-vinylogous Povarov reaction. Firstly, we have successfully adapted this procedure to mechanochemical conditions. In addition, we have applied this variation of the Povarov reaction to the preparation of various quinoline derivatives that were hardly achievable by the conventional methods. Finally, we have used this reaction as a basis to obtain new simple or multitarget compounds with promising neuroprotective and antioxidant profiles.

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades neurodegenerativas

1.1.1 Definición y clasificación

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo muy heterogéneo de patologías que cursan con la degeneración del tejido nervioso, ya sea del sistema nervioso central o del sistema nervioso periférico. Hoy en día se conocen decenas de enfermedades que se pueden acoger a esta definición, pero dada la bisoñez que aún caracteriza a este campo de investigación no se descarta que su número pueda ser mucho mayor.

Aunque la neurodegeneración se expresa de formas muy diversas, se pueden extraer una serie de características comunes más allá de las manifestaciones propias de cada entidad clínica. La primera de ellas reside en su origen multifactorial, siendo su etiología tan compleja que muchos de los mecanismos subyacentes aún eluden el conocimiento científico. No obstante, sí que se conocen dos cosas: pueden ser tanto de origen familiar como adquirido, y están fuertemente relacionadas con el envejecimiento. Aunque todas las áreas centrales, medulares o periféricas se pueden ver afectadas por la neurodegeneración, cada patología se caracteriza por afectar típicamente a uno o varios grupos específicos de neuronas. También comparten un progreso clínico inexorable, aunque pueda ser variable en su velocidad incluso dentro de una misma patología¹.

En vista de su diversidad, es irrefrenable la tentativa de establecer una clasificación de las enfermedades neurodegenerativas, que pueda arrojar una visión de conjunto más clara del tema y permita sistematizar su estudio. El problema es, ¿qué criterio utilizar? Principalmente, se han propuesto dos criterios para clasificar las enfermedades neurodegenerativas: sobre la base de sus manifestaciones clínicas o atendiendo a la proteinopatía subyacente². Hay que aceptar la premisa de que ninguno de los criterios expuestos consigue ajustarse plenamente a la realidad, tanto por la falta de un conocimiento completo sobre muchas de las patologías estudiadas, como por la complejidad de las circunstancias en las que se suelen presentar, siendo frecuentes los casos de pacientes en los que se solapan sintomatologías o hallazgos histopatológicos de varias enfermedades diferentes. Considerando que lo que aquí se expone es una tesis

¹ Przedborski, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V. J. *Clin. Investig.* **2013**, *111*, 3.

² Kovacs, G. G. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 189.

de química farmacéutica, el segundo es quizá el criterio más adecuado, toda vez que dichas proteínas representan también en muchos casos posibles dianas terapéuticas sobre las que se pueden diseñar nuevos fármacos^{2,3}.

Sin ánimo de hacer una clasificación exhaustiva, estos serían los principales tipos de enfermedades neurodegenerativas, citándose en cada epígrafe los ejemplos más destacados por su prevalencia o relevancia clínica:

- β -Amiloidosis: el ejemplo más relevante es la enfermedad de Alzheimer.
- Taupatías: en este grupo se engloban numerosas enfermedades como la encefalopatía traumática crónica, la enfermedad de Pick, el síndrome de degeneración corticobasal, la taupatía primaria relacionada con la edad o el síndrome de parálisis supranuclear progresiva. Además, la enfermedad de Alzheimer también se podría considerar una taupatía secundaria.
- Enfermedades priónicas: destaca, entre otras, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.
- α -Sinucleinopatías: además de la enfermedad de Parkinson, otra enfermedad relevante de este tipo es la atrofia multisistémica.
- Enfermedades relacionadas con TDP-43: la patología más prevalente de este grupo es la esclerosis lateral amiotrófica, destacando asimismo el síndrome de degeneración lobular frontotemporal.
- Otros: en este cajón de sastre podríamos citar enfermedades relacionadas con defectos genéticos que conllevan el depósito anómalo de proteínas, como sucede con la huntingtina en la enfermedad de Huntington; o afectaciones más raras como es el caso de la proteína FUS, una proteína de unión a RNA cuyo procesamiento anormal está detrás de ciertos casos de esclerosis lateral amiotrófica o demencias frontotemporales de índole familiar.

Más adelante se detallará el papel que tienen la agregación o el plegamiento anómalo de estas proteínas en la etiopatología de la neurodegeneración. Como se puede observar, hay enfermedades que se pueden englobar en varios apartados y otras que

³ Dugger, B. N., Dickson, D. W. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*.

no se ajustan bien a ninguno en concreto; con todo, esta sistematización sirve para proporcionar una visión global sobre el tema que nos ocupa.

1.1.2 Epidemiología

En este apartado reside sin lugar a duda la razón que justifica la investigación en este campo de la medicina, y la realización de esta tesis doctoral como humilde aportación al mismo. El espectacular avance de la medicina y de las condiciones de vida en el último siglo, que no tiene precedente en la historia de la Humanidad, han motivado un notabilísimo incremento de la esperanza de vida a nivel mundial, si bien desgraciadamente este aumento no se ha manifestado con la misma magnitud en todos los territorios. La OMS estimó, en el año 2016, una esperanza de vida media de 72 años a nivel mundial, a pesar de las reseñables variaciones geográficas ilustradas por la diferencia entre África, con 61,2 años (a pesar de que ese dato había repuntado más de 10 años en lo que va de siglo), y Europa, que alcanzaba los 77,5 años. Estos valores duplican generosamente las estimaciones realizadas para el año 1900, donde un recién nacido debía esperar vivir poco más de 30 años de media a nivel mundial, si bien las diferencias entre territorios no eran probablemente tan marcadas como hoy en día.

Este prolongamiento de la vida que podemos disfrutar hoy en día tiene, no obstante, un lado no tan positivo. Como es lógico, el hecho de que el ser humano alcance cada vez edades más avanzadas tiene como contrapartida el incremento de la prevalencia de todas aquellas enfermedades que, de una u otra manera, están relacionadas con el envejecimiento. Por este motivo, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer se han convertido hoy en día en las primeras causas de muerte, especialmente en los países con un nivel de vida más alto. Además, la prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas también ha experimentado un fuerte incremento en las últimas décadas, el cual se agudizará si, como señalan las predicciones, la esperanza de vida continúa aumentando en las próximas décadas, especialmente en los países menos desarrollados donde todavía existe un amplio margen de mejora.

Para ilustrar el alcance del problema, es mejor ofrecer algunos datos. Por ejemplo, la asociación *Alzheimer's Disease International* señalaba que de los 20 millones de casos de demencia que se estimaban en 1990, se habría pasado a unos 50 millones en el año

2019, y se prevé que en el año 2050 puedan rondar los 150 millones de casos ⁴. Teniendo en cuenta que la enfermedad de Alzheimer afecta a entre un 60 y un 80 % de los pacientes con demencia⁵, estos datos señalan con crudeza la gravedad del problema. Debido a que son los países en desarrollo donde más se incrementará la esperanza de vida, especialmente India, China y el sudeste asiático, serán estos territorios con menor nivel de vida los que acaparen un 68 % del total mundial de enfermos de demencia. El mismo informe estimaba, a su vez, que en el año 2018 los gastos sanitarios derivados de la demencia sólo en los Estados Unidos rondarían el billón de dólares, e incluso a modo de ejemplo ilustrativo señalaba que el coste global de la demencia sería la decimoctava economía mundial si ésta fuese un país. Es por tanto fácil imaginar la gravedad del problema que pueden llegar a suponer las demencias si las previsiones se cumplen y no se encuentra un tratamiento eficaz.

En el caso de la enfermedad de Parkinson, la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente, la situación es similar. Un informe publicado en 2018 alerta de que la prevalencia mundial ha pasado de 2,5 millones de casos en 1990 a 6,1 millones en 2016, y una estimación más bien conservadora prevé unos 12 millones de enfermos de Parkinson en 2050⁶.

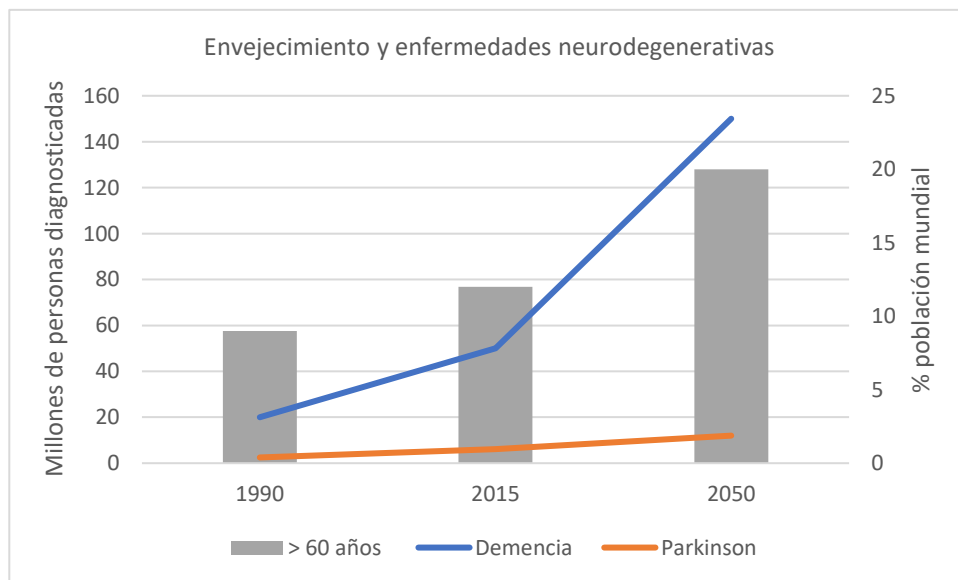


Figura 1.1. Variación en la incidencia de las principales enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento de la población en el período 1990-2050.

⁴ World Health Organization. *Risk Reduction of Cognitive Decline and Dementia: WHO Guidelines.*; 2019.

⁵ Alzheimer's Association. *Alzheimer's Dement.* **2020**, *16*, 391.

⁶ Rocca, W. A. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 928.

La incidencia de la esclerosis lateral amiotrófica es bastante menor que la de los ejemplos mencionados anteriormente, pero la gravedad de la enfermedad, que además afecta a individuos mucho más jóvenes por término medio, merece que también se mencione su situación epidemiológica. Actualmente se estima que la incidencia mundial de esta patología ronda los 1,9 casos por cada 100.000 habitantes, aunque con una distribución un tanto heterogénea⁷, mientras que la edad media de diagnóstico rondaría los 55 años, con una importante variabilidad geográfica también. En 2040 el número de casos podría aumentar hasta un 70 %, siendo también en este caso los países con un menor nivel de riqueza los que sufrirían el mayor aumento de la incidencia.

En definitiva, la sociedad debe buscar no sólo vivir más, sino también que esos años de vida suplementarios transcurran con la mejor calidad de vida posible. Además, tampoco hay que soslayar la amenaza que puede suponer para el sistema sanitario mundial el gasto derivado de la atención a los pacientes de estas patologías si se cumplen los pronósticos, especialmente en los países con más dificultades económicas. Ambos motivos obligan, cada vez con más urgencia, a afrontar el formidable deber de encontrar técnicas diagnósticas fiables y tratamientos eficaces para las enfermedades neurodegenerativas.

1.1.3 Etiología

Como ya se ha mencionado anteriormente, las enfermedades neurodegenerativas son patologías de origen multifactorial, esto es, son el resultado de la interacción entre diversos factores de riesgo y mecanismos fisiopatológicos que se entrecruzan formando una red muy compleja. Aunque se avanza a una velocidad impresionante en el conocimiento de todos estos elementos y, lo más importante, de las relaciones entre los mismos, lo cierto es que hoy en día aún estamos lejos de conocer perfectamente cómo funciona el sistema nervioso, tanto en un estado sano como patológico, y por tanto muchos de los mecanismos que subyacen a la neurodegeneración no están bien identificados y caracterizados. Este hecho es el principal obstáculo que impide que la inmensa mayoría de las enfermedades neurodegenerativas tengan un diagnóstico y un tratamiento adecuados.

⁷ Arthur, K. C., Calvo, A., Price, T. R., Geiger, J. T., Chio, A., Traynor, B. J. *Nat. commun.* **2016**, 7, 1.

Existe un consenso generalizado sobre el principal factor de riesgo de estas patologías, que no es otro que el envejecimiento⁸. Realmente, se podría decir que la neurodegeneración es una consecuencia inevitable del envejecimiento, y otros factores de riesgo genéticos o ambientales determinarían si se llega a alcanzar un nivel de degeneración neuronal patológico, y cuándo y cómo se manifiesta el mismo.

En realidad, el proceso de envejecimiento celular a nivel del sistema nervioso no reviste grandes diferencias con aquél observado para el organismo en general. No obstante, hay que tener en cuenta que las células del sistema nervioso son en su gran mayoría células postmitóticas (no proliferan), por lo que el tejido nervioso es mucho más sensible al declive funcional y todas las alteraciones relacionadas con el envejecimiento. Se suelen establecer dos fases del envejecimiento celular, que sirven perfectamente para tener una visión global de la neurodegeneración:

- Primero, el envejecimiento conlleva una serie de alteraciones genéticas y proteicas. Entre las primeras podemos destacar la inestabilidad genómica y el creciente daño reactivo o mutagénico del ADN, el acortamiento telomérico y las alteraciones epigenéticas. Por otro lado, se observa una progresiva pérdida de la proteostasis celular.
- A continuación, se manifiestan una serie de respuestas fisiológicas a las alteraciones mencionadas anteriormente: perturbaciones en la función mitocondrial, la mitofagia y la autofagia; sobreactivación de procesos de senescencia celular, y alteraciones del metabolismo y la sensibilidad a nutrientes.

El daño provocado por la combinación de todos los procesos expuestos anteriormente conduce al deterioro funcional del organismo (y por supuesto, del sistema nervioso), que se traduce en el agotamiento de las células madre y la degeneración de la comunicación intercelular, incluida la respuesta inmunitaria.

La relación entre el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas se puede observar claramente en el siguiente gráfico, que recoge la prevalencia de algunas enfermedades neurodegenerativas por grupos de edad:

⁸ Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., Bohr, V. A. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15*, 565.

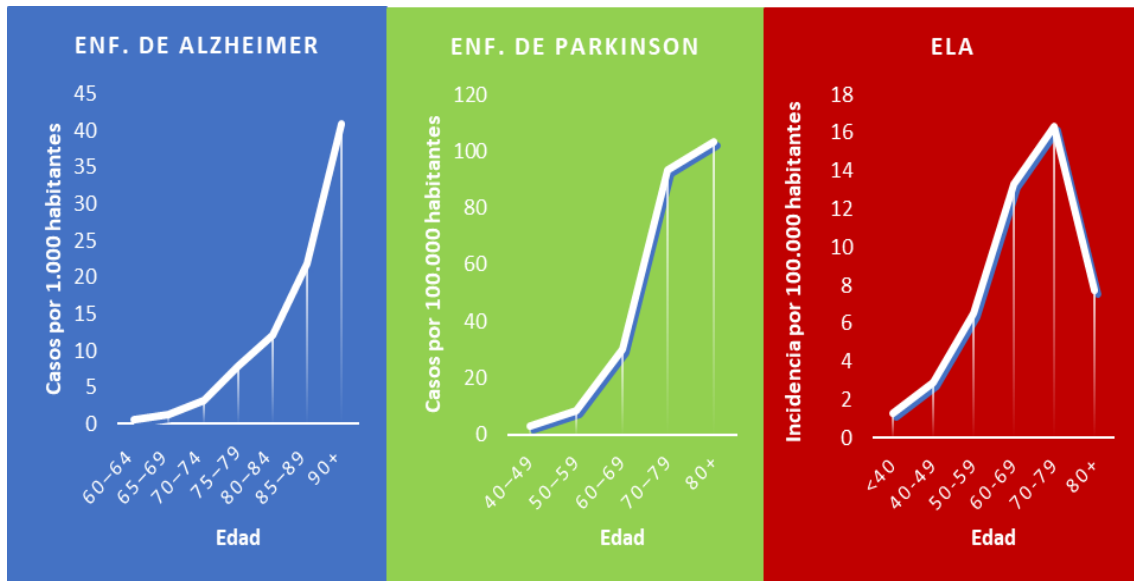


Figura 1.2. Prevalencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa (azul), de la enfermedad de Parkinson en el mundo (verde) e incidencia de ELA en Europa (rojo)⁹ desagregada por grupos de edad.

Dentro de los factores de riesgo que pueden precipitar la neurodegeneración asociada a la edad cabe destacar la herencia genética. El componente genético varía mucho de una patología a otra: mientras que son muy minoritarios los casos de enfermedad de Alzheimer o esclerosis lateral amiotrófica imputables directamente a un defecto genético hereditario¹⁰, la enfermedad de Huntington es generalmente una enfermedad autosómica dominante causada por la mutación del gen que codifica para la proteína huntingtina, y sólo en aproximadamente un 10 % de los casos diagnosticados la mutación parece ser espontánea y no de índole hereditaria¹¹. No obstante, en términos generales la mayoría de las patologías de este grupo, incluyendo las más prevalentes, presentan porcentajes de casos esporádicos superiores al 85 ó 90 por ciento. Habitualmente, los cuadros clínicos de los pacientes cuya enfermedad es de origen genético suelen debutar varios años antes, en promedio, respecto a los casos esporádicos.

⁹ a) Alzheimer Europe. Dementia in Europe Yearbook. Estimating the Prevalence of Dementia in Europe. *Alzheimer Eur.* **2019**, 108. b) Hirsch, L., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T., Pringsheim, T. *Neuroepidemiology*, **2016**, 46, 292. c) Logroscino, G., Traynor, B. J., Hardiman, O., Chiò, A., Mitchell, D., Swigler, R. J., Millul, A., Benn, E., Beghi, E. *J. Neurol. Neurosur. Ps.* **2010**, 81, 385.

¹⁰ Relja, M. J. *Int. Fed. Clin. Chem.* **2004**, 15, 97.

¹¹ Dayalu, P., Albin, R. L. *Neurol. Clin.* **2015**, 33, 101.

Enfermedad	Esporádicos (%)	Genéticos (%)	Mutaciones más comunes	Proteína afectada
Alzheimer	98	2	APP, PSEN1, PSEN2	APP
Parkinson	95	5	LRRK-2, SNCA, PRKN, PINK-1	LRRK-2, α -sinucleína, parkina, PINK-1
ELA	90	10	SOD1, TARDBP, FUS, C9ORF72, DJ-1, ALS-2	SOD-1, TDP-43, FUS, Alsin
Huntington	10	90	HTT	Huntingtina
Enf. priónicas	85-90	10-15	PRNP	PrP
DFT	60-75	25-40	MAPT	Tau

Tabla 1.1. Origen de las enfermedades neurodegenerativas más comunes. Afectaciones más comunes a nivel proteico y genético. Tabla realizada con datos de ^{9,10,12,13}.

Hay que aclarar que el componente genético de una enfermedad neurodegenerativa no siempre reside en un defecto hereditario. El ejemplo mejor establecido de esta casuística es la relación entre los polimorfismos del gen APOE que codifica para la apolipoproteína E y la enfermedad de Alzheimer: la presencia en un individuo del alelo $\epsilon 4$ se comporta como un factor de riesgo que triplica el riesgo de desarrollar la enfermedad, mientras que parece que la presencia del alelo $\epsilon 2$ podría ser un factor de protección¹⁴.

Sin ánimo de ser exhaustivos, dado que el tema da de sí para escribir páginas y páginas, pasaremos a describir brevemente los principales factores de riesgo ambientales para el desarrollo de patologías neurodegenerativas. Hay que tener presente que los resultados obtenidos en los diversos estudios realizados no son muy consistentes, e incluso a menudo son contradictorios. Este hecho está motivado, fundamentalmente, por los largos periodos de latencia de estas patologías, las dificultades diagnósticas y la complejidad de los casos clínicos, en los que muchas veces no es fácil discernir si los cuadros clínicos son resultado de una sola enfermedad o de la concomitancia de varias. En estas circunstancias, el poder de los estudios disminuye y se incrementa notablemente el riesgo de introducción de sesgos y factores de confusión, que restan valor a las conclusiones que de los mismos se pudieren extraer¹⁵. A pesar de todo ello,

¹² Erkkinen, M. G., Kim, M. O., Geschwind, M. D. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*.

¹³ Santiago J. A., Bottero V. and Potashkin J. A. *Front. Aging Neurosci.* 2017, *9*, 166.

¹⁴ Bertram, L., Tanzi, R. E. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 1449.

¹⁵ Brown, R. C., Lockwood, A. H., Sonawane, B. R. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 1250.

algunos factores de riesgo relacionados frecuentemente con las enfermedades neurodegenerativas son:

- Metales pesados: en general, aunque los mecanismos neurotóxicos de muchos metales pesados están bien establecidos y apoyados en una sólida evidencia experimental, los estudios que han tratado de relacionar la exposición a metales pesados con el desarrollo de estas enfermedades han arrojado resultados muy poco consistentes, y a menudo contrapuestos. No obstante, la aparición de enfermedades como la ELA, el Parkinson o el Alzheimer ha sido relacionada con la exposición a diversos metales: plomo, mercurio, arsénico, cadmio, aluminio, manganeso y hierro¹⁶.
- Pesticidas, herbicidas e insecticidas: la exposición a este tipo de compuestos, especialmente organofosforados, organoclorados, carbamatos y piretroides, se han relacionado con efectos neurotóxicos y un posible aumento de la incidencia de algunas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer, si bien estos estudios clínicos también adolecen de los mismos defectos expuestos anteriormente, por lo que los resultados no son muy concluyentes.
- Disolventes y productos químicos: la exposición profesional en ciertos sectores laborales a disolventes orgánicos como el metanol, el tolueno, el tricloroetileno o el *n*-hexano ha sido señalada por varios estudios como posible factor de riesgo para el desarrollo de las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, y la ELA; siempre con correlaciones débiles y poco definitivas¹⁷. Respecto a los productos químicos, merece la pena destacar el síndrome parkinsoniano observado en consumidores habituales de la droga desmetilprodina, un opioide cuya síntesis genera también un producto secundario, el MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), que produce un síndrome muy similar al Parkinson. Esta contaminación llega al consumidor, obviamente, si el proceso de síntesis y purificación no se lleva a cabo adecuadamente, como sucede a menudo en la fabricación casera de estupefacientes.

¹⁶ Chin-Chan, M., Navarro-Yepes, J., Quintanilla-Vega, B. *Front Cell. Neurosci.* **2015**, 9, 124.

¹⁷ Lock, E. A., Zhang, J., Checkoway, H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, 266, 345.

- Medio ambiente: se ha conseguido establecer una relación relativamente sólida entre la presencia de determinados contaminantes en el aire como los óxidos de nitrógeno, las partículas sólidas de 2,5 y 10 micras, el ozono y el monóxido de carbono con las demencias y la enfermedad de Alzheimer. Por el contrario, no se ha conseguido una evidencia similar para la enfermedad de Parkinson o la ELA, aunque sí se ha demostrado que los contaminantes pueden contribuir potencialmente a su desarrollo a nivel fisiopatológico¹⁸. Por otra parte, también hay algunos estudios que relacionan la exposición prolongada a campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja con la ELA, si bien la evidencia no es completa y no se ha conseguido extender a otras enfermedades neurodegenerativas. Es más, incluso se baraja la hipótesis de que puedan suponer una herramienta terapéutica en el caso de la enfermedad de Parkinson¹⁹.
- Estilo de vida: nuevamente, los resultados sobre cómo el estilo de vida incrementa el riesgo de padecer una patología neurodegenerativa son bastante inconsistentes y variables de una enfermedad a otra. Por ejemplo, parece que el hábito de fumar es un factor de riesgo para la ELA y la enfermedad de Alzheimer, pero de protección para la enfermedad de Parkinson. Lo mismo ocurre con el ejercicio físico: realizado moderadamente se suele considerar un factor de protección, pero una rutina de ejercicio intenso podría incrementar el riesgo de enfermedades como la ELA. En general, los estudios muestran una tendencia a señalar la dieta mediterránea como un factor de protección, observándose lo contrario para dietas ricas en grasas o poco equilibradas; en el caso del alcohol, hay cierta evidencia de que un consumo moderado podría ser protector frente a estas enfermedades¹⁹. Por último, también una mayor formación académica y actividad intelectual se han correlacionado con un menor riesgo de desarrollar demencia.

¹⁸ Costa, L. G. *Traffic-Related Air Pollution and Neurodegenerative Diseases: Epidemiological and Experimental Evidence, and Potential Underlying Mechanisms*. In *Environmental Factors in Neurodegenerative Diseases*; Aschner M., Costa L. G., 1st ed.; Elsevier Inc., 2017; Vol. 1.

¹⁹ Riancho, J., de la Torre, J. R. S., Paz-Fajardo, L., Limia, C., Santurtun, A., Cifra, M., Kourtidis, K., Fdez-Arroyabe, P. *Int. J. Biometeorol.* **2020**, 1.

- Sexo: el ejemplo mejor establecido es el de la enfermedad de Parkinson, para la que el sexo masculino supone un factor de riesgo frente al femenino. También se sugiere que el sexo podría ser otro factor a tener en cuenta en la enfermedad de Alzheimer, pero en sentido contrario: el riesgo de desarrollar la enfermedad y de presentar una progresión más veloz podría ser mayor en las mujeres. No se han encontrado relaciones claras de otras patologías neurodegenerativas con el sexo de los pacientes ^{20,21, 22}.
- Patologías previas: en cuanto a las enfermedades metabólicas, una vez más, los resultados de los estudios carecen de la consistencia deseable. No obstante, en lo que respecta a las demencias y la enfermedad de Alzheimer hay mayor evidencia del papel de la obesidad, la diabetes mellitus tipo II y las enfermedades cardiovasculares (sobre todo hipertensión) como factores de riesgo. Por otra parte, numerosos estudios epidemiológicos relacionan los antecedentes de traumatismos o lesiones craneoencefálicas con un mayor riesgo para el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas más comunes. También el insomnio crónico, ciertas enfermedades infecciosas víricas y bacterianas, y algunas patologías autoinmunes se han identificado como factores de riesgo para ciertas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la ELA, entre otras ^{19,23,24}.

No se puede finalizar este apartado sin destacar que, una vez más, el factor socioeconómico está inequívocamente presente en el riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa. Por ejemplo, de lo anteriormente expuesto se desprende que hay ciertas profesiones, como las ligadas al mundo rural o industrial, donde la exposición a algunos factores de riesgo es mucho mayor. Asimismo, el nivel educativo o la contaminación del entorno en el que se vive también pueden desempeñar un papel importante, por lo que en general se puede concluir que las clases

²⁰ Mayeux, R., Stern, Y. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, 2, 1.

²¹ Talbott, E. O.; Malek, A. M.; Lacomis, D. *The Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 1st ed.; Elsevier B.V., 2016; Vol. 138.

²² Kalia L. V., Land A. E. *Lancet.* **2015**, 386, 896.

²³ Zubair Alam, M., Alam, Q., Amjad Kamal, M., Ahmad Jiman-Fatani, A., I Azhar, E., Azhar Khan, M., Haque, A. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, 17, 1390.

²⁴ Riancho, J., Bosque-Varela, P., Perez-Pereda, S., Povedano, M., de Munaín, A. L., Santurtun, A. (2018). *Int. J. Biometeorol.* **2018**, 62, 1361.

económicamente más desfavorecidas también son las más vulnerables en el tema que nos ocupa.

En definitiva, las enfermedades neurodegenerativas están asociadas a la edad, pero hay un importante número de factores de riesgo genéticos y ambientales que son decisivos para que la neurodegeneración natural se presente antes o con más severidad en determinados individuos. Ahora, es momento de estudiar los principales eventos patológicos característicos de la neurodegeneración, cómo aparecen y cómo se relacionan entre sí. En este campo, todavía repleto de incógnitas, está la clave para avanzar hacia la prevención y el control de estas patologías.

1.1.4 Patogenia

Agregación anómala de proteínas

Una de las características fundamentales de las enfermedades neurodegenerativas es la formación de agregados proteicos insolubles intracelulares o extracelulares, que resultan neurotóxicos. En la tabla 1.2 se recogen algunos ejemplos de proteínas cuya alteración está detrás del desarrollo de una o varias patologías²⁵:

Proteína alterada	Enfermedad
β-amiloide	Enf. de Alzheimer
Tau	Enf. de Alzheimer, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick
α-sinucleína	Enf. de Parkinson, atrofia multisistémica
SOD-1	ELA
TDP-43	ELA, demencia lobal frontotemporal
PrP	Encefalopatías espongiiformes
Huntingtina	Enf. de Huntington

Tabla 1.2. Proteínas involucradas en las principales patologías neurodegenerativas.

La base de este proceso neurotóxico es la siguiente²⁶: en un contexto en el que los sistemas celulares de procesamiento y aclaramiento de proteínas comienzan a perder eficacia, se comienza a observar el plegamiento anormal de una determinada proteína, la cual adopta una estructura secundaria rica en regiones con una conformación en lámina beta. Esta proteína plegada de forma anómala no puede ejercer su función correctamente, pero tampoco puede ser procesada y degradada como debería por la

²⁵ Soto, C., Pritzkow, S. *Nat. Neurosci.* **2018**, *21*, 1332.

²⁶ Davis, A. A., Leyns, C. E., Holtzman, D. M. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2018**, *34*, 545.

misma razón, de modo que comienza a formar acúmulos insolubles. Estos depósitos están formados por distintas proteínas, según cada enfermedad, y también las regiones del sistema nervioso donde se originan son específicas de cada patología. Según se desarrolla la enfermedad, se suele observar que la presencia de estas acumulaciones, que a la postre resultan neurotóxicas, se va extendiendo progresivamente a otras áreas del cerebro, preferentemente hacia aquéllas conectadas anatómicamente con el foco original de la proteinopatía. Este último hecho es importante, pues como se explicará más tarde, ha dado pie a la hipótesis de que los agregados proteicos son capaces de extenderse a través de un mecanismo similar al priónico. Esto quiere decir que una proteína plegada anormalmente sería capaz de inducir esta condición en otras proteínas similares de las células de alrededor, contribuyendo a la afectación de una región tisular cada vez más extensa.

Como ya se señaló anteriormente, una de las características fundamentales del envejecimiento celular es la disfunción progresiva de los mecanismos que mantienen la proteostasis celular. La proteostasis ^{27, 28} comprende todos aquellos procesos que regulan globalmente la transcripción, traducción, tráfico, procesamiento, ensamblaje, localización y degradación de las proteínas. *Grosso modo*, el mantenimiento de la proteostasis consta de dos procesos clave: por un lado, la síntesis y plegamiento correctos de las proteínas; por otro lado, los sistemas de respuesta frente a situaciones de estrés o daño proteico.

Durante la síntesis ribosómica de una proteína, la traducción del ARN mensajero da como resultado la formación de una larga cadena polipeptídica. Ésta debe plegarse luego correctamente para dar lugar a la proteína funcional deseada, proceso que ocurre en dos pasos: primero, la proteína adopta una estructura globular simplemente orientando sus residuos hidrófobos hacia dentro, permitiendo que los residuos hidrófilos queden en contacto con el medio acuoso intracelular. Luego, diversas interacciones entre aminoácidos permiten que se componga la estructura secundaria definitiva de la proteína (α -hélices, láminas- β , etc.) En este proceso, es habitual que las proteínas sean asistidas por otras proteínas llamadas chaperonas, que permiten

²⁷ Díaz-Villanueva, J. F., Díaz-Molina, R., García-González, V. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 17193.

²⁸ Triana-Martínez, F., Gómez-Quiroz, L. E., Fainstein, M. K. *Rev. Ed. Bioq.* **2012**, *31*, 136.

estabilizar la cadena polipeptídica primigenia mientras deba permanecer tal cual fue sintetizada, y orientarla después en su plegamiento, impidiendo que interacciones con otras biomoléculas u otros factores externos tengan como resultado un fracaso del proceso.

Por otro lado, las células también poseen un complejo sistema de respuesta frente a las situaciones que amenazan la proteostasis celular: además de condiciones de estrés o daño proteico, hay que tener en cuenta que la maquinaria de síntesis de proteínas no es perfecta, y se estima que entre un 5 y un 30 por ciento adolecen de defectos “de fábrica” que obligan a su eliminación. La respuesta primaria consiste en la activación de diversos factores de transcripción que promueven el aumento de la expresión de chaperonas. Éstas son capaces de detectar las posibles alteraciones en las estructuras proteicas, uniéndose a las mismas para permitir su estabilización y reparación, de modo que promueven la recuperación de la proteína dañada en su estado funcional. Si este sistema no es capaz de restaurar la proteostasis, el retículo endoplásmico (RE) desencadena una respuesta al mal-plegamiento de proteínas conocida como UPR (del inglés *Unfolded Protein Response*), consistente en dos acciones: un aumento del reclutamiento de chaperonas para aumentar la capacidad de reparación, y la activación de cascadas de señalización conducentes a una disminución de la traducción del ARN mensajero, para reducir la carga de trabajo del retículo endoplásmico. Esta respuesta permite aumentar las opciones de supervivencia de la célula bajo condiciones de estrés o daño proteico, pero su activación prolongada determina la activación de señales proapoptóticas.

Como se puede observar, la respuesta preferente de una célula ante la alteración de una proteína es siempre de carácter reparativo, y no destructivo. No obstante, si la amenaza a la proteostasis no puede ser abordada mediante dicha respuesta primaria, la célula posee dos mecanismos principales para la eliminación de las proteínas dañadas: el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia.

El primer sistema consiste en el marcaje de la proteína que la célula debe eliminar con una cadena de poliubiquitina. Para ello, la proteína es reconocida primero por una enzima ubiquitin ligasa, que actúa como mediadora entre el elemento a degradar y otra enzima conjugadora de ubiquitina, encargada del marcaje propiamente dicho. La

proteína ubiquitinada es reconocida e internalizada por el complejo proteasoma 26S, cuya actividad endoproteasa permite la eliminación de la proteína alterada o mal plegada.

Por otro lado, la autofagia permite a la célula enfrentarse a entidades más grandes, como agregados proteicos u orgánulos afuncionales, que no son abordables por el sistema ubiquitina-proteasoma debido a su tamaño. Este sistema no es sólo muy importante para el mantenimiento de la proteostasis, sino que también permite a la célula mantener la producción de ATP y de biomacromoléculas en otras situaciones de desarrollo o cuando su supervivencia se halla críticamente amenazada, participando en lo que se conoce como procesos de “autodigestión” celular. El fundamento es simple: la célula rodea aquello que debe eliminar mediante una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma, que posteriormente es integrada con un lisosoma para permitir la digestión ácida del elemento dañado, deletéreo o innecesario.

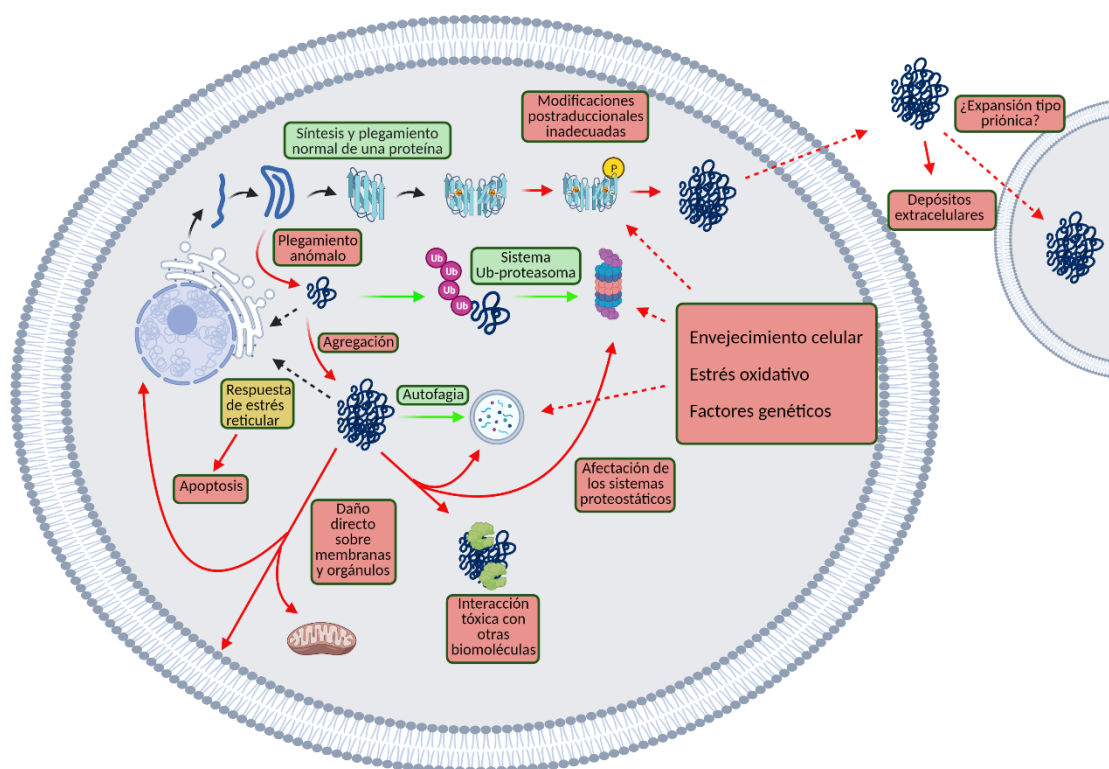


Figura 1.3. Esquema general del sistema de proteostasis celular en estado fisiológico y patológico.

Por último, queda por mencionar una respuesta intermedia entre la reparativa y la destructiva, que pasa por la formación de cuerpos de inclusión en los que la célula confina las proteínas dañadas o agregadas para evitar sus efectos citotóxicos. Hay dos tipos principales: los JUNQ (del inglés *Juxta Nuclear Quality control compartment*),

donde se aíslan principalmente proteínas mal plegadas marcadas con ubiquitina; y los IPOD (del inglés *Insoluble Protein Deposit compartment*), donde la célula almacena agregados proteicos de tipo fibrilla insolubles y no marcados con ubiquitina. Estos cuerpos de inclusión aparecen en numerosas enfermedades neurodegenerativas, como los cuerpos de Lewy característicos de la demencia con cuerpos de Lewy y de la enfermedad de Parkinson. El envejecimiento celular compromete el funcionamiento general de la proteostasis²⁹: aunque se ponen en marcha mecanismos que regulan a la baja la síntesis de proteínas para disminuir la probabilidad de que se saturen los sistemas de plegamiento y procesamiento, los fallos también van en aumento y se produce una acumulación progresiva de proteínas mal plegadas o con errores en su estructura. Este hecho se ve agravado por el aumento concomitante de otros factores deletéreos como el estrés oxidativo, que conllevan asimismo el aumento de proteínas celulares dañadas. Por otro lado, la expresión de chaperonas dependientes de ATP también disminuye a edades avanzadas, del mismo modo que se observa un declive progresivo en la eficacia del aclaramiento de proteínas mediado por el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia. En resumen, se generan más proteínas alteradas y los métodos de reparación y eliminación ven reducida su capacidad para afrontar esta situación. La acumulación potencialmente tóxica de proteínas alteradas se hace más patente, como es lógico, en las células postmitóticas, por lo que el sistema nervioso es especialmente vulnerable a las consecuencias del envejecimiento y el fracaso de los mecanismos celulares de proteostasis. Ya centrándonos en el proceso de neurodegeneración, estas son las alteraciones de la proteostasis más características³⁰:

- Formación de agregados tóxicos: la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se pueden calificar como proteinopatías, por ser la presencia de acúmulos intracelulares o extracelulares de proteínas alteradas una de las principales características de estas patologías. Es importante establecer que, al contrario de otras proteinopatías debidas sobre todo a la pérdida de función de una proteína alterada, en este caso la condición patológica está también íntimamente asociada a la toxicidad generada por estos agregados. Un

²⁹ Hipp, M. S., Kasturi, P., Hartl, F. U. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 421.

³⁰ Kurtishi, A., Rosen, B., Patil, K. S., Alves, G. W., Møller, S. G. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 3676.

ejemplo de ello serían los casos de ELA motivados por la mutación del gen que codifica para la enzima superóxido dismutasa-1 (SOD-1), que conlleva la pérdida de su función antioxidante y su disposición en agregados neurotóxicos.

Los mecanismos de neurotoxicidad mediados por estos depósitos de proteínas no han sido aún bien dilucidados: por ejemplo, existe la hipótesis que defiende que su generación es un mecanismo de defensa de la neurona contra la presencia ubicua de monómeros u oligómeros alterados que pueden interactuar con otros elementos agravando el daño infligido. Esta idea enlaza con otra, basada en el hecho de que el proceso de formación de un agregado proteico insoluble pasa por varios estadios intermedios consistentes en estructuras oligoméricas más solubles, que aún exponen sus regiones hidrofóbicas hacia fuera incrementando de este modo su potencial tóxico a través de la interacción con otras biomoléculas. Por tanto, se propone que un componente importante de la neurotoxicidad provendría de estos oligómeros intermedios, y no de los agregados finales donde los segmentos hidrofóbicos están empaquetados hacia el interior.

- Los efectos deletéreos de estos agregados proteicos se manifiestan, por una parte, en la alteración y/o ruptura de las membranas lipídicas celulares y de los orgánulos. Los oligómeros son capaces de interactuar con las bicapas lipídicas formando estructuras similares a poros, mientras que los grandes depósitos proteicos son capaces de deformarlas o incluso romperlas. Por otro lado, el daño también está causado por las interacciones entre biomoléculas de diversa naturaleza y función con las proteínas alteradas, principalmente con los oligómeros por la razón que se ha detallado anteriormente, pero también con los acúmulos insolubles de mayor tamaño. Por este mecanismo también los agregados son capaces de secuestrar chaperonas, lo que contribuye a un mayor deterioro funcional de todo el sistema de proteostasis, desde la síntesis a la eliminación de proteínas mal plegadas, pasando por su reparación. Éste es un ejemplo claro de retroalimentación positiva de la neurotoxicidad, un fenómeno que se repite a menudo en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas. A modo de ejemplo, los cuerpos de Lewy característicos de

algunas demencias y de la enfermedad de Parkinson no sólo contienen α -sinucleína, su componente fundamental y “fundacional”, sino también otras proteínas involucradas en procesos de autofagia y mitofagia como la parkina o la PINK-1.

- Estrés del retículo endoplasmático: como ya se mencionó antes, el retículo endoplasmático desencadena una respuesta ante el aumento de proteínas mal plegadas consistente en el aumento de la expresión de chaperonas, para agilizar los procesos de reparación y eliminación, y en la regulación a la baja de la síntesis proteica en general para aliviar la sobrecarga funcional del sistema de control. En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, se ha observado que se produce una situación prolongada de estrés reticular, que lleva al desencadenamiento de respuestas proapoptóticas. En la enfermedad de Alzheimer la respuesta prolongada reticular podría ser perjudicial además debido a que estimula diversos factores de procesamiento de la PPA (Proteína Precursora Amiloidea), lo que incrementaría la generación de más péptido β -amiloide que, en un círculo vicioso, agravaría a su vez el nivel de estrés reticular. Además, algunas de las proteínas alteradas en estas patologías son capaces de inhibir ciertas vías de señalización relacionadas con la respuesta reticular, como es el caso de la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson, tornándola más inefectiva.
- Autofagia y mitofagia: aunque aún falta mucho para conocer con exactitud la relación entre estos procesos y las enfermedades neurodegenerativas, en general se piensa que su activación tiene un papel positivo, permitiendo eliminar los agregados proteicos y las mitocondrias disfuncionales que amenazan la supervivencia celular. De hecho, es habitual observar una inducción de la autofagia en los primeros estadios de la enfermedad. En muchos casos, los casos patológicos de origen genético están directamente relacionados con la disfunción de estos mecanismos: las mutaciones en la α -sinucleína, la parkina o la PINK-1 están relacionadas con el bloqueo de la autofagia y la mitofagia en la enfermedad de Parkinson; en la enfermedad de Alzheimer se han comprobado que determinadas mutaciones en la presenilina-1 y en la ATPasa vacuolar acarrearían el mismo efecto. Esto se suma a los eventos patológicos

anteriormente explicados que, como última consecuencia, también reducen la eficacia de la autofagia y la mitofagia. Todos los pasos de estos procesos se pueden ver afectados en la neurodegeneración, según la causa de la alteración: la formación del autofagosoma, el reconocimiento del contenido, el transporte, y la fusión con el lisosoma o su acidificación. El fracaso de la autofagia conlleva la activación de cascadas de señalización proapoptóticas.

- **Modificaciones postraduccionales:** este concepto incluye todas aquellas modificaciones realizadas sobre una proteína tras su biosíntesis (fosforilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones, etc.), y que suelen ser clave para que la proteína pueda desempeñar su función adecuadamente. Estos procesos también se ven severamente afectados en un contexto de neurodegeneración. Quizá el ejemplo más icónico sea la hiperfosforilación de la proteína Tau en la enfermedad de Alzheimer, que conduce a su disposición en ovillos neurofibrilares que suponen uno de los hallazgos histopatológicos más característicos de la enfermedad junto con las placas de péptido β -amiloide. Además, la proteína Tau pierde su función estabilizadora de los microtúbulos del citoesqueleto celular, induciendo su desorganización y, finalmente, la apoptosis neuronal. También en la enfermedad de Parkinson se han descrito otras alteraciones con efectos neurotóxicos como la hiperfosforilación en Ser129 de la α -sinucleína o la alteración del sistema PINK-1/parkina, que provoca disfunciones del sistema ubiquitina-proteasoma. En el caso de la ELA, se han descubierto diversas alteraciones en la modificación postraducciona de la SOD-1, el transportador de glutamato EAAT2 o la proteína FUS de unión a ARN.

Actualmente se encuentra bastante aceptada la hipótesis que defiende que las alteraciones estructurales de las proteínas podrían propagarse mediante un mecanismo similar al priónico en el proceso de la neurodegeneración³¹. Esto quiere decir que cuando una proteína adopta una conformación errónea, es capaz de actuar como un “molde” para inducir la misma alteración estructural en otras proteínas vecinas de la misma clase. Además, se ha observado que estas proteínas alteradas pueden transmitirse entre células interconectadas, de modo que la proteinopatía se puede ir

³¹ Frost, B., Diamond, M. I. *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *11*, 155.

extendiendo desde la primera célula afectada hacia áreas vecinas, y de ahí ir viajando hacia áreas del cerebro más lejanas, pero vinculadas con la lesión inicial. Esta hipótesis explicaría por qué las enfermedades neurodegenerativas suelen presentar patrones anatómicos característicos de afectación y lesiones histológicas, compartidos por diversas áreas del cerebro que no tienen por qué tener una relación espacial inmediata, pero que sí presentan interconexiones anatómicas y funcionales. No se ha dilucidado con exactitud el modo en que una proteína alterada puede transmitirse de una célula a otra, pero se proponen lugares de íntima conexión celular como las sinapsis, así como otros medios de transporte como exosomas o nanotubos de membrana.

Estrés oxidativo

Cuando se intenta explorar la extensa red de caminos que conducen al proceso de la neurodegeneración, se hace patente que el estrés oxidativo a nivel del tejido nervioso es uno de los grandes “nudos viarios” del mapa. Hay unanimidad entre los estudiosos del tema sobre el papel crucial que desempeña el estrés oxidativo en el daño mitocondrial, celular y sobre el ADN que aceleran el envejecimiento y la degeneración del sistema nervioso. Las células poseen una serie de mecanismos de defensa antioxidante que permiten mantener bajo control la concentración de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, de manera que éstas no superen los umbrales de nocividad que comprometen la supervivencia celular. La ruptura de este equilibrio, es decir, la situación que se da cuando los mecanismos antioxidantes no consiguen su objetivo, da paso a la disfunción conocida como estrés oxidativo.

En primer lugar, resulta conveniente conocer quiénes son los actores de este delicado equilibrio. A la denominación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) se acogen diversas moléculas formadas como subproductos del metabolismo normal del oxígeno³². Son en general especies de vida corta y muy reactivas, e incluyen moléculas radicalarias y también otras que no lo son, pero que generan fácilmente especies radicalarias. En la mayoría de los casos, se generan por la reducción incompleta del oxígeno molecular a agua. La transferencia de un solo electrón a la molécula de oxígeno resulta en la formación del anión radical superóxido (O_2^-), que

³² Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., Yoon, S. *Exp Neurobiol.* **2015**, *24*, 325.

es tremendamente reactivo y precursor del resto de ROS. El anión radical superóxido puede ser convertido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la enzima superóxido dismutasa (SOD), o bien puede captar un protón para formar el radical $HO_2\cdot$. A su vez, el H_2O_2 puede ser metabolizado por diversas peroxidasas como la catalasa o la glutatión peroxidasa para generar agua y oxígeno, pero también puede descomponerse en presencia de cationes metálicos como el ión ferroso (Fe^{2+}), dando lugar a la formación de anión hidroxilo (HO^-) y radical hidroxilo ($HO\cdot$) en un proceso conocido como reacción de Fenton. El radical hidroxilo es una de las ROS más reactivas, y por tanto una de las mayores responsables de sus efectos citotóxicos. Por su parte, la conversión de arginina en citrulina por la enzima óxido nítrico sintasa genera óxido nítrico ($NO\cdot$), cuya reacción espontánea con el anión radical superóxido da lugar a la formación del anión peroxinitrito ($ONOO^-$). De estas dos especies deriva a su vez otra familia conocida como especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés *Reactive Nitrogen Species*)³³, entre las que destacan, además de las dos ya mencionadas, otras como el anión nitrito (NO_2^-), el dióxido de nitrógeno ($NO_2\cdot$), el anión nitrosoperoxicarbonato ($ONOOCO_2^-$) o los cationes nitrosonio y nitronio (NO^+ y NO_2^+).

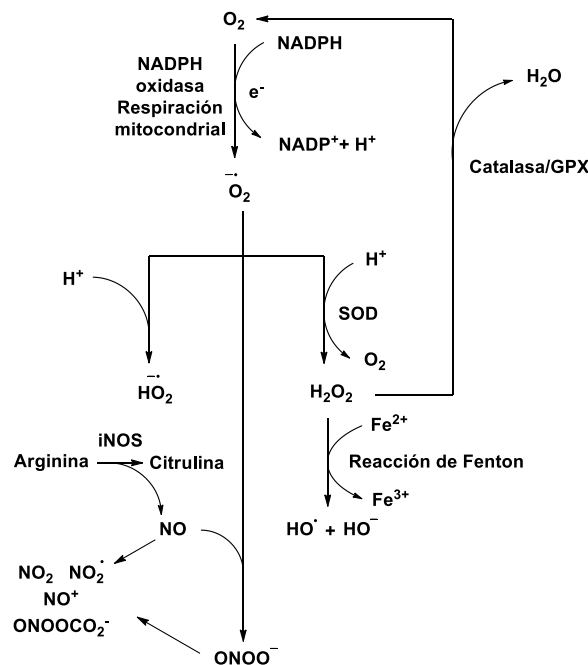


Figura 1.4. Formación de las principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

³³ Martínez, M. C., Andriantsitohaina, R. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 669.

Las ROS pueden ser generadas por causas endógenas o exógenas. Las causas exógenas incluyen radiaciones ultravioleta e ionizantes, y compuestos químicos o toxinas cuyo mecanismo de acción o metabolismo en el organismo suponga la formación de especies radicalarias. La generación endógena de ROS sucede fundamentalmente en tres orgánulos celulares³²:

- **Mitocondria:** en la inmensa mayoría de células, es el principal orgánulo generador de ROS. Se estima que el 2% del oxígeno empleado por una célula se consume en la producción de estas especies reactivas, que en su mayoría se forman como resultado de la actividad de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Los complejos I y III de dicha cadena son los máximos contribuyentes a la producción de anión radical superóxido, aunque parece que el complejo I es el principal responsable en el cerebro y en situaciones patológicas, así como durante el envejecimiento. Respecto a los catalizadores de este proceso, destacan las enzimas NADPH oxidasa y la xantina oxidasa. Por su importancia en las enfermedades neurodegenerativas, también son dignas de mención las monoaminoxidasas (MAO-A Y MAO-B), cuyo mecanismo catabólico de monoaminas conlleva la generación de ROS.
- **Retículo endoplasmático:** la oxidoreductasa 1 del retículo endoplasmático (ERO-1) y la protein-disulfuro isomerasa (PDI) catalizan la formación de los puentes disulfuro necesarios para el plegamiento correcto de muchas proteínas, generando ROS en ese proceso al transferir electrones desde los grupos tiol de las proteínas al oxígeno molecular. Además, cuando se producen plegamientos erróneos por la formación indebida de puentes disulfuro, el glutatión se encarga de reoxidarlos para su posterior corrección por estas enzimas. Si se produce un aumento de este tipo de errores, los niveles de glutatión disminuyen y la actividad reparadora de la ERO-1 y la PDI aumenta, circunstancias ambas que aumentan la concentración de ROS.
- **Peroxisomas:** su actividad metabólica conlleva una importante generación de peróxido de hidrógeno. Por este motivo, estos orgánulos cuentan con una elevada expresión de catalasas, pero cualquier condición patológica que motive

un descenso de su actividad convierte a los peroxisomas en una importante fuente de anión radical superóxido y otros ROS.

Lógicamente, las células han desarrollado un eficaz sistema de defensas antioxidantes para enfrentarse a la inevitable formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, intrínseca a su actividad metabólica. Este sistema se compone de enzimas y moléculas pequeñas:

- Enzimas: la superóxido dismutasa, de la que existen tres isoformas de distinta localización intracelular, cataliza la transformación del anión radical superóxido en peróxido de hidrógeno. Éste a su vez se descompone en agua y oxígeno molecular por acción de la catalasa. Las distintas glutatión peroxidasa también son capaces de catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno y los lípidos peroxidados a agua, utilizando el glutatión disulfuro como la especie reductora. Las peroxirredoxinas, que son responsables de la reducción de más de un 90% del H₂O₂ mitocondrial y citosólico, y de las que se han identificado seis isoformas, catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno y otros peróxidos orgánicos, así como de los peroxinitritos.
- Moléculas pequeñas: en este apartado merece especial mención el glutatión, un tripéptido compuesto por glutamato, cisteína y glicina. Actúa de dos maneras: reaccionando directamente en su forma reducida con las especies radicalarias de oxígeno como el superóxido o el radical hidroxilo, o como donador de electrones para la acción de la enzima glutatión peroxidasa. El glutatión queda en ambos casos en su forma oxidada, formando un puente disulfuro que se encarga de romper la glutatión reductasa, de modo que regenera el glutatión en su forma antioxidante. Otras moléculas pequeñas de especial relevancia por su acción antioxidante son la tioredoxina y las vitaminas A, C y E.

Aunque se podría pensar que las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno sólo causan efectos deletéreos en el organismo, lo cierto es que cumplen una serie de funciones fisiológicas cuando se encuentran en las concentraciones adecuadas³⁴. Por ejemplo, los fagocitos emplean la liberación de radicales libres como arma para enfrentarse a los patógenos. Además, se ha comprobado su función reguladora de algunos procesos de

³⁴ Chen, X., Guo, C., Kong, J. *Neural Regen. Res.* **2012**, 7, 376.

proliferación y supervivencia celulares: pueden activar la mitosis, median señales procrecimiento celular a través de ciertos tipos de receptores tirosina quinasa, y también pueden participar en la modulación de la producción de ATP. Tampoco se pueden soslayar las importantísimas funciones que cumple el óxido nítrico, tanto en la mediación de la respuesta inflamatoria como su cometido como segundo mensajero en la regulación de diversas funciones fisiológicas, entre las que está el tono vascular. El NO también interviene en la plasticidad sináptica, e incluso se debate la existencia de una verdadera neurotransmisión nitrérgica, puesto que el óxido nítrico cumple muchos de los requisitos para ser considerado un neurotransmisor.

Por otra parte, las propias especies reactivas son capaces de modularse a sí mismas mediante la activación de determinadas respuestas antioxidantes³², como es el caso de la mediada por el factor de transcripción Nrf2 (del inglés *Nuclear factor erythroid 2-Related Factor*), que supone uno de los mecanismos de defensa antioxidante más importantes de las células eucariotas. Su activación, mediada por especies oxidantes o electrófilas, conduce al aumento de la expresión de diversas proteínas y enzimas de función citoprotectora como la hemoxigenasa 1 (HO-1), la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, etcétera. Se explicará de manera mucho más detallada el funcionamiento del factor de transcripción Nrf2 en el capítulo 5.

Por tanto, no se puede calificar a las ROS y las RNS como un enemigo *per se* sin profundizar más en el asunto. La situación patológica sólo acontece cuando bien por el declive funcional de los sistemas de defensa antioxidante, o bien por un aumento anómalo de la producción de estas especies reactivas, la concentración de éstas últimas rebasa notablemente sus niveles fisiológicos habituales. Es en este momento cuando hablamos de estrés oxidativo. La presencia de elevadas concentraciones no controladas de este tipo de especies reactivas acarrea graves daños oxidativos sobre una gran variedad de biomoléculas³⁵: sobre el ADN, generando mutaciones; sobre diversas proteínas y enzimas, causando la pérdida de sus funciones y alteraciones en su conformación estructural; sobre los lípidos, generando además reacciones en cadena que conducen a la desorganización de las membranas celulares y de los orgánulos; y por último sobre los carbohidratos. Por su relevancia en la neurodegeneración, es

³⁵ Andersen, J. K. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 18.

especialmente importante la disfunción mitocondrial que produce el exceso de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, ya que afecta a todos los complejos participantes en la cadena de transporte electrónico. El daño mitocondrial por estrés oxidativo produce la liberación del citocromo c, disparándose los mecanismos de apoptosis celular.

Para estudiar la relación entre el estrés oxidativo y la neurodegeneración, hay que comprender por qué el tejido nervioso es especialmente vulnerable a sus efectos³⁶:

- A pesar de suponer un 5% del peso corporal, el cerebro consume un 20% del oxígeno total consumido por el organismo. Esto es, el tejido nervioso está expuesto a unas concentraciones de oxígeno hasta diez veces superiores que otros tejidos, y por ende de especies reactivas, ya que alrededor del 2% del oxígeno es transformado en ROS. Este elevado consumo de oxígeno se debe principalmente a la elevada dependencia de la fosforilación oxidativa por parte del metabolismo neuronal.
- Las neuronas son células que no se dividen, por lo que el daño que sobre ellas se produzca es acumulativo e irreversible.
- El cerebro contiene concentraciones especialmente altas de iones metálicos como cobre o hierro, que pueden catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno como se explicó anteriormente.
- También las membranas celulares del tejido nervioso contienen una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados, más vulnerables frente a la oxidación.
- Los niveles cerebrales de defensas antioxidantes son menores que los de otros tejidos, especialmente de glutatión.
- El óxido nítrico es especialmente abundante en el cerebro por sus funciones fisiológicas habituales, lo que incrementa el riesgo de elevadas concentraciones de especies reactivas de nitrógeno.

³⁶ Gandhi, S., Abramov, A. Y. *Oxid. Med. Cell. Long.* **2012**, artículo 428010.

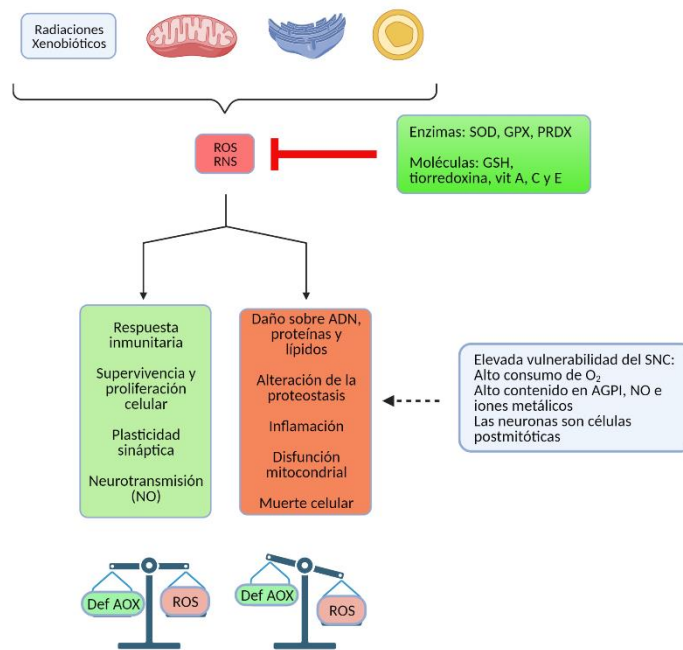


Figura 1.5. Control del estrés oxidativo. Consecuencias de las especies reactivas en función de la situación fisiológica.

La relación entre el estrés oxidativo y las enfermedades neurodegenerativas está bien establecida, a través de los hallazgos realizados en el tejido cerebral de los pacientes. En el caso de la peroxidación lipídica, se observa en el cerebro de los enfermos un aumento de productos de oxidación y degradación como el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), acroleína o los F2-isoprostanos. Las dos primeras moléculas son aldehídos α,β -insaturados, y por tanto susceptibles de ser aceptores de Michael para gran cantidad de biomoléculas con funciones nucleófilas, derivando en una elevada citotoxicidad a través de la afectación de múltiples sistemas. La carbonilación y nitración oxidativa de proteínas es otro marcador muy común observado en la neurodegeneración, lo que conlleva a menudo la pérdida de su estructura y función fisiológicas. Respecto a los ácidos nucleicos, la presencia de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina y la 8-hidroxiguanosina revelan el daño oxidativo del ADN y el ARN, que puede manifestarse en forma de hidroxilaciones, carbonilaciones y nitraciones. Por último, la oxidación de los carbohidratos conduce a la aparición de especies reactivas cuya reacción con proteínas da lugar a la formación de los productos finales de glicación avanzada (AGE, del inglés *Advanced glycation end-products*), a los que cada vez se presta más atención en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas y otras patologías crónicas.

El desequilibrio encuentra sus causas en ambos lados de la balanza: por un lado, el envejecimiento supone una pérdida de eficacia del metabolismo mitocondrial, por lo que se verifica un aumento en la producción de ROS y RNS. Además, también se observa una progresiva acumulación de iones metálicos como Cu^+ y Fe^{2+} a nivel cerebral, que catalizan la formación de un mayor volumen de especies reactivas. También hay evidencias de la menor eficacia de las defensas antioxidantes durante el proceso de degeneración neuronal: por ejemplo, se ha observado un menor contenido en glutatión en el cerebro de pacientes con neurodegeneración respecto del de individuos sanos³⁷. No obstante, hay una gran controversia en la relación causa-consecuencia del estrés oxidativo con la neurodegeneración, aunque realmente esta pregunta se repite con todos los mecanismos fisiopatológicos presentes en las enfermedades neurodegenerativas. Sin ánimo ni capacidad de resolver esta incógnita, lo que sí se puede hacer es una sucinta descripción de los principales efectos neurotóxicos en los que se ha demostrado la participación del estrés oxidativo³⁵:

- La agregación patológica de proteínas tiene una relación muy estrecha con el estrés oxidativo, aunque nuevamente la relación entre causa y efecto vuelve a ser muy difusa. Está claro que la oxidación de proteínas por efecto de las especies reactivas conduce a su mal plegamiento y potencialmente lleva a su agregación, añadida a la pérdida de su función fisiológica. Pero las consecuencias deletéreas van más allá: el estrés oxidativo es capaz de desorganizar la unidad 26S del proteasoma e infligir modificaciones postraduccionales directamente (por ejemplo, a través de aductos con el 4-hidroxi-2-nonenal) que provocan el fallo del sistema ubiquitina-proteasoma, amplificando de este modo el fracaso de la proteostasis neuronal³⁸.

El hecho de que las proteínas alteradas sean capaces de quelar iones cuproso o ferroso acelera la generación de más radicales libres, efecto que se ha observado por ejemplo en el caso del péptido β -amiloide o la α -sinucleína. Un caso muy paradigmático que ilustra este círculo vicioso lo encontramos en la enfermedad de Parkinson: el estrés oxidativo generado por la alteración del metabolismo de

³⁷ Aoyama, K., Nakaki, T. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 21021.

³⁸ Aiken, C. T., Kaake, R. M., Wang, X., Huang, L. *Mol. Cell. Proteom.* **2011**, *10*.

la dopamina provoca la oxidación y agregación de la α -sinucleína. A su vez, ésta provoca la disfunción del sistema de almacenaje vesicular de la dopamina, por lo que aumenta su disponibilidad citosólica promoviendo una mayor generación de especies reactivas. Por si esto no fuera poco, tanto la α -sinucleína como la dopamina son capaces de quelar iones metálicos, y la α -sinucleína oxidada no es reconocida por el sistema ubiquitina-proteasoma. Como se puede observar, se genera la tormenta perfecta para la disrupción de la homeostasis neuronal.

- El estrés oxidativo tiene un impacto muy severo en la función mitocondrial, circunstancia que puede disparar los mecanismos de muerte celular si se prolonga en el tiempo. En primer lugar, el daño oxidativo del ADN mitocondrial causa directamente fallos en la síntesis de proteínas que participan en procesos clave de la mitocondria como la cadena de transporte electrónico. La alteración de las proteínas participantes en dicha cadena también puede ser originada por la acción directa de los radicales libres mediante procesos de oxidación, nitración o inactivación de los centros Fe-S de los complejos respiratorios. Además, el fenómeno de peroxidación de fosfolípidos y proteínas de las membranas mitocondriales conlleva la alteración de su permeabilidad, e incluso la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) que permite la salida al citoplasma del citocromo c, lo que a su vez pone en marcha la apoptosis mediada por caspasas. También un elevado estrés oxidativo mitocondrial incrementa los niveles de calcio en este orgánulo, lo que redundará en un mayor perjuicio a la función de la cadena de transporte electrónico y a la permeabilidad de las membranas, contribuyendo asimismo a la apertura del PTPm. La disfunción mitocondrial causada por los radicales libres se agrava a sí misma, debido a que el intento por parte de la mitocondria de mantener la producción de ATP mediante una maquinaria deteriorada se traduce en una generación creciente de radicales libres, que amplifica el daño funcional^{39,40}.
- El daño tisular generado por el estrés oxidativo provoca la activación de una respuesta inflamatoria mediada por la microglía y los astrocitos. Como ya se

³⁹ Guo, C., Sun, L., Chen, X., Zhang, D. *Neural Regen. Res.* **2013**, *8*, 2003.

⁴⁰ Cenini, G., Lloret, A., Cascella, R. *Oxid. Med. Cell. Long.* **2019**, 2019.

explicará en el apartado de neuroinflamación, la dilatación en el tiempo de esta situación acaba por resultar perjudicial entre otros motivos por la liberación prolongada de especies reactivas como el H₂O₂ y el NO, éste último generado por la activación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

- Si bien unas concentraciones moderadamente altas de especies reactivas conducen a la activación de determinadas vías de señalización citoprotectoras, como la vía Nrf2/ARE, si los niveles de estrés oxidativo son muy elevados y se prolongan demasiado acaban por disparar los procesos de muerte celular, principalmente vía apoptosis. Un ejemplo muy arquetípico de esta circunstancia es la relación de la proteína supresora de tumores p53 con los radicales libres: bajo unos niveles moderados de ROS, p53 estimula una respuesta reparadora, pero si las concentraciones de radicales libres sobrepasan un umbral determinado, p53 promueve la entrada de la célula en apoptosis. Los ROS y los RNS pueden causar la entrada en una muerte celular programada a través de otras muchas vías: causando alteraciones de la función y permeabilidad mitocondriales, por una activación excesiva de la respuesta de estrés del retículo endoplásmico, provocando la activación inflamatoria de receptores de muerte, etcétera⁴¹.

En resumen, el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en la aparición de la mayoría de los eventos patológicos que precipitan la neurodegeneración, operando a través de mecanismos que generalmente se retroalimentan, ya que tienen como consecuencia un nuevo incremento de la producción de radicales libres.

Neuroinflamación

La neuroinflamación es otra de las patas del banco de la neurodegeneración, si bien quizá no se le pueda atribuir una causalidad tan directa como en el caso de la agregación de proteínas o el estrés oxidativo. Mientras que estos dos factores parecen estar entre aquéllos que inician la cascada de efectos deletéreos para el tejido nervioso, todo apunta a que la neuroinflamación podría participar de forma un poco más tardía en el proceso, iniciándose como consecuencia de las alteraciones mencionadas

⁴¹ Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D. A. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2016**, 1863, 2977.

anteriormente, pero siendo a su vez causa de las mismas, en un circuito de daño neuronal que se retroalimenta sin fin.

La inmunidad del sistema nervioso central posee ciertas particularidades respecto a la del organismo en general. Durante mucho tiempo se consideró que era un sistema más bien aislado del resto del organismo desde el punto de vista inmunológico gracias a la barrera hematoencefálica, y sin apenas capacidad intrínseca de respuesta inmune. Hoy en día se ha refutado esta teoría, si bien todavía se considera al sistema nervioso central como un entorno inmunológicamente privilegiado, separado del resto del organismo por la barrera hematoencefálica y el líquido cefalorraquídeo⁴². El sistema linfático no existe como tal en el sistema nervioso central (SNC), sino que existe un sistema llamado glinfático con funciones similares en el que el líquido cefalorraquídeo hace las veces de linfa⁴³. Por otra parte, la otra característica específica de la inmunidad del SNC reside en que éste posee su propio sistema inmune, formado por la microglía y los astrocitos, si bien bajo determinadas condiciones se pueden observar otras células inmunes como macrófagos o linfocitos T en los dominios del SNC.

Las células microgliales se podrían definir como los macrófagos residentes del sistema nervioso central. Sobre estas células, que suponen un 10% del total de la población del SNC, recae buena parte del peso de la respuesta inmune ante cualquier agresión interna o externa que afecte a este territorio. Son además células de vida prolongada cuya tasa de recambio parece ser más bien reducida, lo que las hace más vulnerables al envejecimiento u otros fenómenos patológicos.

El funcionamiento de la microglía sigue siendo un tema de rabiosa actualidad en la investigación, puesto que las incógnitas por resolver son aún demasiado numerosas. Hasta hace pocos años, se defendía que la microglía se encuentra en un estado de reposo M_0 que, bajo la presencia de estímulos inflamatorios, de daño celular o infecciosos, podía seguir dos rutas de activación. En primer lugar, una vía “clásica” que daría lugar al fenotipo M_1 , el cual se podría calificar como proinflamatorio ya que se caracteriza por su capacidad para reclutar otras células inmunes, secretar citoquinas proinflamatorias e incluso segregar directamente sustancias tóxicas como las especies

⁴² Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D., Ploix, C. C. *Immunol. Rev.* **2006**, 213, 48.

⁴³ Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I., Nedergaard, M. *Neurochem. Res.* **2015**, 40, 2583.

reactivas de oxígeno. Por otro lado, la activación se podría verificar por una vía “alternativa” hacia un fenotipo M₂ de perfil antiinflamatorio, que produciría preferentemente citoquinas antiinflamatorias y factores promotores de la reparación tisular. Esta hipótesis sugería una línea temporal coherente: ante cualquier agresión endógena o exógena, la microglía se activaría a un estadio M₁ para eliminar la amenaza lo más rápido posible, para después pasar a un fenotipo M₂ que permitiese la reparación de los daños causados⁴⁴. Sin embargo, hoy en día cobran fuerza las voces que señalan que esta clasificación no es válida, ya que intenta aplicar a la microglía un enfoque que en realidad corresponde al estudio de los macrófagos del sistema inmune en general. Estos autores señalan que los estudios *in vivo* refutan la dualidad M₁/M₂ en la microglía y rechazan que la microglía se encuentre en un estado de reposo fuera de los periodos de activación inmune⁴⁵. El desacuerdo acerca de esta cuestión anima a dejar que sean los análisis genómicos y proteómicos los que arrojen luz sobre el asunto en el futuro.

La microglía ejerce un efecto neuroprotector fundamental, especialmente en el desarrollo del sistema nervioso central pero también en la edad adulta. Son varias las funciones esenciales que desempeña en este sentido: poda sináptica, promoción de la supervivencia neuronal a través de la secreción de factores como el BDNF (del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*), modulación de la sobreactivación neuronal, apoyo para la formación de sinapsis durante los procesos de aprendizaje, eliminación de neuronas muertas y productos de desecho, etcétera⁴⁶. Además, la microglía posee un complejo sistema de sensores que le permiten registrar cualquier cambio que acontece en su entorno. Profundizando en el aspecto inmunológico, la microglía presenta todos los tipos de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptors*) propios de la inmunidad innata, siendo especialmente importantes en la neurodegeneración los receptores tipo Toll (TLR, *Toll-Like Receptors*) y los inflamasomas (también conocidos como *Nod-like receptors*, NLR). Los PRR son capaces de reconocer los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), entre los que destaca el lipopolisacárido (LPS), y los patrones moleculares asociados a daño (DAMP, *Damage-Associated*

⁴⁴ Tang, Y., Le, W. (2016). *Mol. Neurobiol.* **2016**, 53, 1181.

⁴⁵ Ransohoff, R. M. *Nat. Neurosci.* **2016**, 19, 987.

⁴⁶ DiSabato, D. J., Quan, N., Godbout, J. P. *J. Neurochem.* **2016**, 139, 136.

Molecular Patterns), que son señal de daño y muerte celular: ADN mitocondrial, proteínas de choque térmico, etcétera. La activación de los receptores tipo Toll por parte de los PAMP o los DAMP conduce a la activación de varias vías de señalización proinflamatorias como la mediada por el factor de transcripción NF- κ B, y otras relacionadas con la producción de interferones. Los inflamasomas, siendo NRLP3 el que está mejor caracterizado, permiten la activación proteolítica de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 a través de la acción de la caspasa 1. Todo ello compone una rotunda respuesta inflamatoria, a través de la producción de citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), las interleucinas 1 β y 6 o los interferones; y la producción de especies reactivas como el peróxido de hidrógeno o el óxido nítrico, éste último mediante la activación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible^{47,48}. También la microglía desarrolla la capacidad de comportarse como una célula presentadora de antígenos, tiene capacidad fagocítica, activa a los astrocitos para que se incorporen a la respuesta inflamatoria, y junto con éstos últimos recluta células inmunes del resto del organismo, como macrófagos y linfocitos T. Además, es bien conocido que la microglía es capaz de secretar citoquinas antiinflamatorias, como las interleucinas 4, 10 y 13, o el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β , *Transforming Growth Factor* β); y factores de crecimiento y neurotróficos, como el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1, *Insulin-like Growth Factor 1*) o el BDNF⁴⁹. Como ya se ha mencionado antes, hay una clara dualidad en las funciones que desempeña la microglía, entre su capacidad de desencadenar una respuesta inmunitaria y de, a su vez, limitarla y promover la reparación del daño inflamatorio. No obstante, no se conoce bien la manera en la que la microglía concilia estas acciones, ya que los estudios *in vivo* parecen mostrar que una misma célula de la microglía puede presentar perfiles de expresión proteica atribuibles a ambos patrones de comportamiento al mismo tiempo. Se están proponiendo patrones de clasificación alternativos de la microglía, como podría sugerir la identificación de la microglía asociada a enfermedad (DAM, del inglés *Disease-Associated Microglia*) que se ha observado en torno a las zonas afectadas por una lesión,

⁴⁷ Yin, J., Valin, K. L., Dixon, M. L., Leavenworth, J. W. *J. Immunol. Res.* **2017**, 2017.

⁴⁸ Labzin, L. I., Heneka, M. T., & Latz, E. *Annu. Rev. Med.* **2018**, 69, 437.

⁴⁹ Smolders, S. M. T., Kessels, S., Vanganswinkel, T., Rigo, J. M., Legendre, P., Brône, B. *Prog. Neurobiol.* **2019**, 178, 101612.

y a la que se le atribuye un efecto protector y reparador⁵⁰. No obstante, no merece la pena detenerse más en un asunto que sigue lejos de resolverse.

El otro componente principal del sistema inmune residente en el SNC son los astrocitos. Son el tipo celular más abundante en el SNC (60-70% del total de células) y revisten una morfología muy heterogénea, aunque su forma más común es de estrella, de lo que procede el nombre de este tipo celular. Además de mediadores inmunes, los astrocitos ejercen múltiples funciones relacionadas con la asistencia a la sinapsis neuronal y el soporte nutricional y metabólico de las neuronas. Cuando se produce un daño en el tejido nervioso, los astrocitos pueden ser activados por la microglía, pero también expresan PRR como los receptores tipo-Toll que les permiten reconocer por sí mismos un daño celular cercano y desencadenar una respuesta inflamatoria propia, principalmente a través del factor de transcripción NF- κ B. Como la microglía, tienen capacidad fagocítica, y de hecho se ha visto que son capaces de colaborar en la fagocitosis de proteínas mal plegadas como el péptido β -amiloide. Además, el hecho de que los astrocitos formen parte de la barrera hemato-encefálica les permite regular su permeabilidad, posibilitando el paso de células inmunes extrañas al SNC en caso de que sea necesario para asistir el proceso inflamatorio. Todavía hay numerosas incógnitas acerca de los mecanismos que influyen en la naturaleza beneficiosa o deletérea de la activación astrocítica, como en el caso de la microglía⁵¹.

Todas las dudas que se han expresado anteriormente entroncan con la misma gran cuestión: ¿la neuroinflamación es perjudicial o beneficiosa? Como ya se afirmó al tratar el papel del estrés oxidativo, una vez más la cuestión parece ser de índole cuantitativa. Unos niveles bajos o moderados de producción de ciertas citoquinas inflamatorias, como las interleucinas 1 y 4, permiten el mantenimiento de una inmunidad basal preparada para hacer frente a cualquier amenaza, promueven el desarrollo cerebral y de algunas funciones como el aprendizaje o la memoria, y son claves para los procesos de plasticidad, remodelado y reparación neuronal. Por el contrario, cuando la

⁵⁰ Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M., Amit, I. *Cell*, **2017**, *169*, 1276.

⁵¹ Morales, I., Farías, G. A., Cortes, N., Maccioni, R. B. *Update on Dementia*. IntechOpen, 2016.

inflamación alcanza unos niveles anormalmente elevados durante un tiempo prolongado, el beneficio se troca en nocividad.

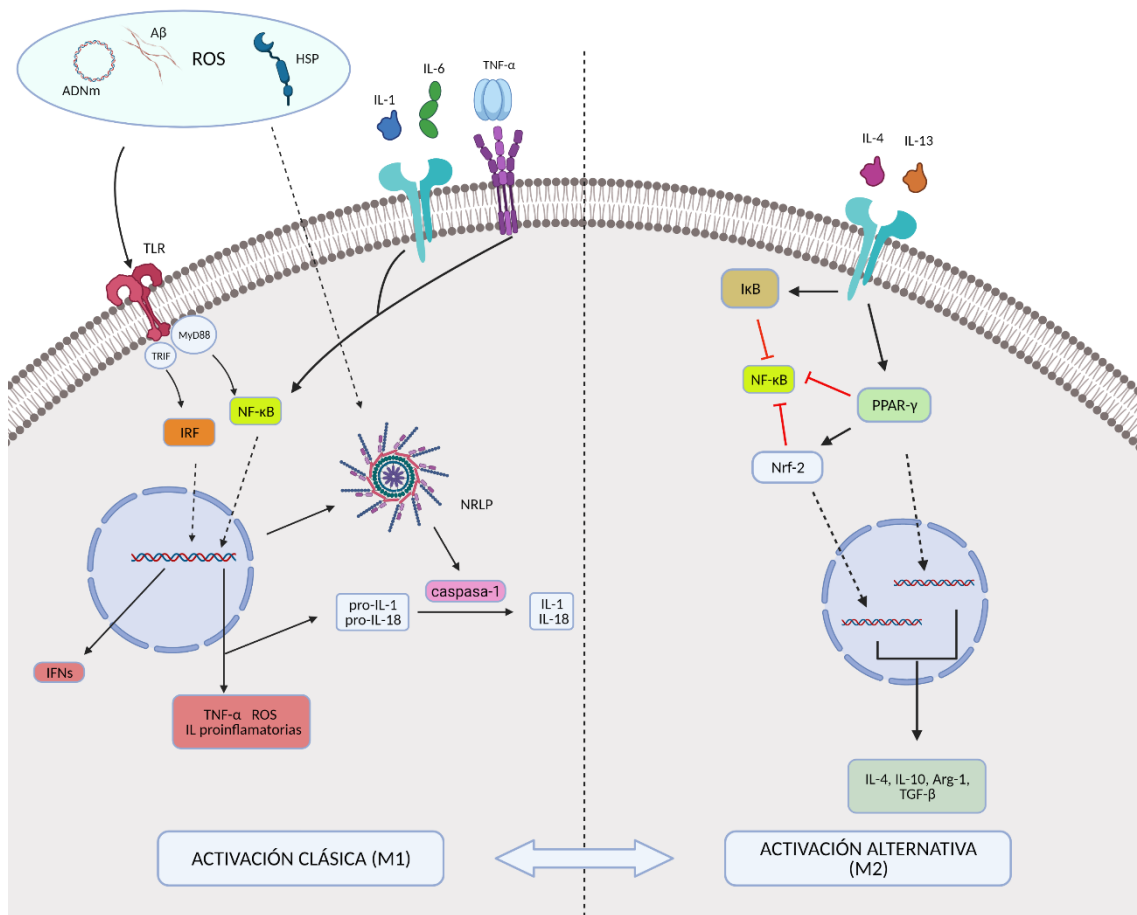


Figura 1.6. Teoría clásica de activación de la microglía hacia los fenotipos M1 y M2, en función de los estímulos presentes en el medio extracelular^{52,53}.

Hay un término inglés, “*inflamm-aging*”⁵⁴, que con la practicidad que caracteriza a este idioma describe perfectamente la relación entre el envejecimiento y el estatus inflamatorio. El organismo, a medida que envejece, adopta una respuesta persistente a estrés de perfil bajo, que le permite compensar con una mayor preparación basal el declive funcional general que le hace más vulnerable frente a las distintas amenazas endógenas y exógenas que van surgiendo y acumulándose. El sistema inmunológico es una de las piezas clave en esta respuesta, observándose una activación basal crónica y que crece paulatinamente en la fase final de la vida. En general, esta respuesta inmune

⁵² Jiang, C. T., Wu, W. F., Deng, Y. H., Ge, J. W. *Mol. Med. Rep.* **2020**, *21*, 2006.

⁵³ Yang, J., Wise, L., Fukuchi, K. I. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 724.

⁵⁴ Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., De Benedictis, G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, *908*, 244.

crónica es de bajo perfil y asintomática, pero en determinadas situaciones esta activación puede ser totalmente contraproducente, contribuyendo a la aparición de diversas patologías autoinmunes o relacionadas con la edad. En líneas generales, tanto la inmunidad innata como la adaptativa muestran una notable desregulación e incluso en ocasiones una pérdida numérica de efectivos, pero a cambio manifiestan una reactividad mayor ante los estímulos. En lo que respecta a la microglía, se observa un aumento en su capacidad proliferativa y de producción de citoquinas proinflamatorias, mientras que la quimiotaxis, la capacidad fagocítica de proteínas mal plegadas y la tendencia a adoptar un perfil antiinflamatorio se reducen. Además, la microglía senescente también sufre cambios morfológicos, fenómenos de agregación proteica y mutaciones en el ADN mitocondrial, que derivan en una producción descontrolada de ROS.

En la neurodegeneración, la neuroinflamación aparece como un factor clave en la aceleración y extensión del proceso⁵⁵. La muerte neuronal causada por el creciente estrés oxidativo y la agregación de proteínas producen la liberación de gran cantidad de DAMP al entorno, que son detectados por la microglía y los astrocitos gracias a sus receptores tipo-Toll o NLR, entre otros. En primer lugar, la respuesta trata de ser de tipo reparador: se activa la producción de citoquinas proinflamatorias para instaurar lo que se conoce como una “gliosis” (activación de la glía) local, la microglía y los astrocitos tratan de fagocitar los péptidos mal plegados y los restos celulares, y además los astrocitos tratan de favorecer la supervivencia de las neuronas que se encuentran en la zona lesionada. El problema es que, como se ha explicado antes, la situación basal de las células inmunes residentes del SNC se caracteriza por su mayor inmunorreactividad y su menor eficacia. Esto se traduce en una respuesta inflamatoria exagerada, de modo que la intensa liberación de citoquinas proinflamatorias y radicales libres acaba por extender el daño neuronal, lo que a su vez agrava la inflamación. Por otro lado, el perfil antiinflamatorio y neurotrófico que podrían tener la microglía y los astrocitos se ve totalmente eclipsado por la respuesta citotóxica, y la menor eficacia de la fagocitosis impide una eliminación eficaz de los depósitos proteicos tóxicos. La activación de la microglía se ha relacionado con otros efectos que agravan aún más la lesión neuronal:

⁵⁵ Costantini, E., D’Angelo, C., Reale, M. *Mediators Inflamm.* **2018**, 2018.

estimula en su entorno la activación de rutas como la mediada por la quinasa Jun N-terminal (JNK), implicada en la hiperfosforilación de la proteína Tau⁵⁶; y también tiende a liberar hierro a su entorno (los depósitos de Fe aumentan en la microglía senescente), promoviendo la generación de un estrés oxidativo mayor. Si el estatus inflamatorio avanza lo suficiente, los astrocitos son capaces de modificar la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica, por lo que linfocitos T y B, macrófagos y neutrófilos procedentes del resto del organismo se infiltran en las zonas lesionadas del SNC, extendiendo e intensificando el daño inflamatorio. Por si esto fuera poco, las zonas afectadas comienzan a desarrollar insuficiencia vascular y aterosclerosis a causa de la propia reacción inflamatoria, lo que conduce a una disminución del aporte de oxígeno y por tanto a la necrosis del tejido con la consecuente intensificación de la respuesta inmune local. La neuroinflamación es, en definitiva, un pequeño fuego capaz de alimentarse a sí mismo que acaba por arrasarse las regiones tisulares donde se desata, constituyendo una eminente contribución al deterioro funcional asociado a la neurodegeneración⁵⁷.

Calcio y excitotoxicidad

El calcio (Ca^{2+}) es uno de los segundos mensajeros más importantes en las células eucariotas, participando en un sinnúmero de procesos relacionados con la diferenciación, proliferación, crecimiento, excitabilidad, supervivencia y apoptosis celular. En el caso de las neuronas, el papel que desempeña es absolutamente crucial, ya que permite acoplar la despolarización de la membrana con la actividad metabólica y funcional de la neurona, siendo asimismo fundamental para la liberación de neurotransmisores y la actividad sináptica, que a la postre son los procesos funcionales que definen a las neuronas⁵⁸. El calcio también desempeña un papel fundamental en otros procesos funcionales del tejido nervioso, como el aprendizaje y la memoria⁵⁹. Las neuronas requieren un control exhaustivo de las concentraciones de calcio citosólicas para ejercer su función correctamente, por lo que disponen de un complejo sistema de canales, bombas e intercambiadores que permiten mantener los niveles de calcio neuronales en

⁵⁶ Metcalfe, M. J., Figueiredo-Pereira, M. E. *Mt. Sinai J. Med.* **2010**, *77*, 50.

⁵⁷ Chen, W. W., Zhang, X. I. A., Huang, W. J. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *13*, 3391.

⁵⁸ Pchitskaya, E., Popugaeva, E., Bezprozvanny, I. *Cell Calcium.* **2018**, *70*, 87.

⁵⁹ Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., Carafoli, E. *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 2787.

los niveles necesarios, del mismo modo que otra extensa red de proteínas dependientes de calcio permiten traducir las variaciones de los niveles de calcio en las acciones fisiológicas adecuadas.

En primer lugar, hay diversos canales implicados en el intercambio de calcio entre los medios extracelular e intracelular. La ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA, *Plasma Membrane Calcium Pump*) y el intercambiador de sodio y calcio de la membrana plasmática (NCX) se ocupan de expulsar calcio al medio extracelular, mientras que la entrada se produce a través de canales mediados por voltaje, ligando o almacenaje (VOC, ROC y SOC, del inglés *Voltage, Receptor* o *Stockage-Operated Channels*, respectivamente). Por su importancia en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas, merece la pena destacar dentro de los ROC los canales de calcio asociados a receptores glutamatérgicos y purinérgicos.

El L-glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso, siendo reconocido por receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Dentro de los primeros hay dos tipos principales, los AMPA (receptores sensibles a ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico), que permiten el paso de sodio, potasio y calcio; y los NMDA (receptores sensibles a *N*-metil-D-aspartato), permeables a sodio y calcio. El papel de los receptores NMDA merece especial atención, debido a su participación clave en la plasticidad sináptica a largo plazo, la memoria y el aprendizaje. Ambos tipos de receptores precisan un estímulo despolarizante simultáneo al reconocimiento del ligando, debido a que un ión Mg^{2+} los mantiene bloqueados en reposo.

Por otra parte, los receptores purinérgicos ionotrópicos (P2X) son la principal vía postsináptica de entrada de calcio en reposo (es decir, cuando los receptores glutamatérgicos permanecen bloqueados), y están implicados en procesos como la plasticidad sináptica o la neuroinflamación.

El control de la concentración plasmática de calcio no sólo se ejerce vía intercambios con el medio extracelular, sino que la célula utiliza el retículo endoplasmático y la mitocondria como almacenes internos de calcio para adaptarse a las necesidades de cada momento. El retículo endoplasmático puede liberar calcio al citosol a través de los receptores de rianodina (RyR) y de trifosfato de inositol (I3PR), o captarlo a través de la bomba de tipo ATPasa SERCA. Por su parte, la mitocondria almacena calcio mediante el

canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, *Voltage-Dependent Anion Channel*), que permite el paso del calcio a través de la membrana mitocondrial externa, y el uniportador mitocondrial de calcio (MCU, *Mitochondrial Calcium Uniporter*), que permite el acceso del calcio a la matriz. A su vez, el intercambiador sodio/calcio mitocondrial (mNCX) y la apertura transitoria del poro de permeabilidad mitocondrial funcionan como vías de liberación de calcio desde la matriz de dicho orgánulo.

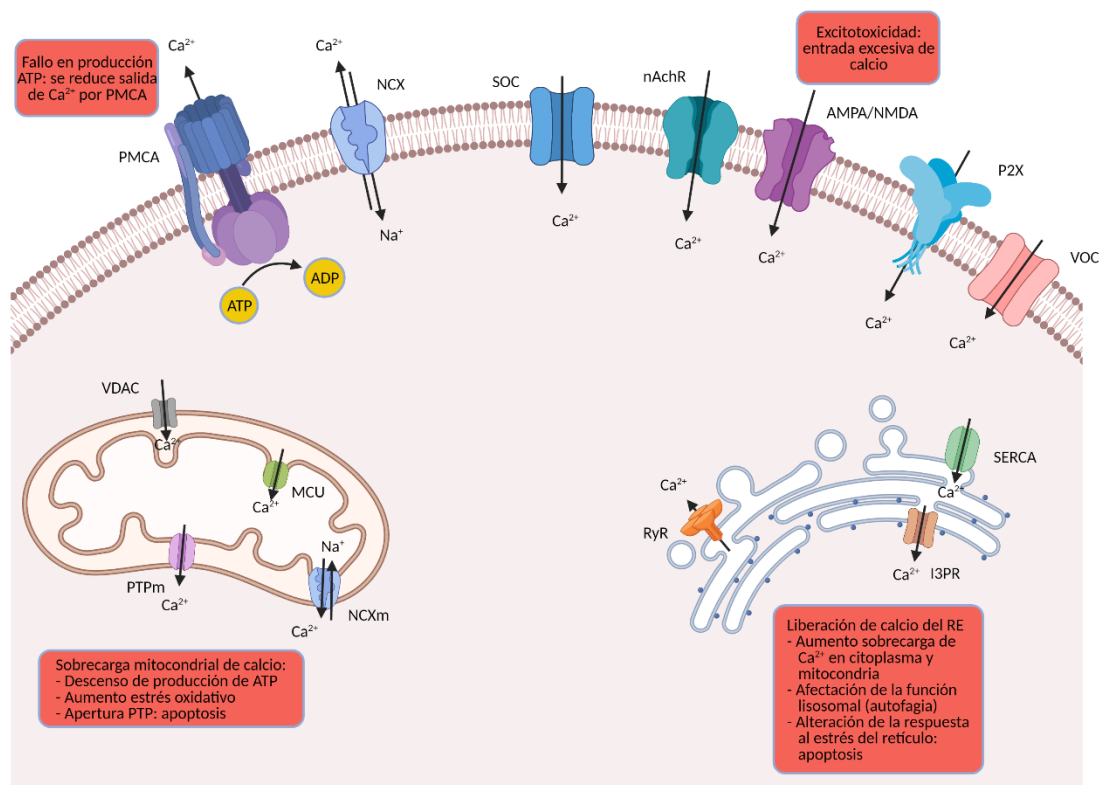


Figura 1.7. Mecanismos de regulación de los niveles de calcio intracelular y su fracaso en el proceso de neurodegeneración.

El deterioro funcional de las neuronas, causado por el envejecimiento y el incremento del estrés oxidativo, también ejerce un notable impacto sobre los sistemas de regulación del calcio⁶⁰. Se produce una progresiva desregulación de los sistemas de transporte y almacenamiento de calcio, que se ven aún más comprometidos por la paulatina disfunción mitocondrial, debido a que la escasez de ATP pone en riesgo la acción de las ATPasas asociadas a los canales y bombas que permiten el mantenimiento de los

⁶⁰ Álvarez, J., Álvarez-Illera, P., García-Casas, P., Fonteriz, R. I., Montero, M. *Cells*. 2020, 9, 204.

potenciales de membrana y de los flujos de calcio a través de membranas. Las alteraciones citosólicas producidas por el incremento de la concentración de calcio observado bajo estas circunstancias se extienden a otros orgánulos, provocando una disfunción celular general que la aboca a un proceso de muerte programada.

Por otro lado, antes de explicar los efectos negativos de la sobrecarga neuronal de calcio, es importante explicar brevemente el concepto de excitotoxicidad. Éste hace referencia al efecto neurotóxico de una excesiva activación de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos por parte de los aminoácidos excitatorios, especialmente el L-glutamato⁶¹. Aunque los mecanismos de aparición de la excitotoxicidad son diferentes para cada enfermedad, en general se pueden establecer algunas características comunes: el estrés oxidativo y los depósitos anómalos de proteínas producen algunas alteraciones como el aumento de la expresión o la sensibilidad de los receptores AMPA y NMDA, y el descenso de la actividad de los transportadores de glutamato EAAT (del inglés *Excitatory Amino Acid Transporter*) mediante los cuales la microglía y los astrocitos captan el glutamato en exceso presente en la hendidura sináptica. Las consecuencias de la excesiva neurotransmisión excitatoria se deben achacar principalmente al exagerado aumento de las concentraciones de calcio que producen en las neuronas postsinápticas, pero también hay otros mecanismos adicionales: por ejemplo, se ha demostrado que la estimulación de los receptores NMDA causa de forma directa la activación de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), lo que supone una fuente adicional de estrés oxidativo y neuroinflamación⁶².

La acumulación de calcio en el citosol neuronal se explica por el aumento de su entrada desde el medio extracelular, y por la alteración de los mecanismos de control de su concentración plasmática. Así, el flujo anormal de calcio al interior celular puede deberse, entre otros motivos, a la excesiva estimulación glutamatérgica (excitotoxicidad) y a la formación de poros transmembrana por parte de los depósitos de proteínas mal plegadas, como ocurre en el caso del péptido β -amiloide. En un contexto de elevado estrés oxidativo y escasez de ATP debida a la disfunción mitocondrial, los intercambiadores y ATPasas encargados de contrarrestar el aumento

⁶¹ Lau, A., Tymianski, M. *Pflügers Arch.* **2010**, 460, 525.

⁶² Lewerenz, J., Maher, P. *Front. Neurosci.* **2015**, 9, 469.

del calcio intracelular mediante su expulsión o almacenamiento en el retículo endoplásmico y la mitocondria no son capaces de realizar correctamente su función, de modo que la célula entra en una situación de sobrecarga de calcio. Ésta tiene efectos directos en el citoplasma, siendo uno de los más destacados el aumento de la actividad de algunas enzimas dependientes de calcio como, por ejemplo, calpaínas, lipooxigenasas o DNAsas. Las calpaínas están involucradas en la degradación de una gran variedad de proteínas, entre las que se incluyen proteínas de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y los transportadores de calcio NCX y VDAC; es decir, su activación perjudica aún más la función mitocondrial y la homeostasis del calcio. Las lipooxigenasas, por su parte, están implicadas en procesos de inflamación y apoptosis celular^{63,64}.

La acción del retículo endoplásmico como almacén de calcio está severamente comprometida en esta situación, ya que lo que se observa en los tejidos afectados por la neurodegeneración es una fuerte tendencia a liberarlo. Este hecho acaece tanto por la disfunción de la bomba ATPasa SERCA que debería captar calcio hacia el RE, como por la estimulación de los sistemas de expulsión de calcio del RE. Merece especial atención la alteración de las membranas del retículo endoplásmico asociadas a las mitocondrias (MAM, *Mitochondria-Associated Membranes*), que tiene como consecuencia que las mitocondrias asuman buena parte del calcio liberado por el retículo endoplásmico, con el consecuente perjuicio de la función mitocondrial. Se ha observado que la α -sinucleína, el péptido β -amiloide y otros péptidos mal plegados participan en la alteración de estas MAM, y también otras proteínas mutantes como las presenilinas 1 y 2 en el caso de la enfermedad de Alzheimer. Este efecto también se observa en las comunicaciones del RE con otros orgánulos a través de membranas, como los lisosomas, de modo que la autofagia también se ve afectada por la excesiva liberación de calcio del RE. La funcionalidad del RE también se ve afectada por el agotamiento de sus reservas de calcio por otros motivos: numerosas proteínas encargadas de mantener la estructura del orgánulo dependen del calcio para hacer su función, lo mismo que algunas de las

⁶³ Cerella, C., Diederich, M., Ghibelli, L. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, 2010.

⁶⁴ Gleichmann, M., Mattson, M. P. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, 14, 1261.

chaperonas que participan en la respuesta al estrés del retículo, lo que desemboca en el fracaso de dicha respuesta y la entrada en apoptosis de la neurona⁶⁵.

El calcio es un elemento imprescindible para el funcionamiento normal de la mitocondria. Como ya se detalló anteriormente, promueve la acción de las enzimas deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, asegura el suministro de sustratos oxidables para el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones, y participa en la activación de la ATP sintasa. Todos estos procesos quedan afectados cuando se produce una sobrecarga mitocondrial de calcio, que se puede deber al intento de almacenar el exceso de calcio citosólico o procedente del retículo endoplásmico, por una disfunción del intercambiador de sodio y calcio mitocondrial o por una alteración de la capacidad de almacenaje de calcio por parte de la matriz mitocondrial. No hay que soslayar otros mecanismos adicionales que pueden conducir a esta situación de sobrecarga: por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer se ha visto que los depósitos de péptido β -amiloide pueden perforar las membranas mitocondriales, formando improvisados canales por donde el calcio entra a la mitocondria. Los efectos de una sobrecarga de calcio son devastadores para la función mitocondrial, principalmente debido a la inhibición de la síntesis de ATP por la pérdida del gradiente electroquímico necesario para el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico y la ATP sintasa, además de a la degradación de algunos de los componentes del sistema por la activación de las calpaínas, entre otros motivos. Además, el exceso de calcio puede llegar a producir la apertura del PTP mitocondrial a través de la acción de la ciclofilina D, precipitando la apoptosis celular. La disfunción mitocondrial resultante produce un aumento del estrés oxidativo debido a la ineficacia de la cadena de transporte electrónico, y el descenso de la producción de ATP compromete más aún el funcionamiento de las bombas de calcio dependientes de ATP y el mantenimiento del potencial de membrana neuronal. Hay que recordar que las calpaínas activadas por calcio también degradan el intercambiador NCX mitocondrial, agravando la disfunción del orgánulo⁶⁶.

⁶⁵ Mekahli, D., Bultynck, G., Parys, J. B., De Smedt, H., Missiaen, L. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, 4317.

⁶⁶ Britti, E., Delaspere, F., Tamarit, J., Ros, J. *Neuronal Signal.* **2018**, *2*.

Por último, hay que destacar que el calcio también actúa como factor de transcripción génica en el núcleo celular⁶⁷, por lo que la alteración en sus concentraciones puede implicar la afectación de numerosas funciones y vías de señalización de las neuronas.

1.1.5 Evolución, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, no se puede achacar la neurodegeneración a un solo factor, ni establecer una relación temporal entre las distintas causas que concurren en la aparición de estas enfermedades. Los cambios en el plegamiento de proteínas, el equilibrio oxidativo celular, el estatus inflamatorio y los sistemas de señalización mediados por calcio se superponen y retroalimentan conduciendo a las neuronas a un estado donde fallan la función mitocondrial, el transporte axonal y su capacidad de dar una respuesta correcta ante los cambios de su entorno y su interior, de modo que el tejido neuronal acaba por perder su funcionalidad y su integridad por la muerte de muchas de sus células.

Las enfermedades neurodegenerativas se han estudiado tradicionalmente a través del desarrollo de modelos *in vitro* e *in vivo* que tratan de mimetizar, mediante métodos de modificación genética o administración de determinadas sustancias, el estatus patológico que presentan los pacientes. A pesar de que esta metodología de trabajo ha permitido enormes avances en la comprensión de lo que ocurre en estas enfermedades, los intentos de traslación de estrategias terapéuticas exitosas en estos modelos al paciente humano han fracasado sistemáticamente, lo que es un claro signo de que el problema no se está abordando de una manera del todo correcta. Por este motivo, se redoblan los esfuerzos para encontrar una serie de biomarcadores que podrían permitir, en primer lugar, establecer mejor cómo y cuándo aparece la neurodegeneración, y por ende, elegir las dianas terapéuticas con más probabilidades de éxito ajustando el inicio temporal del tratamiento a la aparición del daño neuronal, y no a la aparición de la sintomatología como viene sucediendo hasta ahora⁶⁸.

⁶⁷ Hardingham, G. E., Chawla, S., Johnson, C. M., Bading, H. *Nature* **1997**, 385, 260.

⁶⁸ Beach, T. G. *Neurol. Ther.* **2017**, 6, 5.

Hasta hace poco, lo que se manejaba principalmente para predecir la posibilidad de padecer una enfermedad neurodegenerativa era la búsqueda de mutaciones cuya relación con una patología en concreto está bien establecida, tema que ya se revisó en el apartado de etiología. Resulta evidente que este proceder no es el más adecuado por dejar fuera los casos de origen esporádico, mayoritarios en las principales enfermedades neurodegenerativas, por lo que se estudian nuevos marcadores genéticos y bioquímicos que permitan una fotografía de la realidad más ajustada. Éstos últimos parecen los más interesantes, debido a su mayor valor para predecir y monitorizar la progresión de la enfermedad⁶⁹.

En el caso de la enfermedad de Alzheimer, los niveles de proteína Tau, Tau fosforilada y péptido A β ₄₂ en líquido cefalorraquídeo (LCR) han demostrado una buena correlación con la presencia de dicha patología en términos de especificidad y selectividad, mientras que la ratio A β ₄₂/p-Tau ofrece además un buen valor predictivo para la evolución desde un estado sin deterioro cognitivo o deterioro leve hacia el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, la detección mediante tomografía de emisión de positrones (PET, *Positron Emission Tomography*) de los depósitos de péptido β -amiloide gracias al uso de distintos radioligandos también ha demostrado su valor diagnóstico en pacientes y predictivo en individuos en la fase previa a la enfermedad. Otro marcador interesante detectable mediante PET es la ¹⁸F-fluorodeoxiglucosa (FDG), cuya captación reducida en el cerebro es un signo de hipometabolismo detectable tanto en individuos que padecen la enfermedad como en futuros enfermos con un nulo o leve deterioro cognitivo. El diagnóstico se puede apoyar también otras técnicas de imagen como la resonancia magnética de imagen para detectar la atrofia de determinadas áreas cerebrales.

El biomarcador más sólido para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson es la ratio α -sinucleína oligomérica/ α -sinucleína total en el líquido cefalorraquídeo, aunque hay otros marcadores como el BDNF sérico que contribuyen al diagnóstico de la enfermedad y permiten valorar su progresión. Sin embargo, aún no se han conseguido encontrar

⁶⁹ (a) Jeromin, A., Bowser, R. Biomarkers in Neurodegenerative Diseases. In *Neurodegenerative Diseases. Pathology, Mechanisms, and Potential Therapeutic Targets*; Beart, P., Robinson, M., Rattray, M., Maragakis N. (Eds.), Springer; Cham, New York, 2017. (b) Jeromin, A., Bowser, R. *Adv. Neurobiol.* **2017**, *15*, 491.

biomarcadores que permitan predecir con la fiabilidad suficiente la aparición de la enfermedad en individuos asintomáticos.

Los niveles de la proteína ligera de los neurofilamentos (NFL, *NeuroFilament Light polypeptide*) y la proteína de cadena pesada de los neurofilamentos fosforilada (p-NFH, *NeuroFilament Heavy polypeptide*) en líquido cefalorraquídeo han sido propuestos por varios estudios como biomarcadores adecuados para el diagnóstico de la ELA, mientras que se ha estudiado el uso de marcadores inflamatorios como la IL-8 sérica o en LCR para evaluar la progresión de la enfermedad. En lo que respecta a técnicas de imagen, la PET de ¹⁸F-fluorodeoxiglucosa permite relacionar el hipometabolismo con la enfermedad, y otras técnicas como la morfometría basada en superficies (SBM, *Surface-Based Morphometry*) o la resonancia magnética de imagen multimodal (RMIM), que combina una resonancia magnética nuclear de protón con un tensor de difusión, se han explorado para el diagnóstico *in vivo* de la ELA.

Para revisar brevemente la evolución temporal de los biomarcadores patológicos es preferible tomar como modelo la enfermedad de Alzheimer, por ser la patología más estudiada en este sentido^{70,71,72}. En los últimos años se ha redefinido la enfermedad desde una perspectiva puramente clínica hacia un enfoque más fisiopatológico, basándose en el hecho de que las alteraciones de determinados biomarcadores preceden en periodos de cinco a diez años, o incluso más en ocasiones, a la aparición de la sintomatología cognitiva. Se ha podido observar que los niveles del péptido A β ₄₂ y la ratio A β ₄₂/p-Tau en líquido cefalorraquídeo, junto con la detección mediante PET de depósitos cerebrales de A β ₄₂, serían los primeros signos de alteración, seguidos unos años más tarde por una progresiva disfunción sináptica y neuronal revelada por pruebas como la FDG-PET o la resonancia magnética de imagen funcional en determinadas áreas cerebrales. Poco después se observa la alteración de los niveles de la proteína Tau en líquido cefalorraquídeo, considerada un signo algo más inespecífico de daño neuronal. Tras otro lapso que puede durar algunos años, la disfunción cerebral es ya detectable mediante resonancia magnética de imagen volumétrica en las áreas cerebrales

⁷⁰ Young, A. L., Oxtoby, N. P., Ourselin, S., Schott, J. M., Alexander, D. C. *Med. Image Anal.* **2015**, 26, 47.

⁷¹ Khoury, R., Ghossoub, E. *Biomark. Neuropsych.* **2019**, 100005.

⁷² Archetti, D., Ingala, S., Venkatraghavan, V., Wottschel, V., Young, A. L., Bellio, M., Bron, E. E., Klein, S., Barkhofb, F., Alexander, D. C., Oxtoby, N. P., Frisoni, G. B., Redolfi, A. *NeuroImage Clin.* **2019**, 24, 101954.

afectadas y mediante pruebas que miden la función cognitiva, siendo éste el periodo de deterioro cognitivo leve que precedería a la instauración de la sintomatología de demencia propia de la enfermedad de Alzheimer. Se considera, como se puede ver en la figura 1.8, que los parámetros alterados no siguen un modelo lineal, sino más bien una función sigmoïdal con unas pendientes diferentes para cada uno de ellos. La duración de las distintas etapas está sujeta a una notable variabilidad individual que depende de los factores genéticos y ambientales que ya se mencionaron en el apartado de etiopatogenia, e incluso se han observado variaciones en el orden de aparición de los cambios bioquímicos: los marcadores de disfunción sináptica pueden ser detectados incluso antes que los signos de deposición del péptido A β ₄₂ en el caso de los portadores del alelo ϵ 4 del gen APOE⁷³.

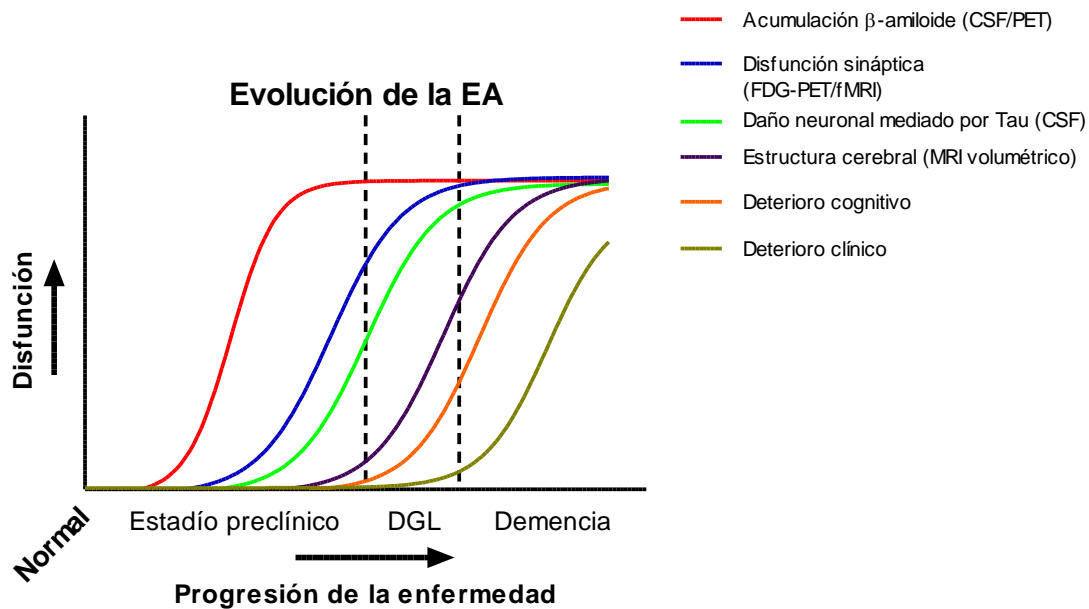


Figura 1.8. Progresión temporal de los marcadores fisiopatológicos y bioquímicos de la EA en relación con la situación clínica. Adaptado de ⁷³.

Aunque, como se puede ver, se ha avanzado mucho en el estudio de diversos marcadores predictivos y/o diagnósticos para las enfermedades neurodegenerativas, la realidad es que hoy en día el diagnóstico sigue apoyándose fundamentalmente en la sintomatología que presenta el paciente, que puede ser confirmada mediante estudios histopatológicos *post mortem* del cerebro de los pacientes. La invasividad, alto coste y

⁷³ Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M., Iwatsubog, T., Jack C. R. Jr., Kaye, J., Montine, T. J., Park, D. C., Reiman, E. M., Rowe, C. C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M. C., Thies, B. Morrison-Bogorad, M., Wagster, M. V., Phelps, C. H. *Alzheimer's Dement.* **2011**, 7, 280.

falta de fiabilidad que caracterizan a los métodos en desarrollo emplazan a la búsqueda de nuevos procedimientos que permitan diagnosticar antes y de forma más eficiente este tipo de patologías, ampliando el margen temporal de actuación terapéutica.

El tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas se realiza hoy en día mediante un enfoque eminentemente paliativo, que permite en el mejor de los casos un cierto retraso en el avance del deterioro funcional, pero no consigue detener ni mucho menos revertir el proceso patológico.

Enfermedad	Mecanismo de acción	Fármacos
Alzheimer	Inhibidores de la acetilcolinesterasa	Rivastigmina, galantamina, donepezilo
	Antagonista del receptor NMDA	Memantina
	Eliminador de depósitos amiloides	Aducanumab**
Parkinson	Precursor de dopamina*	Levodopa
	Agonistas dopaminérgicos	Bromocriptina, lisurida, cabergolina, pramipexol, ropirinol, rotigotina
	Inhibidores de la L-aminoácido aromático descarboxilasa periférica*	Carbidopa, benserazida
	Inhibidores de la monoaminooxidasa B	Rasagilina, selegilina
	Inhibidores de la catecol O-metil transferasa	Entacapona, tolcapona
	Antagonistas muscarínicos	Benzatropina, biperideno, prociclidina, trihexifenidilo, benzatropina
	Estimulador de la liberación de dopamina	Amantadina
	Antagonista del receptor A _{2A} de adenosina	Istradefilina**
ELA	Modulador glutamatérgico	Riluzol
	Captador de radicales libres	Edaravona**
Huntington	Deplecionadores de monoaminas	Tetrabenazina***, reserpina
	Antagonistas dopaminérgicos postsinápticos	Haloperidol, pimozida, tiaprida, perfenazina
	Agonistas dopaminérgicos presinápticos	Bromocriptina, apomorfina

Tabla 1.3. Fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de las principales enfermedades neurodegenerativas.

* Se administran conjuntamente.

** No aprobado aún por la Agencia Europea del Medicamento (sí por FDA y/o Japón).

*** Único aprobado específicamente para el corea de Huntington.

En la tabla 1.3 se recogen los tratamientos actualmente disponibles para las enfermedades neurodegenerativas más comunes, junto con su mecanismo de acción⁷⁴.

⁷⁴ Mediavilla, A., Armijo, J. A., Flórez, J. *Farmacología humana*, 6ª ed., Elsevier-Masson, 2013.

El principal problema al que se enfrenta el abordaje terapéutico de estas enfermedades es la detección tardía y la falta de un conocimiento detallado sobre los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la neurodegeneración. Algunas estrategias propuestas hace décadas, como es el caso de las terapias de reemplazo colinérgico o dopaminérgico en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, siguen plenamente vigentes. El caso de la primera de estas enfermedades es especialmente representativo: el último fármaco aprobado hasta el recentísimo visto bueno del aducanumab había sido la memantina en el año 2003, y se calcula que cerca de 300 moléculas habían fracasado en su intento de superar las fases de desarrollo clínico en las últimas décadas⁷⁵. El aducanumab, un anticuerpo monoclonal diseñado para reconocer específicamente los depósitos de péptido β -amiloide e inducir su eliminación, es *de facto* el primer fármaco aprobado que se puede considerar una terapia modificadora de la enfermedad, pero su llegada se ha visto envuelta de una fuerte polémica ya que muchos expertos ponen en duda la solidez de los ensayos clínicos y la eficacia real del nuevo compuesto. Aunque sobre este fármaco, aprobado de momento sólo por la FDA (*Food and Drug Administration*, de los EE. UU.), planea una duda más que razonable, resulta esperanzador que el cambio de paradigma en el abordaje de las enfermedades neurodegenerativas haya arrojado su primer fruto, que esperemos se vea acompañado en un futuro próximo por otras nuevas moléculas.

Muchas estrategias terapéuticas que parecen prometedoras en los ensayos preclínicos se estrellan en el salto a los ensayos clínicos, lo que se ha dado en calificar como un “valle de la muerte” terapéutico. Esto probablemente se debe a que actúan demasiado tarde, cuando la pérdida de masa neuronal está demasiado avanzada, o porque tratan de modular dianas que no están realmente entre las causas primarias de la enfermedad. Hoy en día, hay una gran variedad de aproximaciones terapéuticas en desarrollo para este tipo de enfermedades, siendo predominantes las anteriormente mencionadas “terapias modificadoras de la enfermedad”, que pretenden retrasar, detener e incluso revertir el curso de la misma⁷⁶. Con este objetivo se explora la modulación de una gran diversidad de dianas mediante entidades de diferente naturaleza como moléculas

⁷⁵ Oxford, A. E., Stewart, E. S., Rohn, T. T. *Int. J. Alzheimer's Dis.* **2020**, 2020.

⁷⁶ Cummings, J. *Transl. Neurodegener.* **2017**, 6, 25.

pequeñas, anticuerpos monoclonales o terapia génica, entre otras. Una estrategia en boga es el uso de ligandos multidiana, moléculas capaces de modular simultáneamente varias dianas relacionadas con una enfermedad. Esta aproximación se detallará en el capítulo 6 de esta tesis doctoral.

1.2 La reacción de Povarov

1.2.1 Importancia de los derivados de 1,2,3,4-tetrahidroquinolina

Los heterociclos nitrogenados suponen uno de los tipos de compuestos orgánicos más importantes en la química orgánica, en general, y en la química farmacéutica en particular. Baste mencionar que aproximadamente el 60 por ciento del total de moléculas pequeñas aprobadas para su uso terapéutico son heterociclos que contienen uno o más átomos de nitrógeno⁷⁷. Dentro de este grupo, muy heterogéneo en cuanto a su diversidad estructural, se encuentra el esqueleto de 1,2,3,4-tetrahidroquinolina, cuya presencia en numerosas moléculas de origen natural o sintético con todo tipo de utilidades le otorga una notable relevancia. Los alcaloides aislados de la corteza del árbol *Galipea officinalis*, llamados (-)-angustureína, (-)-galipeína, (-)-galipinina y (-)-cuspareína, son ejemplos de compuestos naturales que contienen el esqueleto de 1,2,3,4-tetrahidroquinolina y presentan, entre otras, una actividad antimalárica interesante⁷⁸. Las benzastatinas C y D, aisladas de bacterias del género *Streptomyces*, han mostrado una notable actividad antiviral y captadora de radicales libres. También encontramos ejemplos en la naturaleza de alcaloides con una estructura más compleja derivada del núcleo de 1,2,3,4-tetrahidroquinolina, como es el caso de la martinelina y el ácido martinélico, dos pirroloquinolinas aislables de la raíz de la planta tropical *Martinella iquitosensis* capaces de actuar sobre diversos receptores acoplados a proteínas G.

⁷⁷ Vitaku, E., Smith, D. T., Njardarson, J. T. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10257.

⁷⁸ Muñoz, G. D., Dudley, G. B. *Org. Prep. Proced. Int.*, **2015**, *47*, 179.

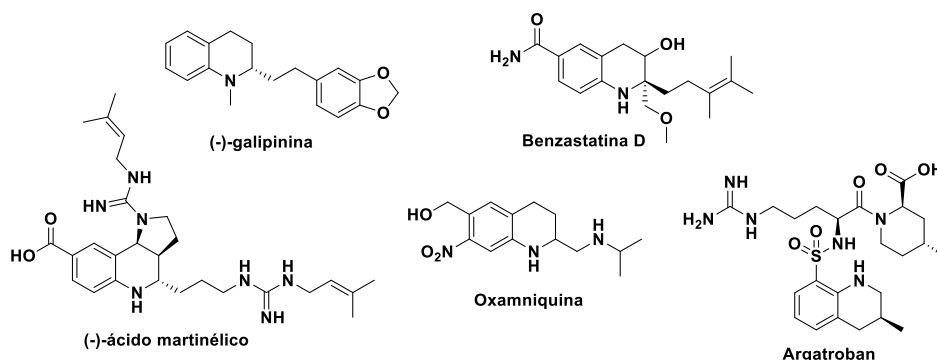


Figura 1.9. Algunas tetrahidroquinolinas naturales y sintéticas de interés farmacéutico.

La química farmacéutica también ha explorado la síntesis de este tipo de compuestos buscando actividades farmacológicas muy diferentes: antibacterianos, antivirales, anticancerígenos, inhibidores enzimáticos, moduladores de receptores metabotrópicos, ionotrópicos y nucleares, etcétera. Por ejemplo, el torcetrapib es un inhibidor de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol que alcanzó la fase III de ensayos clínicos para el tratamiento de la dislipemia, aunque fracasó por motivos de seguridad. El argatroban es un inhibidor directo de la trombina aprobado por la FDA para la profilaxis y tratamiento de la trombosis en pacientes con trombocitopenia tratados con heparina, mientras que la oxamniquina es una tetrahidroquinolina con actividad antihelmíntica de uso común para el tratamiento de la infección por *Schistosoma mansoni*. También se encuentran algunos ejemplos de compuestos tetrahidroquinolínicos con actividad antineurodegenerativa como 4BP-TQS, un modulador alostérico de los receptores nicotínicos α_7 , el compuesto neurotrófico I, el inhibidor de la nNOS II o el inhibidor de la γ -secretasa III^{79,80}.

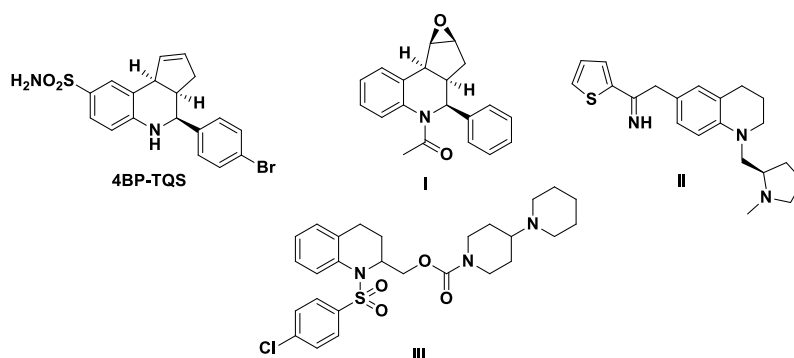


Figura 1.10. Tetrahidroquinolinas sintéticas con actividad antineurodegenerativa

⁷⁹ Muthukrishnan, I., Sridharan, V., Menéndez, J. C. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 5057.

⁸⁰ Ghashghaei, O., Masdeu, C., Alonso, C., Palacios, F., Lavilla, R. *Drug Discov. Today Technol.* **2019**, *29*, 71.

Algunos compuestos derivados de 1,2,3,4-tetrahidroquinolina han encontrado otras posibles aplicaciones fuera de la medicina como ligandos de coordinación para reacciones convencionales o de síntesis asimétrica, colorantes, cristales moleculares, pesticidas, etcétera.

A la vista de la importancia de este esqueleto en diferentes ramas de la química, no resulta sorprendente el esfuerzo que se ha dedicado al desarrollo de diferentes estrategias para la síntesis de 1,2,3,4-tetrahidroquinolinas, de modo que hoy en día hay una gran accesibilidad a este tipo de compuestos partiendo de sustratos muy diferentes y con una diversidad estructural muy notable en lo que a los productos se refiere. Esta tesis se centrará en uno de los métodos más en boga en los últimos tiempos debido a su versatilidad y simplicidad, basado en la reacción conocida como de Povarov.

1.2.2 Definición y reseña histórica

La reacción de Povarov se puede definir como una reacción de cicloadición formal [4+2] de tipo aza Diels-Alder entre *N*-ariliminas y olefinas de alta densidad electrónica, que se caracteriza por ser un proceso de demanda electrónica inversa y requiere catálisis ácida⁸¹. La reacción recibió el nombre de su descubridor, el químico ruso L. S. Povarov, quien en 1963 publicó la obtención de 1,2,3,4-tetrahidroquinolinas mediante la reacción de *N*-ariliminas con vinil éteres acíclicos en presencia de BF₃·Et₂O. Sorprendentemente, este procedimiento novedoso apenas fue explorado en los siguientes treinta años, quizá debido a los problemas de estabilidad de los compuestos de partida utilizados, la necesidad de cantidades estequiométricas del catalizador y los rendimientos que procuraba esta vía, generalmente no demasiado brillantes. En 1995, Kobayashi *et al.* utilizaron con éxito los triflatos de lantánidos como catalizadores para la reacción de Povarov, tanto en la versión convencional como en la versión multicomponente, que había sido aplicada por primera vez a este tipo de cicloadición dos años antes por Narasaka *et al.* De este modo, la eficiencia y utilidad de la reacción de Povarov se vieron notablemente mejoradas, lo que propició un enorme interés y un gran caudal de publicaciones sobre este tema en las siguientes décadas. Gracias al trabajo de muchos grupos de investigación, se ha demostrado que una gran variedad de *N*-ariliminas e

⁸¹ Kouznetsov, V. V. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2721.

incluso *N*-aciliminas de diferentes densidades electrónicas pueden participar con éxito en esta reacción como dienos de partida, de igual modo que a los vinil éteres acíclicos originales se han añadido otros muchos tipos de dienófilos como vinil éteres cíclicos, tioéteres, enaminas, enamidas, alquinos, etcétera. Por su parte, muchas especies diferentes han demostrado su utilidad para catalizar esta cicloadición: ácidos de Lewis, ácidos de Brønsted, sales metálicas, resinas y líquidos iónicos son algunos ejemplos de los catalizadores más usados.

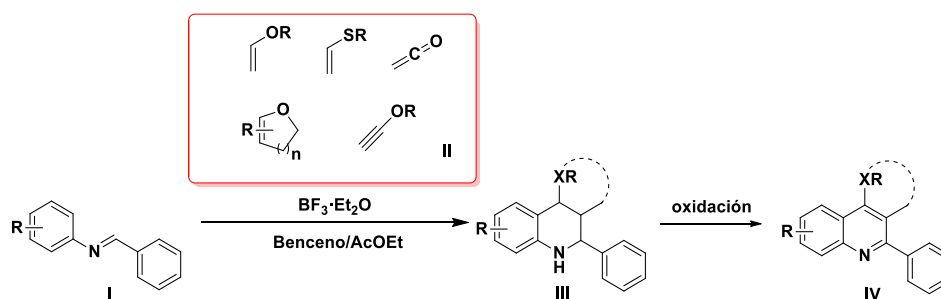
La descripción de la reacción puede parecer un poco compleja, por lo que merece una explicación. La reacción de Povarov se describe como una cicloadición formal debido a que ocurre a través de la formación de un intermedio, aunque como se explicará más adelante hay un intenso debate acerca del mecanismo de este proceso. Además, se describe como una reacción de demanda electrónica inversa debido a que el dienófilo es la especie de elevada densidad electrónica que ataca al dieno, en contraposición a una reacción de Diels-Alder clásica o de demanda electrónica normal, en la que el dieno actúa como nucleófilo en su reacción con el dienófilo. Dentro de las reacciones de Diels-Alder que contienen un heteroátomo en el dieno o el dienófilo, se pueden distinguir las de tipo oxa-Diels-Alder y las de tipo aza-Diels-Alder, perteneciendo la reacción de Povarov a este último grupo.

1.2.3 Diversidad de la reacción de Povarov

Debido al enorme aumento del número de trabajos consagrados a la reacción de Povarov en los últimos 25 años, cualquier intento de clasificación se topa con la variedad de sustratos y catalizadores empleados, así como de las variaciones que se han introducido respecto del concepto original. Se intentará por tanto dar una visión temporal de la evolución en este campo, prestando atención a los ejemplos más representativos e innovadores, pero sin ánimo de ofrecer una revisión exhaustiva de todo el trabajo realizado en el ámbito, algo que excedería con mucho el objeto de esta introducción.

Como no puede ser de otra manera, hay que empezar mencionando el trabajo original. En 1963, el grupo de L. S. Povarov publicó dos trabajos en los que describía una variante de la reacción de Diels-Alder que involucraba la cicloadición [4+2] entre las *N*-arilaldiminas I y distintos dienófilos cíclicos o acíclicos. El nuevo protocolo, asistido por

$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ como catalizador estequiométrico, permitía la formación de las 1,2,3,4-tetrahidroquinolinas **III** con rendimientos moderados^{82,83}. En estos artículos también se describe la conversión de los productos en las quinolinas correspondientes **IV** a través de un tratamiento con ácido *p*-toluenosulfónico. El propio grupo de Povarov dedicó sus esfuerzos en los años siguientes a la exploración de la versatilidad de la nueva reacción descubierta, así como a estudiar los posibles mecanismos que la rigen⁸⁴. A partir de ahí, encontramos en este campo un vacío de casi treinta años sólo salpicado por algún trabajo esporádico, como el de Joh y Hagihara en 1967, en el que utilizaron el octacarbonilo de dicobalto como catalizador de la reacción obteniendo mezclas de tetrahidroquinolinas y quinolinas⁸⁵.



Esquema 1.1. Resumen de los trabajos inaugurales del grupo de Povarov en la síntesis de tetrahidroquinolinas y quinolinas a través de la reacción a la que dio nombre.

En 1993, Narasaka *et al.* publicaron el que se considera el primer ejemplo de reacción de Povarov multicomponente⁸⁶, aunque anteriormente Grieco *et al.* habían publicado la ciclocondensación multicomponente del ciclopentadieno con derivados de anilina y aldehídos aromáticos en medio ácido mediante un proceso que, aunque se ha dado en llamar reacción de Grieco, se puede considerar una variante de la reacción de Povarov⁸⁷.

⁸² Povarov, L. S.; Mikhailov, B. M. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1963**, 955.

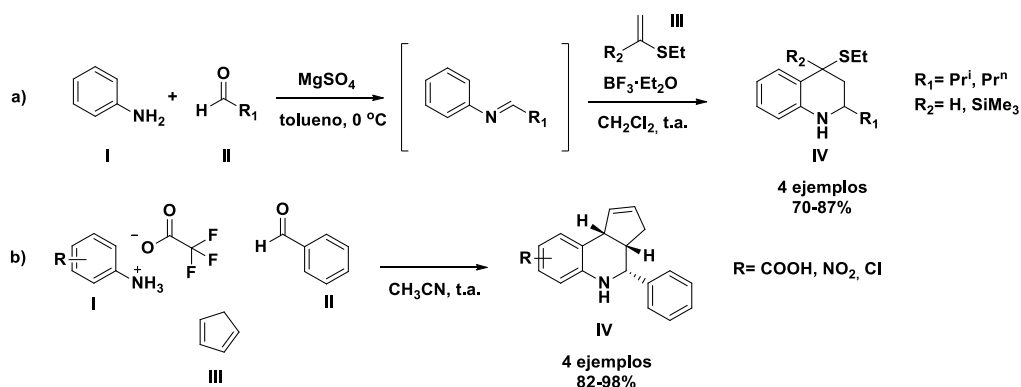
⁸³ Povarov, L. S., Grigos, V. I., Mikhailov, B. M. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.* **1963**, 12, 1878.

⁸⁴ Por ejemplo: a) Mikhailov, B. M.; Povarov, L. S.; Grigos, V. I.; Karakhanov, R. A. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1964**, 9, 1693. b) Povarov, L. S.; Grigos, V. I.; Karakhanov, R. A.; Mikhailov, B. M. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1965**, 2, 365. c) Povarov, L. S. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1966**, 2, 337.

⁸⁵ Joh, T., Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.*, **1967**, 8, 4199.

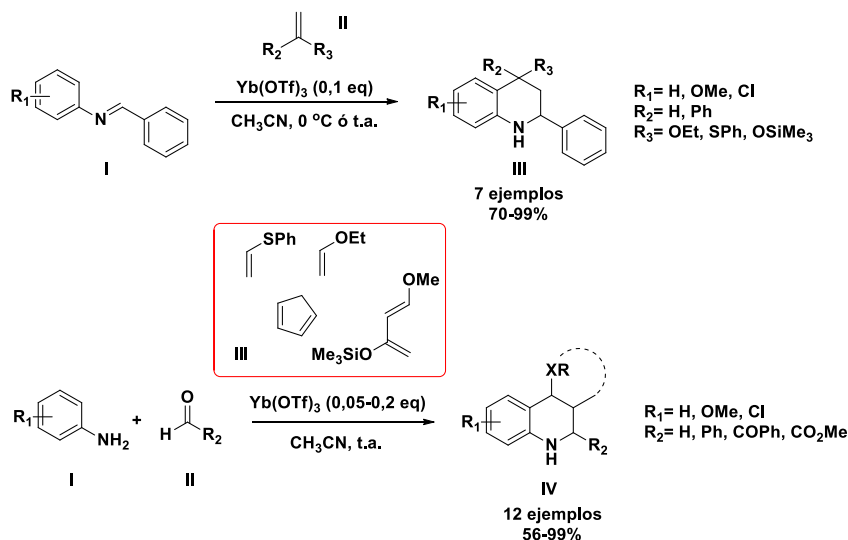
⁸⁶ Narasaka, K., Shibata, T. *Heterocycles.* **1993**, 35, 1039.

⁸⁷ Grieco, P. A., Bahsas, A. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5855.



Esquema 1.2. Variantes multicomponente de Narasaka (a) y de Grieco (b)

En 1995 llegó el trabajo de Kobayashi que dio un espaldarazo definitivo a las opciones de esta reacción de convertirse en una estrategia sintética realmente útil, al demostrar que los triflatos de lantánidos podían, en cantidades catalíticas, facilitar la reacción de Povarov entre aldiminas y diversos vinil éteres o tioéteres acíclicos tanto en su versión clásica, como en la versión multicomponente. El mismo grupo de investigación desarrolló el año siguiente la primera reacción de Povarov enantioselectiva, aunque este tema se tratará más tarde de forma separada⁸⁸.

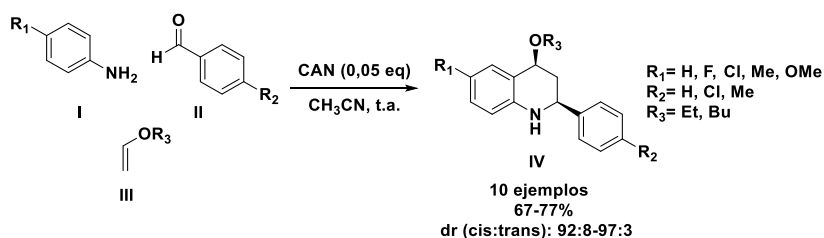


Esquema 1.3. Reacción de Povarov clásica y multicomponente estudiadas por Kobayashi et al.

Otro ejemplo del uso de dienófilos acíclicos viene recogido en una publicación de nuestro grupo de investigación del año 2008, en la que se describe la síntesis multicomponente de las *cis* 2-aryl-4-alcoxi-1,2,3,4-tetrahydroquinolinas **IV** a partir de

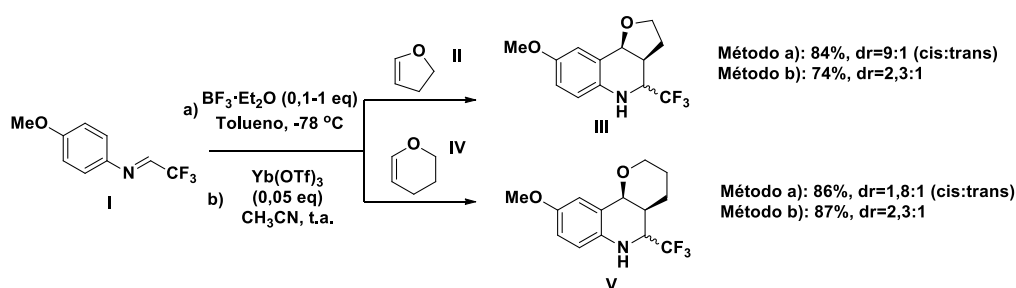
⁸⁸ Kobayashi, S., Ishitani, H., Nagayama, S. *Synthesis*, **1995**, 9, 1195.

vinil éteres, aldehídos aromáticos y derivados de anilina, catalizada por nitrato cérico amónico⁸⁹.



Esquema 1.4. Síntesis multicomponente de 1,2,3,4-tetrahidroquinolinas por Sridharan *et al.*

La reacción de Povarov ha demostrado admitir una gran variedad de dienófilos. Una opción empleada de forma muy frecuente es el uso de éteres cíclicos, que permiten el acceso a tetrahidroquinolinas fusionadas. Un ejemplo de esta aproximación se puede encontrar en el trabajo de Crousse *et al.*, en el que el triflato de iterbio y el $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ catalizan la reacción entre ariliminas preformadas y vinil éteres acíclicos, dihidrofurano o dihidropirano, obteniendo en el caso de los dienófilos cíclicos la correspondiente hexahidrofuroquinolina **III** o hexahidropiranoquinolina **IV** con buenos rendimientos y moderadas diastereoselectividades. Los sustituyentes de los carbonos 3 y 4 (los de la cara de fusión) se encuentran en una disposición *cis*, mientras que la diastereoselección entre los sustituyentes de las posiciones 2 y 4 oscila entre 1,8:1 y 9:1 (*cis:trans*). Más tarde se razonará el mecanismo de diastereoselección en la reacción de Povarov⁹⁰.



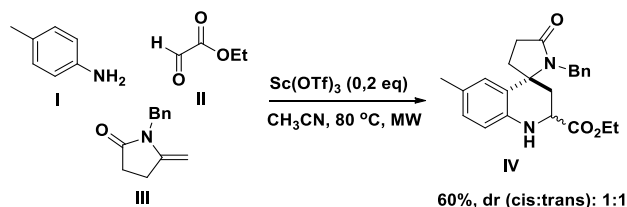
Esquema 1.5. Empleo de dienófilos cíclicos en la reacción de Povarov por Crousse *et al.*

También se ha investigado ampliamente el uso de diversas enamidas como dienófilos activados en la reacción de Povarov. Por ejemplo, Astudillo *et al.* emplearon la *N*-vinilpirrolidona para llevar a cabo una versión multicomponente de la reacción catalizada por BiCl_3 bajo irradiación de microondas y sin necesidad de disolvente, lo que

⁸⁹ Sridharan, V., Avendaño, C., Menéndez, J. C. *Synthesis*, **2008**, 7, 1039.

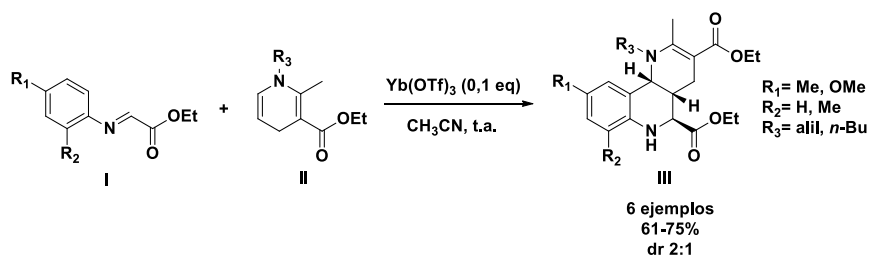
⁹⁰ Crousse, B., Bégué, J. P., Bonnet-Delpon, D. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 5009.

supone además un ejemplo de aplicación de los preceptos de la química verde a esta reacción⁹¹. Vicente-García *et al.* fueron un paso más allá al conseguir obtener un derivado de espirotetrahidroquinolina mediante el uso de una *N*-alquilpirrolidona con un doble enlace exocíclico, en un trabajo en el que también exploraron el uso de diferentes lactamas insaturadas⁹².



Esquema 1.6. Síntesis multicomponente de una espirotetrahidroquinolina por Vicente-García *et al.*

En lo que respecta al uso de enaminas, nuestro grupo publicó una variante de la reacción de Povarov en la que se usaban *N*-alquil-1,4-dihidropiridinas como dienófilo y triflato de ytterbio como ácido de Lewis para facilitar la reacción, obteniéndose las resultantes hexahidrobenzofitridinas con buenos rendimientos, pero baja diastereoselección⁹³.



Esquema 1.7. Síntesis de derivados de hexahidrobenzo[h][1,6]naftiridina a través de una reacción de Povarov por Maiti *et al.*

El empleo de alquenos simples, cíclicos y acíclicos, también está ampliamente documentado. Por ejemplo, Bohórquez *et al.* prepararon los ariliminios II partiendo de anilinas *N*-sustituidas y formaldehído, y los hicieron reaccionar con los fenilpropenos *trans*-anetol y *trans*-eugenol en presencia de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, accediendo así a una serie de derivados de *trans*-3-metil-4-aryl-1,2,3,4-tetrahidroquinolina⁹⁴. La reacción multicomponente de 4-aminoacetofenona con diversos aldehídos aromáticos y ciclopentadieno permitió la síntesis de una quimioteca de compuestos agonistas del

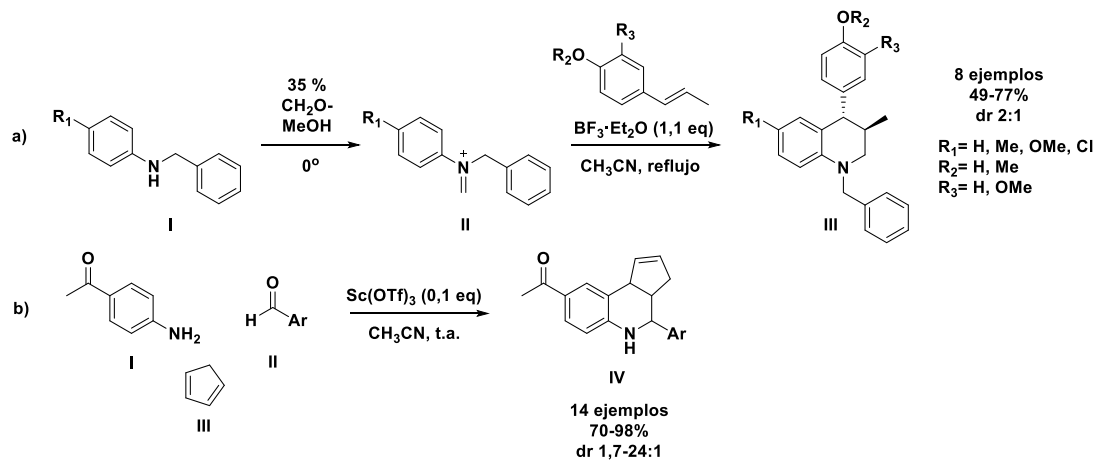
⁹¹ Astudillo, L. S., Gutiérrez, M.; Gaete, H., Kouznetsov, V. V., Meléndez, C. M., Palenzuela, J. A.; Vallejos, G. *Lett. Org. Chem.* **2009**, *6*, 208.

⁹² Vicente-García, E., Catti, F., Ramón, R., Lavilla, R. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 860.

⁹³ Maiti, S., Sridharan, V., Menéndez, J. C. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 713.

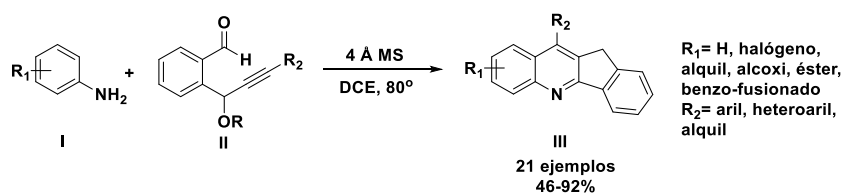
⁹⁴ Bohórquez, A. R. R., Kouznetsov, V. V. *Synlett.* **2010**, *6*, 970.

receptor de estrógenos acoplado a proteínas G GPR-30, en un proceso catalizado por triflato de escandio⁹⁵.



Esquema 1.8. Empleo de alquenos como dienófilos por Bohórquez *et al.* (a) y Burai *et al.* (b)

Los alquinos también han demostrado su capacidad para sufrir una cicloadición [4+2] con *N*-ariliminas para dar lugar a los productos de Povarov. Resulta interesante el trabajo de Chen *et al.* en el que los *o*-propargil-benzaldehídos **II** se hicieron reaccionar con diversas anilinas en presencia sólo de tamices moleculares de 4 Å para obtener una quimioteca de indeno[1,2-*b*]quinolinas. El procedimiento destaca no sólo por la ausencia de un catalizador y por el uso de un alquino, sino además porque la cicloadición consiste en un proceso intramolecular que sucede tras la formación de la imina de partida⁹⁶.



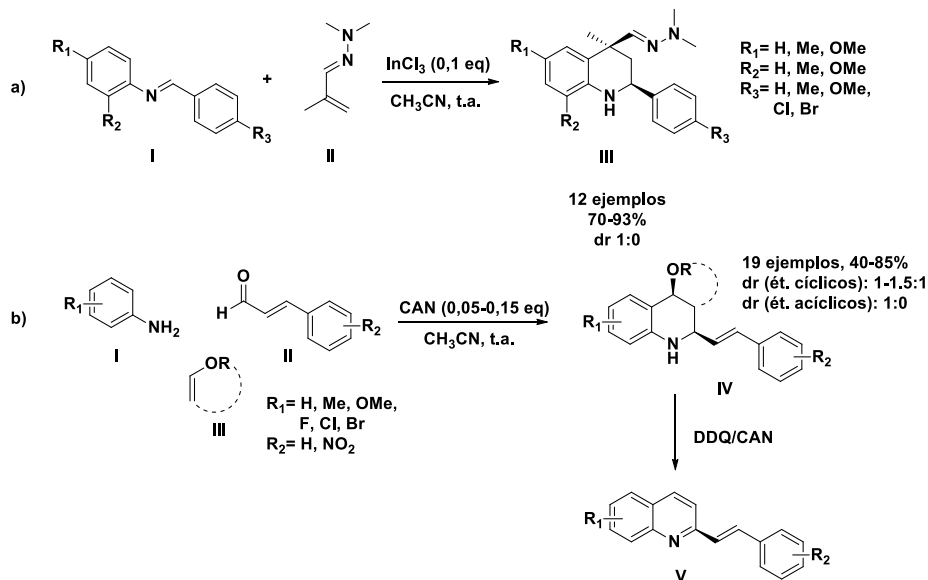
Esquema 1.9. Cicloadición intramolecular de tipo Povarov utilizando un alquino como función dienófila por Chen *et al.*

La reacción de Povarov viníloga involucra el uso de un dieno o un dienófilo con una función insaturada extendida. En el caso de que dicha función se encuentre en el dienófilo, se habla de una reacción de Povarov viníloga de tipo I. Nuestro grupo de investigación tiene una larga tradición de trabajo en este tipo de procesos utilizando *N,N*-dimetilhidrazonas α,β -insaturadas como función dienófila y tricloruro de indio

⁹⁵ Burai, R., Ramesh, C., Shorty, M., Curpan, R., Bologna, C., Sklar, L. A., Oprea, T., Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2252.

⁹⁶ Chen, M., Sun, N., Liu, Y. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5574.

como catalizador⁹⁷, proyecto del que también emana esta tesis. En cuanto a la reacción de Povarov viníloga de tipo II, en la que la función insaturada extendida se encuentra en el dieno, nuestro grupo sentó precedente con la reacción multicomponente, catalizada por nitrato cérico amónico, entre las anilinas **I**, los vinil éteres **II** y los derivados del cinamaldehído **III**. Las 2-estiriltetrahidroquinolinas resultantes **IV** se pueden convertir en las quinolinas correspondientes mediante su oxidación con DDQ o CAN⁹⁸.



Esquema 1.10. Reacciones de Povarov vinológicas desarrolladas por Sridharan et al.: de tipo I (a) y de tipo II (b)

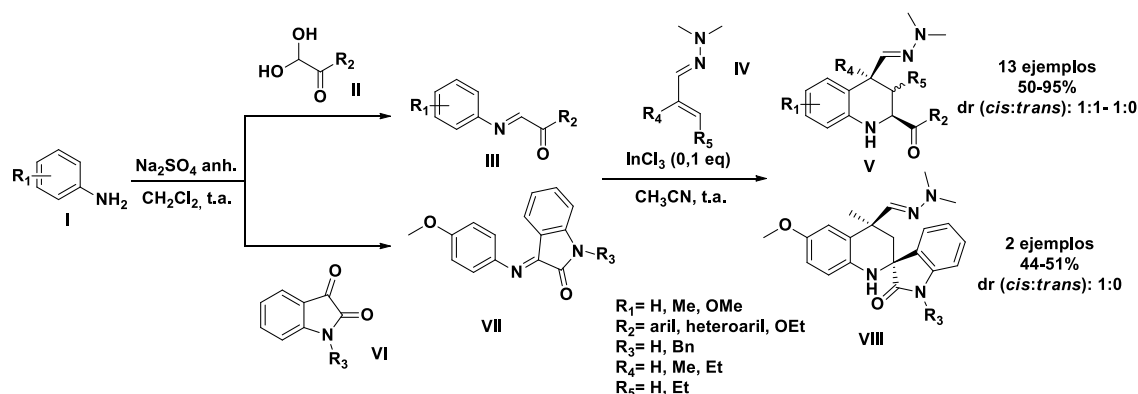
Como se puede observar, este último ejemplo comporta la variación del azadieno de partida. Otra variante admitida en el dieno consiste en el empleo de α -cetoaldehídos para la síntesis de la *N*-arilimina de partida, lo que permite el acceso a estructuras del tipo 2-aciltetrahidroquinolina. Bunescu *et al.* publicaron un ejemplo de este tipo de aproximación, llevando a cabo una reacción multicomponente catalizada por $\text{Yb}(\text{TfO})_3$ entre alquenos (cíclicos o acíclicos), anilinas y glioxales aromáticos o alifáticos, obteniendo una quimioteca de 2-aciltetrahidroquinolinas simples o fusionadas con una notable variedad estructural⁹⁹. También nuestro grupo de investigación amplió la reacción de Povarov viníloga de tipo I anteriormente señalada al uso de glioxales con el mismo fin, destacando además la posibilidad de usar derivados de la isatina en la síntesis

⁹⁷ Sridharan, V., Perumal, P. T., Avendaño, C., Menéndez, J. C. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1351.

⁹⁸ Sridharan, V., Avendaño, C., Menéndez, J. C. *Tetrahedron.* **2009**, *65*, 2087.

⁹⁹ Bunescu, A., Wang, Q., Zhu, J. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1756.

de las iminas de partida para la obtención de compuestos espiránicos en forma de un solo diastereoisómero¹⁰⁰.



Esquema 1.11. Síntesis de 2-aciltetrahidroquinolinas por Bianchini *et al.*

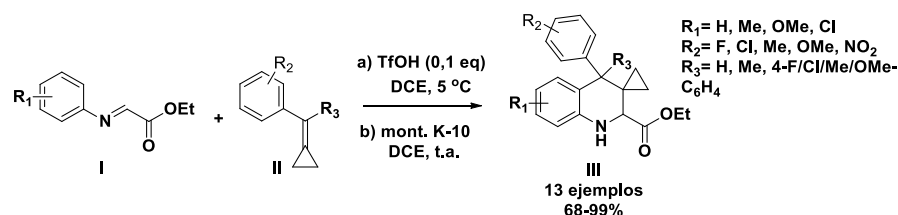
Como ya se ha señalado, los ácidos de Lewis son los catalizadores más populares para esta reacción, habiéndose utilizado una enorme variedad de ellos. Las características del mecanismo de la reacción, que se discutirán posteriormente, han animado a ensayar otros tipos de catálisis en el proceso, como la mediada por ácidos de Brønsted, resinas, líquidos iónicos, etcétera. Un ejemplo interesante fue desarrollado por Zhu *et al.*, que describieron la síntesis de los curiosos derivados de tetrahidroquinolina **III** con un anillo espiránico de ciclopropano en la posición 3 a partir de *N*-aciliminas y metilenciclopropanos, que puede ser catalizada tanto por ácido trifílico como por la montmorillonita K-10, una arcilla de carácter ácido¹⁰¹. Mert-Balci *et al.*, en cambio, publicaron un estudio sobre la capacidad de diversos líquidos iónicos como sales de guanidinio y de imidazolio para catalizar la reacción multicomponente entre anilina, benzaldehído y diversos dienófilos a diversas temperaturas y bajo irradiación por microondas¹⁰². Un último ejemplo, que refleja la pauta general que intenta imbricar cada vez más la química con la biología, viene de la mano de Li *et al.*, quienes en 2015 dieron a conocer una versión multicomponente de la reacción de Povarov partiendo de distintos aldehídos aromáticos, vinil éteres cíclicos y anilinas catalizada por una preparación de α -quimotripsina de páncreas bovino, con excelentes resultados en

¹⁰⁰ Bianchini, G., Ribelles, P., Becerra, D., Ramos, M. T., Menéndez, J. C. *Org. Chem. Front.* **2016**, *3*, 412.

¹⁰¹ Zhu, Z. B., Shao, L. X., Shi, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *15*, 2576.

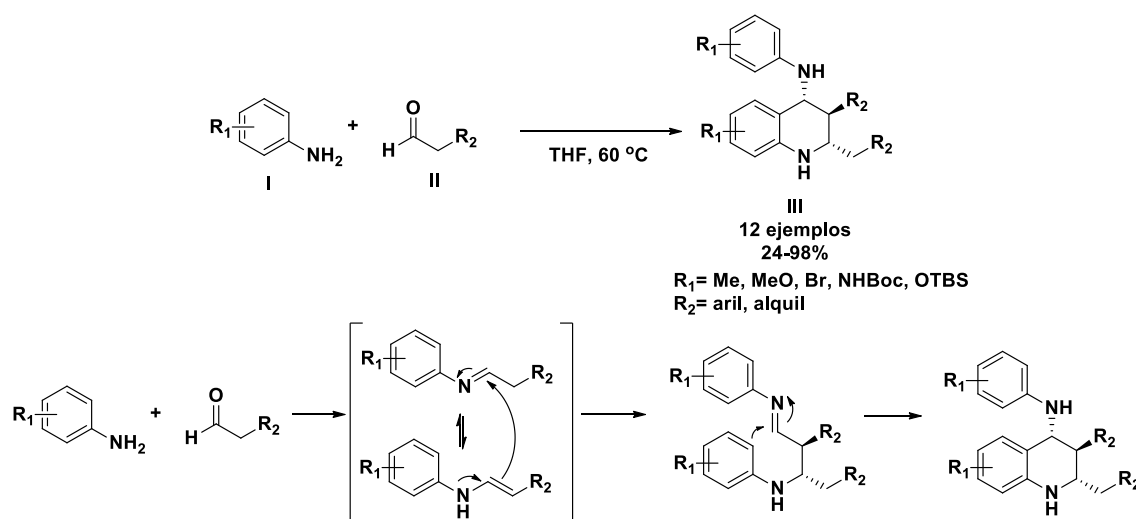
¹⁰² Mert-Balci, F., Imrich, H. G., Conrad, J., Beifuss, U. *Helv. Chim. Acta.* **2013**, *96*, 1681.

términos de rendimiento y diastereoselectividad de las tetrahydroquinolinas obtenidas¹⁰³.



Esquema 1.12. Síntesis de 3-epitetrahydroquinolinas catalizada por ácido triflico o montmorillonita K-10 por Zhu *et al.*

Una vez se han descrito numerosos ejemplos de reacciones de Povarov de dos y tres componentes, es necesario señalar que se pueden encontrar algunos ejemplos en la literatura de una versión tetracomponente. Por ejemplo, Rong *et al.* describieron una reacción del tipo AA'BB' a partir de anilinas y aldehídos alifáticos que conducía a la formación de los productos polisustituídos III, con la particularidad de que la transformación no requirió el uso de ningún catalizador. Para explicar el proceso se propuso que, a la condensación de la anilina con el aldehído, le sucedía la formación de un equilibrio tautomérico entre la imina y la enamina correspondiente, adquiriendo esta última el papel de dienófilo para dar lugar a la cicloadición. Este protocolo reviste especial interés gracias a su utilidad para la síntesis total de los alcaloides martinelina y ácido martinélico¹⁰⁴.

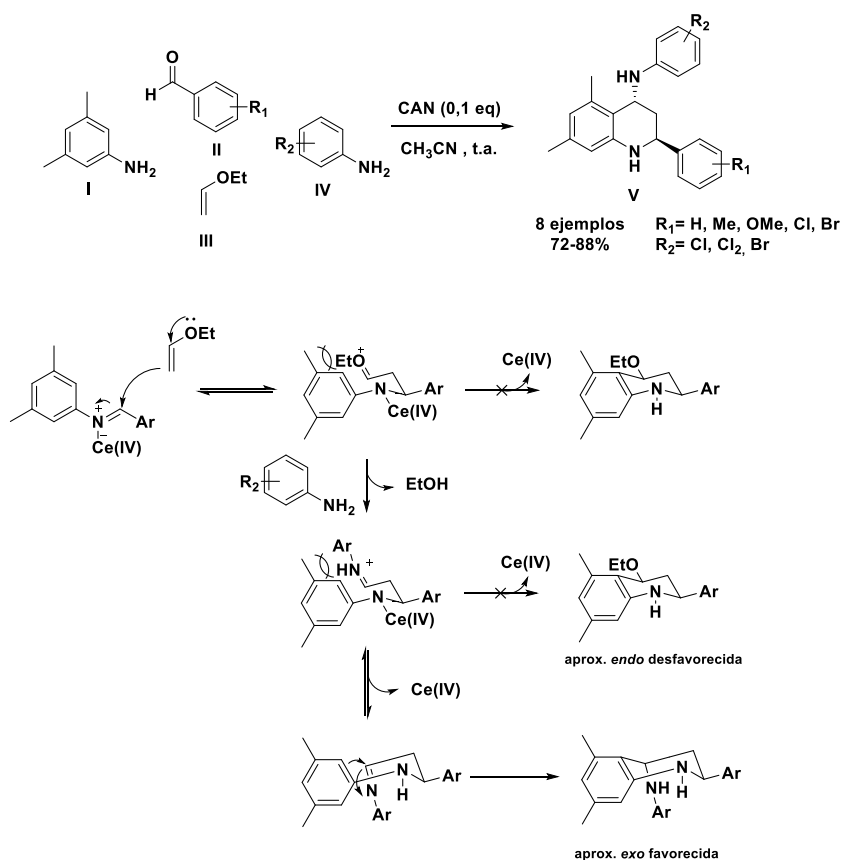


Esquema 1.13. Reacción de Povarov tetracomponente por Rong *et al.* Mecanismo propuesto para la reacción a través de una tautomería imina-enamina.

¹⁰³ Li, L. P., Cai, X., Xiang, Y., Zhang, Y., Song, J., Yang, D. C., Guan, Z., He, Y. H. *Green Chem.* **2015**, *17*, 3148.

¹⁰⁴ Rong, Z., Li, Q., Lin, W., Jia, Y. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 4432.

Nuestro grupo de investigación también ha trabajado en el desarrollo de reacciones multicomponente del tipo AA'BC catalizadas por nitrato cérico amónico, usando etil vinil éter como dienófilo. Las repulsiones estéricas presentes en el intermedio de la cicloadición entre el grupo alcoxilo del dienófilo y el sustituyente en el carbono 3 de la anilina explican que, en lugar de la reacción de Friedel-Crafts intramolecular que debería tener lugar, se produzca el ataque de una segunda molécula de anilina, rindiendo el producto AA'BC. El protocolo se llevó un paso más allá para conseguir productos del tipo ABCD, mediante el empleo de dos anilinas de partida diferentes¹⁰⁵.

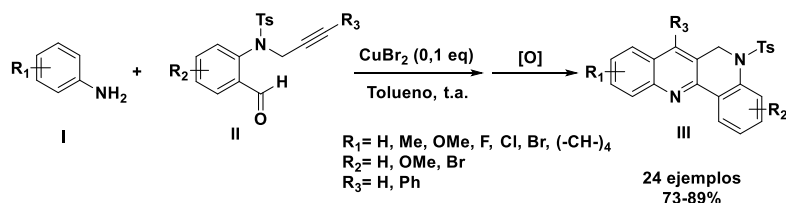


Esquema 1.14. Reacción de Povarov multicomponente del tipo ABCD por Ribelles *et al.* Justificación mecanística para la formación de las estructuras V en su forma trans.

Otra variante muy útil para el acceso a estructuras policíclicas más complejas consiste en el uso de aldehídos o anilinas de partida que presentan un grupo funcional susceptible de funcionar como dienófilo, de manera que la *N*-arilimina resultante puede sufrir un proceso de cicloadición intramolecular. Muthukrishnan *et al.*, por ejemplo, desarrollaron un proceso para la obtención de dihidrodibenzo[*b,h*][1,6]naftiridinas

¹⁰⁵ Ribelles, P., Sridharan, V., Villacampa, M., Ramos, M. T., Menéndez, J. C. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 569.

catalizado por CuBr_2 mediante el empleo de 2-(*N*-propargilamino)benzaldehídos en los que la función alquino, tras la formación del azadieno por la condensación entre el grupo aldehído y la anilina correspondiente, hace las veces de dienófilo para dar lugar a la cicloadición de Povarov. La reacción genera las dihidroquinolinas, que se oxidan al aire para dar lugar a las quinolinas **III**¹⁰⁶.



Esquema 1.15. Reacción de Povarov intramolecular conducente a la formación de 5,6-dihidrodibenzo[*b,h*][1,6]naftiridinas por Muthukrishnan *et al.*

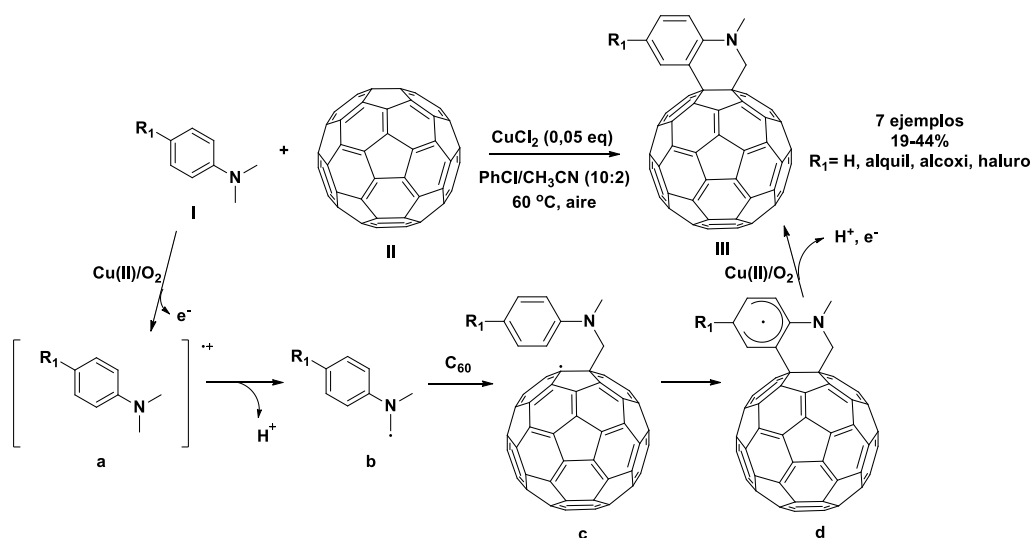
En los últimos años se han publicado varios ejemplos de lo que se conoce como reacción de Povarov oxidativa, en la que la cicloadición ocurre mediante procesos de transferencia de electrones catalizados por el aire o diversos oxidantes, fotocatalizadores, etcétera. Una aplicación muy curiosa de esta aproximación corrió a cargo de Gao *et al.*, quienes lograron la cicloadición [4+2] de diversas *N,N*-dimetilaminas con fulereno C-60 empleando CuCl_2 como catalizador y O_2 del aire como oxidante, obteniendo los productos de Povarov con rendimientos modestos, si bien la particularidad de los productos obtenidos compensa sin duda este inconveniente (esquema 1.16). Se propuso un mecanismo de reacción que comenzaría con la transferencia de un electrón de la *N,N*-dimetilaminas al complejo de cobre, seguido por la pérdida de un protón para originar la especie radicalaria **b**. Posteriormente, se produce la adición radicalaria electrofílica del fulereno y la subsiguiente ciclación que origina el radical ciclohexadienil **d**, el cual recupera la aromaticidad para generar el derivado de fulereno final mediante una segunda transferencia de un electrón y la eliminación de un protón mediadas por el Cu(II) y el O_2 ¹⁰⁷.

Si en vez de una anilina se emplea como producto de partida un derivado de piridina, la reacción de Povarov permite la obtención de derivados de naftiridina, que también cuentan con numerosas aplicaciones biológicas y de otra índole. Alonso *et al.*

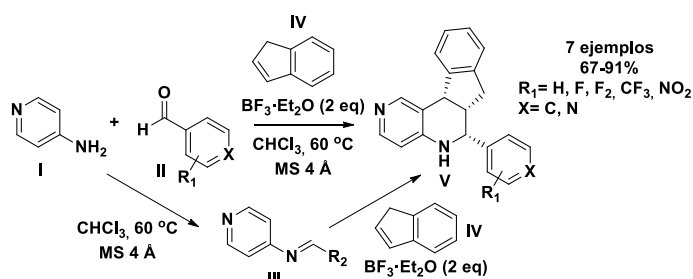
¹⁰⁶ Muthukrishnan, I., Vinoth, P., Vivekanand, T., Nagarajan, S., Maheswari, C. U., Menéndez, J. C., Sridharan, V. J. *Org. Chem.* **2016**, *81*, 1116.

¹⁰⁷ Gao, W., Jin, B., Peng, R., Yu, Y., Shan, D., Chu, S. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2016**, *55*, 10507.

describieron la síntesis por pasos y multicomponente de una serie de indeno[1,5]naftiridinas a partir de 4-aminopiridina, diferentes benzaldehídos e indeno como dienófilo, catalizada por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (esquema 1.17)¹⁰⁸.



Esquema 1.16. Versión oxidativa de la reacción de Povarov desarrollada por Gao et al. Mecanismo de adición del fulereno C_{60} sobre la dimetilaminilina.

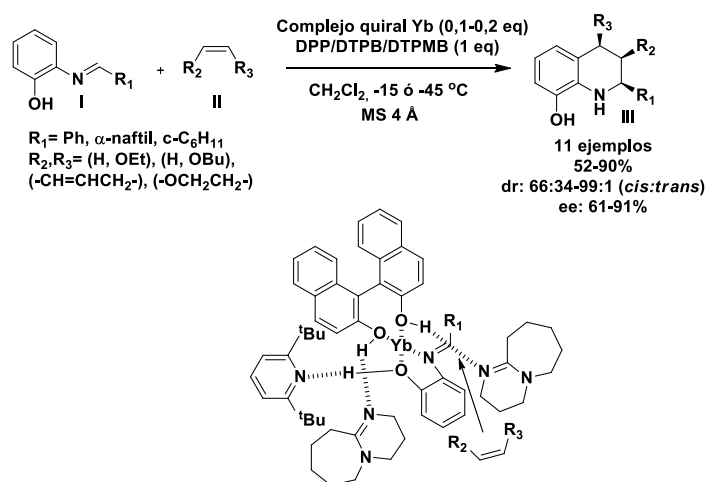


Esquema 1.17. Síntesis por pasos o multicomponente de tetrahidroindeno[1,5]naftiridinas por Alonso et al.

Se ha dejado deliberadamente aparte la versión asimétrica de la reacción de Povarov, cuyo desarrollo centró el interés de numerosos grupos de investigación desde el momento en que se demostró el potencial de esta reacción para la obtención de compuestos interesantes cuyo acceso sintético resultaba muy complicado con las metodologías anteriormente disponibles. Hay que remontarse a 1996 para encontrar el primer trabajo de este tipo, realizado por el grupo de Kobayashi e Ishitani, procediendo por tanto de los mismos investigadores que revolucionaron el panorama de la reacción de Povarov convencional. Aprovechándose de su experiencia en el uso de triflatos de

¹⁰⁸ Alonso, C., Fuertes, M., González, M., Rubiales, G., Tesauro, C., Knudsen, B. R., Palacios, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *115*, 179.

lantánidos para catalizar la reacción, idearon un complejo de triflato de iterbio con DBU y (*R*)-BINOL que fue capaz no sólo de catalizar la reacción, sino de hacerlo de manera que sólo se formase un enantiómero. Como materiales de partida, este método empleó *N*-arilmetiliden-2-hidroxianilinas y diversos vinil éteres o ciclopentadieno. Como se puede ver en el esquema 1.18, la enantioselectividad se basa en la formación de un complejo bidentado entre el catalizador quiral y la imina de partida, siendo esencial la presencia de un grupo hidroxilo en la anilina debido a su capacidad para formar un enlace de hidrógeno con el derivado de piridina utilizado como aditivo en el proceso¹⁰⁹.

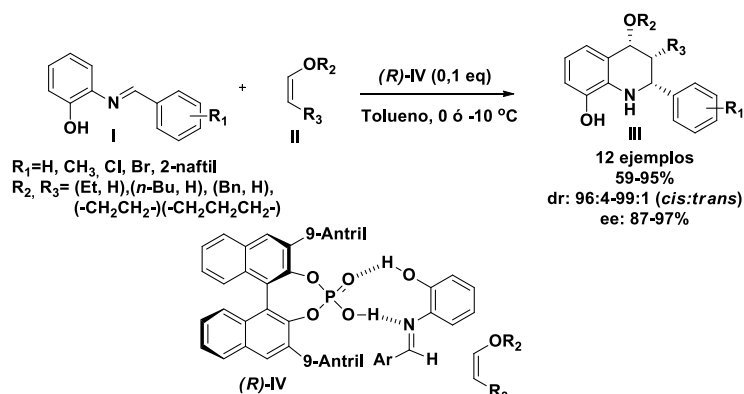


Esquema 1.18. Primer ejemplo de reacción de Povarov enantioselectiva, por Ishitani y Kobayashi. Estado de transición propuesto para la inducción de la enantioselectividad.

Los primeros ejemplos de reacción de Povarov enantioselectiva fueron catalizados por diversos complejos quirales de ácidos de Lewis, pero las limitaciones estructurales en los compuestos de partida que imponía a menudo este tipo de aproximación animaron a explorar otras alternativas. De este modo surgió la catálisis mediante ácidos fosfóricos quirales que protonan directamente la imina para facilitar la primera adición “tipo Mannich” del proceso, que acabó por convertirse en el método más popular. Esta estrategia requiere, generalmente, la presencia de un grupo ácido en uno de los sustratos de la reacción para poder establecer la coordinación adecuada con la unidad quiral. El primer precedente lo sentaron Akiyama *et al.* en 2006 catalizando con un ácido fosfórico derivado del (*R*)-BINOL la reacción entre diferentes aldaminas derivadas de la 2-hidroxianilina y vinil éteres cíclicos o acíclicos. La configuración absoluta de los productos se explica por la coordinación del catalizador con el azadieno de partida, en

¹⁰⁹ Ishitani, H., Kobayashi, S. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7357.

la que el grupo fenólico sigue desempeñando un papel fundamental y que determina que el ataque se realice por la cara Re^{110} .



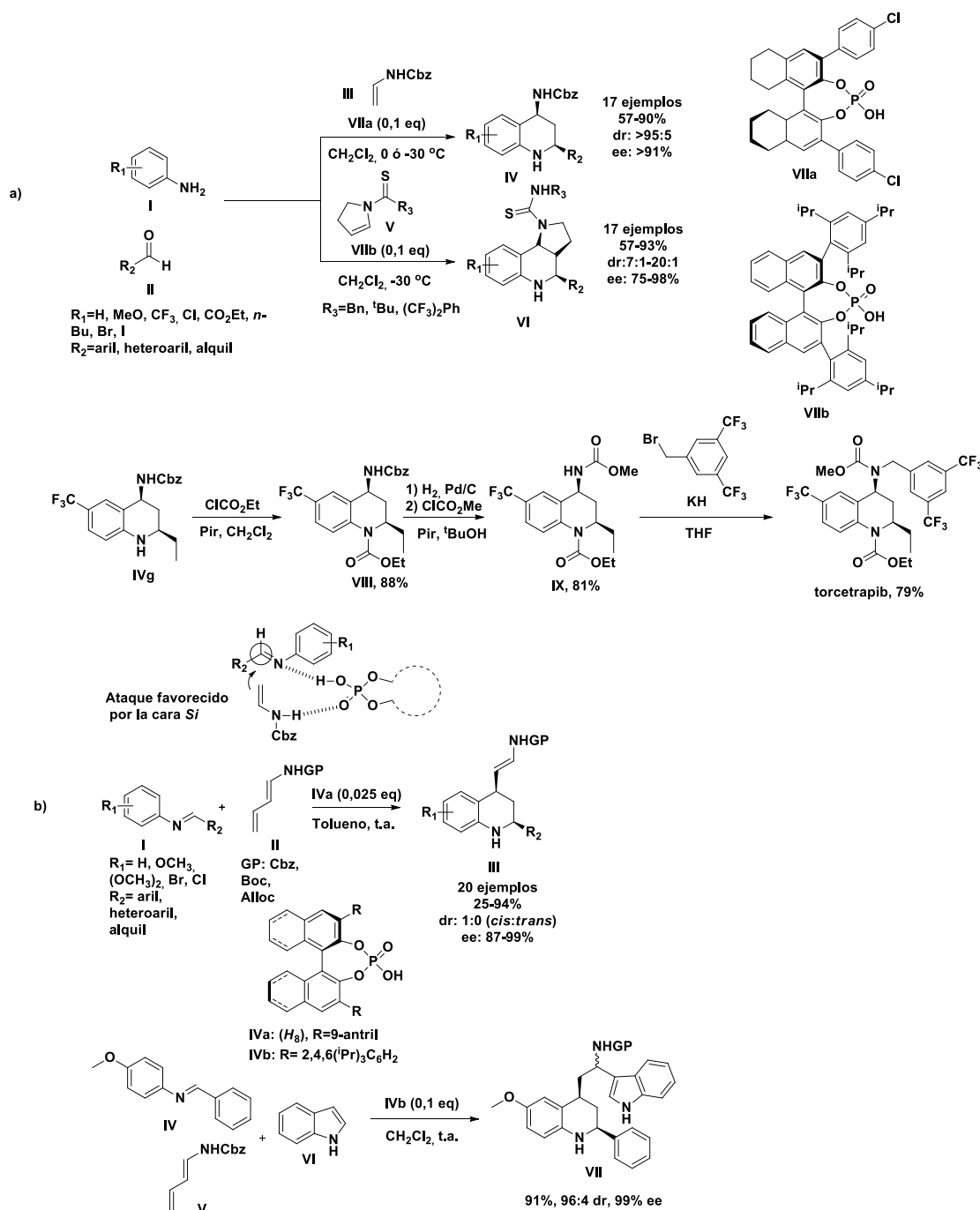
Esquema 1.19. Reacción de Povarov asimétrica catalizada por un ácido fosfórico derivado del (*R*)-BINOL, por Akiyama *et al.* Estructura del complejo entre el catalizador y el dieno de partida.

Al igual que en la versión convencional, la variedad de sustratos empleados en la reacción de Povarov enantioselectiva catalizada por ácidos fosfóricos quirales ha experimentado una notable expansión. Los *N*-vinilcarbamatos son uno de los dienófilos más populares, existiendo numerosos ejemplos de su aplicación a este tipo de síntesis. Destaca el trabajo de Liu *et al.* publicado en el año 2009, ya que además de ser pionero en el empleo de estos carbamatos, también es la primera reacción ulticomponente publicada en este campo, y también el primer ejemplo en el que se utilizaron aldehídos alifáticos. El procedimiento involucra el uso de aldehídos alifáticos o aromáticos, anilinas de distintas densidades electrónicas, el *N*-vinilcarbamato de bencilo como dienófilo de referencia, y un ácido fosfórico derivado del (*R*)-BINOL como catalizador. Animados por la robustez demostrada por el método, lo aplicaron con éxito a la síntesis del hipolipemiante torcetrapib. En este caso, el grupo NH del carbamato es el encargado de establecer, junto con el nitrógeno imínico, las interacciones necesarias para garantizar la enantioselectividad de la cicloadición, y esta diferencia explica el hecho de que el ataque del dienófilo se produzca por la cara *Si*, al contrario que en el procedimiento descrito por Akiyama¹¹¹. Caruana *et al.* describieron la primera reacción de Povarov asimétrica viníloga, haciendo reaccionar distintas *N*-ariliminas con 1-*N*-acilamino-1,3-butadienos en presencia, una vez más, de un ácido fosfórico derivado del (*R*)-BINOL¹¹².

¹¹⁰ Akiyama, T., Morita, H., Fuchibe, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13070.

¹¹¹ Liu, H., Dagousset, G., Masson, G., Retailleau, P., Zhu, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4598.

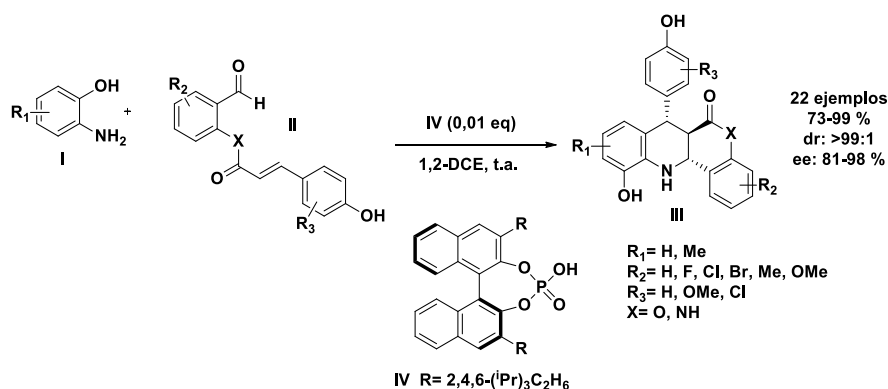
¹¹² Caruana, L., Fochi, M., Ranieri, S., Mazzanti, A., Bernardi, L. *ChemComm.* **2013**, *49*, 880.



Esquema 1.20. a) Empleo de *N*-vinilcarbamatos como dienófilos en la reacción de Povarov asimétrica por Liu *et al.* Mecanismo de inducción de la enantioselectividad y aplicación del método a la síntesis del hipolipemiante torcetrapib. b) Primera reacción de Povarov viníloga por Caruana *et al.*

Los vinilarenos son otro tipo de dienófilos aplicados a esta metodología, siendo notable la diversidad estructural de los mismos: derivados del estireno, vinilindoles, etcétera. Un ejemplo destacable fue desarrollado por Jarrige *et al.*, consistente en una cicloadición enantioselectiva intramolecular que parte del uso de 2-hidroxianilinas y los derivados del aldehído salicílico II, en los que el alqueno funciona como función dienófila después

de la formación de la imina. El procedimiento, catalizado por un ácido fosfórico derivado del (*R*)-BINOL, permite la obtención de derivados de *trans,trans*-tetrahidrocromeno[4,3-*b*]quinolin-6-ona y tetrahidrodibenzo[1,6]naftiridin-6-ona con buenos rendimientos y enantioselectividades¹¹³.



Esquema 1.21. Reacción de Povarov asimétrica desarrollada por Jarrige et al.

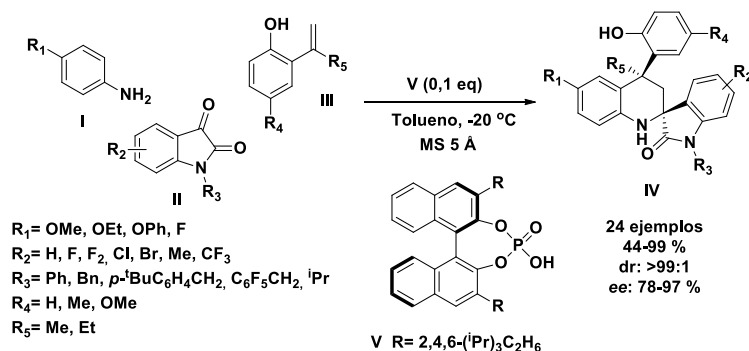
No sólo el dienófilo es susceptible de variaciones estructurales, sino que también se ha investigado el uso de cetonas para la obtención de las *N*-ariliminas de partida, en lugar de aldehídos. Shi *et al.* publicaron en el año 2013 una síntesis enantioselectiva de espiro[indolin-3,2'-quinolinas] mediante la reacción multicomponente entre anilinas de alta densidad electrónica, derivados de isatina y α -alquil-*o*-hidroxiestirenos, utilizando también un ácido fosfórico derivado de BINOL como catalizador¹¹⁴. El mismo grupo fue capaz de adaptar más tarde el método al empleo de 3-vinilindol como especie dienófila¹¹⁵. Por su parte, Luo y Huang utilizaron cetonas enolizables, concretamente ésteres de piruvato, en un protocolo tetracomponente del tipo AA'BB' en el que la formación de la imina da lugar a un equilibrio tautomérico con la enamina correspondiente, teniendo lugar la cicloadición entre ambas especies. Un ácido fosfórico derivado del H₈-BINOL, con sustituyentes muy voluminosos, se encarga de catalizar la reacción y dirigir su enantioselectividad. Se observó la posibilidad de obtener productos del tipo AA'BC si se empleaban dos anilinas o dos aldehídos distintos¹¹⁶.

¹¹³ Jarrige, L., Blanchard, F., Masson, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10573.

¹¹⁴ Shi, F., Xing, G. J., Zhu, R. Y., Tan, W., Tu, S. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 128.

¹¹⁵ Zhang, H. H., Sun, X. X., Liang, J., Wang, Y. M., Zhao, C. C., Shi, F. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 9539.

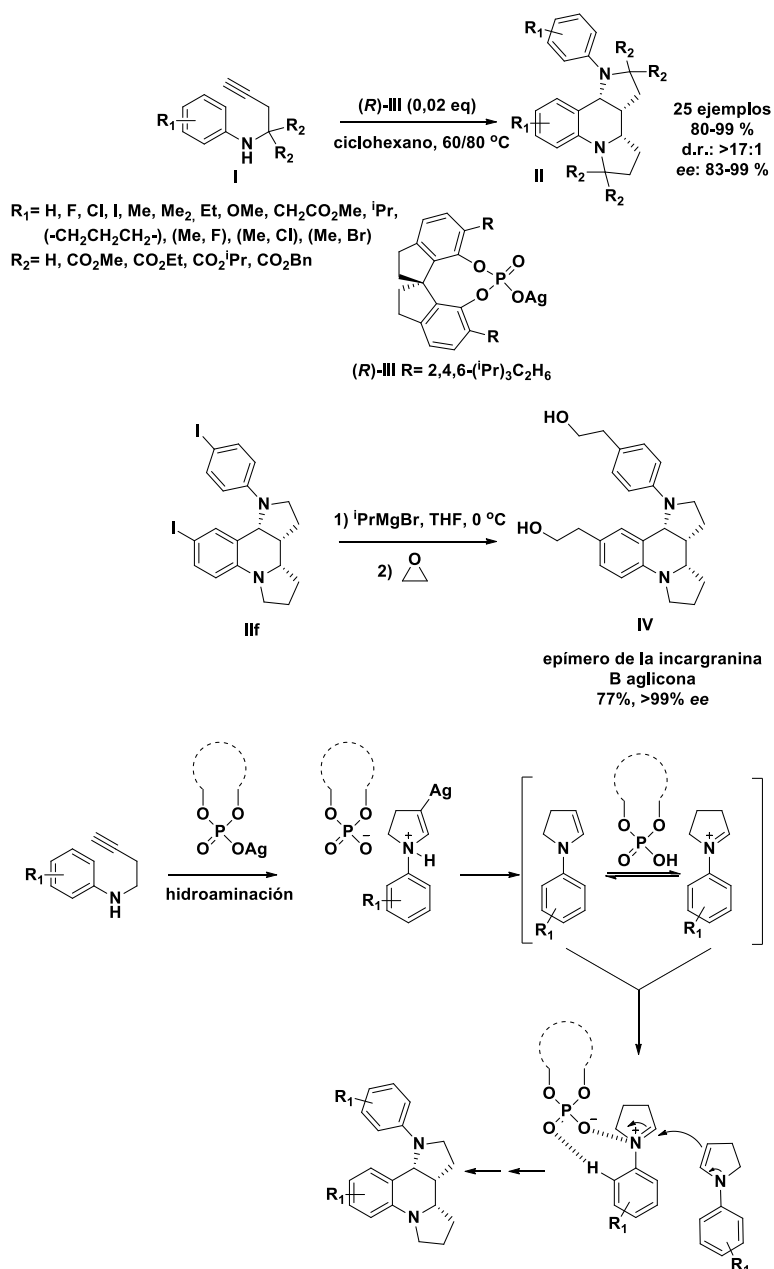
¹¹⁶ Luo, C., Huang, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8193.



Esquema 1.22. Síntesis enantioselectiva de espiro[indolin-3,2'-quinolinas] por Shi *et al.*

También es posible la generación *in situ* simultánea del dieno y el dienófilo desde sustratos no convencionales. Es el caso del trabajo de Yu *et al.*, en el que se describe una reacción de hidroaminación/Povarov asimétrica en cascada catalizada por una sal de plata de un ácido fosfórico derivado del SPINOL que rinde los derivados de octahidrodipirrolquinolina II. El mecanismo de la reacción resulta muy elegante: se parte de las 3-butinilanilinas I, que sufren un proceso de hidroaminación intramolecular catalizado por plata para generar los derivados de 2,3-dihidropirrol. En presencia del ácido fosfórico, se produce la tautomería entre esta forma de enamina y la imina correspondiente, produciéndose la cicloadición enantioselectiva entre ambas especies. El método fue aprovechado para la obtención en un solo paso de un epímero de la aglicona de la incargranina B, un alcaloide relacionado con efectos citotóxicos. También se estudió pormenorizadamente el mecanismo de la reacción, comprobándose que la plata sólo interviene en el paso inicial de hidroaminación, y que la cicloadición se produce mediante una aproximación *endo* gracias a la interacción doble del sustrato con el catalizador quiral a través del nitrógeno imínico y de uno de los hidrógenos aromáticos de la anilina¹¹⁷.

¹¹⁷ Yu, X. L., Kuang, L., Chen, S., Zhu, X. L., Li, Z. L., Tan, B., Liu, X. Y. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 6182.



Esquema 1.23. Protocolo de hidrogenación/Povarov asimétrica desarrollado por Yu et al. Mecanismo de la reacción y aplicación a la síntesis del epímero de la incaranina B aglicona.

En 2010, el grupo de Jacobsen aplicó un nuevo sistema catalítico, muy novedoso, consistente en la combinación de un ácido de Brønsted aquiral, cuya capacidad para protonar la imina de partida permite que se dé inicio a la cicloadición, y una molécula pequeña con capacidad donadora en la formación de enlaces de hidrógeno como auxiliar quiral. Tras una optimización exhaustiva, escogieron la combinación de ácido *o*-nitrobenzenosulfónico y la (*R,R,R*)-sulfamido urea **VIII** en proporción 1:2 (para evitar la formación de producto catalizada sólo por el ácido de Brønsted) para dirigir la reacción entre diferentes *N*-ariliminas y dienófilos, observándose que la estereoquímica de los

productos dependía de los reactivos de partida aunque mayoritariamente se generaban los aductos *trans*. Asimismo, se reforzó la utilidad del método al constatarse que permite la obtención de análogos del alcaloide martinelina. Para apoyar esta nueva aproximación, se realizó un pormenorizado estudio mecanístico para explicar el funcionamiento de este sistema catalítico. En primer lugar, el ácido de Brønsted protona el nitrógeno imínico, formándose un complejo entre ambas especies que muestra una baja solubilidad en el medio de reacción. Este problema se soluciona cuando la urea quiral se coordina, mediante enlaces de hidrógeno, con el complejo imina-ácido. La observación de que la reacción de cicloadición se producía mucho más rápidamente desde el complejo binario que desde el complejo ternario (con la urea) planteaba la siguiente cuestión: ¿cómo era posible que la reacción transcurriese de forma enantioselectiva? La respuesta residía en la constante de asociación de la urea con el complejo imina-ácido ($9000 \pm 2000 \text{ M}^{-1}$), lo suficientemente alta para garantizar la rápida formación del complejo ternario y suprimir la vía de reacción alternativa. El estudio experimental y computacional propone asimismo un mecanismo de cicloadición concertado pero altamente asincrónico, estableciéndose las interacciones entre los sustratos y los catalizadores que se reflejan en el esquema 1.24: el nitrógeno imínico protonado interacciona con el grupo aniónico sulfamida del auxiliar quiral, mientras que el protón CH=N forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno aniónico del ácido de Brønsted desprotonado. Dos enlaces de hidrógeno entre los otros oxígenos del ácido y los hidrógenos de la urea aseguran una mayor estabilidad del complejo. También parece influir en la enantioselectividad una interacción del tipo π - π entre los anillos aromáticos del ácido y la anilina. Este modelo propone los productos (*R*)/*exo* como los más probables, hecho que se ve apoyado por las observaciones experimentales, aunque con ciertas excepciones. El hecho de que no sea necesario que los productos de partida presenten un protón ácido que se pueda coordinar con el sistema catalítico quiral supone una ventaja adicional¹¹⁸. Nuestro grupo de investigación ha adaptado, en un trabajo en vías de publicación, este protocolo a la síntesis de 2-aciltetrahydroquinolinas mediante una reacción de Povarov viníloga de tipo I que ya previamente se había optimizado en su versión racémica, partiendo de α -cetoiminas preformadas y *N,N*-

¹¹⁸ Xu, H., Zuend, S. J., Woll, M. G., Tao, Y., Jacobsen, E. N. *Science*. **2010**, 327, 986.

dimetilhidrazonas (esquema 1.25). En este caso, se empleó como auxiliar quiral la urea **III** y el ácido de Brønsted que dio mejores resultados fue el ácido (+)-canforsulfónico. Este nuevo procedimiento supone varios avances: amplía la aplicación de la estrategia de Jacobsen a dienófilos acíclicos que además presentan un nitrógeno básico susceptible de competir con el del dieno a la hora de su protonación, y genera 2-aciltetrahydroquinolinas con un carbono cuaternario en la posición 4 y un patrón de sustitución en las posiciones 2 y 4 que permite llevar a cabo otras transformaciones posteriores. Los mecanismos de reacción y de inducción de la quiralidad son similares a los propuestos por Jacobsen, siendo una asignatura pendiente la confirmación de la configuración absoluta de los productos¹¹⁹.

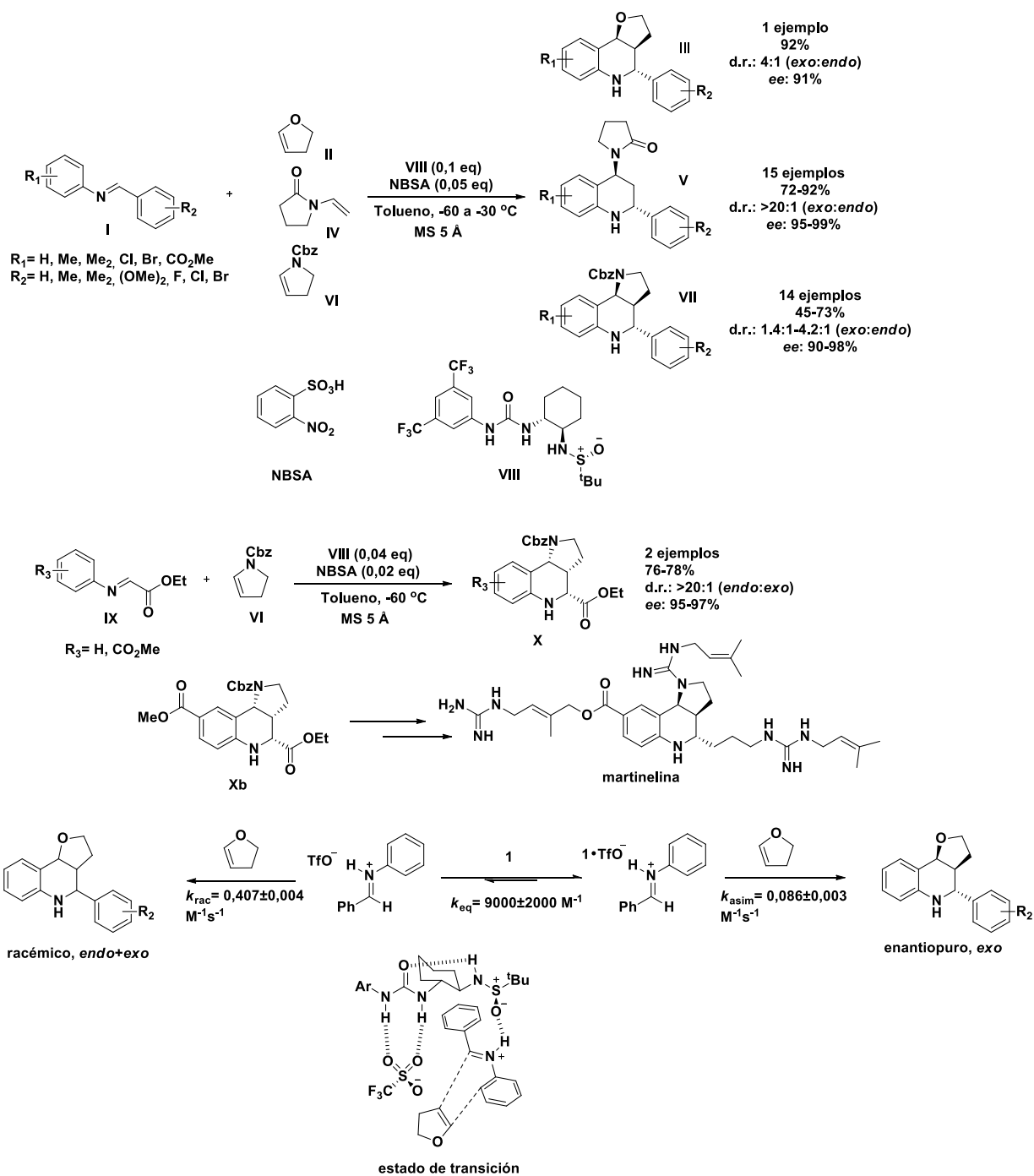
Hay otros ejemplos de la reacción de Povarov enantioselectiva que emplean mecanismos catalíticos alternativos, como moléculas que incorporan en la misma entidad química una función ácida y otra de urea o tiourea donadora de enlaces de hidrógeno¹²⁰, aminas quirales¹²¹ o incluso procesos en los que la propia disposición espacial de los reactivos propicia la inducción de la quiralidad sin la necesidad de un auxiliar. Esta última vía fue abierta por el trabajo de Dickmeiss *et al.*, que comprendía la síntesis de octahidroacridonas mediante una reacción de Mannich/Povarov intramolecular en cascada. Este proceso se inicia con la adición de Mannich estereoselectiva de los derivados del estirilmalononitrilo **II** a los aldehídos α,β -insaturados **I**, asistida por la pirrolidina quiral **VI** (esquema 1.26). Tras la adición de la anilina correspondiente y ácido trifluoroacético, se genera *in situ* el azadieno que sufre la posterior cicloadición del grupo estirilo. La disposición de los sustratos, en la que los anillos aromáticos del estirilo y la anilina establecen una interacción del tipo π - π , dirige una aproximación *endo* y la formación del producto en forma de un único enantiómero¹²².

¹¹⁹ Tesis doctoral de Giulia Bianchini, Universidad Complutense (2016). Trabajo pendiente de publicación.

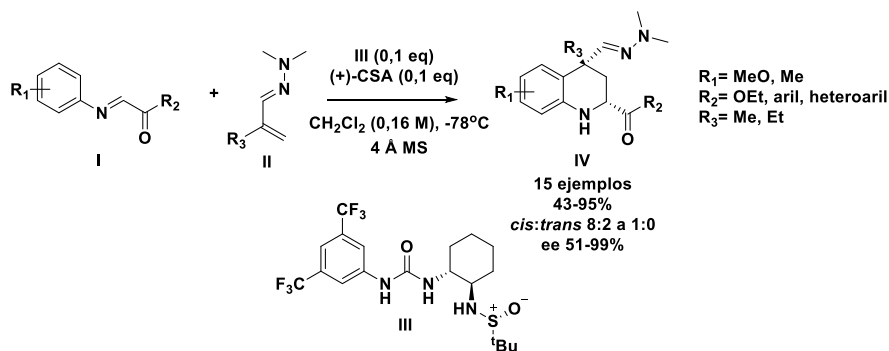
¹²⁰ Min, C., Mittal, N., Sun, D. X., Seidel, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14084.

¹²¹ Huang, J. X., Hou, K. Q., Hu, Q. L., Chen, X. P., Li, J., Chan, A. S., Xiong, X. F. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 1858.

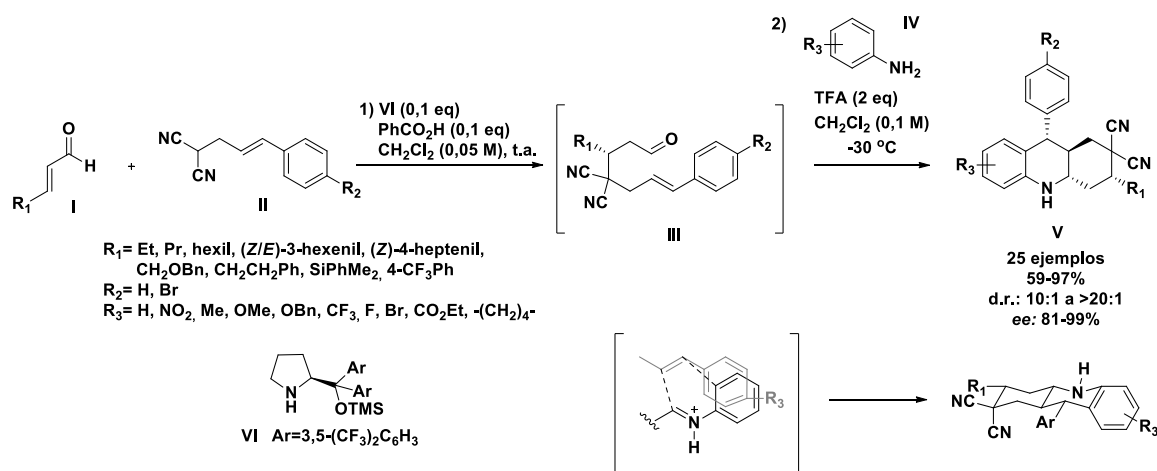
¹²² Dickmeiss, G., Jensen, K. L., Worgull, D., Franke, P. T., Jørgensen, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1580.



Esquema 1.24. Reacción de Povarov enantioselectiva desarrollada por Xu et al. Estudio computacional y aplicación a la síntesis del alcaloide martinelina.



Esquema 1.25. Adaptación de la metodología de Jacobsen para la síntesis asimétrica de 2-aciltetrahydroquinolinas (tesis doctoral de Giulia Bianchini).



Esquema 1.26. Reacción secuencial de Mannich/Povarov intramolecular asimétrica desarrollada por Dickmeiss et al.

1.2.4 Mecanismo y estereoquímica de la reacción de Povarov

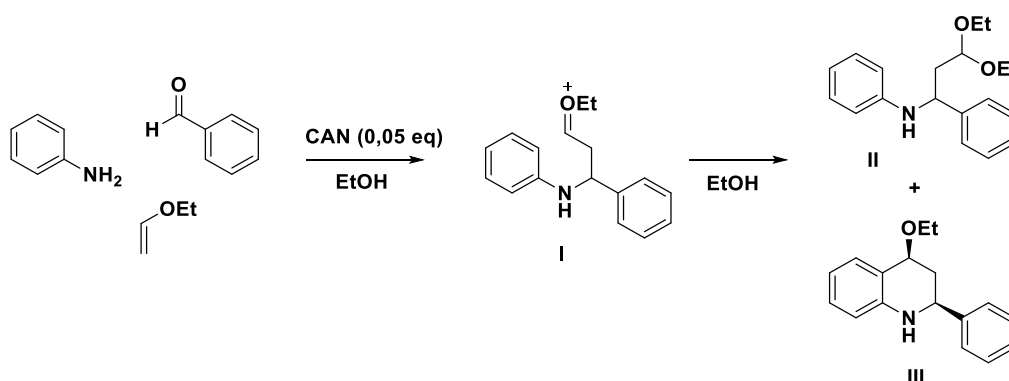
Mecanismo de la reacción: consensos y controversias

El mecanismo de la reacción de Povarov involucra tres procesos consecutivos: primero, una adición de tipo Mannich del dienófilo sobre el azadieno activado por la especie catalítica; luego tiene lugar una reacción de Friedel-Crafts intramolecular que supone el cierre del anillo de tetrahydroquinolina; finalmente, se produce una rearomatización que da lugar al producto final de la reacción. El consenso en este asunto termina aquí, porque la manera en la que este proceso se desarrolla en el tiempo está sujeta a un acalorado debate. Por un lado, algunos defienden que la cicloadición ocurre de manera concertada, aunque con un grado variable de asincronicidad entre la adición del dienófilo y el paso de cierre del anillo. La otra hipótesis apuesta por un mecanismo por pasos, pasando por un intermedio zwitteriónico que se puede detectar e incluso atrapar. ¿Cuál es la respuesta correcta? Como se podrá observar a continuación, quizá ésta

dependa de la idiosincrasia de cada proceso y sea un esfuerzo fútil tratar de encontrar una explicación que cubra todos los supuestos.

Este complicado asunto ya fue abordado por el propio Povarov, en una de las publicaciones en las que desarrolló el trabajo original de 1963. En primer lugar, describió el papel crucial del ácido de Lewis para aumentar la electrofilia del azadieno permitiendo la consecución de la reacción de aza Diels-Alder con demanda electrónica inversa, señalando además que el pobre carácter básico de la tetrahydroquinolina formada permite el reciclaje continuo del catalizador mediante su cesión a una nueva unidad de *N*-arilimina de partida. Respecto al desarrollo temporal del proceso, se decantó por un mecanismo concertado en el que se produce el movimiento simultáneo de tres pares de electrones, que resulta en el cierre del anillo de tetrahydroquinolina¹²³.

No obstante, numerosos estudios sobre la reacción de Povarov han aportado evidencias teóricas, computacionales o experimentales para defender el mecanismo por pasos¹²⁴. Nuestro grupo de investigación también demostró el mecanismo por pasos de la reacción de Povarov multicomponente entre anilinas, aldehídos aromáticos y vinil éteres acíclicos catalizada por nitrato cérico amónico, mediante la captura del intermedio catiónico I a través del uso del etanol como especie nucleófila, consiguiéndose aislar el acetal II como prueba de la existencia del intermedio de reacción⁸⁹.

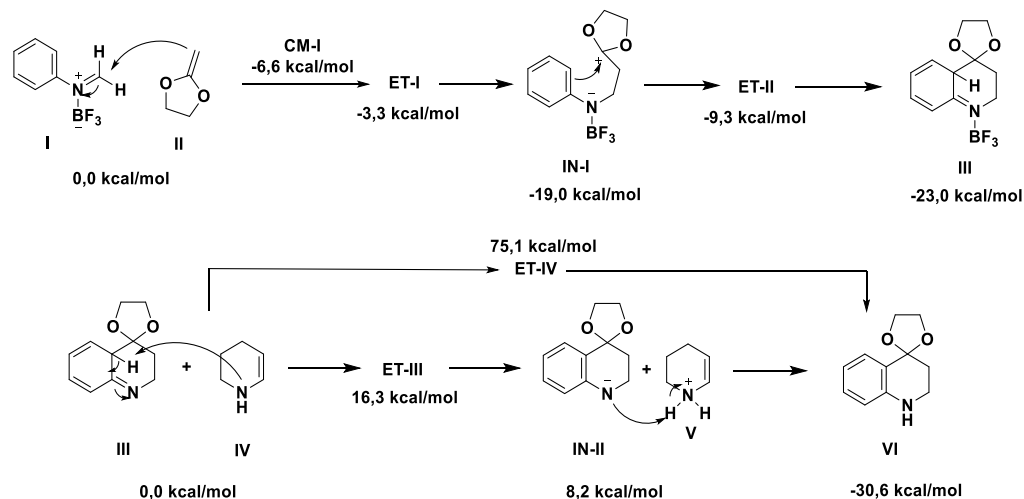


Esquema 1.27. Captura del intermedio de reacción catiónico en el proceso multicomponente desarrollado por Sridharan et al.

¹²³ Grigos, V. I., Povarov, L. S., Mikhailov, B. M. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.* **1965**, *14*, 2129.

¹²⁴ Por ejemplo, a) Hermitage, S., Jay, D. A., Whiting, A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9633. b) Alves, M. J., Azoia, N. G., Fortes, A. G. *Tetrahedron.* **2007**, *63*, 727. c) Pérez-Ruiz, R., Domingo, L. R., Jiménez, M. C., Miranda, M. A. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5116.

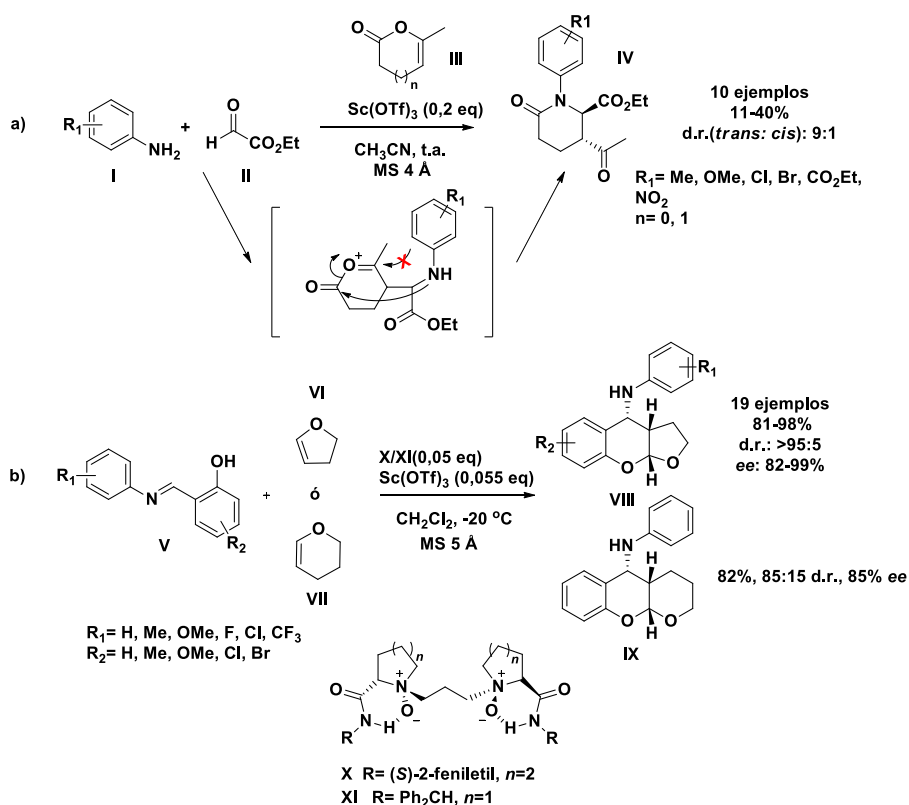
Domingo *et al.* han llevado a cabo varios estudios en los últimos años, sobre todo basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT, del inglés *Density-Functional Theory*), sobre el mecanismo de la reacción catalizada por ácidos de Lewis y de Brønsted. En estos trabajos se propone que la reacción de Povarov se puede considerar una transformación de tipo dominó que comprende dos procesos fundamentales: una cicloadición [4+2] entre un azadieno y un dienófilo mediada por catálisis ácida, y una tautomería 1,3 de un átomo de hidrógeno que permite la rearomatización del producto de reacción. A su vez, la cicloadición tiene lugar en dos pasos: una adición de Mannich del dienófilo sobre la imina activada por el ácido de Lewis o Brønsted, que sería el proceso limitante, y una reacción intramolecular de Friedel-Crafts para cerrar el anillo de tetrahydroquinolina, existiendo entre ambos pasos una especie zwitteriónica lo suficientemente estable como para considerarla un intermedio de reacción. Por otro lado, también se defiende que en la tautomería 1,3 del átomo de hidrógeno puede intervenir una especie básica presente en el medio de reacción, como la propia tetrahydroquinolina en formación, gracias al carácter ácido de dicho protón. Un mecanismo de migración directa intramolecular se descarta al estar enormemente desfavorecida desde el punto de vista termodinámico, debido a la necesidad de que se forme un estado de transición tetracíclico muy tensionado¹²⁵.



Esquema 1.28. Estudio DFT del mecanismo de la reacción de Povarov por Domingo *et al.*

¹²⁵ a) Domingo, L. R., Aurell, M. J., Sáez, J. A., Mekelleche, S. M. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 25268. b) Ríos-Gutiérrez, M., Layeb, H., Domingo, L. R. *Tetrahedron.* **2015**, *71*, 9339. c) Mahi, M. A., Mekelleche, S. M., Benchouk, W., Aurell, M. J., Domingo, L. R. *RSC Adv.* **2016**, 15759.

Como se ha visto, la presencia de un intermedio catiónico estable en la cicloadición permite su captura mediante el empleo de un nucleófilo más reactivo que el anillo aromático de la anilina, de modo que su adición se produzca más rápidamente que la reacción de Friedel-Crafts intramolecular. Este hecho ha sido aprovechado en algunos casos para, mediante la presencia de un grupo nucleófilo adecuado en el azideno de partida, llevar a cabo un atrapamiento intramolecular del intermedio que da lugar a la obtención de otras estructuras diferentes a los aductos de Povarov habituales. Un ejemplo es el trabajo de Isambert *et al.*, en el que se observó que la reacción multicomponente de las anilinas **I**, los enol ésteres cíclicos **III** y glioxilato de etilo catalizada por $\text{Sc}(\text{TfO})_3$ no rendía las tetrahydroquinolinas esperadas sino las *N*-aril lactamas **IV** (esquema 1.29). Este resultado se explicó porque, tras la formación del intermedio de Mannich, la lactamización intramolecular a cargo del grupo amino de la anilina sucede más rápido que el proceso de cierre de anillo esperado¹²⁶.



Esquema 1.29. Aprovechamiento sintético de la interrupción de la reacción de Povarov por Isambert *et al.* (a) y Zhang *et al.* (b)

¹²⁶ Isambert, N., Cruz, M., Arévalo, M. J., Gomez, E., Lavilla, R. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4199.

En la versión enantioselectiva de la reacción, no ha sido infrecuente el empleo de azadienos de partida que presentan un grupo nucleófilo con el mismo propósito, siendo los más comunes los derivados del aldehído salicílico. Zhang *et al.* consiguieron optimizar mediante esta estrategia una síntesis enantioselectiva de *cis*-4-anilinobenzopiranos a partir de diferentes salicilaldiminas y 2,3-dihidrofurano o 3,4-dihidropirano, empleando como catalizadores quirales unos *N,N'*-dióxidos derivados de L-prolina y L-ácido pipercolico¹²⁷ (esquema 1.29).

Aunque el mecanismo por pasos sea el que suscite un mayor consenso en este momento, algunos trabajos se mantienen en la defensa de la reacción concertada. Es el caso de la síntesis de tetrahydro-1,5-naftiridinas publicada por Palacios *et al.* a partir de *N*-(3-piridil)aldiminas y diversos dienófilos, en la que un estudio computacional y experimental de la reacción apunta a un mecanismo concertado asíncrono¹²⁸. Como ya se mencionó anteriormente, el estudio de la síntesis enantioselectiva de tetrahydroquinolinas de Xu *et al.* catalizada por un ácido de Brønsted aquiral y una urea quiral también propone un proceso concertado altamente asíncrono como el mecanismo de reacción más probable^{118,129}. En este debate, un caso particular está representado por el trabajo de Smith *et al.*, referente a una reacción de Povarov multicomponente a partir de anilinas, aldehídos aromáticos y derivados del norborneno, un sistema de biciclohepteno moderadamente tensionado. Se pudo observar que, generalmente, el producto mayoritario de la reacción correspondía al aducto *exo-exo*, pero en los casos en que la anilina de partida presentaba una sustitución en *orto* o *meta* se obtenían preferentemente los productos *exo-endo*. Un estudio detallado de los estados de transición que debían mediar la formación de cada uno de los productos les llevó a proponer que el impedimento estérico motivado por estos patrones de sustitución podía influir en el mecanismo de la reacción, de modo que los productos *exo-exo* procederían de una cicloadición concertada asíncrona, mientras que en el caso de los derivados *exo-endo* la asincronicidad del proceso sería mucho mayor y se podría hablar de un mecanismo por pasos. En definitiva, en este curioso ejemplo las ratios de

¹²⁷ Zhang, Y., Dong, S., Liu, X., Xie, M., Zhu, Y., Lin, L., Feng, X. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13684.

¹²⁸ Palacios, F., Alonso, C., Arrieta, A., Cossío, F. P., Ezpeleta, J. M., Fuertes, M., Rubiales, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *11*, 2091.

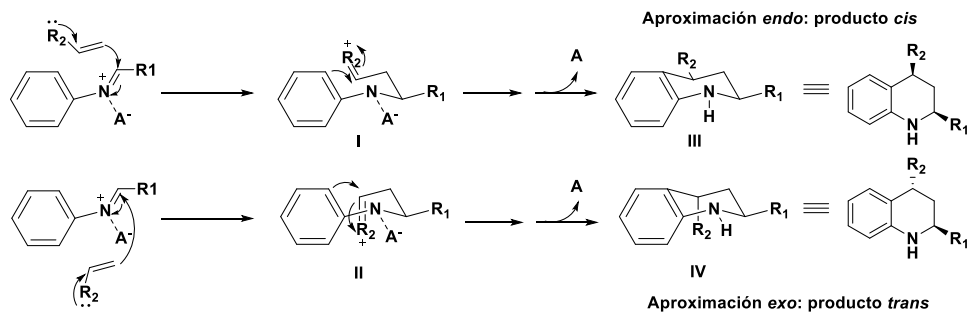
¹²⁹ Otros ejemplos de mecanismo concertado: a) Beifuss, U., Ledderhose, S., Ondrus, V. *Arkivoc* **2005**, *147*, 173. b) Stevenson, P. J., Nieuwenhuyzen, M., Osborne, D. *Arkivoc* **2007**, *11*, 129.

diastereoselección observadas en los productos de la cicloadición serían el resultado de la competición entre ambas posibilidades de aproximación¹³⁰.

Por tanto, esta polémica no parece tener una solución definitiva, y probablemente el mecanismo pueda depender en última instancia de la naturaleza de los reactivos de partida empleados y de la polaridad del medio de la reacción, que podría influir decisivamente en el grado de estabilización del estado de transición zwitteriónico y por ende determinar el mecanismo de la cicloadición.

Estereoquímica de la reacción de Povarov

La reacción de Povarov genera como productos, con carácter general, derivados de 1,2,3,4-tetrahidroquinolina sustituidos en las posiciones 2 y 4, por lo que hay que considerar la formación de dos posibles diastereoisómeros atendiendo a la configuración relativa de estas dos posiciones. En las reacciones de tipo Diels-Alder en general, y la reacción de Povarov no es una excepción, los productos pueden derivar de dos aproximaciones diferentes de los reactivos de partida, llamadas *endo* y *exo*. Una explicación sencilla se puede observar en el esquema 1.30:



Esquema 1.30. Aproximaciones *endo* y *exo* en la reacción de Povarov.

La aproximación *endo* da lugar a los productos que presentan una disposición *cis* de sus sustituyentes en las posiciones 2 y 4, mientras que los productos con estereoquímica *trans* proceden de la aproximación *exo*. Una revisión de la literatura publicada sobre la reacción de Povarov revela una tendencia general de este proceso a rendir el diastereoisómero *cis* como el producto mayoritario, si bien es frecuente la obtención de mezclas de ambas especies en proporción variable, e incluso hay un buen número de ejemplos donde el resultado es el inverso. La explicación más repetida para este

¹³⁰ Smith, C. D., Gavriluk, J. I., Lough, A. J., Batey, R. A. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 702.

fenómeno reside en el establecimiento de interacciones secundarias entre orbitales atómicos del dieno y el dienófilo paralelas a la formación de los orbitales moleculares que dan lugar a los nuevos enlaces, cuya presencia sólo sería viable en el caso de la aproximación *endo* debido a factores estéricos. La formación de estos solapamientos secundarios permitiría una mayor estabilización y una menor energía de activación de este estado de transición frente a la aproximación *exo*, y por tanto una ratio de formación del producto *cis* mucho más alta. No obstante, en el esquema anterior se puede observar que la aproximación *endo* supone un grado de tensión estérica mucho mayor que su contraparte, de lo que se desprende que desde este punto de vista los productos *trans* son más estables. Una de las explicaciones que se han sugerido para abordar esta aparente contradicción es que uno de los aductos sería el producto cinético de la reacción, mientras que el otro sería el producto termodinámico. En función de las condiciones en las que se lleve a cabo la reacción, uno u otro tenderían a ser el producto mayoritario¹³¹. Las condiciones de reacción y las características de los reactivos de partida tendrían por tanto una influencia decisiva en la diastereoselectividad del proceso¹³¹. Tampoco esta hipótesis cuenta con un consenso generalizado, ya que hay autores que niegan la influencia e incluso la existencia de dichas interacciones secundarias entre orbitales, y apuestan por otros factores estéricos e interacciones de diferentes clases (electrostáticas, de Van der Waals, etcétera) para explicar la estereoquímica de este tipo de reacciones¹³². Probablemente la solución más aproximada a la verdad sea una combinación de ambas teorías, y todos los factores anteriormente mencionados desempeñen un papel más o menos importante en la selectividad de la reacción.

Una explicación más simplificada, aunque interesante por su carácter intuitivo, se puede razonar a través de la conformación de los posibles intermedios de la cicloadición (esquema 1.30). Cuando se produce el ataque del dienófilo sobre la imina activada se pueden generar los intermedios **I** y **II**, con el anillo de tetrahydroquinolina dispuesto en una conformación de tipo silla. La forma **I** presenta los sustituyentes de las posiciones 2

¹³¹ Como ejemplo de artículos que tratan este tema: a) Damon, D. B., Dugger, R. W., Magnus-Aryitey, G., Ruggeri, R. B., Wester, R. T., Tu, M., Abramov, Y. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10*, 464. b) Domingo, L. R., Ríos-Gutiérrez, M., Emamian, S. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 17064.

¹³² García, J. I., Mayoral, J. A., Salvatella, L. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *1*, 85.

y 4 en disposición ecuatorial, lo que reduce el impedimento estérico comparativamente frente al intermedio II. Por este motivo, se encuentra favorecida la formación de la *cis*-tetrahydroquinolina y no del producto *trans* más impedido⁸⁹.

1.2.5 Aplicación de la reacción de Povarov a la síntesis de compuestos con actividad antineurodegenerativa.

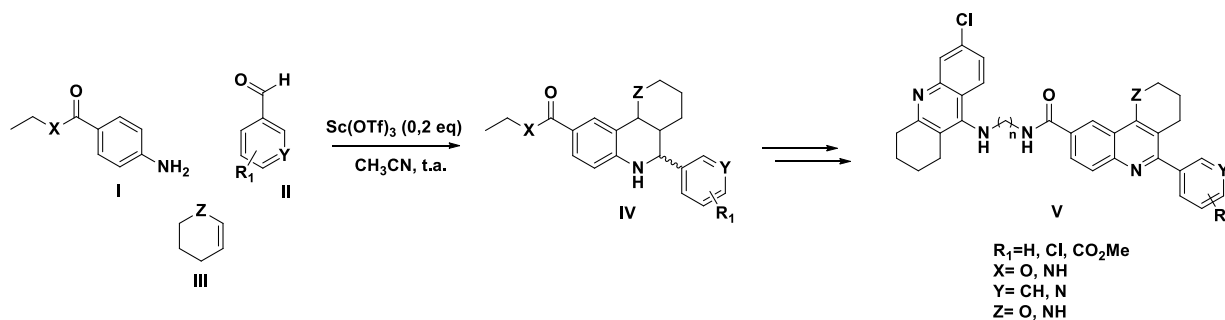
Después de haber explicado con detalle las bases teóricas generales sobre las que se apoya esta tesis doctoral, es de justicia finalizar esta introducción mencionando algunos antecedentes en los que la reacción de Povarov ha permitido la obtención de compuestos con actividades farmacológicas interesantes en el ámbito de la neurodegeneración.

En primer lugar, hay que mencionar algunos trabajos encaminados a la investigación de productos de la reacción de Povarov para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El grupo de Muñoz-Torrero diseñó una síntesis multicomponente de derivados de pirano[3,2-*c*]quinolina para, mediante una cadena diamínica, conectarlos con la 6-clorotacrina, generando una quimioteca de ligandos multidiana. Aunque el perfil farmacológico fue algo irregular y las actividades exhibidas no fueron en general demasiado brillantes, algunos de estos compuestos fueron capaces de inhibir la acetilcolinesterasa (AChE), la butirilcolinesterasa (BChE), la agregación del péptido A β ₁₋₄₂ espontánea o inducida por la AChE, y la β -secretasa¹³³. Utilizando este trabajo como base, se observó que el reemplazo bioisostérico del oxígeno del dienófilo empleado por un nitrógeno conducía a un aumento muy ostensible de la actividad inhibitoria de la AChE y la BChE¹³⁴. Una nueva familia de ligandos híbridos de 6-clorotacrina, esta vez conectados con los derivados optimizados de tetrahydro[*h*][1,6]naftiridina, mostró un perfil farmacológico notablemente mejorado en comparación con los resultados de la primera familia de ligandos multidiana en cuanto a la inhibición de la AchE y la BuChE, así como de la agregación del péptido A β ₁₋₄₂ y la proteína Tau¹³⁵.

¹³³ Camps, P., Formosa, X., Galdeano, C., Munoz-Torrero, D., Ramírez, L., Gómez, E., Isambert, N., Lavilla, R., Badia, A., Clos, M. V., Bartolini, M., Mancini, F., Andrisano, V., Arce, M., Rodríguez-Franco, M. I., Huertas, O., Dafni, T., Luque, F. J. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5365.

¹³⁴ Di Pietro, O., Viayna, E., Vicente-García, E., Bartolini, M., Ramón, R., Juárez-Jiménez, J., Clos, M. V., Pérez, B., Andrisano, V., Luque, F. J., Lavilla, R., Muñoz-Torrero, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *73*, 141.

¹³⁵ Di Pietro, O., Pérez-Areales, F. J., Juárez-Jiménez, J., Espargaró, A., Clos, M. V., Pérez, B., Lavilla, R., Sabaté, R., Luque, F. J., Muñoz-Torrero, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *84*, 107.



Esquema 1.31. Resumen de los trabajos de síntesis de nuevos inhibidores de la AchE y BuChE a través de la reacción de Povarov.

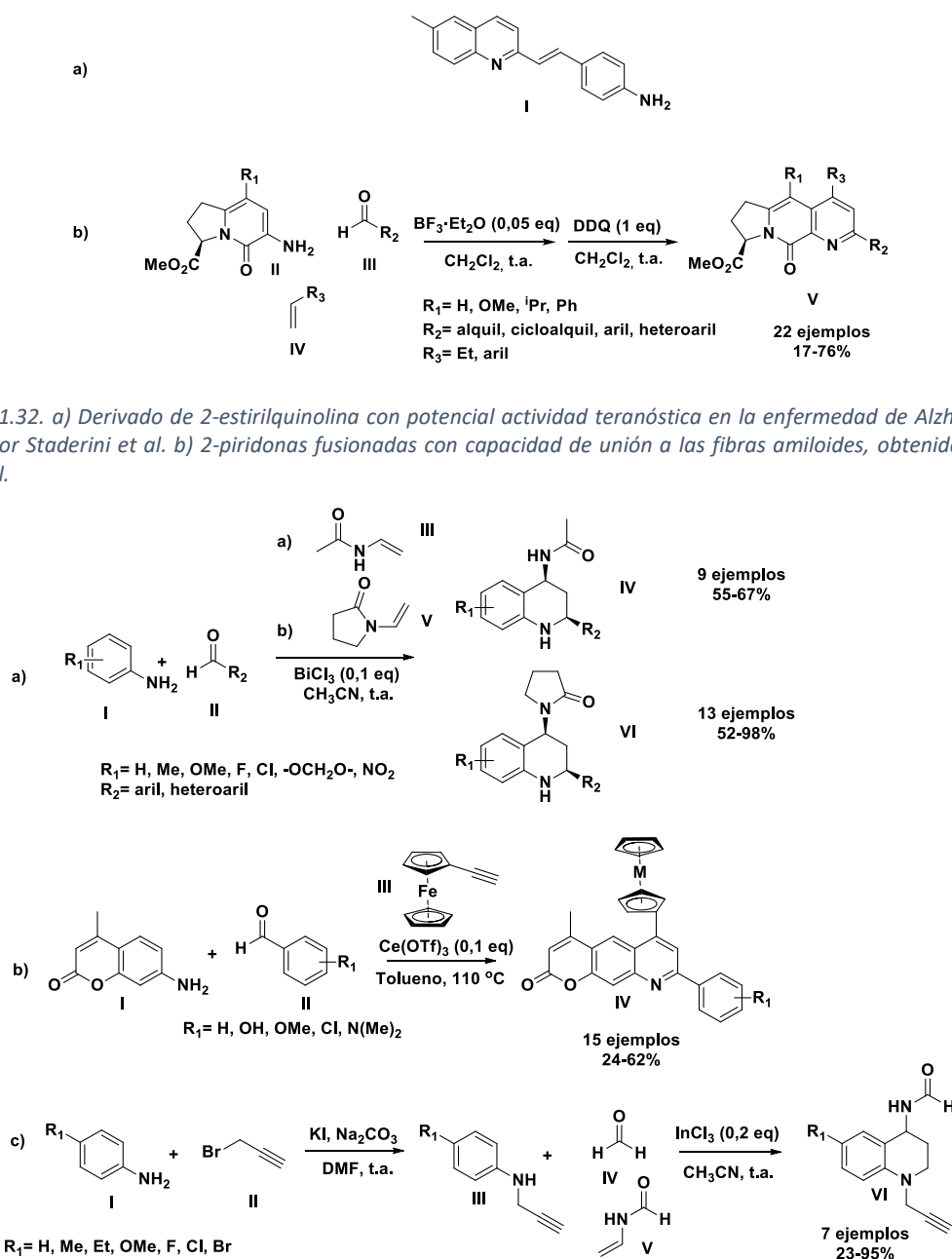
Una aproximación más enfocada a la inhibición de la agregación del péptido $A\beta_{1-42}$ se encuentra en un trabajo de nuestro grupo⁹⁸, en el que se describe la interesante actividad teranóstica por parte del derivado de 2-estirilquinolina I sintetizado a través de una versión viníloga de la reacción de Povarov que ya se ha mencionado anteriormente. Este compuesto no sólo fue capaz de interactuar con el péptido $A\beta_{1-42}$, sino que su estructura química le confería la propiedad de emitir fluorescencia en el infrarrojo cercano, de modo que hacía detectables los depósitos amiloides mediante técnicas de imagen a la vez que podía limitar su agregación. Además, también mostró su capacidad para inhibir la agregación y propagación de la proteína priónica, ampliando su interés en el contexto de la neurodegeneración¹³⁶. Singh *et al.* describieron una versión multicomponente de la reacción de Povarov que utilizaba 6-amino-2-piridonas bicíclicas en lugar de anilinas como producto de partida, permitiendo la obtención de una serie de 2-piridonas tricíclicas fusionadas con piridina. El ensayo farmacológico de estos compuestos reveló que algunos de los derivados eran capaces de unirse a fibrillas amiloides y de α -sinucleína, sugiriendo su posible utilidad como agentes diagnósticos y terapéuticos para las enfermedades de Alzheimer y Parkinson¹³⁷.

Otros derivados de tetrahydroquinolina sintetizados a través de la reacción de Povarov han demostrado su capacidad para captar radicales libres, lo que les otorga interés como potenciales moléculas neuroprotectoras. Es el caso de la quimioteca sintetizada por Kouznetsov *et al.*, en la que se comprobó que el patrón de sustitución de la

¹³⁶ Staderini, M., Aulić, S., Bartolini, M., Tran, H. N. A., González-Ruiz, V., Pérez, D. I., Cabezas, N., Martínez, A., Martín, M. A., Andrisano, V., Legname, G., Menéndez, J. C., Bolognesi, M L. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 225.

¹³⁷ Singh, P., Adolfsson, D. E., Ådén, J., Cairns, A. G., Bartens, C., Brännström, K., Olofsson, A., Almqvist, F. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 3887.

tetrahidroquinolina puede ser decisivo para la actividad antioxidante: ésta era elevada para productos provenientes de anilinas con sustituyentes donadores de electrones, y muy baja cuando la anilina de partida presentaba sustituyentes electrón-aceptores¹³⁸ (esquema 1.33).



Esquema 1.33. Diversos ejemplos de reacción de Povarov conducentes a la síntesis de productos neuroprotectores: a) Kouznetsov et al., b) Xi et al., c) Núñez et al.

¹³⁸ Kouznetsov, V. V., Gómez, C. M. M., Parada, L. K. L., Bermúdez, J. H., Méndez, L. Y. V., Acevedo, A. M. *Mol. Divers.* **2011**, *15*, 1007.

Las curiosas 6-ferrocenilpirano[3,2-*g*]-2-quinolonas de Xi *et al.*¹³⁹, y las *N*-propargiltetrahydroquinolinas obtenidas por Núñez *et al.* a través de una reacción de Povarov catiónica¹⁴⁰ también demostraron una interesante y potente actividad captadora de radicales libres y de protección del ADN frente al daño oxidativo (esquema 1.33).

Otros productos de la reacción de Povarov se han sugerido como posibles agentes neuroprotectores debido a actividades como la inhibición de la prolil oligopeptidasa¹⁴¹, la inhibición de la rho-quinasa (ROCK)¹⁴², el estímulo de factores de crecimiento y neurotróficos como el BDNF y el NGF¹⁴³, y finalmente la actividad agonista o de modulación alostérica sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina α_7 ¹⁴⁴. Este último ejemplo será examinado más profundamente en el capítulo 5 de esta tesis doctoral, debido a su relación con la hipótesis del proyecto que se ha desarrollado.

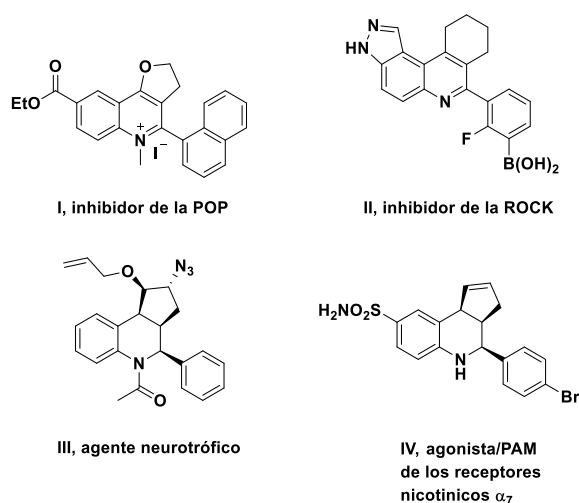


Figura 1.11. Otros productos de la reacción de Povarov con actividad neuroprotectora.

¹³⁹ Xi, G. L., Liu, Z. Q. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 416.

¹⁴⁰ Núñez, Y. A. R., Norambuena, M., Bohórquez, A. R. R., Morales-Bayuelo, A., Gutiérrez, M. *Heliyon*, **2019**, *5*, 351.

¹⁴¹ Tarrago, T., Masdeu, C., Gómez, E., Isambert, N., Lavilla, R., Giralt, E. *ChemMedChem*. **2008**, *3*, 1558.

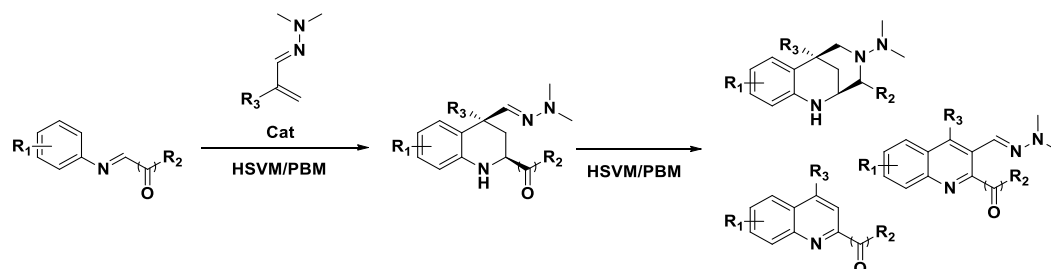
¹⁴² Dayal, N., Mikek, C. G., Hernández, D., Naclerio, G. A., Chu, E. F. Y., Carter-Cooper, B. A., Lapidus, R. G., Sintim, H. O. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *180*, 449.

¹⁴³ Goli, N., Mainkar, P. S., Kotapalli, S. S., Tejaswini, K., Ummanni, R., Chandrasekhar, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1714.

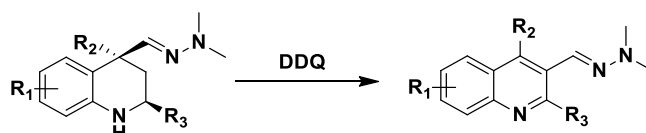
¹⁴⁴ Thakur, G. A., Kulkarni, A. R., Deschamps, J. R., Papke, R. L. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8943.

Capítulo 2. OBJETIVOS

1. En un contexto general en el que se prima el desarrollo de procesos químicos que conjuguen la eficiencia con la seguridad y la sostenibilidad, se decidió investigar la adaptación de la reacción de Povarov aza-viníloga desarrollada en nuestro grupo de investigación a las condiciones de mecanoquímica. El objetivo radicaba en desarrollar un nuevo protocolo que, manteniendo la versatilidad y eficiencia de la reacción en disolución, permitiese acortar los tiempos de reacción, simplificar el procedimiento experimental y reducir el uso de disolventes. Además, se quiso explorar la transformación de los derivados de tetrahydroquinolina resultantes en otros compuestos de interés mediante procesos “one-pot” de ciclación reductora u oxidación, siempre bajo condiciones de activación mecánica.



2. En un trabajo anterior realizado en nuestro grupo de investigación, se había observado que los productos de la reacción de Povarov aza-viníloga se podían transformar en derivados de 2-aryl/2-acilquinolina mediante un tratamiento con DDQ a temperatura ambiente, en un proceso que no sólo entrañaba la oxidación del producto de partida sino también la transposición del grupo dimetilhidrazonometilo de la posición 4 a la posición 3 del anillo. Para ampliar el trabajo ya realizado, se hacía necesario estudiar la versatilidad del nuevo proceso reactivo, ampliar la quimioteca disponible y llevar a cabo un estudio computacional y experimental que permitiese formular una propuesta mecanística para esta transformación.

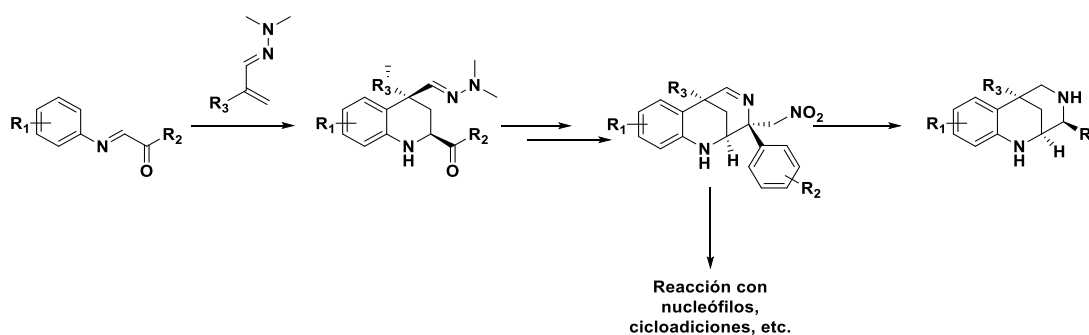


3. Asimismo, la obtención de los derivados de 2-acilquinolina relacionados con el objetivo anterior supuso una nueva oportunidad para investigar su transformación en estructuras del tipo pirrolo[3,4-*b*]quinolina, interesantes no

sólo desde un punto de vista sintético sino también desde una perspectiva práctica, dado su parentesco estructural con algunos compuestos interesantes en el campo de la química farmacéutica.

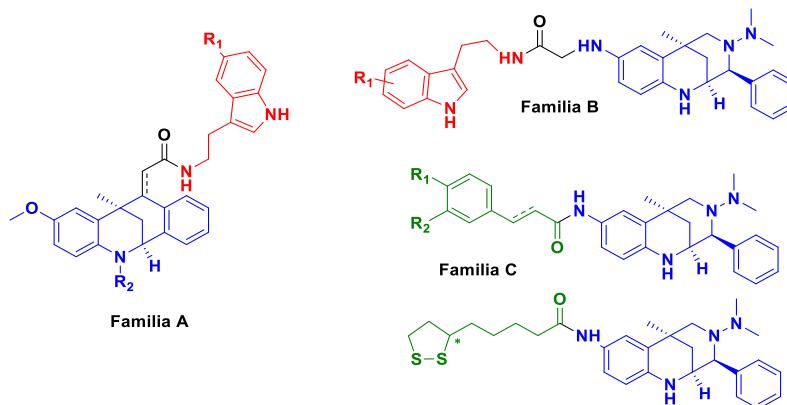


4. Otra vía de trabajo ya abierta con anterioridad a esta Tesis Doctoral se basaba en el aprovechamiento de los derivados de 2-aciltetrahydroquinolina obtenibles mediante la reacción de Povarov aza-viníloga para la obtención de nuevas familias de compuestos con una estructura diazabíclica. Estos productos exhiben una notable semejanza estructural con la citisina, un alcaloide con actividad sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina, y además tienen propiedades neuroprotectoras. Para continuar con el desarrollo del proyecto, era necesario completar la quimioteca preexistente y profundizar en el estudio farmacológico de los compuestos. Además, se decidió explorar las posibilidades sintéticas que ofrecía uno de los intermedios de la ruta sintética empleada, ya que su naturaleza de imina altamente reactiva lo convertía en un sustrato interesante para ensayar otras transformaciones alternativas.



5. Los ligandos multidiana parecen una estrategia muy prometedora para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, teniendo en cuenta su carácter multifactorial. Por ello, se decidió diseñar tres nuevas familias de ligandos multidiana que incorporasen estructuras análogas a la citisina, accesibles mediante la reacción de Povarov aza-viníloga, y otros productos naturales con una contrastada actividad neuroprotectora. Se proyectó la síntesis de los compuestos, con una diversidad estructural suficiente para permitir extraer algunas conclusiones preliminares sobre la relación estructura-actividad,

y la evaluación farmacológica de toda la quimioteca, para comprobar la validez del diseño planteado.



**Capítulo 3. ADAPTACIÓN DE LA REACCIÓN
DE POVAROV AZA-VINÍLOGA A
CONDICIONES DE MECANOQUÍMICA**

3.1 Introducción

3.1.1 Mecanoquímica: concepto y evolución.

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) define las reacciones mecanoquímicas como aquéllas inducidas por la absorción directa de energía mecánica¹⁴⁵. Si se quiere definir de una manera un poco más práctica, la mecanoquímica consiste en el empleo de diversos procedimientos mecánicos (compresión, fricción, agitación, cizalladura, etcétera) para inducir transformaciones químicas.

Aunque la mecanoquímica ha experimentado un notable auge en los últimos años al calor de la búsqueda de nuevos procedimientos sintéticos menos contaminantes, en realidad se trata de una herramienta conocida hace más tiempo del que parece: ya en el siglo IV antes de Cristo Teofrasto de Ereso describió la obtención de mercurio a través de la molienda de cinabrio mezclado con vinagre utilizando un mortero y un pistilo de cobre¹⁴⁶. En el siglo XIX se retomó el estudio de la trituración y la molienda como métodos para la obtención de algunos materiales, siempre en el campo de la química inorgánica, y de estos estudios emanó la idea de que era la energía mecánica, y no el calentamiento local generado por la fricción, la responsable de las transformaciones observadas. En 1891 Ostwald define por primera vez la mecanoquímica como la rama de la química que estudia los cambios químicos o fisicoquímicos de las sustancias en cualquier estado debido a la influencia de la energía mecánica, una definición que ha ido evolucionando a lo largo del tiempo hasta llegar a la mencionada al inicio del capítulo¹⁴⁷. A pesar de estos avances, los químicos orgánicos del siglo XIX y buena parte del siglo XX se interesaron más bien poco en explorar las posibilidades de este nuevo campo de la química, una situación que sufrió un vuelco drástico a partir de los años sesenta del siglo pasado. Este cambio de tendencia se ha mantenido hasta la actualidad, siendo la mecanoquímica uno de los campos con mayor proyección dentro de la síntesis orgánica gracias al interés en el hallazgo de nuevos métodos sintéticos menos contaminantes y/o

¹⁴⁵ Book, G. *Compendium of chemical terminology*. IUPAC, 2014.

¹⁴⁶ Takacs, L. *JOM*. **2000**, 52, 12.

¹⁴⁷ Ostwald, W. *Lehrbuch der Allgemeinen Chemie*; Engelmann, Leipzig, 1891.

capaces de promover nuevos procesos reactivos inaccesibles mediante los procedimientos tradicionales¹⁴⁸.

El concepto de química verde, desarrollado a partir de los años 90 del siglo pasado, refleja la búsqueda de nuevas metodologías que permitan reducir la generación de residuos tóxicos o contaminantes, de modo que la química se convierta en una disciplina más segura para los operadores y el medio ambiente, tanto en el ámbito académico e investigador como a nivel industrial. En 1998, Anastas y Warner enunciaron los doce principios de la química verde, recogidos en la siguiente figura¹⁴⁹:

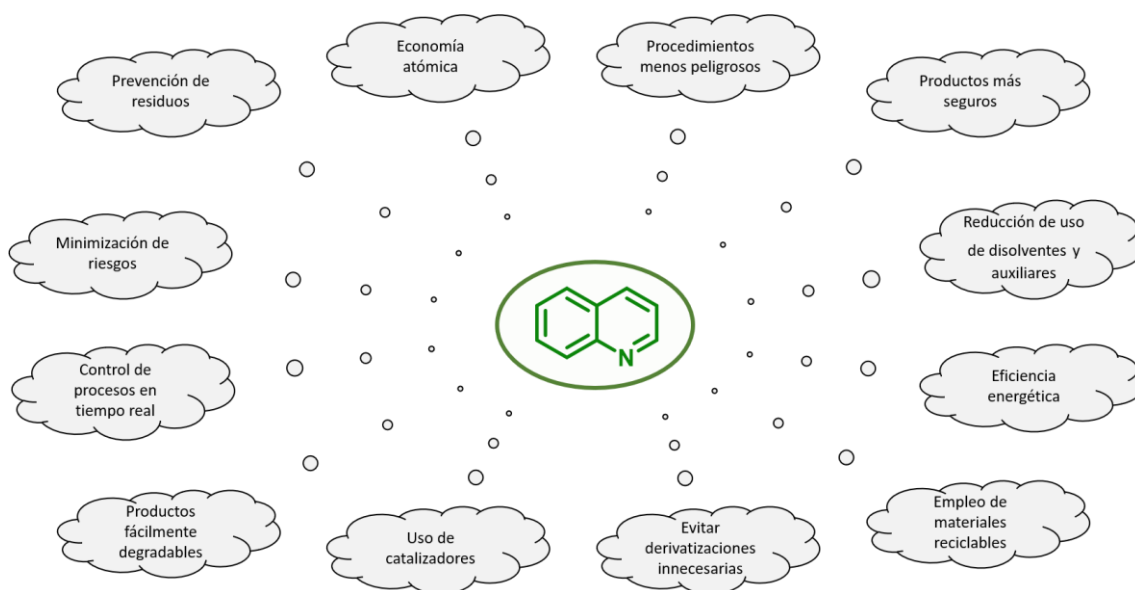


Figura 3.1. Los doce principios de la química verde.

La mecanoquímica contribuye al desarrollo de procesos que cumplen con algunos de estos parámetros. En primer lugar, prescindir del disolvente como medio de reacción significa reducir en gran medida el volumen de residuos contaminantes generados en el proceso, además de suponer procedimientos más económicos y seguros para el operador, habida cuenta que muchos de los disolventes empleados comúnmente son tóxicos o inflamables. Además, hay que tener en cuenta que la mecanoquímica prevé reacciones a temperatura ambiente, lo que redundaría nuevamente en procesos más

¹⁴⁸ Takacs, L. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 7649.

¹⁴⁹ Anastas, P.T.; Warner, J.C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press, Oxford, 1998.

eficientes energéticamente, económicos y seguros. Hay que insistir en las ventajas en términos de eficiencia y coste, puesto que desgraciadamente la aplicación de nuevas tecnologías o procesos, sobre todo a nivel industrial, se ve supeditada a la satisfacción de estos requisitos.

Si bien las preocupaciones ecológicas han sido el principal motor del despegue de la mecanoquímica, no hay que desdeñar las motivaciones puramente sintéticas. Este tipo de reacciones, como ya se explicará detalladamente más adelante, transcurren gracias a un mecanismo de activación y en unas condiciones muy diferentes a las de la química en disolución, lo que lógicamente se traduce en la posibilidad de que el resultado de ambas metodologías sea diferente¹⁵⁰. Así, hay casos en los que esta nueva aproximación ha posibilitado reacciones que no eran viables en disolución¹⁵¹, mientras que en otros casos la activación mecánica genera productos distintos¹⁵² o cambios en la selectividad del proceso¹⁵³ que pueden ser muy interesantes desde los puntos de vista teórico y práctico.

3.1.2 Aspectos técnicos de la mecanoquímica. Ventajas e inconvenientes.

Uno de los aspectos cruciales para la evolución de la mecanoquímica ha sido el desarrollo de equipos especializados para llevar a cabo este tipo de reacciones. En los albores de este campo la molienda de los reactivos se llevaba a cabo en un mortero, para desgracia del sufrido operador. Aunque este modo de proceder dio lugar a muchos descubrimientos interesantes, dejó de resultar aceptable cuando la mecanoquímica se consolidó como una nueva alternativa sintética. El hecho de que la activación mecánica dependiese de la fuerza del operador comprometía seriamente la reproducibilidad de los resultados obtenidos, sin obviar que la fuerza humana podía no ser suficiente en muchos casos para activar las reacciones; también resulta evidente la incomodidad que suponía trabajar de esta manera. Hoy en día este proceso se encuentra mecanizado (aunque ocasionalmente se siga recurriendo al método tradicional), existiendo fundamentalmente tres tipos de equipos¹⁵⁴:

¹⁵⁰ Hernández, J. G., Bolm, C. J. *Org. Chem.* **2017**, *82*, 4007.

¹⁵¹ Tan, D., Mottillo, C., Katsenis, A. D., Štrukil, V., Friščić, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9321.

¹⁵² Jia, K. Y., Yu, J. B., Jiang, Z. J., Su, W. K. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 6049.

¹⁵³ Belenguer, A. M., Friščić, T., Day, G. M., Sanders, J. K. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 696.

¹⁵⁴ Howard, J. L., Cao, Q., Browne, D. L. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 3080.

- Molinos vibratorios: los reactivos se introducen en unos reactores especiales, que pueden ser de diversos materiales, junto con una o varias bolas del mismo material que el reactor. Una vez fijado el reactor al equipo en posición horizontal, éste se encarga de agitarlo a la frecuencia elegida, de modo que los impactos de las bolas en el interior del reactor trituran los reactivos, los mezclan y generan la energía mecánica necesaria para que se dé la transformación pretendida.
- Molinos planetarios: se diferencian de los anteriores en el tipo de movimiento al que es sometido el reactor, colocado en este caso en el equipo en posición vertical. Los reactores se fijan a un soporte especial que les permite rotar sobre sí mismos al tiempo que giran en torno a un eje central en sentido contrario, trazando un movimiento orbital que recuerda al que realizan los planetas alrededor del sol, y cuya velocidad también se puede ajustar. En este sistema, son las fuerzas de corte y cizalla las principales fuentes de energía mecánica que posibilitan las reacciones observadas.
- Extrusores de doble tornillo: este tipo de equipos han permitido llevar a cabo química de flujo en condiciones mecanoquímicas, por lo que han suscitado un creciente interés en el ámbito industrial. El equipo permite introducir un flujo constante de los reactivos de partida en la interfaz de dos tornillos acoplados corrotatorios, donde se produce la molienda y transformación de los reactivos en los productos deseados, que son recuperados por el otro extremo del sistema.

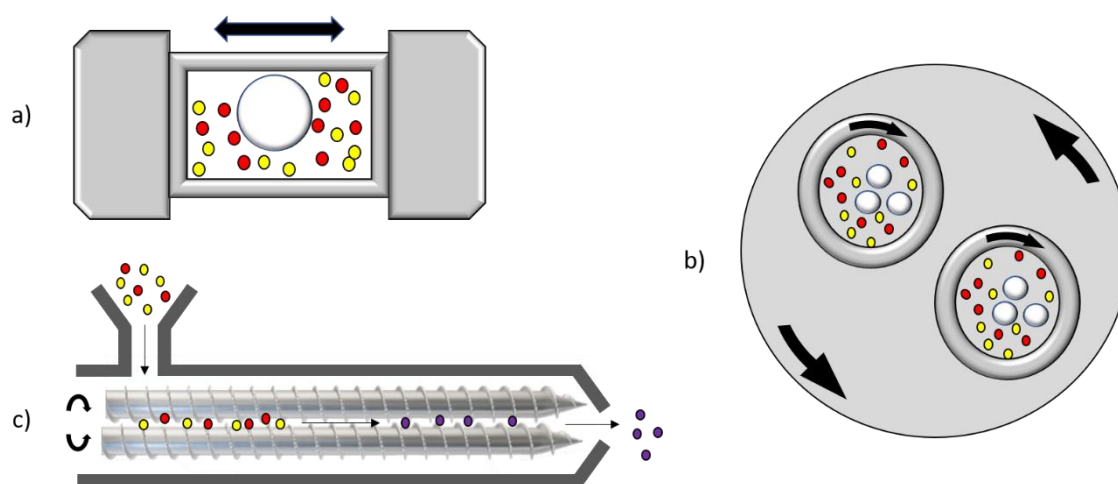


Figura 3.2. Representación esquemática de los distintos tipos de dispositivos mecanoquímicos: a) molino vibratorio, b) molino planetario, c) extrusor de doble tornillo.

Centrándonos en los dos primeros tipos, que son los utilizados habitualmente en el ámbito de la investigación, hay distintas variables que es necesario tener en cuenta a la hora de ensayar u optimizar una reacción¹⁵⁴. En primer lugar, el ajuste de la frecuencia de agitación o la velocidad de giro de los reactores es fundamental para controlar la cantidad de energía mecánica transferida a los materiales de partida, teniendo en cuenta el nivel necesario para que la reacción tenga lugar, pero sin generar un exceso que comprometa la estabilidad de los reactivos o los productos. Obviamente, el tipo de molino utilizado es decisivo para controlar este aspecto, lo que implica decidir cuál conviene más para la transformación planeada. También es crítica la elección del material de los reactores y las bolas, existiendo una notable variedad disponible: acero inoxidable, ágata, óxido de zirconio, carburo de tungsteno, teflón, etcétera. Los recipientes de acero inoxidable son los más baratos, pero tienden a contaminar progresivamente los crudos de reacción por su menor resistencia al desgaste; este inconveniente se puede soslayar utilizando reactores de materiales más inertes como el óxido de zirconio o el ágata, que son mucho más costosos. La interacción del material de los reactores y las bolas con los reactivos puede ser un fenómeno provechoso, como demuestran algunos trabajos que describen reacciones catalizadas por cobre o plata utilizando recipientes de molienda revestidos con estos metales, prescindiendo de un catalizador convencional^{155,156}. El tamaño y número de bolas también determina la cantidad de energía mecánica generada en los impactos, además de condicionar el porcentaje del recipiente que se llena para llevar a cabo la reacción, otro parámetro que debe ser ajustado para elegir el tamaño de reactor adecuado teniendo en cuenta la cantidad de materiales de partida que se desea hacer reaccionar. Por ejemplo, un recipiente demasiado lleno podría comprometer la trituración y mezcla adecuadas de los reactivos. Por último, no hay que olvidar los aspectos que hay que optimizar en toda reacción química, como la estequiometría o el tiempo de reacción. La temperatura, en cambio, no se puede controlar de forma directa por la propia naturaleza de la mecanoquímica, si bien se puede modular de manera indirecta a través del nivel de energía mecánica generada e incluso se ha intentado diseñar modelos que permitan la

¹⁵⁵ Cook, T. L., Walker, J. A., Mack, J. *Green Chem.* **2013**, *15*, 617.

¹⁵⁶ Chen, L., Bovee, M. O., Lemma, B. E., Keithley, K. S., Pilson, S. L., Coleman, M. G., Mack, J. *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 11236.

refrigeración de los reactores¹⁵⁷. En definitiva, la optimización de una reacción en condiciones de mecanoquímica dista mucho de ser trivial, y requiere un minucioso cribado de condiciones de reacción acompañado de un análisis razonado de los resultados obtenidos.

Asimismo, a la idea básica de la mecanoquímica consistente en la molturación de los reactivos para generar una transformación se han ido sumando algunas variantes, con el objetivo de aumentar la reactividad. Éstas son las principales¹⁵⁸:

- Adición de un auxiliar de molienda: si uno o varios de los materiales de partida y/o los productos son líquidos, es habitual que se genere una mezcla pegajosa en el reactor que puede obstaculizar el progreso de la reacción o dificultar su manejo posterior. Este problema se puede evitar mediante la adición de un sólido inerte que funciona como adsorbente o auxiliar de molienda, sin interferir en la reacción que se pretende llevar a cabo. Algunas sustancias empleadas con este fin son la sílica, la alúmina, sales inorgánicas, arena, etcétera.
- Molienda asistida por líquido (LAG, en inglés): cuando la molienda convencional de los reactivos no conduce al producto deseado, la solución a veces reside en la adición de una pequeña cantidad de un líquido para facilitar la reactividad, no más de 1 μL por miligramo de reactivos. Trabajando en este rango de cantidades, se asegura que el aditivo puede contribuir a la transformación deseada sin importar la solubilidad de los materiales de partida en el líquido empleado. Recientemente, también se han explorado otras variantes en la que la molienda es asistida por líquidos iónicos (IL-AG) o por iones y líquido (ILAG). En esta última, se explota el efecto conjunto de la adición de un líquido y una pequeña cantidad de una sal (menos de 5 mol%).
- Molienda asistida por polímero (POLAG): en este caso, una pequeña cantidad de un polímero sólido o líquido contribuye a la transformación en condiciones mecanoquímicas. El polietilenglicol es uno de los polímeros más utilizados con este propósito.

¹⁵⁷ Kumar, N., Biswas, K. *Rev. Sci. Instrum.* **2015**, *86*, 083903.

¹⁵⁸ Friščić, T., Mottillo, C., Titi, H. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 1018.

- Fotomecanoquímica: se ha explorado con éxito la posibilidad de llevar a cabo reacciones de fotocatalisis en las que los materiales de partida se someten al mismo tiempo a un tratamiento mecánico que favorece el proceso. Para ello, se han diseñado dispositivos en los que los reactores, fabricados en un material transparente como el polimetilmetacrilato, están rodeados por diodos LED que emiten luz con la longitud de onda requerida¹⁵⁹.

Una vez se ha repasado el concepto de mecanoquímica y se han revisado brevemente sus principales aspectos técnicos, toca hablar de su carácter práctico: ¿dónde puede ayudarnos y dónde no? La mecanoquímica reúne numerosas ventajas, la mayoría gracias a que permite trabajar sin disolventes: es más ecológica, económica, segura y facilita el uso de determinados reactivos que sufren problemas de insolubilidad o solvólisis cuando se trabaja con ellos en solución. Además, en muchos casos resulta una alternativa más eficiente desde el punto de vista energético ya que, al trabajar a temperatura ambiente, permite evitar el aporte prolongado de energía que requiere frecuentemente la química en disolución. Por último, como ya se explicó anteriormente, el modo particular en que se activan los reactivos en condiciones mecánicas permite realizar con éxito determinadas transformaciones inviables en disolución, acceder a productos distintos mediante cambios en el mecanismo o la selectividad de la reacción, o simplemente mejorar la eficiencia de la transformación en términos de tiempo y/o rendimiento de los productos^{154,160}.

No obstante, la mecanoquímica también presenta algunas limitaciones¹⁶⁰. Una de las más evidentes es que no permite un correcto control de la temperatura: aunque la reacción se lleve a cabo supuestamente a temperatura ambiente, en realidad la energía mecánica generada produce microcalentamientos de la muestra difíciles de caracterizar y cuantificar, lo que puede suponer un problema en el caso de que se estén manejando reactivos o productos termolábiles. Asimismo, la aplicación de estas condiciones a reacciones sensibles al oxígeno o la humedad se ve limitada por la dificultad para asegurar el cumplimiento de estos requisitos, debiéndose realizar la carga del reactor en una cámara inerte. Este problema se ve agravado por la necesidad de abrir el

¹⁵⁹ Hernández, J. G. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 1463.

¹⁶⁰ Obst, M., König, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *31*, 4213.

recipiente de molienda cuando se quiere monitorizar la reacción, algo que es crítico para ese tipo de reacciones pero que en general también supone una limitación, ya que la necesidad de parar la reacción y abrir el reactor puede terminar afectando al proceso y constituye un obstáculo para entender el mecanismo de la transformación. El escalado suele suponer otro problema, especialmente a nivel de laboratorio, ya que los molinos que se emplean habitualmente no permiten trabajar con cantidades más allá de unas decenas o cientos de gramos. A nivel industrial se está explorando el uso del extrusor de doble tornillo para sortear este obstáculo. Por último, hay que señalar que el beneficio de la mecanoquímica en términos de uso de disolventes y generación de residuos sólo es realmente significativo si la reacción es más o menos limpia y la purificación del producto es sencilla, premisas que no siempre se cumplen.

3.1.3 Aspectos mecanísticos

Uno de los retos más difíciles en el campo de la mecanoquímica ha sido el estudio del mecanismo de activación y de reacción bajo este tipo de condiciones. Dado que no había manera de controlar lo que sucedía exactamente dentro del reactor, inicialmente sólo se contaba con aproximaciones *ex situ*: apertura del reactor a determinados tiempos, y análisis de una muestra de la mezcla de reacción con diversas técnicas de análisis en el estado sólido. Recientemente, se ha ido implementando el uso de técnicas como la difracción de rayos X en polvo y la espectroscopía de Raman para el análisis *in situ* de las reacciones mecanoquímicas, obviamente utilizando reactores de materiales como el polimetilmetacrilato que son transparentes a este tipo de radiaciones. Los estudios publicados hasta el momento, mayoritariamente realizados sobre redes metalorgánicas y polímeros, revelan que estas reacciones suelen darse por pasos y estar gobernadas por cinéticas de primer orden que recuerdan a sus homólogas en disolución, transcurriendo probablemente a través de la formación de estados pseudofluidos bajo las condiciones de molienda y cizalla^{161,162}.

La influencia de la temperatura es otra de las incógnitas de la ecuación¹⁶⁰. Las dos teorías clásicas que trataban de explicar la activación mecánica de las reacciones químicas le

¹⁶¹ Do, J. L., Friščić, T. *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 13.

¹⁶² Užarević, K., Halasz, I., Friščić, T. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 4129.

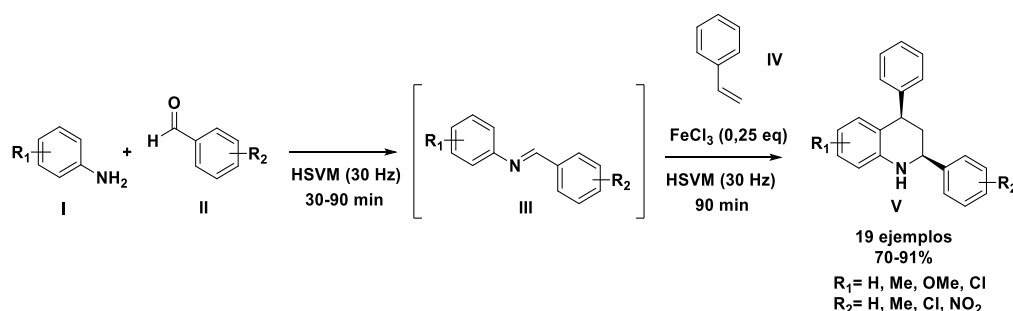
asignaban un papel clave: la teoría del magma-plasma y la teoría de los “hot spots” o puntos calientes. La primera de ellas defiende que, bajo las condiciones de molienda, la deformación de los sólidos genera acumulaciones locales de energía, conduciendo a la formación de plasmas de alto contenido energético con temperaturas superiores a los 10.000 grados centígrados donde los compuestos alcanzan grados de alta excitación, con el consiguiente aumento de reactividad. Por su parte, el modelo de puntos calientes sugiere que estas zonas con temperaturas muy elevadas aparecen como consecuencia de los fenómenos de fricción entre sólidos. Ambas teorías han sido cuestionadas por algunos trabajos que señalan la gran influencia de la temperatura en las reacciones mecanoquímicas, además de que existen dudas sobre si ese calor generado en determinados puntos no se debería disipar rápidamente hacia las zonas circundantes. Probablemente, estas teorías puedan servir para explicar en parte lo que ocurre en una reacción activada por energía mecánica, pero la falta de control sobre lo que sucede dentro de un reactor y la diversidad de propiedades mecánicas que exhiben los compuestos orgánicos e inorgánicos utilizados en este tipo de reacciones hacen muy difícil llegar a una explicación convincente, al menos con las herramientas disponibles hasta el momento. Quizá la idea general con la que haya que quedarse es que una reacción en condiciones de mecanoquímica viene determinada por una acción mecánica directa sobre los materiales de partida que conduce a su amorfización, y por una activación térmica causada por las fuerzas de fricción características del proceso.

3.1.4 La reacción de Povarov en condiciones de mecanoquímica: antecedentes.

La reacción de Povarov, como se explica muchas veces a lo largo de esta memoria de tesis, es un instrumento muy útil para la síntesis de tetrahydroquinolinas funcionalizadas. A pesar de ello, sorprendentemente apenas hay un par de antecedentes de su adaptación a condiciones de mecanoquímica. Tan *et al.* publicaron en el año 2014 el primer trabajo en este campo¹⁶³, en el que describen la síntesis de 2,4-diariltetrahydroquinolinas catalizada por FeCl₃ a partir de diferentes anilinas, derivados del benzaldehído y estireno. El protocolo, efectuado en un molino vibratorio, prevé dos

¹⁶³ Tan, Y. J., Zhang, Z., Wang, F. J., Wu, H. H., Li, Q. H. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 35635.

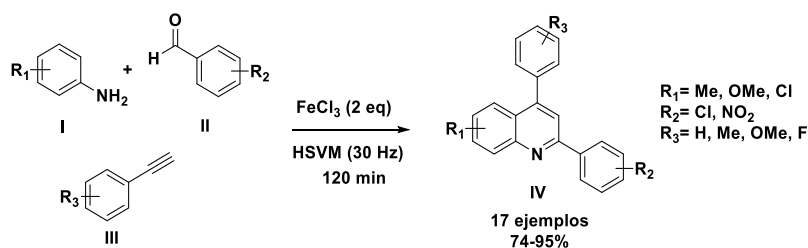
pasos: la formación de la arilimina de partida en condiciones mecanoquímicas, y la posterior adición del ácido de Lewis y el estireno para formar el producto de Povarov. Se comprobó que el método admite sustituyentes electroaceptores y electrodonadores tanto en la anilina como en el aldehído aromático, y que los productos de cicloadición se obtienen con buenos rendimientos y una diastereoselectividad total en favor del isómero *cis*, probablemente gracias a que la alta concentración de reactivos en ausencia de disolvente favorece el producto de control cinético. La duración del paso de formación del heterociclo, de tan sólo 90 minutos, supone una ventaja adicional frente al método convencional. Aunque varios ácidos de Lewis fuertes mostraron una similar capacidad catalítica del proceso, se eligió el FeCl₃ por su precio, su baja toxicidad y su carácter menos contaminante. El carácter “verde” de la reacción se ve reforzado por la facilidad para aislar los productos, bastando un lavado con agua del crudo de reacción y una recristalización en etanol/agua.



Esquema 3.1. Versión mecanoquímica de la reacción de Povarov por Tan et al.

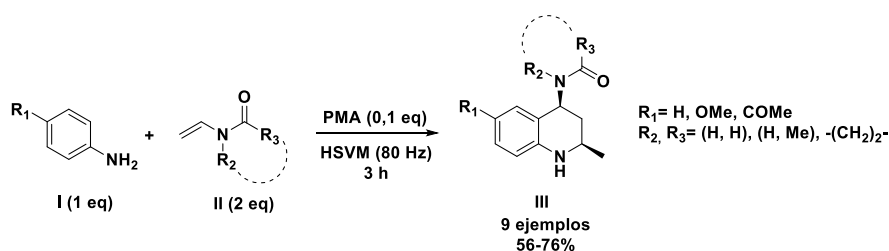
Tres años más tarde, el mismo grupo extendió el método a la síntesis de 2,4-difenilquinolinas utilizando fenilacetilenos como dienófilos, siempre con FeCl₃ como catalizador¹⁶⁴. Realmente, el producto de la cicloadición son dihidroquinolinas, pero el carácter oxidante del catalizador utilizado permite aislar directamente las quinolinas con buenos rendimientos. El método mantiene una buena tolerancia para sustituyentes de distinta densidad electrónica en todos los materiales de partida, y además esconde una agradable sorpresa: se verificó que el protocolo multicomponente arroja unos resultados incluso mejores en términos de rendimiento, manteniendo la versatilidad y con un aislamiento del producto aún más simple, puesto que es suficiente con lavar el crudo de reacción con HCl diluido y agua para obtener el producto puro.

¹⁶⁴ Tan, Y. J., Wang, F. J., Asirib, A. M., Marwanib, H. M., Zhang, Z. J. *Chin. Chem. Soc.* **2018**, *65*, 65.



Esquema 3.2. Síntesis mecanoquímica de 2,4-difenilquinolinas por Tan *et al.*

La otra versión mecanoquímica de la reacción de Povarov corrió a cargo de Kouznetsov *et al.*, desvelada en un trabajo publicado en 2016¹⁶⁵. En él se describe la preparación de *cis*-4-acilamino-2-metiltetrahidroquinolinas utilizando ácido fosfomolíbico como catalizador. La reacción descrita es del tipo ABB', utilizando un equivalente de la anilina correspondiente y 2,1 equivalentes de una *N*-vinilamida, que puede ser cíclica o acíclica. En la optimización se probaron distintos tipos de molino y reactores de varios materiales, obteniéndose los mejores resultados con reactores de ágata en un molino vibratorio. En general los rendimientos obtenidos son buenos y la diastereoselectividad de la reacción es completa, aunque la quimioteca obtenida no es muy extensa y el método no admite mucha variedad estructural en los materiales de partida.



Esquema 3.3. Preparación de 2-metiltetrahidroquinolinas a través de una reacción de Povarov en condiciones de mecanoquímica por Kouznetsov *et al.*

3.1.5 Reacción de Povarov aza-viníloga. Ventajas de su adaptación a condiciones de mecanoquímica.

El esqueleto de 1-azadieno reviste un enorme interés en la síntesis de heterociclos nitrogenados debido a su reactividad, que se puede modular y orientar fácilmente a la generación de estructuras muy diversas. Un ejemplo paradigmático serían las hidrazonas α,β -insaturadas con la estructura mostrada en la figura 3.3, que pueden participar en procesos de muy diversa índole: si R_3 es un grupo dimetilamino, el carácter

¹⁶⁵ Kouznetsov, V. V., Merchán-Arenas, D. R., Martínez-Bonilla, C. A., Macías, M. A., Roussel, P., Gauthier, G. H. J. *Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27*, 2246.

electrodonador de dicho grupo permitiría a estas moléculas adoptar el papel de dienos en reacciones de hetero Diels-Alder con demanda electrónica normal; el carbono β es un buen aceptor de Michael; el átomo de nitrógeno que forma parte del azadieno tiene una elevada densidad electrónica, lo que le confiere un claro carácter nucleófilo; el doble enlace C=N puede ser oxidado, reducido o incluso hidrolizado, abriendo un abanico de posibilidades en términos de funcionalización^{166,167}. Además, hay que tener en cuenta que la introducción de unidades quirales en la posición de R₃ puede permitir llevar a cabo todos estos procesos de forma enantioselectiva.

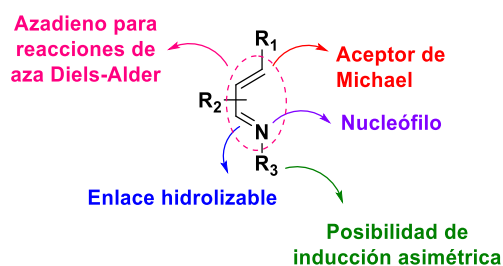


Figura 3.3. Diferentes aplicaciones sintéticas del sistema de 1-azadieno.

Si bien el sistema de 1-azadieno es *a priori* una estructura de baja densidad electrónica debido al carácter electroceptor del átomo de nitrógeno, el grupo de Ghosez demostró que la introducción de un grupo dimetilamino convertía las hidrazonas α,β -insaturadas resultantes en dienos adecuados para la reacción de hetero Diels-Alder¹⁶⁸. En nuestro grupo de investigación se exploró la posibilidad de extender su uso a la reacción de Povarov viníloga, partiendo de un cálculo computacional *ab initio* al nivel B3LYP-6-31G*. Como se observa en la figura 3.4, las cargas de Mulliken observadas en la hidrazona I se asemejan enormemente a las que se puede encontrar en el etil vinil éter, uno de los dienófilos acíclicos más populares en la reacción de Povarov. Esta predicción fue confirmada posteriormente de forma experimental, verificándose la primera aplicación exitosa de una hidrazona α,β -insaturada como reactivo dienófilo en una cicloadición formal [4+2], que hemos dado en llamar reacción de Povarov aza-viníloga.

¹⁶⁶ Lazny, R., Nodzevska, A. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1386.

¹⁶⁷ Groenendaal, B., Ruijter, E., Orru, R. V. A. *Chem. Commun.* **2008**, 5474.

¹⁶⁸ Serckx-Poncin, B., Hesbain-Frisque, A. M., Ghosez, L. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3261.

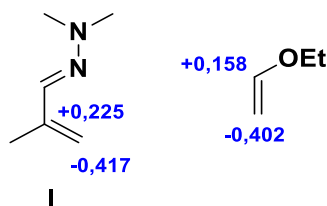
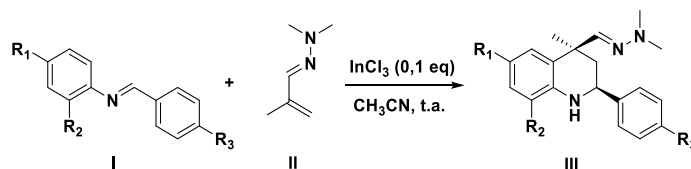


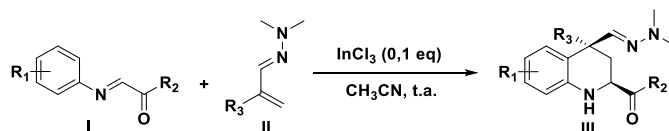
Figura 3.4. Distribución de las cargas de Mulliken en la hidrazona I y el etil vinil éter.

En el año 2007 nuestro grupo publicó el primer ejemplo de reacción de Povarov aza-viníloga, en el que se empleaba como dienófilo una hidrazona α,β -insaturada. Concretamente, la reacción de la dimetilhidrazona de la acroleína con diferentes iminas aromáticas en presencia de un 10 por ciento de tricloruro de indio permitió la obtención estereoselectiva de una serie de 1,2,3,4-tetrahidroquinolinas, con un estereocentro cuaternario en la posición 4 y otro estereocentro en la posición 2⁹⁷.



Esquema 3.4. Primer ejemplo de la reacción de Povarov aza viníloga desarrollado por nuestro grupo de investigación.

El siguiente paso en el camino fue la extensión de este procedimiento a la síntesis de 2-aciltetrahidroquinolinas, gracias al empleo de α -cetoiminas que a su vez procedían de derivados del glicoxal en lugar de los aldehídos aromáticos utilizados en los anteriores trabajos¹⁰⁰.



Esquema 3.5. Síntesis de 2-aciltetrahidroquinolinas mediante la reacción de Povarov aza-viníloga.

A la luz de la revisión anterior, se puede observar que apenas se ha explorado la adaptación a la mecanoquímica de la reacción de Povarov, y los protocolos hasta ahora disponibles no proporcionan la diversidad estructural que sería deseable. En este contexto, consideramos que el trabajo que se va a presentar a continuación resulta interesante, pues viene a cubrir algunas carencias relevantes: representa la primera síntesis mecanoquímica de 2-aciltetrahidroquinolinas, permite la adaptación de la versión viníloga a estas condiciones, y da lugar a estructuras más complejas que los

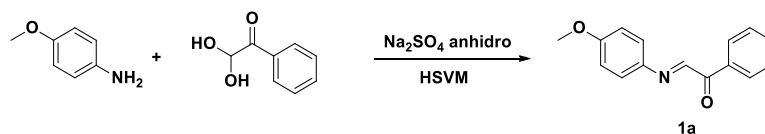
métodos ya disponibles, con dos estereocentros cuaternarios y un patrón de funcionalización que permite acceder de forma sencilla a otro tipo de estructuras.

Cuando decidimos adaptar la reacción de Povarov aza-viníloga a las condiciones de mecanoquímica no sólo buscábamos aliviar estas carencias, sino que también teníamos el objetivo de intentar mejorar algunos aspectos de la versión en disolución como el tiempo de reacción, la diastereoselección, la versatilidad, el rendimiento, la simplicidad del protocolo y la purificación: en definitiva, un acceso más eficiente, económico y ecológico a los productos de Povarov. En el desarrollo de este capítulo se detallará qué objetivos se han cumplido y en qué ámbitos la nueva aproximación no ha conseguido superar a la antigua.

3.2 Síntesis de 2-aciltetrahydroquinolinas mediante la reacción de Povarov aza-viníloga en condiciones de mecanoquímica

El primer paso de este trabajo consistió en averiguar si las α -cetoiminas **1** necesarias como producto de partida para la reacción de Povarov se podían obtener en condiciones de mecanoquímica, para dotar de uniformidad a todo el proceso. Así, se ensayó la reacción entre la *p*-anisidina y el monohidrato de fenilglioxal, los productos de partida que se han utilizado para todos los procesos de optimización descritos en este capítulo debido a su disponibilidad comercial y su bajo coste. La primera prueba se realizó empleando un recipiente de óxido de zirconio con una única bola de 20 mm de diámetro del mismo material, en un molino de bolas vibratorio de alta velocidad a una escala de 0,5 mmol y en presencia de 5 gramos de sulfato sódico anhidro. Esta sustancia se añadió con dos propósitos: como agente desecante para deshidratar el fenilglioxal y eliminar del medio el agua liberada en la formación de la imina, impidiendo su hidrólisis y desplazando el equilibrio hacia el producto; y también como auxiliar de molienda, pues la imina formada es un producto oleoso, de modo que tiende a formar una pasta dentro del reactor que impide la correcta molturación y mezcla de los materiales de partida que aún no han reaccionado, obstaculizando el progreso adecuado de la reacción. Tras sólo 15 minutos de reacción a 20 Hz de frecuencia, se observó una esperanzadora conversión al producto deseado **1a** del 49% según un espectro de RMN de protón (tabla 3.1, entrada

1). A continuación, se llevó a cabo un estudio del tiempo necesario para completar la reacción recogido en la tabla 3.1, del que se desprende que lo más adecuado es dejar agitando la mezcla de reacción durante 75 minutos para asegurarse la conversión completa de los materiales de partida (entrada 5). Realmente se habla de “conversión media” porque se observó cierta variabilidad en la velocidad de reacción comparando diversos intentos, de modo que los porcentajes reseñados corresponden a la conversión media registrada para cada tiempo de los diferentes ensayos realizados. Hay que tener en cuenta que la reacción en cuestión comprende en realidad dos procesos con sus correspondientes equilibrios: la deshidratación del glicoxal de partida y su condensación con la anilina. Teniendo en cuenta que la atmósfera de la reacción no es inerte (por lo que contiene un porcentaje de humedad) y que no hay un control de la temperatura, siendo característico el aumento de la temperatura como consecuencia de los fenómenos de fricción e impacto, es de esperar que la progresión de ambos procesos no sea lineal y los equilibrios mencionados experimenten ciertos vaivenes, motivando una cierta variabilidad en la velocidad de conversión total a la imina.



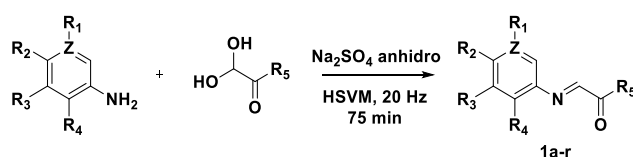
Entrada	t (min)	Conversión (%)
1	15	49
2	30	55
3	45	60
4	60	70
5	75	100

Esquema 3.6. Tabla 3.1. Optimización del tiempo necesario para la obtención de las α -cetoimas de partida en condiciones de mecanoquímica.

Para completar la optimización de este primer paso, se hicieron algunos ensayos complementarios. Se probó a añadir cantidades diferentes de Na_2SO_4 anhidro (1, 2 y 5 gramos), determinándose que esta última cantidad era la idónea para asegurar la conversión total tras los 75 minutos de reacción. Se examinó también la influencia del material de los recipientes y la bola, resultando significativo el hecho de que el empleo de un reactor y dos bolas de acero inoxidable de 15 mm de diámetro reducía el tiempo de reacción a una hora cuando se elevaba la frecuencia de reacción a 30 Hz, algo imposible de hacer cuando se usa ZrO_2 debido a la fragilidad de este material ante

frecuencias tan altas. Como veremos después, los malos resultados de la reacción de Povarov en reactores de acero inoxidable nos forzaron a despreciar esta mejora. Por último, se ensayó la reacción en un molino planetario utilizando un recipiente de acero inoxidable con 25 bolas de 6 mm, requiriéndose 90 minutos y una velocidad de giro muy alta (600 rpm) para lograr la compleción del proceso.

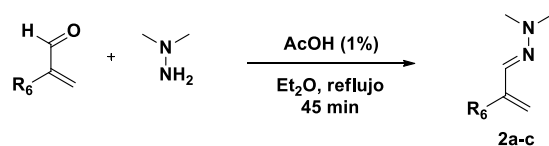
Se seleccionó, por tanto, el protocolo que prevé el uso de un recipiente de óxido de zirconio con una única bola de 20 mm del mismo material para llevar a cabo la reacción de las anilinas seleccionadas con diversos glioxales a 20 Hz de frecuencia durante 75 minutos, usando un molino de bolas vibratorio, para obtener de forma cuantitativa las cetoiminas **1a-n**. El uso de la 5-metoxi-2-aminopiridina, gracias a su razonablemente elevada densidad electrónica, resultó también compatible con el procedimiento descrito (derivados **1o-p**). Este éxito no se reproduce con otras aminopiridinas sin un sustituyente fuertemente electrodonador. Las iminas obtenidas fueron empleadas en la siguiente reacción sin ninguna manipulación adicional, tras confirmar su conversión completa mediante un espectro de RMN de protón del crudo de reacción.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Z	R ₅
1a	H	OCH ₃	H	H	C	C ₆ H ₅
1b	CH ₃	H	CH ₃	H	C	C ₆ H ₅
1c	H	H	CH ₃	H	C	C ₆ H ₅
1d	H	CH ₃	H	CH ₃	C	C ₆ H ₅
1e	H	OCH ₃	H	H	C	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃
1f	H	NHBoc	H	H	C	C ₆ H ₅
1g	H	N(CH ₃) ₂	H	H	C	C ₆ H ₅
1h	H	OCH ₃	H	H	C	4-OCH ₃ C ₆ H ₄
1i	H	CH ₃	H	H	C	4-OCH ₃ C ₆ H ₄
1j	H	CH ₃	H	CH ₃	C	4-OCH ₃ C ₆ H ₄
1k	H	OCH ₃	H	H	C	4-FC ₆ H ₄
1l	H	CH ₃	H	CH ₃	C	4-FC ₆ H ₄
1m	H	H	H	CH ₃	C	4-ClC ₆ H ₄
1n	H	OCH ₃	H	H	C	2-furilo
1o	H	OCH ₃	H	H	C	2-tienilo
1p	H	OCH ₃	H	H	C	OEt
1q	-	OCH ₃	H	H	N	C ₆ H ₅
1r	-	OCH ₃	H	H	N	4-CH ₃ C ₆ H ₄

Esquema 3.7. Tabla 3.2. Síntesis de las α -cetoiminas **1a-r**.

Por otro lado, las *N,N*-dimetilhidrazonas requeridas como dienófilo en la reacción de Povarov se prepararon siguiendo un método ya establecido¹⁶⁹ que consiste en el calentamiento a reflujo de una solución de *N,N*-dimetilhidracina y la acroleína que corresponda en éter etílico, utilizando ácido acético como catalizador de la condensación. También en este caso los productos se obtuvieron con un rendimiento prácticamente cuantitativo, si bien su elevada volatilidad obligó a tomar la precaución de eliminar el disolvente sin utilizar vacío.



Compuesto	R ₆	Rendimiento (%)
2a	CH ₃	95
2b	CH ₂ CH ₃	90
2c	H	95

Esquema 3.8. Tabla 3.3. Síntesis de las *N,N*-dimetilhidrazonas **2a-c**.

Con ambos reactivos de la reacción de Povarov en mano, se investigó si la adición directa de las dimetilhidrazonas **2** y el catalizador adecuado sobre el crudo de la reacción anterior podía permitir la obtención de los derivados de 2-acil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina/tetrahidronaftiridina **3** mediante un protocolo multicomponente secuencial *one-pot*, a través de una reacción de Povarov aza-vinílica en condiciones de mecanoquímica (tabla 3.4). Tomando como modelo la reacción de la imina **1a** con la hidrazona **2a**, se hizo un ensayo preliminar utilizando un 10% de tricloruro de indio como catalizador, ya que ésta era la catálisis óptima de la reacción en disolución. Tras 30 minutos de reacción a 20 Hz se detuvo la reacción después de haberse observado por TLC el consumo de los materiales de partida (el glioxal y la anilina, pues la α -cetoimina se hidroliza en la sílice), consiguiéndose aislar tras el proceso de purificación el producto **3a** en un 62% de rendimiento. Si bien el resultado ya era aceptable, se optó por ensayar otros tiempos de reacción, siempre utilizando InCl₃ como catalizador. El acortamiento del tiempo de reacción se tradujo en una caída del rendimiento, pero su prolongación a 45 y 60 minutos tuvo un resultado positivo (rendimientos del 67% y 90%, respectivamente), observándose ya una caída notable hasta el 54% cuando se mantuvo

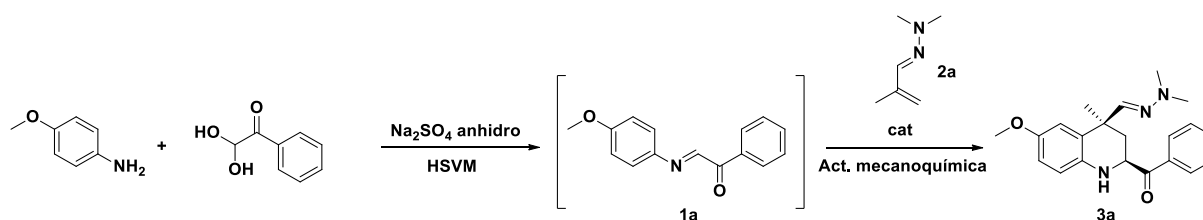
¹⁶⁹ Waldner, A. *Helv. Chim. Acta.* **1988**, *71*, 486.

la reacción durante 90 minutos (tabla 3.4, entradas 2-5). Al degradarse en sílice el compuesto de partida real de la reacción, su seguimiento por TLC se debe tomar como algo orientativo, admitiéndose que pueda haber cierta discordancia entre lo que se observa en la misma y el estado real del proceso. Esto explicaría que, aunque a tiempos más cortos se observe que la reacción aparentemente se ha completado, en la práctica no sea así y los rendimientos continúen mejorando a medida que se alarga el tiempo de reacción. Por otra parte, el crudo de reacción y el rendimiento empeoran manifiestamente cuando la reacción se prolonga hasta los 90 minutos. Aunque no se aislaron los productos de degradación, en el espectro de RMN de protón del crudo de reacción se puede observar la presencia de diversos productos de oxidación parcial o total de **3a**, generados seguramente por la prolongada exposición del compuesto a las altas temperaturas que se generan habitualmente en un reactor de mecanoquímica.

Una vez ajustado el tiempo óptimo de reacción, se ensayaron otros ácidos de Lewis, de diversa naturaleza y fuerza, para ver si alguno superaba al InCl_3 en términos de rendimiento y/o diastereoselectividad del producto (entradas 6-13). Ninguno proporcionó un rendimiento mejor que el de referencia, aunque con $\text{Yb}(\text{TfO})_3$ se logró la diastereoselectividad más alta de todas las condiciones ensayadas. Sorprendentemente, se observó que la reacción de Povarov se podía dar en condiciones de mecanoquímica incluso en ausencia de catalizador, aunque con un rendimiento lógicamente mucho más pobre (entrada 14).

A continuación, se abordó la optimización de otros parámetros. El aumento de la frecuencia a 25 Hz no supuso una mejora (entrada 15), ni tampoco el empleo de una bola de ZrO_2 más pequeña ($\varnothing=16$ mm, entrada 16) o el aumento de la cantidad de InCl_3 a un 20% (entrada 17). Siempre usando como catalizador el InCl_3 al 10%, se probó el cambio a reactores de acero inoxidable con dos bolas de 15 mm del mismo material, siendo los rendimientos a las diferentes frecuencias de reacción ensayadas (10-30 Hz) siempre menores a sus contrapartes en un recipiente de óxido de zirconio (entradas 18-20). El empleo de 9 bolas pequeñas de 6 mm proporcionó un resultado aún más pobre (entrada 21). Cuando la reacción se efectuó en un molino de bolas planetario utilizando un reactor de acero inoxidable con 25 bolas de 6 mm, se observó una cierta mejoría del

rendimiento a medida que se aumentaba la velocidad de giro, aunque a la velocidad máxima del aparato (600 rpm) el rendimiento no superó el 48% (entradas 22-23).



Ent.	Cat.	Molino	v (Hz)/rpm	Material	t (min)	Rto. (%)	dr (cis:trans)
1	InCl ₃ (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	30	57	71:29
2	InCl ₃ (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	15	62	71:29
3	InCl ₃ (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	45	67	71:29
4	InCl ₃ (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	90	71:29
5	InCl ₃ (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	90	54	71:29
6	CAN (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	54	69:31
7	FeCl ₃ (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	51	70:30
8	AlCl ₃ (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	49	72:28
9	ZnCl ₂ (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	60	75:25
10	BF ₃ ·Et ₂ O (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	69	75:25
11	Eu(hfc) ₃ (0,05 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	35	55:45
12	Sc(OTf) ₃ (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	72	73:27
13	Yb(OTf) ₃ (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	73	78:22
14	-	HSVVM	20	ZrO ₂	60	31	67:33
15	InCl ₃ (0,1 eq)	HSVVM	25	ZrO ₂	60	67	71:29
16 ^a	InCl ₃ (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	72	71:29
17	InCl ₃ (0,2 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	78	71:29
18 ^b	InCl ₃ (0,1 eq)	HSVVM	10	Ac. inox.	60	45	71:29
19 ^b	InCl ₃ (0,1 eq)	HSVVM	20	Ac. inox.	60	35	71:29
20 ^b	InCl ₃ (0,1 eq)	HSVVM	30	Ac. inox.	60	30	71:29
21 ^c	InCl ₃ (0,1 eq)	HSVVM	30	Ac. inox.	60	16	71:29
22 ^d	InCl ₃ (0,1 eq)	PBM	400	Ac. inox.	60	22	71:29
23 ^d	InCl ₃ (0,1 eq)	PBM	600	Ac. inox.	60	48	71:29
24	(±)-CSA (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	67	70:30
25	<i>p</i> -TsOH (0,1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	90	75:25
26	<i>p</i> -TsOH (1 eq)	HSVVM	20	ZrO ₂	60	87	75:25

Esquema 3.9. Tabla 3.4. Optimización del proceso one-pot para la obtención de 2-acil-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas a través de una reacción de Povarov en condiciones mecanoquímicas.

^a 1 bola, Ø=16 mm

^b 2 bolas, Ø=15 mm

^c 9 bolas, Ø=6 mm

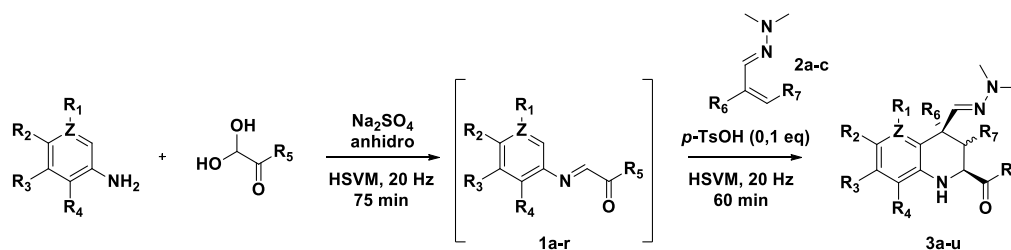
^d 25 bolas, Ø=6 mm

Finalmente, se decidió estudiar el uso de un ácido de Brønsted para catalizar la reacción en lugar de los ácidos de Lewis utilizados hasta el momento, esperando que la

protonación de la α -cetoimina de partida facilitara el proceso de la misma manera. Aunque el ácido (\pm)-canfosulfónico tampoco permitió mejorar la eficacia de la reacción (entrada 24), el uso de un 10% de ácido *p*-toluenosulfónico igualó el rendimiento obtenido con un 10% de InCl_3 , pero con un ligero aumento de la diastereoselectividad (3:1 *cis:trans*, entrada 25). Una vez se comprobó que el empleo de ácido *p*-toluenosulfónico en cantidad estequiométrica no generaba ninguna ventaja adicional (entrada 26), se concluyó el proceso de optimización de la reacción.

Quedó claro, por tanto, que las mejores condiciones de reacción consistían en mantener la reacción durante 60 minutos a 20 Hz de frecuencia en un molino vibratorio, empleando un recipiente y una bola de 20 mm de ZrO_2 y catalizando la reacción con un 10% de ácido *p*-toluenosulfónico. Siguiendo este protocolo *one-pot*, y partiendo de las iminas **1a-p** y las hidrazonas **2a-c**, se sintetizaron las tetrahydroquinolinas **3a-s** con unos rendimientos comparables a los de la reacción en disolución, si bien la diastereoselectividad es un poco menor con este procedimiento alternativo (tabla 3.5). El esqueleto de 1,5-tetrahidronaftiridina, aunque no destaque entre los más explorados en química médica, se encuentra en algunos compuestos de interés biológico¹⁷⁰. La aplicación de las condiciones optimizadas para esta reacción de Povarov en condiciones de mecanoquímica a las iminas **1q-r** y la hidrazona **2a** permitió la obtención de las tetrahidronaftiridinas **3t-u** con rendimientos muy buenos y diastereoselectividades en la línea de lo observado para los derivados de tetrahydroquinolina. De los dos regioisómeros posibles (1,5-naftiridina ó 1,7-naftiridina) sólo se observó la formación del primero, habiéndose confirmado la estructura gracias a la observación de una constante de acoplamiento de 8,6 Hz en el espectro de RMN de protón, correspondiente al acoplamiento *orto* entre los protones H-7 y H-8.

¹⁷⁰ Fernandez, M. C., Escribano, A., Mateo, A. I., Parthasarathy, S., de la Nava, E. M. M., Wang, X., Cockerham, S. L., Beyer, T. P., Schmidt, R. J., Cao, G., Zhang, Y., Jones, T. M., Borel, A., Sweetana, S. A., Cannady, E. A., Stephenson, G., Frank, S., Mantlo, N. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 3056.



Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Z	R ₅	R ₆	R ₇	Rto. (%)	dr (cis:trans)
3a	H	OCH ₃	H	H	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H	90	75:25
3b	H	OCH ₃	H	H	C	C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₃	H	62	75:25
3c	H	OCH ₃	H	H	C	C ₆ H ₅	H	H	45	86:14
3d	CH ₃	H	CH ₃	H	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H	76	55:45
3e	H	H	CH ₃	H	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H	41	72:28
3f	H	CH ₃	H	CH ₃	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H	76	69:31
3g	H	OCH ₃	H	H	C	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃	CH ₃	H	81	75:25
3h	H	NHBoc	H	H	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H	72	74:26
3i	H	N(CH ₃) ₂	H	H	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H	59	76:24
3j	H	OCH ₃	H	H	C	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	H	61	73:27
3k	H	CH ₃	H	H	C	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	H	71	74:26
3l	H	CH ₃	H	CH ₃	C	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	H	99	75:25
3m	H	OCH ₃	H	H	C	4-FC ₆ H ₄	CH ₃	H	93	75:25
3n	H	CH ₃	H	CH ₃	C	4-FC ₆ H ₄	CH ₂ CH ₃	H	99	72:28
3o	H	H	H	CH ₃	C	4-ClC ₆ H ₄	CH ₃	H	53	71:29
3p	H	OCH ₃	H	H	C	2-furil	CH ₃	H	85	82:18
3q	H	OCH ₃	H	H	C	2-tienil	CH ₃	H	72	73:27
3r	H	OCH ₃	H	H	C	OEt	CH ₃	H	70	75:25
3s	H	OCH ₃	H	H	C	OEt	CH ₂ CH ₃	H	64	66:34
3t	-	OCH ₃	H	H	N	C ₆ H ₅	CH ₃	H	98	86:14
3u	-	OCH ₃	H	H	N	4-CH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	H	85	71:29
3v	H	OCH ₃	H	H	C	Isatina	CH ₃	H	-	-
3w	H	OCH ₃	H	H	C	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₂ CH ₃	-	-
3x	H	H	CH ₃	H	C	4-CH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	H	-	-
3y	H	C ₆ H ₅ O	H	H	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H	-	-
3z	H	AcNH	H	H	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H	-	-

Esquema 3.10. Tabla 3.5. Síntesis mecanoquímica de los productos **3a-u**. Intentos fallidos de aplicación del método para la obtención de los productos **3v-z**.

Hay que destacar otra pequeña variación procedimental de la versión mecanoquímica respecto de la reacción en disolución: en este nuevo protocolo se optó por añadir siempre 1,5 equivalentes de la hidrazona, lo que supone un exceso mayor del habitual (1,2 equivalentes). Esto se hizo considerando la volatilidad de dicho reactivo, un aspecto más crítico en ausencia que en presencia de disolvente.

En la tabla 3.5 no sólo se ha recogido la quimioteca de productos de Povarov sintetizada por este método, sino también aquellos intentos que no condujeron al producto

deseado. De este modo, se pueden extraer algunas conclusiones sobre la versatilidad del método. Considerando la anilina de partida, el método admite una notable variedad de sustituyentes sobre el anillo aromático, siempre y cuando tengan un marcado carácter electrodonador y/o estén situados en la posición adecuada respecto al grupo amino. Así, la presencia de los grupos $-OCH_3$, $-N(CH_3)_2$ y $-NHBoc$ fue plenamente compatible con este método, mientras que para los grupos metilo se observa un patrón: los resultados fueron positivos cuando la anilina presenta dos grupos metilo o sólo uno en posición *orto* o *para* respecto al grupo amino. En cambio, el empleo de *m*-toluidina condujo a una significativa pérdida de rendimiento, cuando no directamente al fracaso de la reacción. La presencia de un sustituyente en la posición 5 de la tetrahydroquinolina vino acompañada de una diastereoselección muy baja, probablemente por la interacción estérica de los sustituyentes en C-4 y C-5 cuando se encuentran en disposición ecuatorial, igualándose la estabilidad de las formas *cis* y *trans*. Tampoco fue posible la introducción de los grupos fenoxilo y acetamido en posición *para* al grupo amino, presumiblemente por su débil carácter electrodonador. La diversidad admisible por este procedimiento en el glioxal de partida es mucho más satisfactoria, pudiendo presentar sustituyentes electrodonadores o electroaceptores sobre el anillo aromático, e incluso ser éste sustituido por heterociclos (furano, tiofeno) o por un grupo éster. No obstante, cuando se intentó introducir la isatina en lugar de un glioxal, la síntesis de la cetoimina de partida sí fue posible pero la reacción de Povarov dio lugar a una cantidad muy pequeña del compuesto deseado, que no fue posible purificar. En lo que respecta a la hidrazona, en la posición 4 (R_6 en el esquema 3.10) se admite la ausencia de sustitución o la presencia de cadenas alquílicas cortas (metilo, etilo), mientras que en la posición 5 (R_7) no puede haber sustituyente alguno, lo que inhabilita aparentemente a este método para la síntesis de tetrahydroquinolinas o tetrahidronaftiridinas sustituidas en la posición 3.

En la tabla 3.6 se muestra la comparativa entre los resultados obtenidos mediante el procedimiento en disolución y en condiciones de mecanoquímica, para aquellos compuestos de los que se disponen ambos datos. Los rendimientos están en el mismo rango, en líneas generales, siendo éstos en algunos casos claramente favorables a uno u otro método sin un patrón aparente. No obstante, hay que destacar que la reacción en disolución permite la introducción de algunas variantes inaccesibles mediante el

nuevo método, como la obtención de 3-alquiltetrahydroquinolinas o la formación de espiroderivados del tipo **3v** cuando se utiliza la isatina como producto de partida.

Comp.	Síntesis mecanoquímica			Síntesis en disolución		
	t (h)	Rto. (%)	dr (cis:trans)	t (h)	Rto. (%)	dr (cis:trans)
3a	1	90	75:25	3	72	82:18
3b	1	62	75:25	3	63	91:09
3c	1	45	86:14	1	72	100:0
3d	1	76	55:45	3	63	52:48
3e	1	41	72:28	-	-	-
3f	1	76	69:31	4	95	98:2
3g	1	81	75:25	5	78	86:14
3h	1	72	74:26	-	-	-
3i	1	59	76:24	-	-	-
3j	1	61	73:27	3	70	83:17
3k	1	71	74:26	3	30	78:22
3l	1	99	75:25	3	72	86:14
3m	1	93	75:25	3	75	84:16
3n	1	99	72:28	3	55	81:19
3o	1	53	71:29	-	-	-
3p	1	85	82:18	3	88	100:0
3q	1	72	73:27	3	72	90:10
3r	1	70	75:25	2	88	100:0
3s	1	64	66:34	2	74	87:13
3t	1	98	86:14	4	95	98:02
3u	1	85	71:29	-	-	-

Tabla 3.6. Comparación de la eficacia de la reacción de Povarov mecanoquímica respecto a su versión en disolución, en términos de rendimiento y diastereoselectividad. En verde, se señalan aquellos casos donde el método mecanoquímico supone una mejora, mientras que los compuestos cuya obtención en disolución resulta más favorable en disolución se marcan en rojo.

Tampoco supone el procedimiento mecanoquímico una mejora a nivel de la diastereoselectividad de la reacción, siempre mejor con el método convencional a excepción del compuesto **3d**. En un experimento en disolución previo a la realización de este trabajo se había comprobado que, si bien el producto mayoritario de la reacción de Povarov aza-viníloga a temperatura ambiente era el diastereoisómero *cis*, la elevación de la temperatura de reacción a 40°C tendía a favorecer la generación del isómero *trans* sobre el *cis*¹¹⁹. Esta observación parece indicar que el isómero *cis* es el producto cinético de la reacción, mientras que el *trans* sería el producto termodinámico. Cuando se efectúa la reacción en condiciones de mecanoquímica la temperatura se eleva a causa de los fenómenos de fricción e impacto que ocurren dentro del reactor, lo que favorecería la formación del producto termodinámico en un grado mayor al habitual, motivando por ende una moderada pérdida de la diastereoselectividad. Al ser este

inconveniente inherente al empleo de la energía mecánica como mecanismo activante de la reacción, no parece que se pueda hacer mucho para solucionarlo a falta de una manera efectiva de controlar o impedir el aumento de temperatura en el seno del reactor.

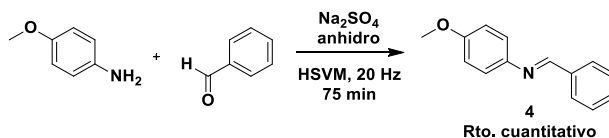
Por último, hay que mencionar un par de ensayos que completaron la caracterización de este nuevo procedimiento. En primer lugar, intentando desarrollar un protocolo que generase el menor volumen de residuos posible, se eliminó el *work-up* del proceso de purificación, efectuando directamente la columna cromatográfica desde el crudo de reacción sin ningún tratamiento intermedio. Desgraciadamente, este proceder se tradujo en una pérdida de rendimiento de **3a** (del 90% al 56%), que hizo aconsejable mantener el protocolo original. Más suerte hubo con la prueba de escalado de la reacción, pues el 90% de rendimiento de **3a** obtenido partiendo de 0,5 mmol de los reactivos de partida apenas cayó hasta el 81% cuando se utilizaron 3 mmol, escala que correspondería a la obtención de aproximadamente 1 gramo de los productos de Povarov.

3.3 Tentativas para extender la metodología mecanoquímica a la síntesis de 2-ariltetrahidroquinolinas y hexahidropirrol[3,2-*b*]indoles.

Una vez desarrollado un método adecuado para la síntesis mecanoquímica de 2-aciltetrahidroquinolinas, se planteó la posibilidad de poner a punto un procedimiento análogo para la obtención de 2-ariltetrahidroquinolinas, algo que no parecía revestir gran dificultad dado que las condiciones de síntesis en disolución son idénticas para ambos tipos de compuestos.

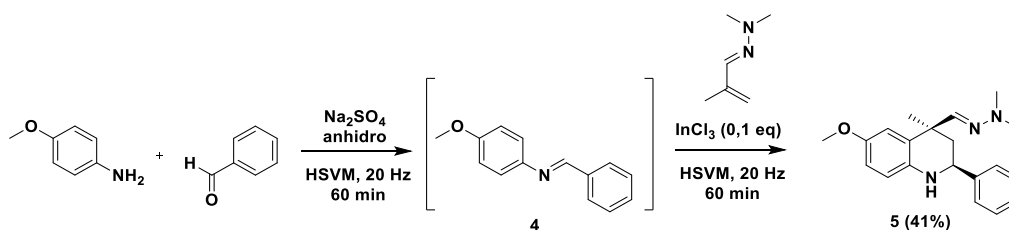
El trabajo se inició ensayando la síntesis de la arilimina **4** a partir de *p*-anisidina y benzaldehído, tomando como base el trabajo de optimización detallado en el apartado anterior. Se comprobó que los métodos que habían dado resultado anteriormente, esto es, hacer reaccionar ambas sustancias en presencia de sulfato sódico anhidro en el molino vibratorio durante 75 minutos, a 20 Hz y en un reactor con una bola de ZrO₂; o

bien durante 60 minutos a 30 Hz en un reactor con dos bolas de 15 mm de acero inoxidable, conducían a la formación cuantitativa del compuesto **4**.



Esquema 3.11. Síntesis de la arilimina **4**.

Sin embargo, este éxito no se reprodujo en el siguiente paso. Cuando se intentó llevar a cabo la reacción de Povarov entre la imina **4** y la hidrazona **3a** en presencia de un 10% de InCl_3 , p -TsOH o $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ los rendimientos fueron bastante discretos: no se superó el 30% utilizando un reactor de ZrO_2 a una frecuencia de 20 Hz, mientras que en acero inoxidable el mejor resultado fue un 41% también a 20 Hz, sin que la variación de la frecuencia e incluso el cambio a un molino planetario supusiesen una mejora. Estos resultados nos empujaron a abandonar, al menos por el momento, el propósito de adaptar la síntesis de 2-ariltetrahydroquinolinas a las condiciones de mecanoquímica.

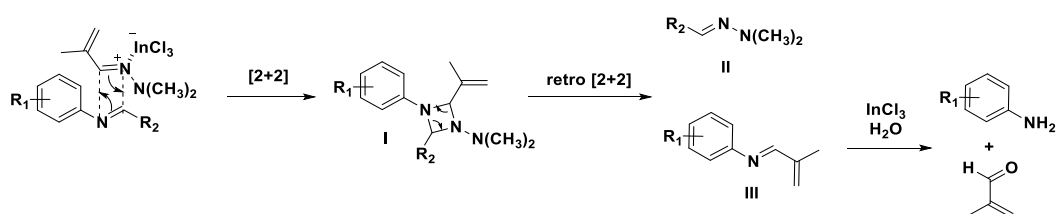


Esquema 3.12. Obtención de la 2-ariltetrahydroquinolina **5**.

Para entender el porqué de estos rendimientos tan bajos, hay que recordar que la reacción de Povarov aza-viníloga conducente a la obtención de 2-ariltetrahydroquinolinas genera cantidades apreciables de otros productos secundarios, siendo este hecho y su total diastereoselectividad dos características que la diferencian de la síntesis de 2-aciltetrahydroquinolinas por el mismo método. Entre los productos secundarios que aparecen en este tipo de reacción de Povarov destacan dos: las benzaldehído- N,N -dimetilhidrazonas **II** y los hexahidropirroló[3,2- b]indoles **VII**¹⁷¹. Los compuestos **II** se forman por una reacción de transiminación que transcurre a través del siguiente mecanismo: se produce una reacción de cicloadición [2+2] entre la arilimina y la hidrazona, activada esta última por el ácido de Lewis/Brönsted, para generar el

¹⁷¹ Sridharan, V., Ribelles, P., Estévez, V., Villacampa, M., Ramos, M. T., Perumal, P. T., Menéndez, J. C. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5056.

intermedio cíclico **I**. Esta 1,3-diazetidina se fragmenta a continuación mediante una reacción de retrocicloadición para dar lugar al producto de transiminación **II** y a la imina **III**, que se descompone rápidamente en la anilina de partida y acroleína, cuya volatilidad impide su detección.

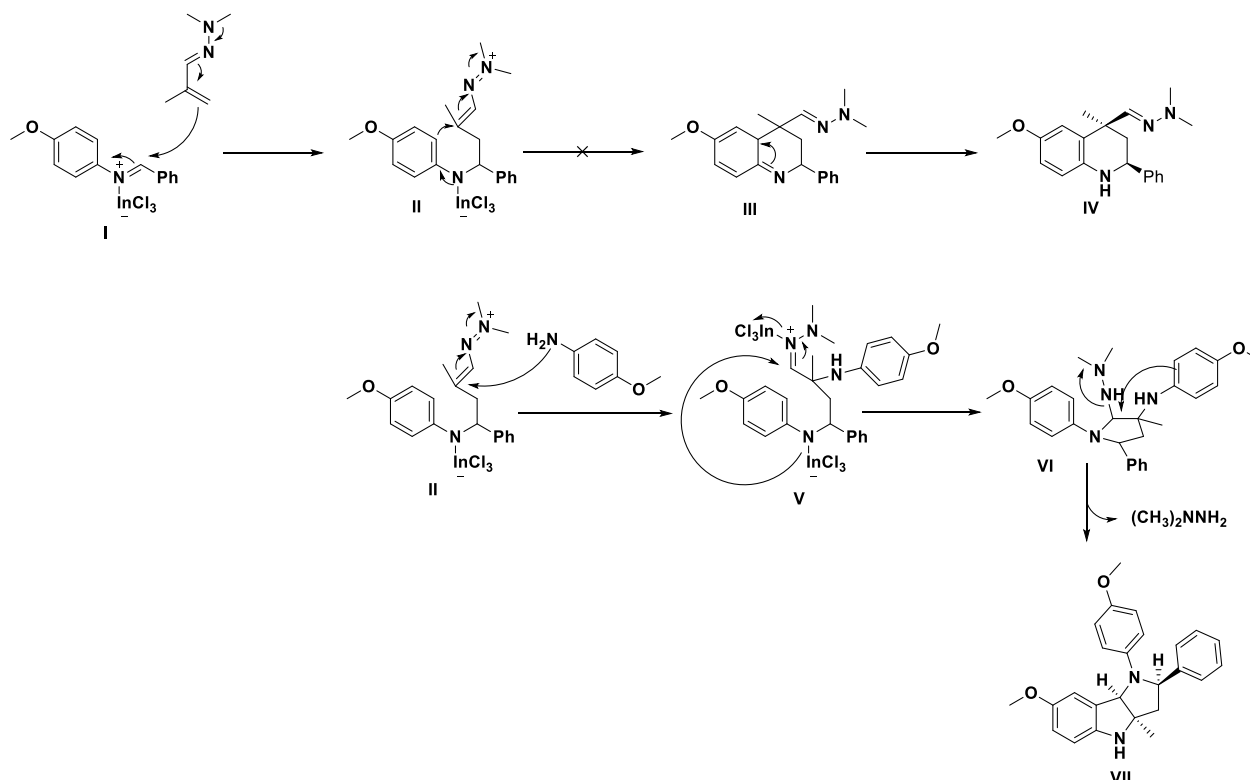


Esquema 3.13. Mecanismo de formación de las benzaldehído- N,N -dimetilhidrazonas **III** como producto secundario de la reacción de Povarov aza-vinílica.

La formación de los pirroloindoles **VII** comienza de la misma manera que la de las tetrahydroquinolinas **IV**, con el ataque de la hidrazona sobre la imina activada por el ácido de Lewis/Brönsted para formar el intermedio **II**. Es aquí donde se dividen los caminos para ambos productos: mientras que en el caso del producto de Povarov deseado se produce una reacción de Friedel-Crafts intramolecular, en el caso que nos ocupa es una segunda molécula de anilina (que procede de la transiminación detallada anteriormente) la que ataca sobre la posición electrófila conjugada con el catión diazenio, generando el intermedio alternativo **V**. Una ciclación del tipo 5-*exo-trig* facilitada por el catalizador forma el derivado de pirrolidina **VI**, que deriva en el producto secundario **VII** mediante la pérdida de una molécula de N,N -dimetilhidracina, seguida de una ciclación intramolecular del tipo Friedel-Crafts (esquema 3.14). En los diversos intentos llevados a cabo para obtener las 2-ariltetrahydroquinolinas en condiciones mecanoquímicas se observó siempre que el producto de transiminación se formaba en una proporción superior a la de los otros productos posibles. Por algún motivo que no hemos podido esclarecer, estas condiciones de reacción favorecen la formación del producto alternativo de transiminación por encima del habitual en la reacción de Povarov.

Aunque en un primer momento la formación de los hexahidropirroloindoles resultara un inconveniente cuando se investigaba la reacción de Povarov en disolución, la complejidad de su estructura invitó a la optimización de las condiciones de reacción para intentar convertirla en el producto mayoritario. En disolución esto se había conseguido

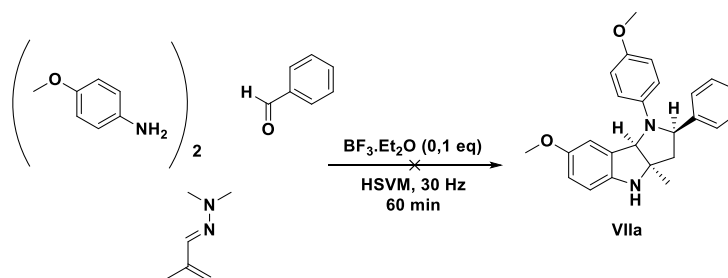
haciendo reaccionar la anilina, el aldehído y la hidrazona mediante un protocolo multicomponente catalizado por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ y usando cloroformo como disolvente¹⁷¹.



Esquema 3.14. Mecanismo de formación de los hexahidropirroló[3,2-b]indoles **VII** como producto secundario de la reacción de Povarov aza-vinílica.

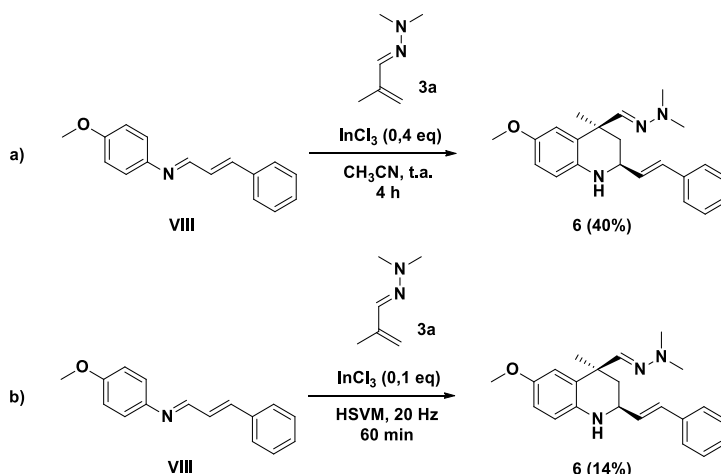
Volviendo sobre el mecanismo anteriormente explicado, se observa que cuando éste se divide en dos vías, conducentes a la formación de **VII** o del producto de Povarov, se produce realmente una competición entre un ataque intramolecular y otro intermolecular. La lógica dice que si se trabaja en unas condiciones de elevada concentración se podría favorecer más la segunda opción, de modo que se optimizaría el acceso a los pirroloindoles. Siendo la mecanoquímica el procedimiento por excelencia para lograr la máxima concentración de reactivos posible debido a la ausencia de disolvente, se razonó que podía constituir una nueva herramienta para acceder eficazmente a este tipo de compuestos. Mas la realidad no respondió a tales expectativas: la reacción entre *p*-anisidina, benzaldehído y la hidrazona **3a** en el molino vibratorio a 30 Hz durante 1 hora, utilizando el reactor y las bolas de acero inoxidable, y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ al 10% como catalizador, apenas dio lugar a la formación de trazas del triciclo deseado **VIIa**, que ni tan siquiera pudieron ser adecuadamente purificadas. Como en el caso anterior, se asumió que las particulares condiciones en las que transcurre el

proceso de activación mecanoquímica no se adecuaban a los requerimientos de este mecanismo.



Esquema 3.15. Intento fallido para la síntesis del compuesto tricíclico **VIIa** en condiciones de mecanoquímica.

Para finalizar este epígrafe, mencionaremos brevemente el intento que se hizo para llevar a cabo por primera vez una reacción de Povarov viníloga combinada de tipo I y II, en la que la imina también presenta una insaturación extendida. La versión en disolución de esta reacción había arrojado unos resultados mejorables, pues la reacción de la imina **VIII** con la hidrazona **3a** proporcionó un rendimiento del compuesto **6** de un 40%¹⁷². Se decidió entonces ensayar la reacción en el molino vibratorio, utilizando las condiciones que mejor habían funcionado para las 2-ariltetrahidroquinolinas: recipiente y bolas de acero inoxidable, frecuencia de 20 Hz, 60 minutos de reacción y catálisis con un 10% de ácido *p*-toluenosulfónico o de InCl_3 . Los resultados fueron en este caso paupérrimos, con un rendimiento máximo del 14%.



Esquema 3.16. Obtención del compuesto **6** en a) disolución y b) condiciones de mecanoquímica.

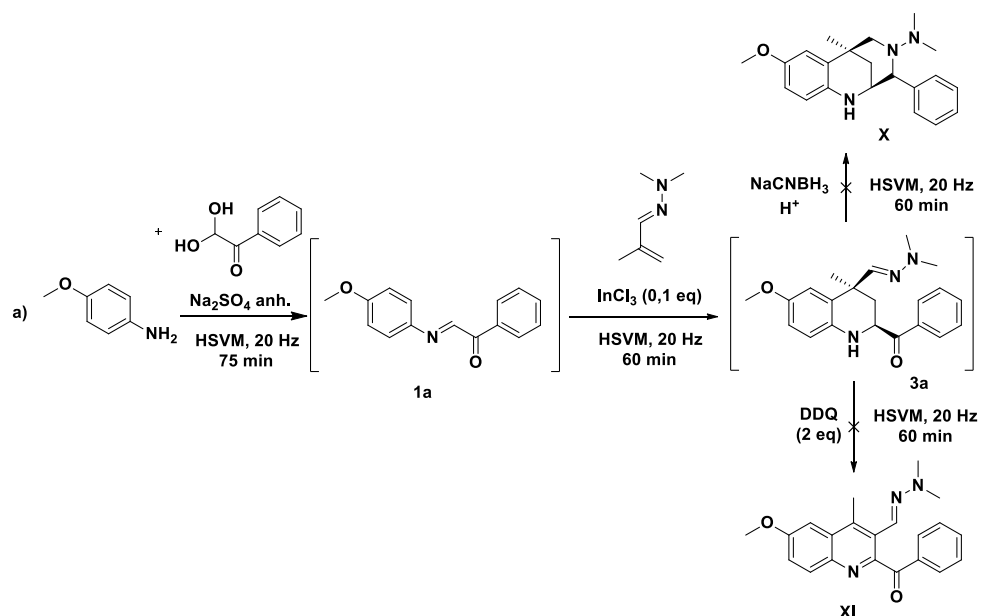
¹⁷² Clerigué, J., Ramos, M. T., Menéndez, J. C. *Molbank*. **2021**, 2, 1220.

3.4 Aplicaciones sintéticas de los productos de la reacción de Povarov aza-viníloga en condiciones de mecanoquímica.

Una vez se demostró que la reacción de Povarov aza-viníloga se podía llevar a cabo en condiciones de mecanoquímica, se consideró interesante investigar qué transformaciones sobre sus productos se podían adaptar también a esta estrategia, intentando de este modo desarrollar protocolos que permitiesen integrar varios pasos de reacción en una única secuencia *one-pot*.

En primer lugar, se ensayó la obtención del compuesto **X** mediante una secuencia *one-pot* que comprendía la síntesis de la tetrahydroquinolina **3a** y una posterior ciclación reductora que se explicará con detalle en el capítulo siguiente, a través del tratamiento del primer crudo de reacción con un exceso de NaCNBH₃. La primera tentativa, en la que se añadieron unas gotas de una solución de HCl acuoso en metanol para tratar de catalizar la reacción, condujo a la obtención de una mezcla compleja donde apenas se hallaron trazas del producto deseado. Observando que esta molienda asistida por líquido no había dado resultado, se optó por utilizar un ácido de Brønsted sólido, concretamente un equivalente de ácido *p*-toluenosulfónico. El resultado fue nuevamente un crudo de reacción muy complejo, y aunque tras una columna cromatográfica sí se pudo aislar el compuesto **X**, el rendimiento fue inferior al 10%. Aunque obviamente haría falta ensayar más condiciones de reacción para dar por imposible la formación de compuestos tricíclicos como **X** en un solo paso, estos intentos fallidos nos llevaron a abandonar esta línea de trabajo.

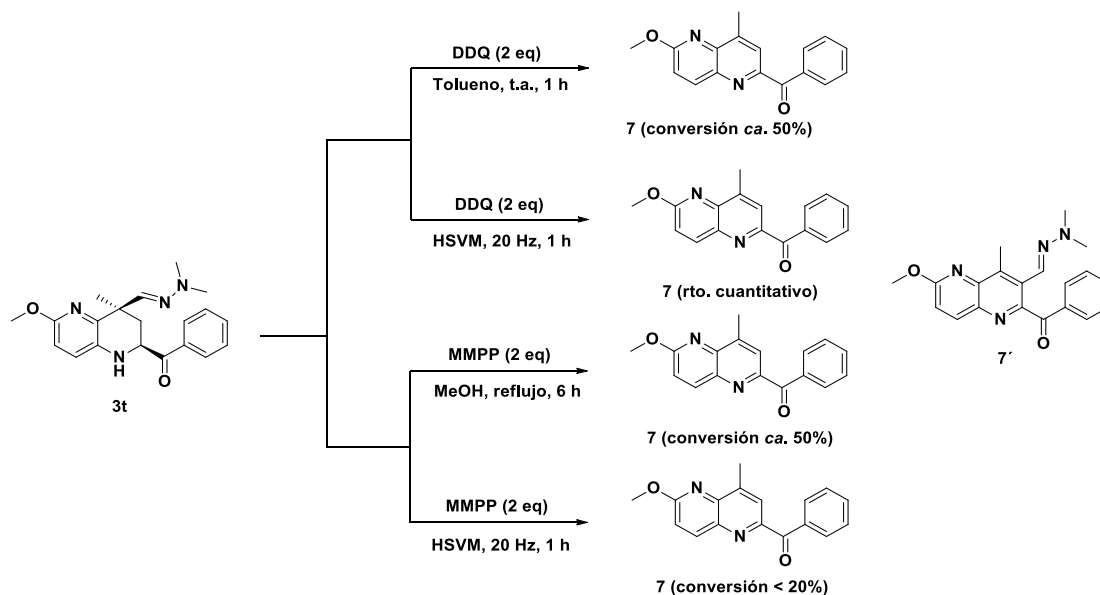
Siguiendo un planteamiento análogo, se exploró la síntesis del producto **XI** a través de un proceso secuencial, en el que la síntesis de **3a** se seguiría de su deshidrogenación/transposición gracias a la adición de dos equivalentes de DDQ (también se detallará este proceso en el próximo capítulo). Nuevamente, el resultado fue un crudo de reacción complejo en el que sólo se observaron trazas de **XI**.



Esquema 3.17. Intentos de aprovechamiento sintético de las 2-aciltetrahydroquinolinas mediante protocolos *one-pot* en condiciones de mecanoquímica.

Por último, se decidió investigar la transformación de **3t** en distintos derivados de 2-acil-1,5-naftiridina, un esqueleto que resulta especialmente interesante por la escasez de métodos descritos para su síntesis. Basándonos en la experiencia previa en este tipo de reacciones¹⁰⁰, se esperaba poder obtener el compuesto **7** mediante el tratamiento de **3t** con dos equivalentes de monoperoxifalato de magnesio (MMPP), y el compuesto **7'** si se usaban dos equivalentes de DDQ. Se decidió utilizar el mismo procedimiento para ambas reacciones: se obtuvo **3t** en condiciones mecanoquímicas, y se añadió sobre el crudo de reacción el reactivo correspondiente, sometiendo la mezcla a una nueva agitación a una frecuencia de 20 Hz en el molino vibratorio. El tratamiento con MMPP no proporcionó ninguna sorpresa, observándose la formación progresiva del compuesto **7**, si bien la velocidad de reacción era demasiado lenta como para revestir alguna utilidad sintética: tras dos horas de reacción la mayoría del producto de partida permanecía sin reaccionar. Se observó además que se precisaba la adición de Celite® como auxiliar de molienda, pues sin ella se formaba una mezcla pastosa que no reaccionaba correctamente. En cambio, la reacción con DDQ contravino las expectativas, conduciendo a la formación de **7** con un rendimiento cuantitativo tras sólo una hora de reacción, y sin observarse en absoluto la formación del producto inicialmente esperado, **7'**. Este protocolo resulta de gran interés, al permitir la síntesis de 2-acil-1,5-naftiridinas mediante un protocolo *one-pot* que implica tres pasos de

reacción y que tiene un rendimiento global excelente, al menos en el ejemplo ensayado. Sin duda, una vía a explorar con más profundidad en el futuro.



Esquema 3.18. Aplicación de diversos protocolos de oxidación sobre el compuesto **3t**.

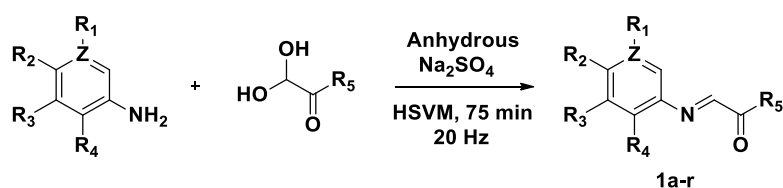
El hecho de que el tratamiento con DDQ condujese a la formación exclusiva de **7** en lugar de **7'** se debe, muy probablemente, a la menor densidad electrónica del fragmento de la naftiridina procedente de la piridina de partida. Esta característica, como se explicará en el próximo capítulo, motiva el fracaso del proceso de transposición que sí se produce cuando ese anillo tiene una elevada densidad electrónica.

No se puede finalizar este epígrafe sin destacar el papel de la mecanoquímica en la obtención del compuesto **7**. Cuando se efectuaron las dos reacciones descritas anteriormente en disolución, empleando las condiciones establecidas en otros trabajos previos, se obtuvieron resultados inferiores a los de sus versiones mecanoquímicas. Concretamente, el tratamiento con MMPP en metanol a reflujo proporcionó una conversión aproximada del 50% tras 6 horas de reacción, mientras que la reacción con DDQ, de forma análoga a lo sucedido en el molino vibratorio, condujo a la formación de **7** en lugar de **7'**, pero no como único producto, sino como parte de una mezcla compleja de productos cuya identificación no se llevó a cabo.

3.5 Experimental section

General experimental details

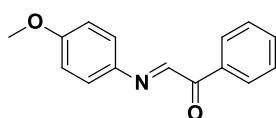
All reagents (Aldrich, Fischer, Alpha Aesar) and solvents (Scharlau, Fischer) were of commercial quality and were used as received. Reactions were monitored by thin layer chromatography on aluminium plates coated with silica gel and fluorescent indicator (Macherey-Nagel Xtra SIL G/UV254). Mechanochemical reactions were carried out in a vibratory ball mill Anton Paar BM500 (Madrid, Spain) and a planetary ball mill Retsch PM 100 (Asturias, España), using grinding jars and balls of zirconium oxide and stainless steel with different volumes and diameters. Microwave-assisted reactions were performed on a CEM Discover focused microwave reactor. Separations by flash chromatography were performed using a Combiflash Teledyne automated flash chromatograph or on conventional silica gel columns (Scharlau 40–60 μm , 230–400 mesh ASTM). Melting points were determined using a Stuart Scientific apparatus, SMP3 Model, and are uncorrected. Infrared spectra were recorded with an Agilent Cary630 FTIR spectrophotometer with a diamond accessory for solid and liquid samples. NMR spectroscopic data were recorded using a Bruker Avance 250 spectrometer operating at 250 MHz for ^1H NMR and 63 MHz for ^{13}C NMR (CAI de Resonancia Magnética Nuclear, Universidad Complutense); Topspin (Bruker, Rivas-Vaciamadrid, Madrid, Spain) or Mestrenova (Mestrelab, Santiago de Compostela, Spain) software packages were used throughout for data processing; chemical shifts are given in ppm and coupling constants in Hertz. Elemental analyses were determined by the CAI de Microanálisis Elemental, Universidad Complutense, using a Leco 932 combustion microanalyzer. Exact mass data were recorded with a high-resolution mass spectrometer FTMS Bruker APEX Q IV coupled to 2DLC-NS-ESI-MALDI (Mass range: 200-10.000 uma) and a time-of-flight mass spectrometer MALDI-TOF/TOF Bruker ULTRAFLEX coupled to MALDI (Mass range: 300-150000 uma), operated by the CAI de Espectrometría de Masas, Universidad Complutense.

Synthesis of α -ketoimines **1a-r**


Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Z	R ₅
1a	H	OCH ₃	H	H	C	C ₆ H ₅
1b	CH ₃	H	CH ₃	H	C	C ₆ H ₅
1c	H	H	CH ₃	H	C	C ₆ H ₅
1d	H	CH ₃	H	CH ₃	C	C ₆ H ₅
1e	H	OCH ₃	H	H	C	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃
1f	H	NHBoc	H	H	C	C ₆ H ₅
1g	H	N(CH ₃) ₂	H	H	C	C ₆ H ₅
1h	H	OCH ₃	H	H	C	4-OCH ₃ C ₆ H ₄
1i	H	CH ₃	H	H	C	4-OCH ₃ C ₆ H ₄
1j	H	CH ₃	H	CH ₃	C	4-OCH ₃ C ₆ H ₄
1k	H	OCH ₃	H	H	C	4-FC ₆ H ₄
1l	H	CH ₃	H	CH ₃	C	4-FC ₆ H ₄
1m	H	H	H	CH ₃	C	4-ClC ₆ H ₄
1n	H	OCH ₃	H	H	C	2-furyl
1o	H	OCH ₃	H	H	C	2-thienyl
1p	H	OCH ₃	H	H	C	OEt
1q	-	OCH ₃	H	H	N	C ₆ H ₅
1r	-	OCH ₃	H	H	N	4-CH ₃ C ₆ H ₄

Reactions were carried out in an Anton Paar BM500 ball mill at a frequency of 20 Hz using a 25 mL zirconia grinding jar and a single ball (d = 20 mm, 25.5 g) of the same material.

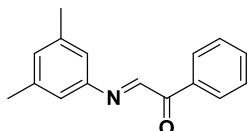
The suitable aniline (1 eq, 0.5 mmol), glyoxal derivative (1-1.5 eq, 0.5-0.75 mmol) and anhydrous sodium sulphate (5 g) were added to a zirconia ball mill vessel of 25 mL with a single zirconia ball. The vessel was fixed to a horizontal mixer arm and it was shaken for 75 min at a frequency of 20 Hz. Then, a little sample of the reaction mixture was collected and analysed by ¹H NMR to confirm the quantitative formation of the corresponding imine **1**.

(E)-2-((4-Methoxyphenyl)imino)-1-phenylethanone (1a)


Prepared from *p*-anisidine (0.062 g, 0.5 mmol) and phenylglyoxal monohydrate (0.076 g, 0.5 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.35 (s, 1H), 8.31 – 8.27 (m, 2H), 7.62 (m, 1H), 7.58 – 7.49 (m, 2H), 7.40 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.84 (s, 3H) ppm.

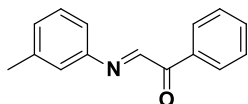
(*E*)-2-((3,5-Dimethylphenyl)imino)-1-phenylethanone (1b)



Prepared from 3,5-dimethylaniline (0.061 g, 0.5 mmol) and phenylglyoxal monohydrate (0.076 g, 0.5 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.36 – 8.32 (m, 3H), 7.70 – 7.61 (m, 1H), 7.58 – 7.51 (m, 2H), 7.04 – 7.00 (m, 3H), 2.41 (m, 6H) ppm.

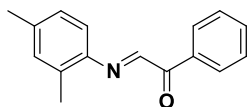
(*E*)-1-Phenyl-2-(*m*-tolylimino)ethanone (1c)



Prepared from *m*-toluidine (0.054 g, 0.5 mmol) and phenylglyoxal monohydrate (0.076 g, 0.5 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.40-8.32 (m, 3H), 7.70-7.62 (m, 1H), 7.59-7.51 (m, 2H), 7.42-7.34 (m, 1H), 7.25-7.14 (m, 3H), 2.45 (s, 3H) ppm.

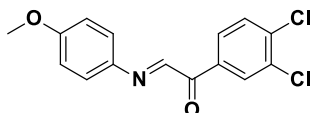
(*E*)-2-((2,4-Dimethylphenyl)imino)-1-phenylethanone (1d)



Prepared from 2,4-dimethylaniline (0.061 g, 0.5 mmol) and phenylglyoxal monohydrate (0.076 g, 0.5 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.36 – 8.33 (m, 2H), 8.23 (s, 1H), 7.61 (m, 1H), 7.54 – 7.47 (m, 2H), 7.13 – 7.03 (m, 2H), 7.00 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.36 (s, 3H) ppm.

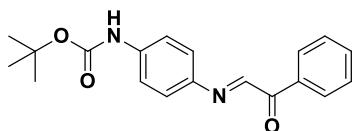
(*E*)-1-(3,4-Dichlorophenyl)-2-((4-methoxyphenyl)imino)ethanone (1e)



Prepared from *p*-anisidine (0.062 g, 0.5 mmol) and 3,4-dichlorophenylglyoxal (0.122 g, 0.6 mmol).

¹H NMR (250 MHz, DMSO) δ: 8.48 (s, 1H), 8.36 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.13 (dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H) ppm.

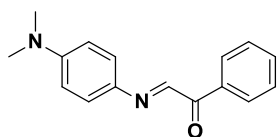
(*E*)-*tert*-Butyl (4-((2-oxo-2-phenylethylidene)amino)phenyl)carbamate (1f)



Prepared from *tert*-butyl(4-aminophenyl)carbamate (0.104 g, 0.5 mmol) and phenylglyoxal monohydrate (0.076 g, 0.5 mmol).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.36 (s, 1H), 8.35 – 8.26 (m, 2H), 7.66 – 7.57 (m, 1H), 7.55 – 7.46 (m, 4H), 7.40 – 7.32 (m, 2H), 7.10 (bs, 1H), 1.53 (s, 9H) ppm.

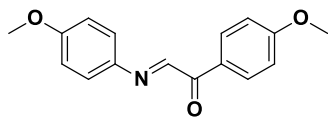
(*E*)-2-((4-(Dimethylamino)phenyl)imino)-1-phenylethanone (1g)



Prepared from *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine (0.068 g, 0.5 mmol) and phenylglyoxal monohydrate (0.076 g, 0.5 mmol).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.44 (s, 1H), 8.38 – 8.28 (m, 2H), 7.67 – 7.58 (m, 1H), 7.56 – 7.42 (m, 4H), 6.80 – 6.68 (m, 2H), 3.04 (s, 6H) ppm.

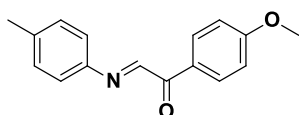
(*E*)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-((4-methoxyphenyl)imino)ethenone (1h)



Prepared from *p*-anisidine (0.062 g, 0.5 mmol) and *p*-methoxyphenylglyoxal hydrate (0.099 g, 0.6 mmol).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.35 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 8.33 (s, 1H), 7.39 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.85 (s, 3H) ppm.

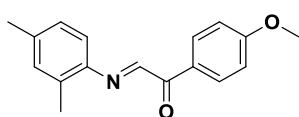
(E)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-(p-tolylimino)ethanone (1i)



Prepared from *p*-toluidine (0.054 g, 0.5 mmol) and *p*-methoxyphenylglyoxal hydrate (0.099 g, 0.6 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.43 – 8.35 (m, 2H), 8.33 (s, 1H), 7.35 – 7.19 (m, 4H), 7.04 – 6.97 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.42 (s, 3H) ppm.

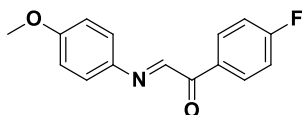
(E)-2-((2,4-Dimethylphenyl)imino)-1-(4-methoxyphenyl)ethanone (1j)



Prepared from 2,4-dimethylaniline (0.061 g, 0.5 mmol) and *p*-methoxyphenylglyoxal hydrate (0.099 g, 0.6 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.43-8.40 (m, 2H), 8.20 (s, 1H), 7.10-7.01 (m, 2H), 7.00-6.96 (m, 3H), 3.90 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.36 (s, 3H) ppm.

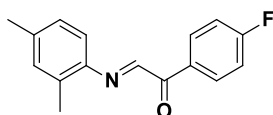
(E)-1-(4-Fluorophenyl)-2-((4-methoxyphenyl)imino)ethenone (1k)



Prepared from *p*-anisidine (0.062 g, 0.5 mmol) and *p*-fluorophenylglyoxal (0.091 g, 0.6 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.39 (dd, $J = 9.0, 5.6$ Hz, 2H), 8.31 (s, 1H), 7.40 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.17 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.86 (s, 3H) ppm.

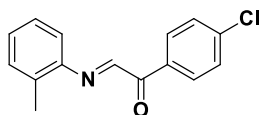
(E)-2-((2,4-Dimethylphenyl)imino)-1-(4-fluorophenyl)ethenone (1l)



Prepared from 2,4-dimethylaniline (0.061 g, 0.5 mmol) and *p*-fluorophenylglyoxal (0.091 g, 0.6 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.44 (dd, $J = 9.0, 5.6$ Hz, 2H), 8.20 (s, 1H), 7.18 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.11 (s, 1H), 7.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.36 (s, 3H) ppm.

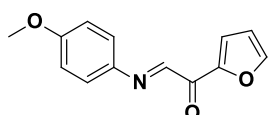
(E)-1-(4-Chlorophenyl)-2-(*o*-tolylimino)ethanone (1m)



Prepared from *o*-toluidine (0.054 g, 0.5 mmol) and 4-chlorophenylglyoxal (0.101 g, 0.6 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.41 – 8.32 (m, 2H), 8.21 (s, 1H), 7.54 – 7.48 (m, 2H), 7.34 – 7.26 (m, 3H), 7.11 – 7.04 (m, 1H), 2.45 (s, 3H) ppm.

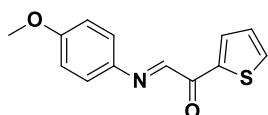
(E)-1-(Furan-2-yl)-2-((4-methoxyphenyl)imino)ethanone (1n)



Prepared from *p*-anisidine (0.062 g, 0.5 mmol) and 2-furyl glyoxal (0.075 g, 0.6 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.29 (s, 1H), 8.00 (dd, $J = 3.5, 0.7$ Hz, 1H), 7.78 (dd, $J = 1.6, 0.7$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.01 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.65 (dd, $J = 3.6, 1.7$ Hz, 1H), 3.89 (s, 3H) ppm.

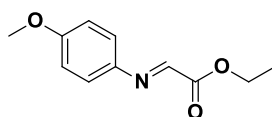
(E)-2-((4-Methoxyphenyl)imino)-1-(thiophen-2-yl)ethanone (1o)



Prepared from *p*-anisidine (0.062 g, 0.5 mmol) and 2-thienyl glyoxal (0.084 g, 0.6 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.36 (dd, $J = 3.9, 1.2$ Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.74 (dd, $J = 5.0, 1.2$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.18 (dd, $J = 5.0, 3.9$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.85 (s, 3H) ppm.

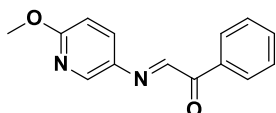
(E)-Ethyl 2-((4-methoxyphenyl)imino)acetate (1p)



Prepared from *p*-anisidine (0.062 g, 0.5 mmol) and ethyl glyoxal monohydrate (0.077 g, 0.75 mmol).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.89 (s, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H) ppm.

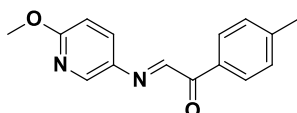
(*E*)-2-((6-Methoxypyridin-3-yl)imino)-1-phenylethanone (1q)



Prepared from 5-amino-2-methoxypyridine (0.062 g, 0.5 mmol) and phenylglyoxal monohydrate (0.076 g, 0.5 mmol).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.38 (s, 1H), 8.33 – 8.23 (m, 3H), 7.73 – 7.60 (m, 2H), 7.57 – 7.47 (m, 2H), 6.89 – 6.80 (m, 1H), 3.99 (s, 3H) ppm.

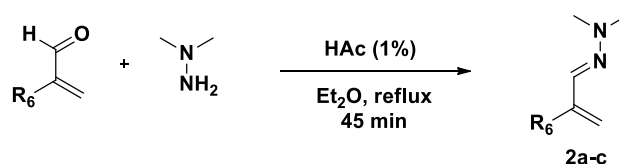
(*E*)-2-((6-Methoxypyridin-3-yl)imino)-1-(*p*-tolyl)ethanone (1r)



Prepared from 5-amino-2-methoxypyridine (0.062 g, 0.5 mmol) and 4-methylphenylglyoxal (0.089 g, 0.6 mmol).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.37 (s, 1H), 8.28 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.69 (dd, *J* = 8.9, 2.7 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 2.45 (s, 3H) ppm.

Synthesis of α,β-unsaturated *N,N*-dimethylhydrazones 2a-c

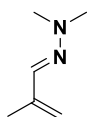


Compound	R ₆
2a	CH ₃
2b	CH ₂ CH ₃
2c	H

To a stirred solution of the corresponding acrolein derivative (1 eq) in diethyl ether (50 mL), *N,N*-dimethylhydrazine (2 eq) and acetic acid (1 mL) were added dropwise, and the

resulting yellow solution was refluxed for 45 minutes. Then, the reaction mixture was cooled to room temperature and it was washed successively with saturated NaHCO_3 (2 x 50 mL) and water (2 x 50 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and the solvent was evaporated on a water bath keeping the temperature below 60°C , to avoid volatilization of the resulting hydrazone. The crude product thus obtained was used in subsequent reactions with no further purification.

(E)-1,1-Dimethyl-2-(2-methylallylidene)hydrazine (2a)



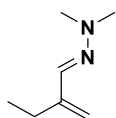
Prepared from methacrolein (4.9 mL, 60 mmol) and *N,N*-dimethylhydrazine (9.1 mL, 120 mmol).

Yield: 6.39 g (95 %). Yellow liquid.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 7.03 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 5.02 (s, 1H), 2.85 (s, 6H), 1.91 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 63 MHz) δ : 142.1, 135.7, 114.3, 42.0, 17.2 ppm.

(E)-1,1-Dimethyl-2-(2-ethylallylidene)hydrazine (2b)



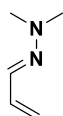
Prepared from 2-ethylacrolein (5.9 mL, 60 mmol) and *N,N*-dimethylhydrazine (9.1 mL, 120 mmol).

Yield: 6.81 g (90 %). Yellow liquid.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 6.98 (s, 1H), 5.08 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 5.01 (d, $J = 0.6$ Hz, 1H), 2.81 (s, 6H), 2.34 (q, $J = 7.4$ Hz), 1.08 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 63 MHz) δ : 148.7, 136.4, 113.7, 42.9, 24.3, 13.1 ppm.

(E)-2-Allylidene-1,1-dimethylhydrazine (2c)



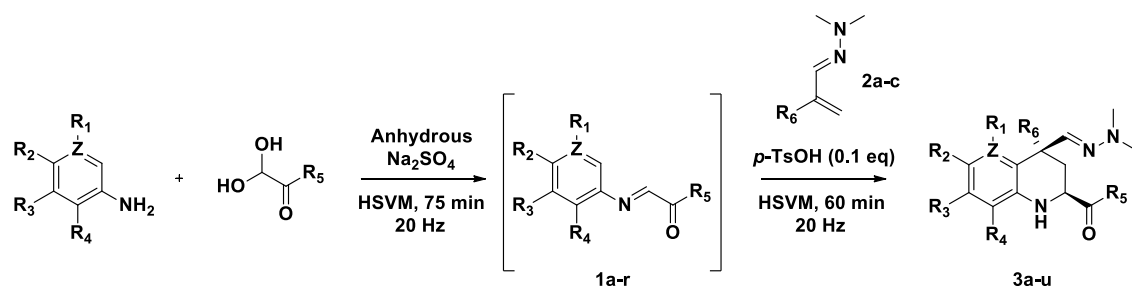
Prepared from acrolein (1.3 mL, 20 mmol) and *N,N*-dimethylhydrazine (3.0 mL, 40 mmol).

Yield: 1.86 g (95 %). Yellow liquid.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 6.96 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.45 (ddd, $J = 17.3, 10.3, 9.0$ Hz, 1H), 5.26 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 5.21 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 2.84 (s, 6H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 63 MHz) δ : 135.8, 135.7, 116.7, 42.7 ppm.

Synthesis of 2-acyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines and 2-acyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,5-naphthyridines 3a-u.

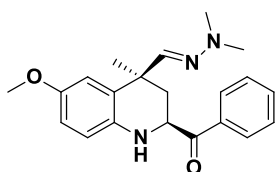


Cmpd.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Z	R ₅	R ₆	R ₇
3a	H	OCH ₃	H	H	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H
3b	H	OCH ₃	H	H	C	C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₃	H
3c	H	OCH ₃	H	H	C	C ₆ H ₅	H	H
3d	CH ₃	H	CH ₃	H	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H
3e	H	H	CH ₃	H	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H
3f	H	CH ₃	H	CH ₃	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H
3g	H	OCH ₃	H	H	C	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃	CH ₃	H
3h	H	NHBoc	H	H	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H
3i	H	N(CH ₃) ₂	H	H	C	C ₆ H ₅	CH ₃	H
3j	H	OCH ₃	H	H	C	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	H
3k	H	CH ₃	H	H	C	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	H
3l	H	CH ₃	H	CH ₃	C	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	H
3m	H	OCH ₃	H	H	C	4-FC ₆ H ₄	CH ₃	H
3n	H	CH ₃	H	CH ₃	C	4-FC ₆ H ₄	CH ₂ CH ₃	H
3o	H	H	H	CH ₃	C	4-ClC ₆ H ₄	CH ₃	H
3p	H	OCH ₃	H	H	C	2-furyl	CH ₃	H
3q	H	OCH ₃	H	H	C	2-thienyl	CH ₃	H
3r	H	OCH ₃	H	H	C	OEt	CH ₃	H
3s	H	OCH ₃	H	H	C	OEt	CH ₂ CH ₃	H
3t	-	OCH ₃	H	H	N	C ₆ H ₅	CH ₃	H
3u	-	OCH ₃	H	H	N	4-CH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	H

After obtaining the starting imines **1** (1 eq, 0.5 mmol), the suitable hydrazone (1.5 eq, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.1 eq, 0.05 mmol) were added directly to the mill vessel. The mixture was shaken at 20 Hz for 1 h, and then, the jar was washed with 10 mL of methanol, and the resulting suspension was stirred for 10 min to recover all the material from the ground sodium sulphate. The methanolic suspension was filtered through a

pad of celite to remove the sodium sulphate, and the solvent was eliminated under reduced pressure. The oily residue was redissolved in ethyl acetate, washed with water (15 mL) and brine (15 mL), and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 10 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous sodium sulphate and evaporated. The resulting crude was purified by silica gel flash chromatography, using the suitable mixture of solvents that are detailed in the description of each compound.

(±)-(2*S*,4*S*)-2-Benzoyl-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3a)



Prepared from imine **1a** (0.5 mmol), hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 85:15.

Yield: 0.158 g (90 %). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.98 – 7.92 (m, 2H), 7.61 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.49 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 6.73 – 6.70 (m, 2H), 6.65 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.09 (dd, *J* = 12.2, 2.7 Hz, 1H), 4.60 (bs, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.72 (s, 6H), 2.07 (dd, *J* = 13.0, 2.8 Hz, 1H), 1.73 (t, *J* = 12.6 Hz, 1H), 1.65 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 199.9, 152.5, 143.6, 136.8, 135.0, 133.9, 129.2, 128.6, 128.5, 117.4, 113.9, 113.8, 56.1, 54.6, 43.6, 41.4, 39.2, 26.6 ppm.

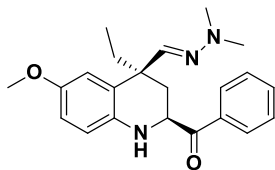
IR (neat) v: 3370.9, 2954.1, 1685.3, 1597.0 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₁H₂₅N₃O₂ (M = 351.44): C, 71.77; H, 7.17; N, 11.96.

Found: C, 71.48; H, 7.03; N, 11.80.

mp: 130-131°C.

(±)-(2S,4S)-2-Benzoyl-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-4-ethyl-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3b)



Prepared from imine **1a** (0.5 mmol) and hydrazone **2b** (0.095 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 9:1.

Yield: 0.108 g (62 %). Orange oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.93 (m, 2H), 7.57(m, 1H), 7.51 – 7.45 (m, 2H), 6.68 (m, 3H), 6.51 (s, 1H), 5.05 (dd, *J* = 12.4, 3.3 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.69 (s, 6H), 2.23 (dd, *J* = 13.3, 3.3 Hz, 1H), 2.06 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.71 (t, *J* = 12.5 Hz, 1H), 1.00 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H) ppm.

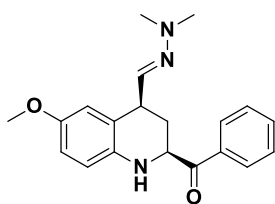
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 200.4, 151.8, 141.2, 136.9, 135.2, 133.6, 129.0, 128.3, 127.4, 116.8, 114.5, 113.3, 56.0, 54.1, 43.8, 43.3, 35.2, 30.8, 9.3 ppm.

IR (neat) v: 3375.1, 2925.6, 1620.4 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₂H₂₇N₃O₂ (M= 349.47): C, 75.61; H, 7.79; N, 12.02.

Found: C, 75.31; H, 7.79; N, 11.90.

(±)-(2S,4S)-2-Benzoyl-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3c)



Prepared from imine **1a** (0.5 mmol) and hydrazone **2c** (0.074 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 9:1.

Yield: 0.076 g (45 %). Red solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.96 – 7.93 (m, 2H), 7.61 (m, 1H), 7.55 – 7.43 (m, 2H), 6.73 – 6.72 (m, 2H), 6.66 (m, 1H), 6.42 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.05 (dd, *J* = 12.0, 2.7 Hz, 1H), 4.61

(bs, 1H), 3.96 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.77 (s, 6H), 2.39 (ddd, $J = 2.7, 5.5, 12.7$ Hz, 1H), 1.64 (q, $J = 12.5$ Hz, 1H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 199.3, 152.3, 139.1, 137.4, 134.7, 133.7, 129.0, 128.5, 123.1, 117.1, 114.1, 114.0, 57.0, 56.0, 43.3, 41.9, 33.0 ppm.

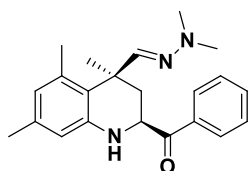
IR (NaCl) ν : 3300.5, 2949.1, 1683.1, 1503.0 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ ($M = 337.42$): C, 71.19; H, 6.87; N, 12.45.

Found: C, 70.86; H, 6.57; N, 12.25.

mp: 95-97 $^\circ\text{C}$.

(±)-(2S,4S)-2-Benzoyl-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-4,5,7-trimethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3d)



Prepared from imine **1b** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 94:6.

Yield: 0.133 g (76 %). White solid.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.00-7.95 (m, 2H), 7.69-7.61 (m, 1H), 7.56-7.50 (m, 2H), 6.63 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 5.06 (dd, $J = 12.3, 2.5$ Hz, 1H), 4.89 (bs, 1H), 2.73 (s, 6H), 2.25 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 1.97 (dd, $J = 12.8, 2.5$ Hz, 1H), 1.76 (s, 3H), 1.68 (t, $J = 12.5$ Hz, 1H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 199.6, 145.5, 143.8, 137.8, 137.6, 135.0, 134.0, 129.3, 128.7, 122.9, 121.6, 114.9, 54.0, 43.6, 42.1, 41.4, 23.4, 22.3, 21.2 ppm.

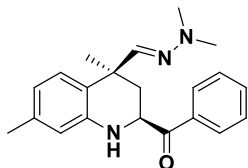
IR (neat) ν : 3333.7, 2918.9, 1682.9 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}$ ($M = 349.48$): C, 75.61; H, 7.79; N, 12.02.

Found: C, 75.58; H, 8.01; N, 12.21.

mp: 153-154 $^\circ\text{C}$.

(±)-(2S,4S)-2-Benzoyl-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-4,7-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3e)



Prepared from imine **1c** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 85:15.

Yield: 0.069 g (41 %). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.02 – 7.94 (m, 2H), 7.69 – 7.59 (m, 1H), 7.57 – 7.47 (m, 2H), 6.96 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.58 – 6.52 (m, 2H), 5.14 (dd, *J* = 12.3, 2.7 Hz, 1H), 4.84 (bs, 1H), 2.75 (s, 6H), 2.29 (s, 3H), 2.11 (dd, *J* = 12.9, 2.9 Hz, 1H), 1.75 (t, *J* = 12.6 Hz, 1H), 1.66 (s, 3H) ppm.

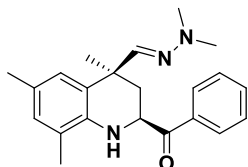
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 199.8, 143.8, 142.8, 137.9, 135.1, 134.0, 129.3, 128.7, 128.3, 124.2, 119.1, 116.4, 54.5, 43.7, 40.9, 39.1, 26.5, 21.6 ppm.

IR (neat) v: 3392.6, 2951.7, 1685.4, 1594.4 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₁H₂₅N₃O (M = 335.44): C, 75.19; H, 7.51; N, 12.53. Found: C, 75.03; H, 7.27; N, 12.86.

mp: 111-113 °C.

(±)-(2S,4S)-2-Benzoyl-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-4,6,8-trimethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3f)



Prepared from imine **1d** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 96:4.

Yield: 0.133 g (76 %). White solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.97 – 7.94 (m, 2H), 7.57 (m, 1H), 7.51 – 7.41 (m, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.13 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 4.57 (s, 1H), 2.73 (s, 6H), 2.22 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.06 (dd, *J* = 12.9, 2.9 Hz, 1H), 1.74 – 1.64 (m, 4H) ppm.

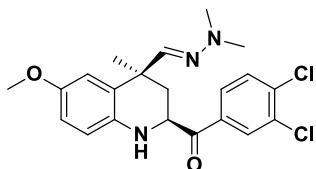
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 199.7, 143.9, 138.2, 134.8, 133.7, 129.7, 129.0, 128.5, 126.4, 126.4, 126.2, 123.4, 54.4, 43.5, 41.1, 39.0, 26.3, 20.6, 17.7 ppm.

IR (neat) v: 3346.8, 2918.2, 1627.5 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₂H₂₇N₃O (M= 349.47): C, 75.61; H, 7.79; N, 12.02. Found: C, 75.31; H, 7.79; N, 11.90.

mp: 136-138 °C

(±)-(2*S*,4*S*)-2-(3,4-Dichlorobenzoyl)-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3g)



Prepared from imine **1e** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 9:1.

Yield: 0.170 g (81 %). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.06 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.79 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 6.68 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.02 (dd, *J* = 12.0, 2.9 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.76 (s, 6H), 2.05 (dd, *J* = 12.9, 2.9 Hz, 1H), 1.81 (t, *J* = 12.5 Hz, 1H), 1.66 (s, 3H) ppm.

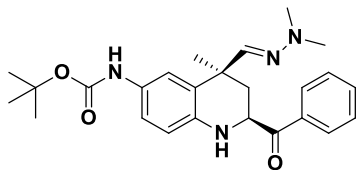
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 198.0, 152.8, 142.8, 138.6, 136.6, 134.7, 134.2, 131.4, 130.8, 128.6, 127.6, 117.5, 114.1, 114.0, 56.2, 55.0, 43.6, 41.4, 39.2, 26.9 ppm.

IR (neat) v: 3326.5, 1686.9, 1601.0 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₁H₂₃Cl₂N₃O₂ (M = 420.33): C, 60.01; H, 5.52; N, 10.00. Found: C, 59.67; H, 5.45; N, 9.86

mp: 102-104 °C

(±)-(2*S*,4*S*)-tert-Butyl 2-benzoyl-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)carbamate (3h)



Prepared from imine **1f** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 7:3.

Yield: 0.157 g (72 %). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.01 – 7.92 (m, 2H), 7.68 – 7.59 (m, 1H), 7.57 – 7.49 (m, 2H), 7.21 (bs, 1H), 6.88 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 5.11 (dd, *J* = 12.3, 2.8 Hz, 1H), 4.75 (bs, 1H), 2.78 (s, 6H), 2.11 (dd, *J* = 12.9, 2.8 Hz, 1H), 1.76 (t, *J* = 12.6 Hz, 1H), 1.65 (s, 3H), 1.52 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 199.8, 153.8, 139.2, 135.1, 134.0, 129.3, 129.3, 129.0, 128.7, 127.4, 120.7, 120.1, 116.6, 80.3, 54.5, 43.7, 41.3, 39.0, 28.8, 26.63 ppm.

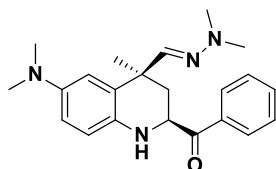
IR (neat) v: 3357.8, 2968.6, 1706.2, 1684.5, 1595.3 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₅H₃₂N₄O₃ (M = 436.56): C, 68.78; H, 7.39; N, 12.83. Found: C, 69.10; H, 7.10; N, 12.57.

mp: 95-98 °C

* In this case, *cis* diastereoisomer could not be fully separated from the *trans* derivative.

(±)-(2*S*,4*S*)-2-Benzoyl-6-(dimethylamino)-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3i)



Prepared from imine **1g** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: dichloromethane: ethyl acetate 4:1.

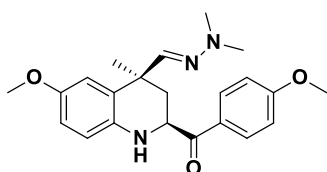
Yield: 0.108 g (59 %). Yellow oil.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.03 – 7.93 (m, 2H), 7.69 – 7.59 (m, 1H), 7.57 – 7.48 (m, 2H), 6.77 (s, 2H), 6.70 – 6.62 (m, 1H), 6.60 (s, 1H), 5.12 (dd, $J = 12.3, 2.6$ Hz, 1H), 2.86 (s, 6H), 2.75 (s, 6H), 2.09 (dd, $J = 12.9, 2.7$ Hz, 1H), 1.83 – 1.66 (m, 4H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 200.0, 144.4, 144.2, 135.7, 135.1, 133.9, 129.3, 128.7, 128.4, 117.7, 115.8, 115.2, 54.7, 43.8, 42.9, 41.5, 39.5, 26.6 ppm.

*This compound decomposes rapidly into a complex mixture after the purification, making impossible its full characterization.

(±)-(2*S*,4*S*)-2-Benzoyl-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3j)



Prepared from imine **1h** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 9:1.

Yield: 0.116 g (61 %). Yellow solid.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 7.94 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.73 – 6.69 (m, 2H), 6.65 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.04 (dd, $J = 12.3, 2.7$ Hz, 1H), 4.58 (bs, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 2.73 (s, 6H), 2.06 (dd, $J = 13.0, 2.8$ Hz, 1H), 1.72 (t, $J = 12.7$ Hz, 1H), 1.64 (s, 3H) ppm.

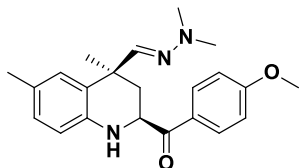
^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 198.2, 164.1, 152.5, 143.4, 137.0, 131.0, 128.6, 127.8, 117.5, 114.4, 113.9, 113.9, 56.1, 55.9, 54.1, 43.6, 41.4, 39.5, 26.5 ppm.

IR (neat) ν : 3375.9, 2960.7, 1676.3, 1600.5 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3$ ($M = 381.47$): C, 69.27; H, 7.13; N, 11.02. Found: C, 68.90; H, 6.90; N, 10.77.

mp: 127-128 °C.

(±)-(2*S*,4*S*)-4-((2,2-Dimethylhydrazono)methyl)-4,6-dimethyl-2-(4-methoxybenzoyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3k)



Prepared from imine **1i** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 95:5.

Yield: 0.130 g (71 %). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.96 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.15-6.78 (m, 4H), 6.68 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.06 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.71 (bs, 1H), 3.89 (s, 3H), 2.75 (s, 6H), 2.23 (s, 3H), 2.07 (dd, *J* = 13.0, 2.8 Hz, 1H), 1.74 (t, *J* = 12.8 Hz, 1H), 1.64 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 197.9, 163.9, 143.6, 140.4, 130.7, 128.4, 127.6, 126.9, 126.8, 116.0, 114.1, 55.6, 53.8, 43.4, 40.9, 39.3, 26.3, 20.6 ppm.

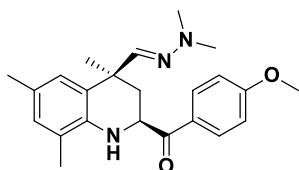
IR (neat) v: 3356.2, 2961.2, 1668.2, 1601.3 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₂H₂₇N₃O₂ (M = 365.48): C, 72.30; H, 7.45; N, 11.50.

Found: C, 72.17; H, 7.31; N, 11.27

mp: 118-121 °C.

(±)-(2*S*,4*S*)-4-((2,2-Dimethylhydrazineylidene)methyl)-2-(4-methoxybenzoyl)-4,6,8-trimethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3l)



Prepared from imine **1j** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 95:5.

Yield: 0.188 g (99 %). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.05 – 7.91 (m, 2H), 7.01 – 6.95 (m, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.10 (dd, *J* = 12.5, 2.8 Hz, 1H), 4.55 (bs, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.74 (s, 6H), 2.21 (s, 6H), 2.07 (dd, *J* = 13.0, 2.8 Hz, 1H), 1.70 (t, *J* = 12.7 Hz, 1H), 1.66 (s, 3H) ppm.

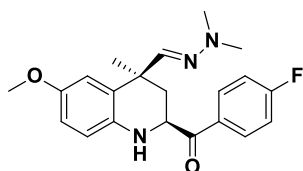
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 198.0, 163.9, 144.2, 138.4, 130.8, 129.7, 127.6, 126.4, 126.3, 126.2, 123.5, 114.2, 55.7, 53.9, 43.5, 41.0, 39.3, 26.2, 20.6, 17.6 ppm.

IR (neat) v: 3365.9, 2954.7, 1669.2, 1611.2 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₃H₂₉N₃O₂ (M = 379.50): C, 72.79; H, 7.70; N, 11.07. Found: C, 72.51; H, 7.34; N, 11.36.

mp: 137-140 °C.

(±)-(2S,4S)-4-((2,2-Dimethylhydrazono)methyl)-2-(4-fluorobenzoyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3m)



Prepared from imine **1k** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 92:8.

Yield: 0.172 g (93 %). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.98 (dd, *J* = 8.8, 5.4 Hz, 2H), 7.17 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.72 – 6.70 (m, 2H), 6.66 – 6.64 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.04 (dd, *J* = 12.2, 2.8 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.72 (s, 6H), 2.04 (dd, *J* = 13.0, 2.8 Hz, 1H), 1.74 (t, *J* = 12.6 Hz, 1H), 1.63 (s, 3H) ppm.

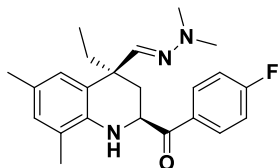
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 198.3, 166.2 (d, *J* = 280.8 Hz, C-4'), 152.6, 143.1, 136.7, 131.3 (d, *J* = 3.6 Hz, C-1'), 131.3 (d, *J* = 10.2 Hz, C-2' and C-6'), 128.6, 117.5, 116.4 (d, *J* = 24.1 Hz, C-3' and C-5'), 114.0, 113.9, 56.1, 54.6, 43.6, 41.3, 39.3, 26.7 ppm.

IR (neat) v: 3358.2, 2960.2, 1686.1, 1597.4 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₁H₂₄FN₃O₂ (M = 369.43): C, 68.27; H, 6.55; N, 11.37. Found: C, 68.53; H, 6.29; N, 10.98.

mp: 121-122 °C.

(±)-(2*S*,4*S*)-4-((2,2-Dimethylhydrazono)methyl)-4-ethyl-2-(4-fluorobenzoyl)-6,8-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3n)



Prepared from imine **1l** (0.5 mmol) and hydrazone **2b** (0.095 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 95:5.

Yield: 0.189 g (99 %). Yellow viscous liquid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.12 – 7.85 (m, 2H), 7.24 – 7.10 (m, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.07 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.53 (bs, 1H), 2.71 (s, 6H), 2.22 – 2.17 (m, 7H), 2.05 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.68 (t, *J* = 12.9 Hz, 1H), 1.01 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H) ppm.

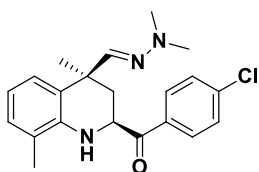
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 198.8, 166.0 (d, *J* = 252 Hz), 142.0, 138.2, 131.4 (d, *J* = 2.9 Hz), 131.0 (d, *J* = 9 Hz), 129.7, 126.6, 125.9, 125.5, 123.1, 116.2 (d, *J* = 25.2 Hz), 54.1, 43.7, 43.4, 35.2, 30.7, 20.7, 17.8, 9.3 ppm.

IR (neat) v: 3370.9, 2964.5, 1673.1, 1603.3 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₃H₂₈FN₃O (M = 381.50): C, 72.41; H, 7.40; N, 11.01.

Found: C, 72.10; H, 7.10; N, 10.57.

(±)-2-(4-Chlorobenzoyl)((2*S*,4*S*)-4-((*E*)-(2,2-dimethylhydrazono)methyl)-4,8-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3o)



Prepared from imine **1m** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 95:5.

Yield: 0.110 g (53 %). Pale yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 8.00 – 7.88 (m, 2H), 7.59 – 7.46 (m, 2H), 7.06 – 6.93 (m, 2H), 6.68 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.59 (bs, 1H), 5.13 (dd, *J* = 12.3, 2.5 Hz, 1H), 4.69 (s, 1H), 2.77

(s, 6H), 2.27 (s, 3H), 2.08 (dd, $J = 12.9, 3.0$ Hz, 1H), 1.76 (t, $J = 12.7$ Hz, 1H), 1.67 (s, 3H) ppm.

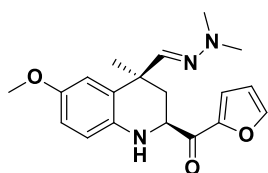
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 198.8, 143.7, 140.8, 140.5, 133.4, 130.2, 129.7, 129.1, 126.6, 126.3, 123.3, 117.6, 54.7, 43.7, 41.3, 39.0, 26.7, 18.0 ppm.

IR (neat) ν : 3425.7, 2946.1, 1684.9, 1591.8 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{BrN}_3\text{O}$ ($M = 414.35$): C, 60.87; H, 5.84; N, 10.14. Found: C, 61.23; H, 6.02; N, 10.22.

mp: 153-156 $^\circ\text{C}$

(±)-(2*S*,4*S*)-4-((2,2-Dimethylhydrazono)methyl)-2-(2-furylcarbonyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3p)



Prepared from imine **1n** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 85:15.

Yield: 0.145 g (85 %). Yellow solid

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 7.65 (dd, $J = 1.6, 0.7$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 3.6, 0.5$ Hz, 1H), 6.73 – 6.66 (m, 3H), 6.62 – 6.58 (m, 2H), 4.87 (dd, $J = 11.9, 2.9$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.77 (s, 6H), 2.22 (dd, $J = 12.7, 3.0$ Hz, 1H), 1.86 (t, $J = 12.3$, 1H), 1.64 (s, 3H) ppm.

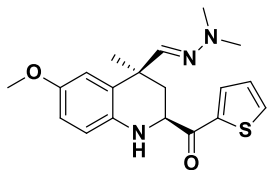
^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 188.5, 152.1, 150.9, 146.5, 143.0, 136.3, 128.1, 118.2, 116.8, 113.5, 113.4, 112.3, 55.7, 54.7, 43.2, 40.6, 38.3, 26.2 ppm.

IR (neat) ν : 3378.0, 2956.3, 1675.8, 1568.2 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$ ($M = 341.40$): C, 66.84; H, 6.79; N, 12.31. Found: C, 66.59; H, 6.56; N, 12.63.

mp: 113-114 $^\circ\text{C}$.

(±)-(2S,4S)-4-((2,2-Dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methyl-2-(thiophen-2-ylcarbonyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (3q)



Prepared from imine **1o** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 8:1.

Yield: 0.129 g (72 %). Brown solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.82 (dd, *J* = 3.8, 1.1 Hz, 1H), 7.68 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 4.9, 3.8 Hz, 1H), 6.71 – 6.68 (m, 2H), 6.65 (m, 1H), 6.56 (s, 1H), 4.90 (dd, *J* = 12.1, 3.0 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.73 (s, 6H), 2.14 (dd, *J* = 13.0, 3.1 Hz, 1H), 1.92 (t, *J* = 12.4 Hz, 1H), 1.62 (s, 3H) ppm.

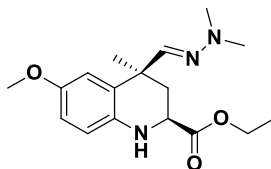
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 192.9, 152.6, 143.2, 141.1, 136.6, 134.4, 132.7, 128.6, 117.3, 113.9, 56.1, 56.0, 43.6, 41.2, 40.2, 26.8 ppm.

IR (neat) v: 3367.8, 2957.3, 1661.8, 1597.0 cm⁻¹

Elemental analysis (%): Calc. for C₁₉H₂₃N₃O₂S (M = 357.47): C, 63.84; H, 6.49; N, 11.75; S, 8.97. Found: C, 63.65; H, 6.22; N, 11.59; S, 8.92.

mp: 107-108 °C

(±)-(2S,4S)-Ethyl 4-((E)-(2,2-dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-2-carboxylate (3r)



Prepared from imine **1p** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 8:1.

Yield: 0.112 g (70 %). Pale yellow viscous liquid.

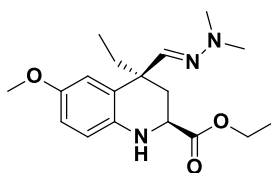
^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 6.73 – 6.60 (m, 4H), 4.29 (bs, 1H), 4.28 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.14 (dd, $J = 11.6, 3.2$ Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.80 (s, 6H), 2.12 (dd, $J = 12.9, 3.3$ Hz, 1H), 1.98 (t, $J = 12.0$ Hz), 1.52 (s, 3H), 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 173.2, 152.1, 143.5, 136.4, 127.9, 116.0, 113.7, 113.4, 61.3, 55.7, 51.1, 43.3, 40.3, 37.3, 26.9, 14.1 ppm.

IR (neat) ν : 3388.0, 2977.8, 2828.9, 1737.3, 1603.1 (C=N) cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$ (M = 319.40): C, 63.93; H, 7.89; N, 13.16.
Found: C, 63.94; H, 7.63; N, 13.03.

(±)-(2S,4S)-Ethyl-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-4-ethyl-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-2-carboxylate (3s)



Prepared from imine **1p** (0.5 mmol) and hydrazone **2b** (0.095 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 9:1.

Yield: 0.107 g (64 %). Orange oil.

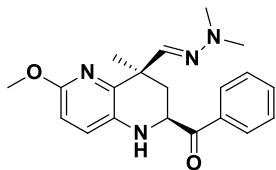
^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 6.73 – 6.58 (m, 4H), 4.26 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.11 (dd, $J = 11.9, 3.5$ Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.78 (s, 6H), 2.32 (dd, $J = 13.3, 3.5$ Hz, 1H), 2.03 – 1.85 (m, 3H), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 174.1, 152.1, 142.3, 136.9, 127.6, 116.2, 114.6, 113.4, 61.8, 56.2, 51.3, 43.7, 43.4, 33.7, 31.6, 14.6, 9.1 ppm.

IR (neat) ν : 3395.4, 2927.3, 1743.8, 1117.3 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3$ (M = 333.43): C, 64.84; H, 8.16; N, 12.60.
Found: C, 64.46; H, 8.14; N, 12.79.

(±)-(2S,4S)-2-Benzoyl-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-1,5-naphthyridine (3t)



Prepared from imine **1q** (0.5 mmol) and hydrazone **2a** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 9:1.

Yield: 0.173 g (98 %). Pale yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.02 – 7.96 (m, 2H), 7.67 – 7.59 (m, 1H), 7.57 – 7.47 (m, 2H), 7.17 (s, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.07 (dd, *J* = 12.1, 2.8 Hz, 1H), 4.46 (bs, 1H), 3.86 (s, 3H), 2.69 (s, 6H), 2.29 (dd, *J* = 13.5, 2.9 Hz, 1H), 2.13 – 1.97 (m, 1H), 1.68 (s, 3H) ppm.

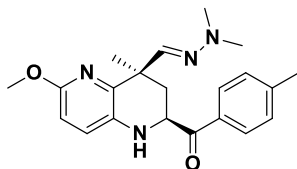
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 199.9, 157.2, 144.5, 143.4, 135.0, 133.9, 132.8, 129.2, 128.8, 128.6, 109.4, 54.7, 53.5, 43.6, 42.1, 37.9, 27.2 ppm.

IR (neat) v: 3318.5, 2964.1, 1678.3, 1595.4 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₀H₂₄N₄O₂ (M = 352.44): C, 68.16; H, 6.86; N, 15.90. Found: C, 68.50; H, 6.46; N, 15.58.

mp: 103-106 °C

(±)-(2S,4S)-4-((2,2-Dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methyl-2-(4-methylbenzoyl)-1,2,3,4-tetrahydro-1,5-naphthyridine (3u)



Prepared from imine **1r** (0.5 mmol) and hydrazone **2b** (0.084 g, 0.75 mmol) and *p*-TsOH (0.010 g, 0.05 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 8:1.

Yield: 0.156 g (85 %). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.90 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.20 (bs, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.04 (dd, *J* = 12.2, 2.8 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 2.70 (s, 6H), 2.46 (s, 3H), 2.28 (dd, *J* = 13.5, 2.8 Hz, 1H), 2.09 – 1.94 (m, 1H), 1.68 (s, 3H) ppm.

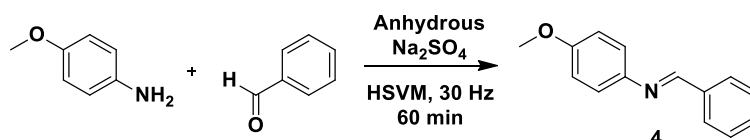
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 199.5, 157.2, 145.0, 144.7, 143.5, 132.9, 132.5, 130.0, 129.0, 128.7, 109.5, 54.6, 53.6, 43.7, 42.2, 38.1, 27.2, 22.1 ppm.

IR (neat) v: 3316.1, 2960.5, 1676.8, 1605.5 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₁H₂₆N₄O₂ (M = 366.46): C, 68.83; H, 7.15; N, 15.29. Found: C, 68.62; H, 6.80; N, 14.90.

mp: 123-125 °C

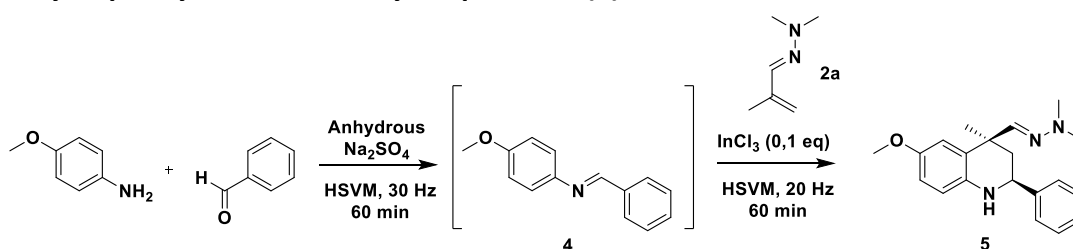
Synthesis of (*E*)-*N*-(4-methoxyphenyl)-1-phenylmethanimine (**4**)



p-Anisidine (0.5 mmol, 0.062 g), benzaldehyde (0.5 mmol, 0.053 g) and anhydrous sodium sulphate (5 g) were added to a stainless steel mill vessel of 25 mL with two balls of the same material (ϕ = 15mm). The vessel was fixed to a horizontal mixer arm and it was shaken for 60 min at a frequency of 30 Hz. Then, a little sample of the reaction mixture was collected and analysed by ¹H NMR to confirm the quantitative formation of the corresponding imine **4**.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ: 8.52 (s, 1H), 7.97-7.90 (m, 2H), 7.53-7.47 (m, 3H), 7.28 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H) ppm.

Synthesis of (±)-(2*S*,4*S*)-4-((*E*)-(2,2-dimethylhydrazineylidene)methyl)-6-methoxy-4-methyl-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (**5**)



After obtaining the starting imine **4** (0.5 mmol), the hydrazone **2a** (0.75 mmol, 0.084 g) and InCl₃ (0.05 mmol, 0.011 g) were added directly to the mill vessel. The mixture was

shaken at 20 Hz for 1 h, and then, the jar was washed with 10 mL of methanol, and the resulting suspension was stirred for 10 min to recover all the material from the ground sodium sulphate. The methanolic suspension was filtered through a pad of celite to remove the sodium sulphate, and the solvent was eliminated under reduced pressure. The oily residue was redissolved in ethyl acetate, washed with water (15 mL) and brine (15 mL), and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 10 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous sodium sulphate and evaporated. The resulting crude was purified by silica gel flash chromatography, using a mixture of petroleum ether: ethyl acetate (20:1) as the mobile phase, to obtain 0.066 g of **5** as a white solid.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ: 7.53-7.32 (m, 5H), 6.75-6.65 (m, 3H), 6.58 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 4.54 (dd, *J* = 11.5, 2.1 Hz, 1H), 3.95 (bs, 1H), 3.77 (s, 3H), 2.77 (s, 6H), 2.10 (t, *J* = 12.7 Hz, 1H), 1.86 (dd, *J* = 13.1, 2.3 Hz, 1H), 1.62 (s, 3H) ppm.

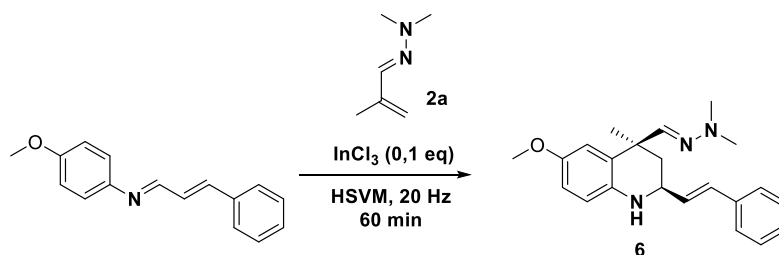
¹³C-NMR (CDCl₃, 63 MHz) δ: 152.0, 144.4, 144.1, 138.5, 128.5, 128.0, 127.5, 126.6, 115.4, 114.3, 113.4, 55.8, 53.2, 44.2, 43.3, 41.0, 28.1 ppm.

IR (NaCl) v: 3356.8, 2951.0, 2826.8, 1503.6 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₀H₂₅N₃O (M = 366.46): C, 74.27; H, 7.79; N, 12.99. Found: C, 74.27; H, 7.57; N, 13.09.

mp: 90-91 °C.

Synthesis of (±)-(2*S*,4*S*)-4-((*E*)-(2,2-dimethylhydrazineylidene)methyl)-6-methoxy-4-methyl-2-((*E*-styryl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (6**)**



(*E*)-4-methoxy-*N*-((*E*)-3-phenylallylidene)aniline (0.5 mmol, 0.119 g), hydrazone **2a** (0.75 mmol, 0.084 g) and InCl₃ (0.05 mmol, 0.011 g) were added directly to a stainless steel mill vessel of 25 mL with two balls of the same material (ϕ= 15mm). The vessel was fixed to a horizontal mixer arm and it was shaken for 60 min at a frequency of 20 Hz. Then, the jar was washed with 10 mL of methanol, and the resulting suspension was stirred

for 10 min to recover all the material from the ground sodium sulphate. The methanolic suspension was filtered through a pad of celite to remove the sodium sulphate, and the solvent was eliminated under reduced pressure. The oily residue was redissolved in ethyl acetate, washed with water (15 mL) and brine (15 mL), and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 10 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous sodium sulphate and evaporated. The resulting crude was purified by silica gel flash chromatography, using a mixture of petroleum ether: ethyl acetate (92.5:7.5) as the mobile phase, to obtain 0.025 g (14%) of **6** as a yellow oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.45–7.27 (m, 5H), 6.74–6.64 (m, 4H), 6.57 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.27 (dd, *J* = 15.8, 7.3 Hz, 1H), 4.19–4.08 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.79 (s, 6H), 2.05–1.90 (m, 1H), 1.82 (dd, *J* = 13.1, 2.9 Hz, 1H), 1.56 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 152.6, 145.3, 138.2, 137.2, 132.4, 131.0, 129.1, 128.7, 128.1, 126.8, 116.1, 114.7, 113.9, 56.3, 51.6, 43.9, 41.9, 41.0, 28.5 ppm.

IR (neat) v: 3369.8, 2951.1, 2826.0, 1600.2, 1501.6, 1235.3 cm⁻¹.

HRMS (MALDI-TOF): calculated for C₂₂H₂₇N₃O, 349.2154. Found, 349.2161.

Synthesis of 6-methoxy-4-methyl-1,5-naphthyridin-2-yl)(phenyl)methanone (**7**)



Tetrahydronaphthyridine **3t** (0.100 g, 0.284 mmol) and 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (0.129 g, 0.567 mmol) were added to a 25 mL zirconia milling jar with a single zirconia ball 20 mm in diameter. The vessel was fixed to the horizontal arm of a mixer mill and it was shaken for 60 min at a frequency of 20 Hz. The resulting paste was recovered from the vessel by washing with dichlorometane, which was subsequently removed under reduced pressure. A silica gel flash chromatography using petroleum ether: ethyl acetate 8:2 as the mobile phase was performed to obtain 0.075 g (95%) of **7** as a white solid.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.32 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 8.24–8.12 (m, 3H), 7.70–7.60 (m, 1H), 7.58–7.47 (m, 2H), 7.20 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 4.16 (s, 3H), 2.83 (d, *J* = 0.5 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 193.9, 163.2, 151.9, 146.6, 143.0, 141.1, 139.9, 136.7, 133.4, 131.8, 128.6, 125.2, 117.7, 54.4, 17.7 ppm.

IR (neat) v: 2942.9, 1161.7, 1608.9 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₁₇H₁₄N₂O₂ (M = 278.31): C, 73.37; H, 5.07; N, 10.07.

Found: C, 73.66; H, 5.26; N, 10.05.

mp: 121–123 °C.

**Capítulo 4. APLICACIONES DE LA REACCIÓN
DE POVAROV AZA-VINÍLOGA: SÍNTESIS DE
QUINOLINAS POLISUSTITUIDAS Y
DERIVADOS DE PIRROLOQUINOLINA**

4.1 Introducción

4.1.1 Quinolinas: relevancia y métodos de obtención.

El esqueleto de quinolina es uno de los ejemplos más evidentes de “estructura privilegiada” en la química farmacéutica, debido a su presencia en una enorme cantidad de productos naturales y sintéticos que exhiben un amplio abanico de actividades farmacológicas interesantes ¹⁷³ , ¹⁷⁴ : antimaláricos, antibióticos, antitumorales, antiinflamatorios, anticonvulsivantes, etcétera. Hay que remarcar que no sólo aparecen en moléculas con un potencial uso terapéutico, sino que resulta fácil encontrar derivados de quinolina incorporados al uso clínico habitual: quinina, cloroquina y mefloquina (antimaláricos), pitavastatina (hipolipemiente), lenvatinib (antitumoral) y saquinavir (antiretroviral) son algunos de los ejemplos más relevantes¹⁷⁵. También se puede encontrar algún ejemplo de derivados de quinolina interesantes como agentes teranósticos, como las 2-estirilquinolinas diseñadas hace unos años en nuestro grupo de investigación¹³⁶.

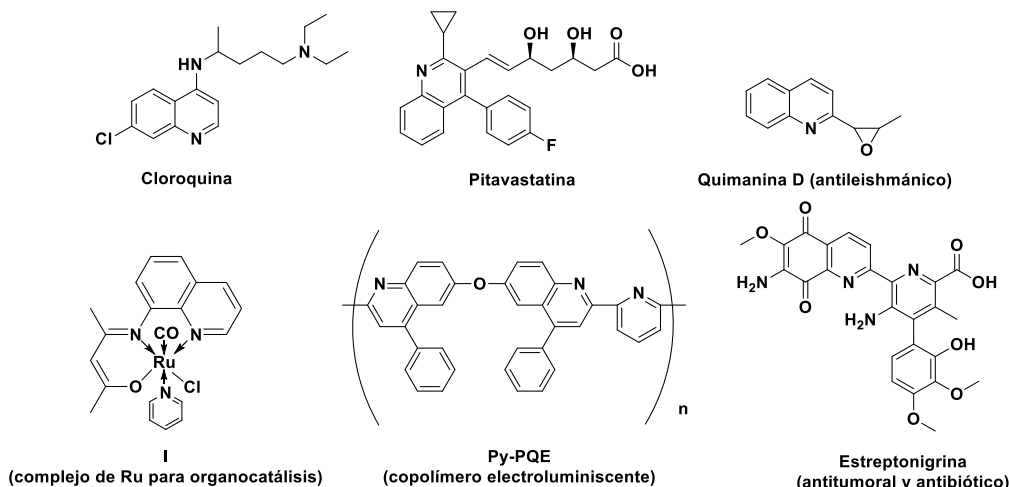


Figura 4.1. Quinolinas naturales y sintéticas de interés farmacológico o químico.

No sólo en la química farmacéutica es frecuente tropezarse con derivados de quinolina, sino que también éstos aparecen en otros campos de la química con aplicaciones de lo

¹⁷³ Kumar, S., Bawa, S., Gupta, H. *Mini Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1648.

¹⁷⁴ Marella, A., Tanwar, O. P., Saha, R., Ali, M. R., Srivastava, S., Akhter, M., Shaquiquzzaman, M., Alam, M. M. *Saudi Pharm. J.* **2013**, *21*, 1.

¹⁷⁵ Bharate, J. B., Vishwakarma, R. A., Bharate, S. B. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 420203.

más variopinto: en copolímeros electroluminiscentes¹⁷⁶, materiales termoestables¹⁷⁷ o incluso como ligandos en organocatálisis¹⁷⁸.

Como es natural, el hecho de que sea un heterociclo con semejante potencial ha espoleado a los químicos orgánicos, desde los albores de este campo de la ciencia, a la búsqueda de métodos sencillos y versátiles para su obtención. Fruto de este trabajo concienzudo, hoy en día se dispone de un gran número de protocolos bien establecidos para la síntesis de quinolinas, entre los que se encuentran algunos de larga tradición como las reacciones de Skraup, Doebner-Von Miller, Pfitzinger, Friedländer, Conrad-Limpach, y Combes¹⁷⁹.

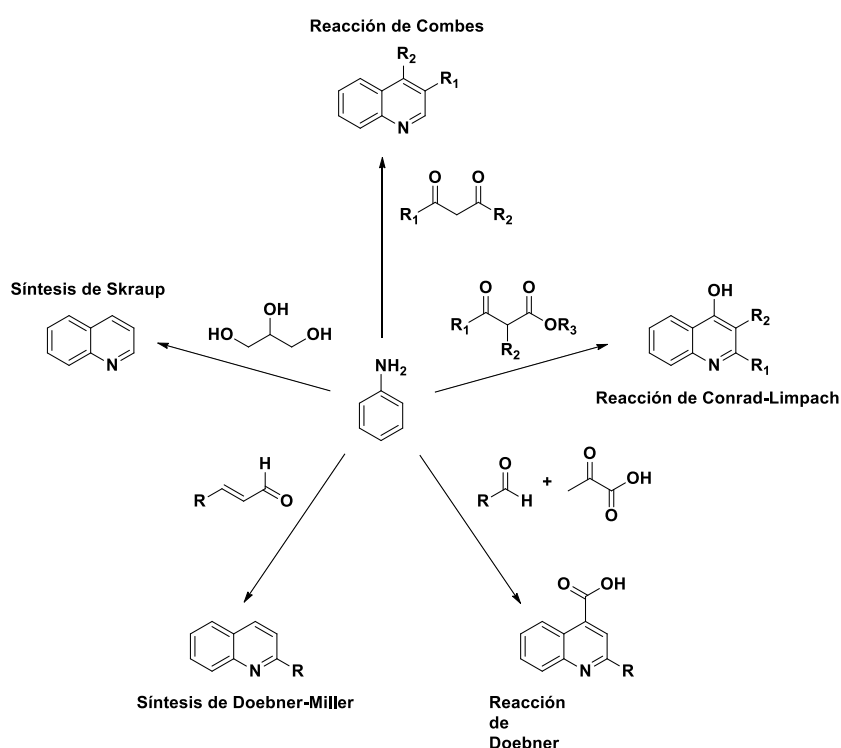


Figura 4.2. Principales métodos tradicionales para la síntesis de derivados de quinolina a partir de anilina.

A pesar de la variedad de métodos disponibles, queda mucho por hacer en este campo en vista de los inconvenientes que presentan estas aproximaciones: condiciones de reacción drásticas que no son compatibles con algunas funciones o estructuras, empleo de reactivos tóxicos, purificaciones tediosas, rendimientos bajos, falta de

¹⁷⁶ Liu, Y., Ma, H., Jen, A. K. Y. *J. Mat. Chem.* **2001**, *11*, 1800.

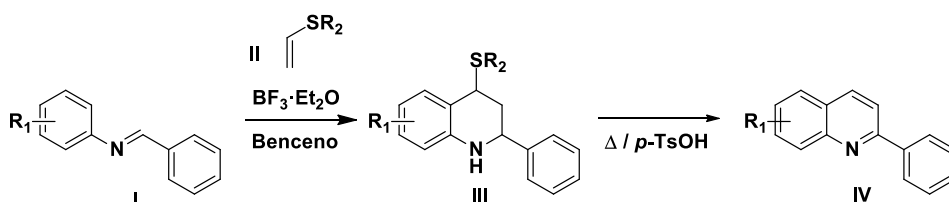
¹⁷⁷ Mehdipour-Ataei, S., Babanzadeh, S., Abouzari-Lotf, E., Khodami, S. *Soft Mat.* **2018**, *16*, 265.

¹⁷⁸ Manikandan, R., Prakash, G., Kathirvel, R., Viswanathamurthi, P. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013**, *116*, 501.

¹⁷⁹ Rajesh, Y. B. *Heterocycles. Synthesis and Biological Activities*. IntechOpen, 2018.

regioselectividad, etcétera. Además, las crecientes necesidades de la química orgánica moderna en términos de diversidad estructural impelen a encontrar métodos más versátiles¹⁸⁰.

Dentro de la enorme variedad de procedimientos ideados en las últimas décadas para sortear estas dificultades, nuestro grupo de investigación se sumergió en el estudio de las posibilidades brindadas por la reacción de Povarov, como ya ha quedado de manifiesto en el capítulo anterior. Aunque se haga referencia a esta reacción como un método de síntesis de tetrahydroquinolinas, merece la pena destacar que el trabajo inaugural del propio Povarov incluye el acceso a sus productos de oxidación, *i.e.* los derivados de quinolina, bien de forma directa sin posibilidad de aislamiento de los intermedios de tetrahydroquinolina a causa de su inestabilidad, o bien de forma intencional a través de su tratamiento ulterior con ácido *p*-toluenosulfónico⁸³.



Esquema 4.1. Primer ejemplo de síntesis de quinolinas a través de la reacción de Povarov.

Son muchos los trabajos que refieren derivados de quinolina como productos de la reacción de Povarov, un resultado que se puede deber a diversos motivos: la elección del dienófilo, siendo los alquinos una buena opción¹⁸¹; el desarrollo de variantes de la reacción cuyo mecanismo implica la oxidación de la tetrahydroquinolina formada¹⁸²; o directamente el acoplamiento de un paso posterior de oxidación, que puede ocurrir a cargo del aire, de un ácido (siendo el *p*-TsOH y el HCl los más comunes) o de un reactivo oxidante (DDQ, CAN, dióxido de manganeso, etcétera)^{136,183}.

Aunque la literatura sobre síntesis de quinolinas sea muy amplia, no todos los patrones de sustitución sobre el anillo son igualmente accesibles con los métodos disponibles hoy en día. Dentro de los compuestos que se van a tratar en este capítulo, hay que destacar

¹⁸⁰ Ramann, G. A., Cowen, B. J. *Molecules* **2016**, *21*, 986.

¹⁸¹ Huma, H. S., Halder, R., Kalra, S. S., Das, J., Iqbal, J. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6485.

¹⁸² Shindoh, N., Tokuyama, H., Takemoto, Y., Takasu, K. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7451.

¹⁸³ Vicente-García, E., Catti, F., Ramón, R., Lavilla, R. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 860.

la escasez de antecedentes en la síntesis de 2-acilquinolinas, circunstancia que sería conveniente superar en vista de las interesantes características farmacológicas exhibidas por algunos compuestos que incluyen esta subestructura^{184,185}. Los métodos sintéticos disponibles hasta ahora tienen diversos inconvenientes: algunos requieren demasiados pasos de reacción^{186,187}, otros no procuran los rendimientos que serían deseables¹⁸⁸, y el abanico de sustituyentes compatibles con el método en la posición 2 del anillo es a menudo demasiado reducido, restringiéndose generalmente las posibilidades a un grupo carboxilato de alquilo, o bien un fenilo^{189,190}. Más adelante se detallará cómo el trabajo llevado a cabo en nuestro grupo de investigación sobre la reacción de Povarov desde hace unos años, incluido el que se presenta en este apartado de la tesis doctoral, ha permitido aportar algunas soluciones interesantes para este problema.

4.1.2 Pirrolo[3,4-*b*]quinolinas: relevancia y métodos de obtención.

Otro tipo de heterociclo, si bien derivado del anterior, que va a aparecer en la sección de química de este capítulo es el núcleo de pirrolo[3,4-*b*]quinolina. Aunque quizá no sean los derivados de quinolina más célebres, su presencia en algunos productos naturales y sintéticos de interés biológico merecen una pequeña revisión de su papel en la química farmacéutica.

Dentro de los derivados de pirrolo[3,4-*b*]quinolina con potencial terapéutico, los más estudiados son la camptotecina y la luotonina A, dos alcaloides procedentes de diversas plantas utilizadas en la medicina tradicional china, y que exhiben una potente actividad citotóxica. Estos compuestos son capaces de unirse al complejo formado por la enzima topoisomerasa I y el ADN, dando lugar a su vez a un complejo ternario estabilizado que desemboca en el bloqueo del desenrollamiento, replicación y transcripción del ADN,

¹⁸⁴ Manfredini, S., Vertuani, S., Pavan, B., Vitali, F., Scaglianti, M., Bortolotti, F., Biondi, C., Scatturin, A., Prasad, P., Dalpiaz, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5453.

¹⁸⁵ Horchler, C. L., McCauley Jr, J. P., Hall, J. E., Snyder, D. H., Moore, W. C., Hudzik, T. J., Chapdelaine, M. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 939.

¹⁸⁶ Mao, Z., Qu, H., Zhao, Y., Lin, X. *ChemComm.* **2012**, *48*, 9927.

¹⁸⁷ Reux, B., Nevalainen, T., Raitio, K. H., Koskinen, A. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4441.

¹⁸⁸ McNulty, J., Vemula, R., Bordón, C., Yolken, R., Jones-Brando, L. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 255.

¹⁸⁹ Richter, H., García Mancheño, O. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 6066.

¹⁹⁰ Matcha, K., Antonchick, A. P. *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2136.

abocando a la célula a la entrada en apoptosis¹⁹¹. Los efectos adversos y la baja solubilidad de estos alcaloides llevaron al diseño de dos nuevos productos semisintéticos, el irinotecan y el topotecan, que están actualmente aprobados para el tratamiento de algunos tipos de cáncer colorrectal, pulmonar y ovárico¹⁹². Por otro lado, dos alcaloides relacionados estructuralmente con la camptotecina, llamados notapoditina A y B, han demostrado una potente actividad contra los herpesvirus HSV-1 y HSV-2, además de contra el citomegalovirus humano¹⁹³. Además, se han sintetizado derivados de pirrolo[3,4-*b*]quinolina activos sobre dianas de muy diversa índole: antitumorales¹⁹⁴, antifúngicos¹⁹⁵, inhibidores de acetilcolinesterasa, activadores de canales de potasio dependientes de ATP, ligandos de receptores de benzodiazepinas, inhibidores de PIKK (quinasas relacionadas con la enzima PI3K), inhibidores de la fosfodiesterasa 5 y moduladores de los receptores del GABA tipo A¹⁹⁶.

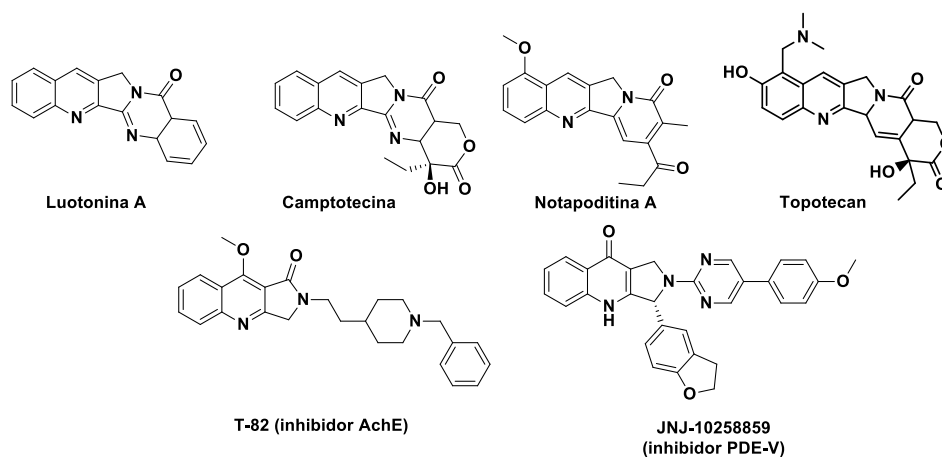


Figura 4.3. Ejemplos representativos de pirrolo[3,4-*b*]quinolinas interesantes desde el punto de vista farmacológico.

Desde el punto de vista estructural, el fragmento de pirrolo[3,4-*b*]quinolina constituye los anillos A, B y C del grupo de compuestos inhibidores de la topoisomerasa I, por lo que una parte importante del esfuerzo sintético desplegado en este campo se ha

¹⁹¹ Cagir, A., Jones, S. H., Gao, R., Eisenhauer, B. M., Hecht, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13628.

¹⁹² Mathijssen, R. H., Loos, W. J., Verweij, J., Sparreboom, A. *Curr. Cancer Drug Targets.* **2002**, *2*, 103.

¹⁹³ Chavan, S. P., Sivappa, R. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3941.

¹⁹⁴ Almansour, A. I., Arumugam, N., Suresh Kumar, R., Mahalingam, S. M., Sau, S., Bianchini, G., Menéndez, J. C., Ghabbour, H. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 932.

¹⁹⁵ Villa, P., Arumugam, N., Almansour, A. I., Kumar, R. S., Mahalingam, S. M., Maruoka, K., Thangamani, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 729.

¹⁹⁶ Eften'eva, R. I., Kushnir, O. V., Lyavinets, O. S., Mangalagiu, I. I., Vovk, M. V. *Monatsh. Chem.* **2017**, *148*, 1745.

encaminado a simplificar la obtención de este tipo de moléculas^{197,198,199}, aunque como se ha explicado anteriormente también se han explorado derivados de este tipo con otros propósitos. Las síntesis publicadas comprenden ciclaciones inter- o intramoleculares en medio ácido^{200, 201}, aminólisis de derivados de quinolina funcionalizados adecuadamente²⁰², y, sobre todo, reacciones de Povarov. Dentro de éstas últimas, se pueden encontrar a su vez cicloadiciones intramoleculares partiendo de derivados propargílicos^{194,195,203} u olefínicos²⁰⁴, o versiones intermoleculares donde una enamina cíclica desempeña el papel de dienófilo¹⁹⁶. Los procesos intramoleculares precisan la obtención previa de los materiales de partida adecuados, pero generan el núcleo de pirrolo[3,4-*b*]quinolina en un solo paso; los intermoleculares, entre los que se encuentra la síntesis descrita en esta tesis de doctorado, parten de materiales sencillos, pero requieren de algún paso adicional para transformar las quinolinas resultantes de la cicloadición en los productos tricíclicos deseados.

4.1.3 Antecedentes en el grupo de obtención de quinolinas por transposiciones térmicas y oxidativas. Certezas y dudas sin resolver sobre el mecanismo.

El trabajo que se expone en este capítulo constituye un paso más en la exploración de las posibilidades generadas por la reacción de Povarov aza-viníloga desarrollada en nuestro grupo de investigación. Por ello, consideramos que es interesante hacer un breve recorrido por el avance de este proyecto hasta el momento actual.

En primer lugar se optimizó la síntesis de 2-*aril*-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas a partir de anilinas de alta densidad electrónica, aldehídos aromáticos y *N,N*-dimetilhidrazonas, catalizada por un diez por ciento de tricloruro de indio, y llevando a cabo la reacción en acetonitrilo a temperatura ambiente. El protocolo de dos componentes, que prevé la

¹⁹⁷ Fortunak, J. M., Mastrocola, A. R., Mellinger, M., Sisti, N. J., Wood, J. L., Zhuang, Z. P. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5679.

¹⁹⁸ Osborne, D., Stevenson, P. J. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5469-5470.

¹⁹⁹ Twin, H., Batey, R. A. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4913.

²⁰⁰ Gein, V. L., Bezmaternykh, E. N., Gein, L. F., Krylova, I. V. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2004**, *40*, 1332.

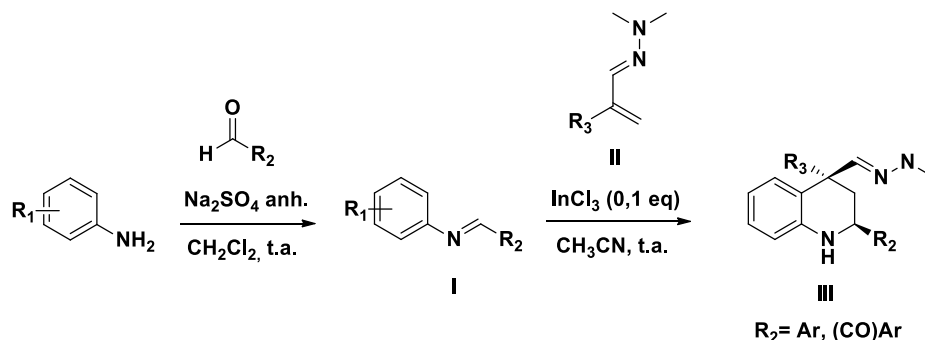
²⁰¹ Jiang, Y. H., Xiao, M., Yan, C. G. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 35609.

²⁰² Van Es, T., Staskun, B. S. *Afr. J. Chem.* **2013**, *56*, 40.

²⁰³ Almansour, A. I., Arumugam, N., Kumar, R. S., Menéndez, J. C., Ghabbour, H. A., Fun, H. K., Kumar, R. R. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6900.

²⁰⁴ Jayagobi, M., Poornachandran, M., Raghunathan, R. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 648.

formación de las *N*-ariliminas previa al paso de cicloadición, demostró mejores resultados en líneas generales comparado con el protocolo multicomponente, que favorecía en mayor medida la formación de otros productos secundarios^{97,171}. Más tarde, se extendió con éxito el método a la síntesis de 2-aciltetrahydroquinolinas reemplazando los aldehídos aromáticos por glioxales en las iminas de partida¹⁰⁰.



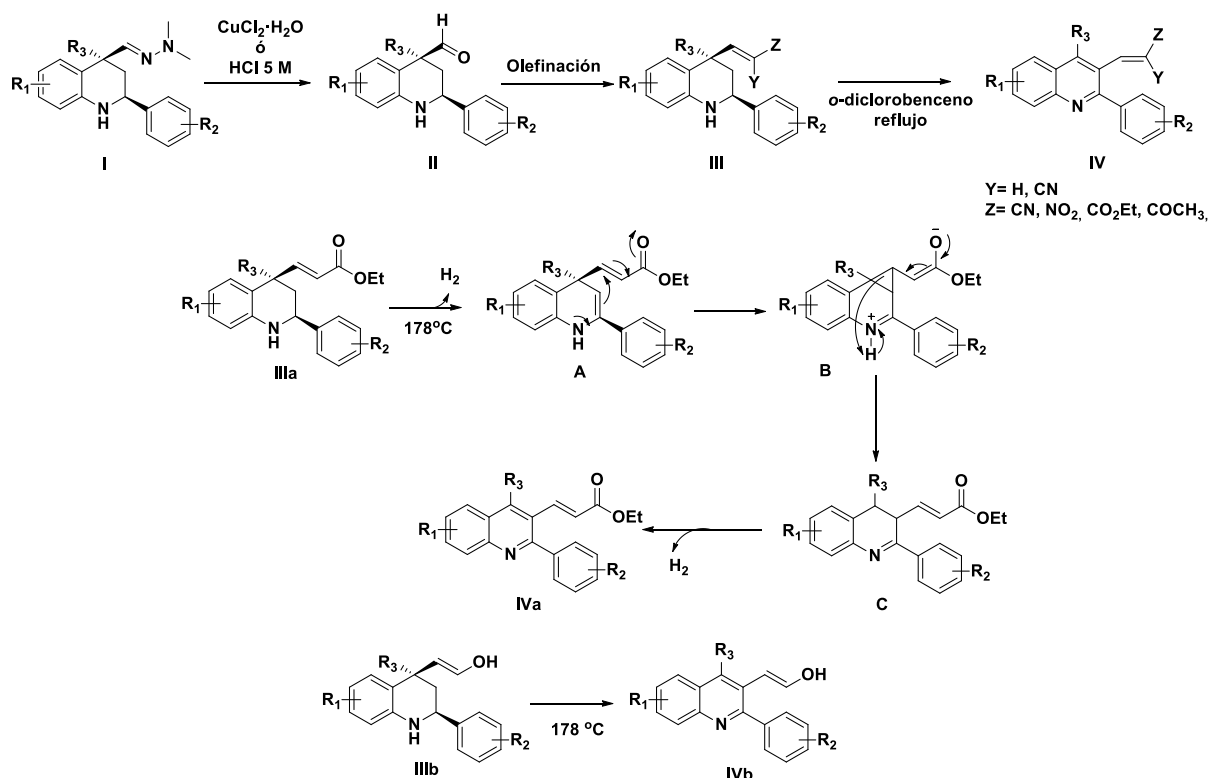
Esquema 4.2. Síntesis de 2-aril/2-aciltetrahydroquinolinas a través de una reacción de Povarov aza-vinílica.

Desde este punto, se abrieron dos vías interesantes de trabajo. En primer lugar, cabía explorar las posibilidades sintéticas de los aductos de Povarov obtenidos, dado el particular patrón de funcionalización que presentaban. En segundo lugar, era interesante investigar la oxidación de estos compuestos a las quinolinas correspondientes. En este capítulo nos centraremos en esta segunda vía.

Comenzando por las tetrahydroquinolinas sustituidas con un grupo aromático en la posición 2, en 2012 nuestro grupo publicó un primer trabajo en el que se describe su oxidación térmica en un proceso que también implicaba una transposición C₄-C₃, dando lugar a una serie de quinolinas polifuncionalizadas²⁰⁵. En primer lugar, se verificaba la hidrólisis de las hidrazonas I con cloruro de cobre o ácido clorhídrico 5M, dando lugar a los aldehídos II. A continuación, se ejecutaban distintas reacciones de olefinación sobre estos aldehídos: Horner-Wadsworth-Emmons, Knoevenagel y Henry, dando lugar a los compuestos III. En la siguiente transformación radica el interés de este trabajo: el simple calentamiento de los compuestos III a reflujo en *o*-diclorobenceno (180 °C) daba lugar a los productos de oxidación y transposición IV, con rendimientos generalmente muy buenos. En aquel momento, el mecanismo que se propuso para este proceso se explica en el esquema 4.3: a una primera deshidrogenación de los compuestos III en

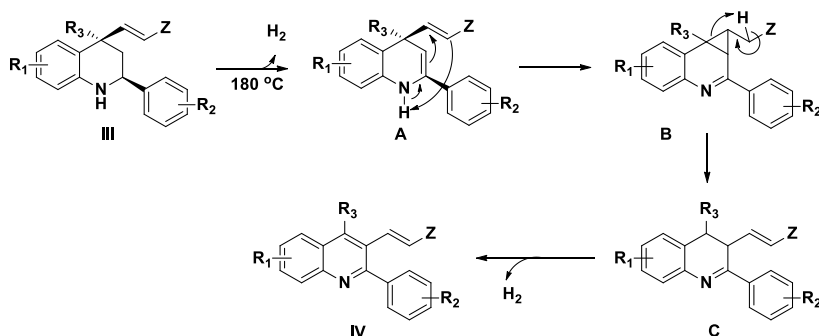
²⁰⁵ Ribelles, P., Ramos, M. T., Menéndez, J. C. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1402.

condiciones térmicas y al aire, le sigue una adición intramolecular de la enamina sobre el aceptor de Michael presente en la posición 4 del anillo (ejemplificado en el esquema con un éster α,β -insaturado). Posteriormente, tiene lugar la migración de este sustituyente del carbono 4 al carbono 3 del anillo, en un proceso que incluye la generación de un intermedio de ciclopropano inestable **B** y su consecuente apertura para dar lugar a la especie **C**. Finalmente, una segunda deshidrogenación rinde las quinolinas **IV**.



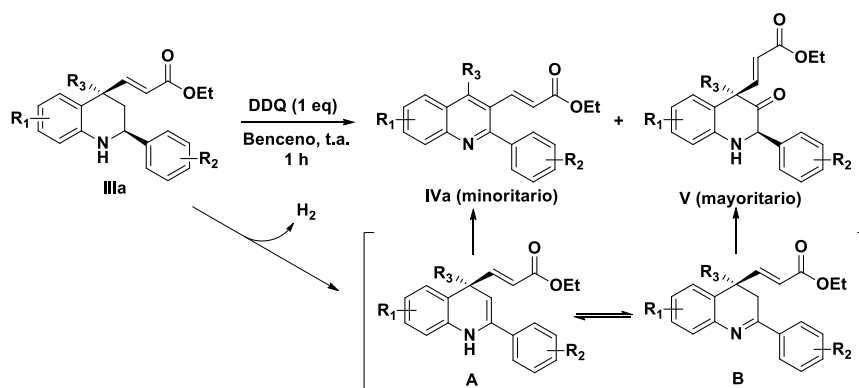
Esquema 4.3. Obtención de los compuestos **IV** a través de un proceso de transposición en condiciones térmicas. Primer mecanismo propuesto para dicha transformación.

Esta explicación fue cuestionada posteriormente por el hecho de que el compuesto **IIIb**, carente de un sustituyente aceptor de electrones que genere una posición electrófila susceptible de ser atacada por la enamina, es capaz de transformarse en la quinolina de transposición correspondiente bajo las mismas condiciones de reacción. Por tanto, fue propuesto un nuevo mecanismo: en este caso, la deshidrogenación de los compuestos **III** daría paso a una reacción aza-eno intramolecular para generar el intermedio ciclopropánico **B**, cuya apertura y deshidrogenación resultarían en la formación de los derivados **IV**.



Esquema 4.4. Propuesta alternativa para el mecanismo de la deshidrogenación/transposición/deshidrogenación en condiciones térmicas.

Por otra parte, cuando se exploraba la conversión de las tetrahidroquinolinas **III** en las quinolinas correspondientes mediante el tratamiento con un equivalente de DDQ (un reactivo típico en estas oxidaciones), se observó que se formaban como producto mayoritario las 3-oxoquinolinas **V**, acompañadas por cierta cantidad de los productos de transposición **IVa**. Este hallazgo se explicaría por la formación, tras la primera deshidrogenación, de la enamina **A**, que establecería un equilibrio con su tautómero **B**. Mientras que la enamina es susceptible de sufrir la reacción aza-eno explicada anteriormente, la dihidroquinolina **B** se podría oxidar en la posición 3 para generar los compuestos **V**²⁰⁶.

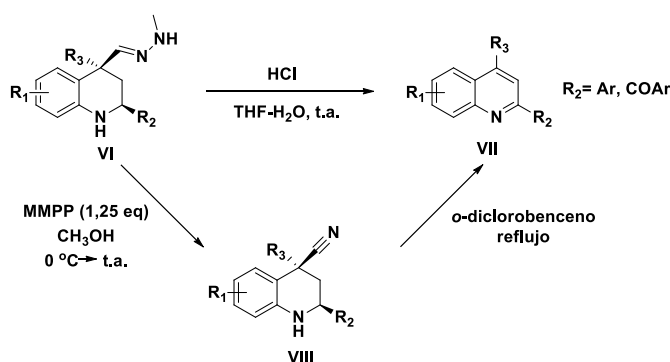


Esquema 4.5. Formación de las 3-oxoquinolinas **V**.

Asimismo, nuestro grupo de investigación también trabajó sobre la oxidación de los derivados de 2-aciltetrahidroquinolina, pues como ya se dijo anteriormente no hay muchos métodos disponibles para la obtención de 2-acilquinolinas, y los que hay carecen de la versatilidad deseable. En primer lugar, cuando se exploraba la hidrólisis en

²⁰⁶ Tesis doctoral de Pascual Ribelles, Universidad Complutense (2012).

medio ácido de las hidrazonas **VI** para después, mediante una desformilación oxidativa, convertirlas en las quinolinas **VII**, se observó que el tratamiento con ácido clorhídrico a temperatura ambiente y al aire en una mezcla de THF y agua generaba directamente los productos de eliminación **VII**, aunque con unos rendimientos irregulares. Buscando un nuevo procedimiento más consistente para la síntesis de las quinolinas **VII**, se comprobó que la reacción de las hidrazonas **VI** con monoperoxifitalato de magnesio (MMPP) rendía los nitrilos **VIII**, que a su vez se podían convertir en las quinolinas **VII** mediante su calentamiento a reflujo en *o*-diclorobenceno, en un proceso que comprende una deshidrogenación seguida de la pérdida de ácido cianhídrico. Ambas reacciones proporcionan unos rendimientos buenos o excelentes y permiten la manipulación de los productos de partida en forma de mezcla diastereomérica. El nuevo método fue ampliado con éxito a la oxidación de 2-ariltetrahidroquinolinas.

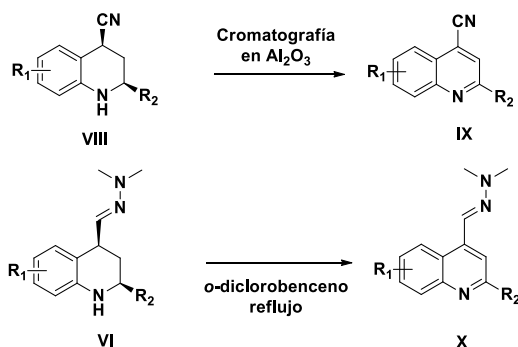


Esquema 4.6. Diferentes métodos para la oxidación de las tetrahidroquinolinas **VI** a las quinolinas **VII**.

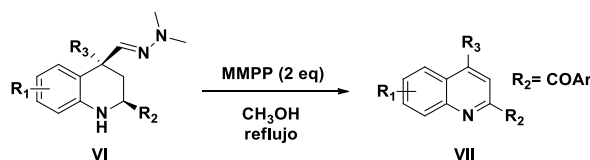
En cambio, se observó que los nitrilos **VIII** donde R₃=H podían ser convertidos en las quinolinas **IX** simplemente sometidos a una columna cromatográfica en alúmina básica, por mor de la acidez del protón sobre el carbono 4 del anillo. Cuando se investigó esta transformación partiendo de las hidrazonas en lugar de los nitrilos, se requirió la aplicación de unas condiciones más drásticas (reflujo en *o*-diclorobenceno) para acometer su oxidación debido a la menor acidez del protón en C-4 cuando es la posición α a un grupo dimetilhidrazona respecto a un grupo nitrilo (esquema 4.7).

Aunque el protocolo resultaba ya bastante útil no carecía de inconvenientes, como la necesidad de unas condiciones muy contundentes y la dificultad para eliminar el disolvente, dado su elevado punto de ebullición. Afortunadamente, se comprobó que el tratamiento de las hidrazonas **VI** con dos equivalentes de MMPP en metanol a reflujo

permitía acceder directamente a los productos de oxidación/eliminación **VII**, lo cual resultaba muy conveniente ya que reduce la operación a un solo paso, requiere condiciones de reacción mucho más suaves y proporciona unos rendimientos bastante altos (esquema 4.8). No obstante, no fue posible extender este método simplificado a la oxidación de 2-ariltetrahydroquinolinas^{100,119}.



Esquema 4.7. Métodos de oxidación a quinolina sin pérdida del grupo nitrogenado sobre la posición 4 de la tetrahydroquinolina.



Esquema 4.8. Obtención de las quinolinas **VII** en un solo paso mediante la oxidación con dos equivalentes de MMPP.

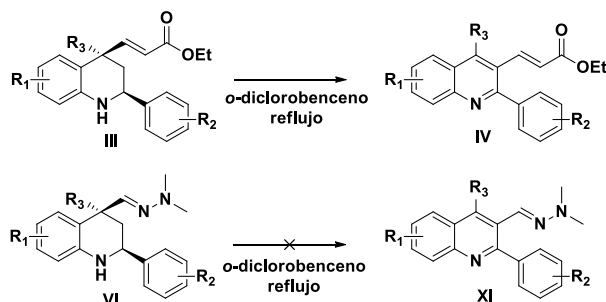
En este capítulo se describirá un nuevo método para la síntesis de quinolinas que incluye la transposición C₄-C₃ de un grupo dimetilhidrazona, mediante un simple tratamiento con dos equivalentes de DDQ. Este método ha demostrado su eficacia tanto para 2-aril como para 2-aciltetrahydroquinolinas.

4.2 Síntesis de quinolinas 2,3,4-trisustituidas a través de un proceso dominó de deshidrogenación/transposición C₄-C₃/deshidrogenación.

En un trabajo experimental previo al desarrollo de esta tesis doctoral se había comprobado que el tratamiento térmico de las hidrazonas **VI** no daba lugar a los productos de oxidación y transposición **XI**, que sí se generaban cuando se sometía a las olefinas **III** a estas mismas condiciones²⁰⁶ (esquema 4.9).

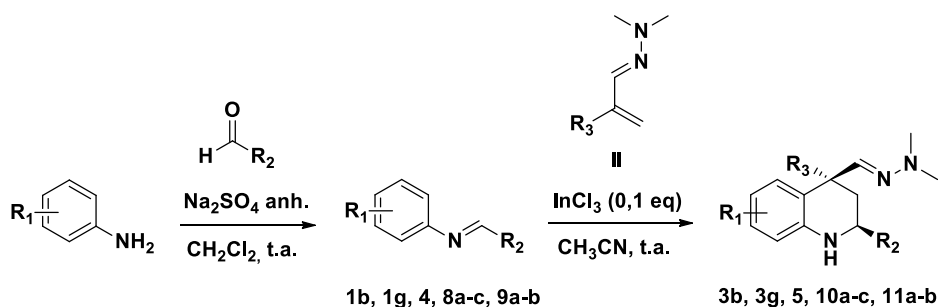
En vista de que el tratamiento de estas últimas con DDQ también era capaz de generar los productos de deshidrogenación/transposición aunque con menores rendimientos,

se decidió ensayar el tratamiento de las hidrazonas con dos equivalentes de DDQ para ver si en estas condiciones de reacción más suaves era posible aislar los productos de transposición.



Esquema 4.9. Diferente resultado en el tratamiento térmico de los derivados de tetrahydroquinolina en función del grupo funcional presente en la posición 4.

Tras la preparación de los pertinentes productos de partida, se observó que las 2-ariltetrahydroquinolinas **5** y **10a-c** se convertían tras una hora de reacción en tolueno a temperatura ambiente en los productos **12a-d** a través de un proceso dominó de deshidrogenación/transposición/deshidrogenación, con unos rendimientos moderados.



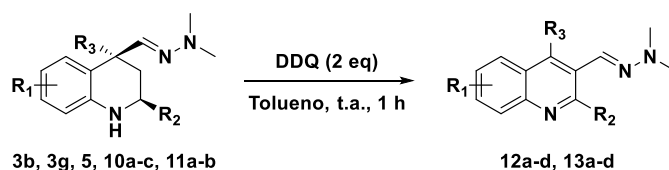
Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	t (h)	Rto.* (%)	d.r. (cis:trans)
5	4-OCH ₃	C ₆ H ₅	CH ₃	3	90	-
10a	4-OCH ₃	2-BrC ₆ H ₄	CH ₃	3	38	-
10b	4-OCH ₃	3-ClC ₆ H ₄	CH ₃	3	53	-
10c	4-OCH ₃	3-CH ₃ C ₆ H ₄	CH ₂ CH ₃	4	55	-
3b	4-OCH ₃	(CO)C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₃	3	63	91:9
3g	4-OCH ₃	(CO)3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃	CH ₃	5	78	86:14
11a	4-OCH ₃	(CO)4-CH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	4	82	80:20
11b	4-OCH ₃	(CO)3-BrC ₆ H ₄	CH ₃	2,5	76	83:17

Esquema 4.10. Tabla 4.1. Preparación de las hidrazonas de partida.

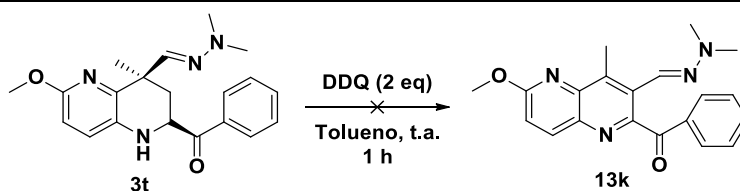
* Los rendimientos consignados corresponden a la mezcla diastereomérica.

Cuando se aplicó el mismo protocolo a las hidrazonas **3b**, **3g** y **11a-b**, que exhiben un grupo acilo en la posición 2 del anillo de tetrahydroquinolina, se obtuvo igualmente un

buen resultado, aislándose las quinolinas **13a-d** en unos rendimientos similares al caso anterior.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	Rto. (%)
12a	6-OCH ₃	2-BrC ₆ H ₄	CH ₃	53
12b	6-OCH ₃	3-ClC ₆ H ₄	CH ₃	73
12c	6-OCH ₃	3-CH ₃ C ₆ H ₄	CH ₂ CH ₃	39
12d	6-OCH ₃	C ₆ H ₅	CH ₃	51
12e	6-OCH ₃	4-ClC ₆ H ₄	CH ₃	57
12f	6-OCH ₃	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	50
13a	6-OCH ₃	(CO)4-CH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	60
13b	6-OCH ₃	(CO)3-BrC ₆ H ₄	CH ₃	48
13c	6-OCH ₃	(CO)C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₃	35
13d	6-OCH ₃	(CO)3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃	CH ₃	46
13e	6-OCH ₃	(CO)C ₆ H ₅	CH ₃	75
13f	6-OCH ₃	(CO)4-OCH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃	73
13g	6,8-(CH ₃) ₂	(CO)4-FC ₆ H ₄	CH ₃	59
13h	6-OCH ₃	(CO)4-FC ₆ H ₄	CH ₃	53
12g	6,8-(CH ₃) ₂	3-ClC ₆ H ₄	CH ₃	-
12h	6,8-(CH ₃) ₂	4-ClC ₆ H ₄	CH ₃	-
12i	6,8-(CH ₃) ₂	C ₆ H ₅	CH ₃	-
12j	6-OCH ₃	2-furil	CH ₃	-
13i	7-CH ₃	(CO)C ₆ H ₅	CH ₃	-
13j	5,7-(CH ₃) ₂	(CO)C ₆ H ₅	CH ₃	-



Esquema 4.11. Tabla 4.2. Esquema 4.12. Síntesis de las 2-aryl/2-acilquinolinas de transposición **12a-f** y **13a-h**. Intentos fallidos para la obtención de los compuestos **12g-j** y **13i-k**.

En la tabla 4.2 se recogen, además, algunos compuestos sintetizados anteriormente¹¹⁹ mediante este protocolo y los intentos que resultaron fallidos cuando se exploró la versatilidad de la reacción en lo que se refiere a los sustituyentes sobre ambos anillos aromáticos. De esta información experimental se puede extraer la conclusión de que parece necesario que el fragmento aromático del anillo de tetrahydroquinolina presente una elevada densidad electrónica, pues sólo la presencia de un grupo fuertemente electrodonador (metoxilo) u ocasionalmente la de dos grupos donadores más débiles

(metilos) permite la formación de los productos de transposición. En el caso de la tetrahidronaftiridina **3t**, parece que la presencia del grupo metoxilo en la posición 6 no es capaz de compensar la baja densidad electrónica del anillo de piridina. En contraste, la variabilidad estructural admitida por el método en la posición 2 del anillo es mucho mayor: además de funcionar tanto en presencia como en ausencia del grupo carbonilo, es compatible con la presencia de sustituyentes electrodonadores y electroaceptores en el anillo aromático. El intento de introducir un heterociclo, concretamente un furano (compuesto **12j**) no llegó a buen puerto, probablemente por la descomposición del anillo de furano en presencia de unas condiciones fuertemente oxidantes. Por último, también es posible introducir un grupo etilo en lugar de un metilo en la posición 4 de la quinolina, si bien se produce un descenso en el rendimiento seguramente explicable por un mayor impedimento estérico en el estado de transición.

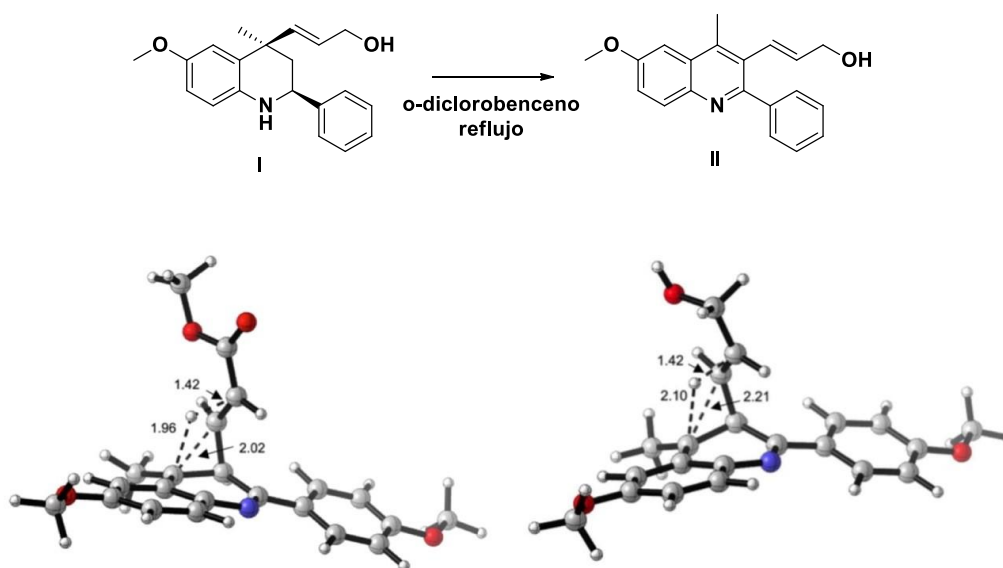
Además de todas estas consideraciones, el hecho de que los rendimientos fueran en general modestos se puede relacionar con tres causas fundamentalmente: la formación en todos los casos de una cierta cantidad del producto de deshidrogenación/eliminación del grupo dimetilhidrazonometilo, la dificultad para separar los restos de DDQ y su hidroquinona conjugada (formada en el curso de la reacción) del producto deseado mediante una columna cromatográfica, y finalmente, en el caso de los compuestos **13**, la transformación parcial de los productos de reacción en otros derivados de pirroloquinolina durante la columna cromatográfica, fenómeno que se abordará en un apartado posterior al haber conducido al hallazgo de un nuevo procedimiento sintético. Hay que señalar que se probaron otros métodos de purificación alternativos como la realización de la columna cromatográfica en gel de alúmina neutra e incluso alúmina desactivada con un 10% de agua, pero la peor calidad de la separación dilapidaba el beneficio derivado de la menor proporción de producto transformado en la correspondiente pirroloquinolina.

Dadas las dudas existentes sobre el mecanismo de esta reacción y las que se habían descrito anteriormente, se realizó en colaboración con el grupo del profesor Pedro Merino (Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Zaragoza) un estudio computacional basado en la teoría del funcional de la densidad (estudio DFT) para tratar de encontrar algunas respuestas.

En primer lugar, se analizó el proceso de oxidación y transposición en presencia de dos equivalentes de DDQ utilizando como modelo para el cálculo la tetrahydroquinolina **S1** (esquema 4.14). El proceso se iniciaría con la deshidrogenación de **S1** a cargo de un equivalente de DDQ, dando lugar a las dihydroquinolinas **I** y **II**, que coexistirían en equilibrio. A partir de aquí se valoraron los dos posibles caminos a seguir por la reacción, desde la enamina **I** y desde la imina **II**. El estudio de este primer paso permite refutar el mecanismo que se había propuesto anteriormente, consistente en la adición de Michael de la enamina sobre el éster α,β -insaturado para formar el intermedio **IN-0**, que según estos cálculos revertiría al material de partida. En el caso de **I**, el proceso continuaría con un ataque de la enamina sobre el alqueno, a través de un ataque aza-eno intramolecular en el que el alqueno abstrae además el protón unido hasta ahora al nitrógeno del heterociclo (estado de transición **ET-Ia**), generándose finalmente el intermedio ciclopropánico **IN-Ia**. Éste, a su vez, debería continuar por la apertura del anillo de ciclopropano pasando por el estado de transición **ET-Ib** para formar la dihydroquinolina **IN-Ib**, que tras una nueva deshidrogenación mediada por el otro equivalente de DDQ daría lugar al producto **P1**. Si se considera la evolución de la transformación desde la imina **II**, en primer lugar se observaría la captación de uno de los protones de la posición 3 del anillo de dihydroquinolina por el segundo equivalente de DDQ, formándose el catión **IN-IIa**. Desde este punto la molécula podría evolucionar a través de la formación de dos estados de transición pseudociclopropánicos distintos, en función de si involucran a la olefina (**ET-IIb**) o al metilo (**ET-IIc**), para dar lugar tras su apertura a los cationes **IN-IIb** e **IN-IIc**, respectivamente. Finalmente, una nueva abstracción de un protón por parte del equivalente de DDQ que permanecía parcialmente reducido generaría los productos **P1** (desde **IN-IIb**) y **P2** (desde **IN-IIc**).

En la figura 4.4 se muestra el diagrama energético para cada uno de los caminos posibles en esta transformación, cuyo análisis permite explicar en líneas generales la reactividad observada experimentalmente. Ya desde el inicio se advierte que el equilibrio entre los productos de deshidrogenación **I** y **II** favorece ligeramente a la imina, aunque en principio no supone una diferencia enorme. Sin embargo, la barrera energética para la formación del estado de transición **ET-Ia** es considerablemente más alta que para su contraparte **ET-IIa**.

Comenzando por la ruta que parte de la enamina **I**, se observa que la formación del estado de transición **ET-Ib** supone una auténtica barrera energética, además de requerir una marcada acidez del protón migrante. De esto se desprenden dos conclusiones: la formación del producto de deshidrogenación/ transposición/deshidrogenación a través de esta ruta sólo sería posible a altas temperaturas para superar las dos barreras energéticas que predice el modelo, y la acidez del protón en α al grupo éster sería clave para posibilitar su migración. Aquí hay una cuestión en la que la predicción y la realidad disienten, pues el compuesto **I** sí es capaz de dar el compuesto de transposición **II** en condiciones térmicas. En la figura 4.3 se recoge la estructura de los estados de transición correspondientes al éster (**ET-Ib**) y al alcohol (**ET-Ic**), observándose una gran similitud. **ET-Ib** muestra una asincronicidad ligeramente mayor con respecto a **ET-Ic**, aunque en ambos casos la transferencia del protón y la apertura del anillo de ciclopropano se pueden considerar procesos concertados.



Esquema 4.13. Figura 4.3. Transposición/deshidrogenación exitosa del alcohol **I**. Comparación del estado de transición del éster (izquierda) con el del alcohol (derecha).

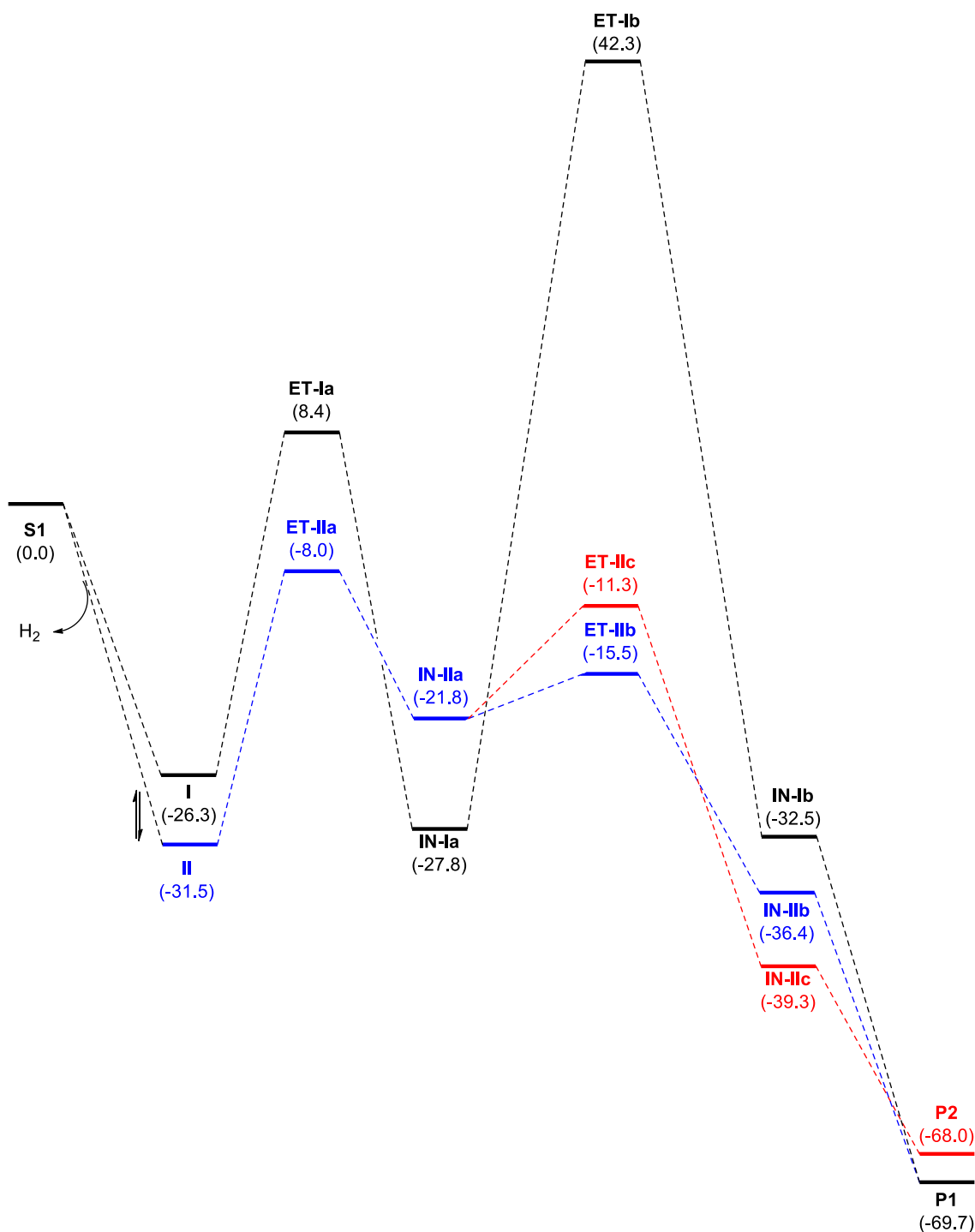
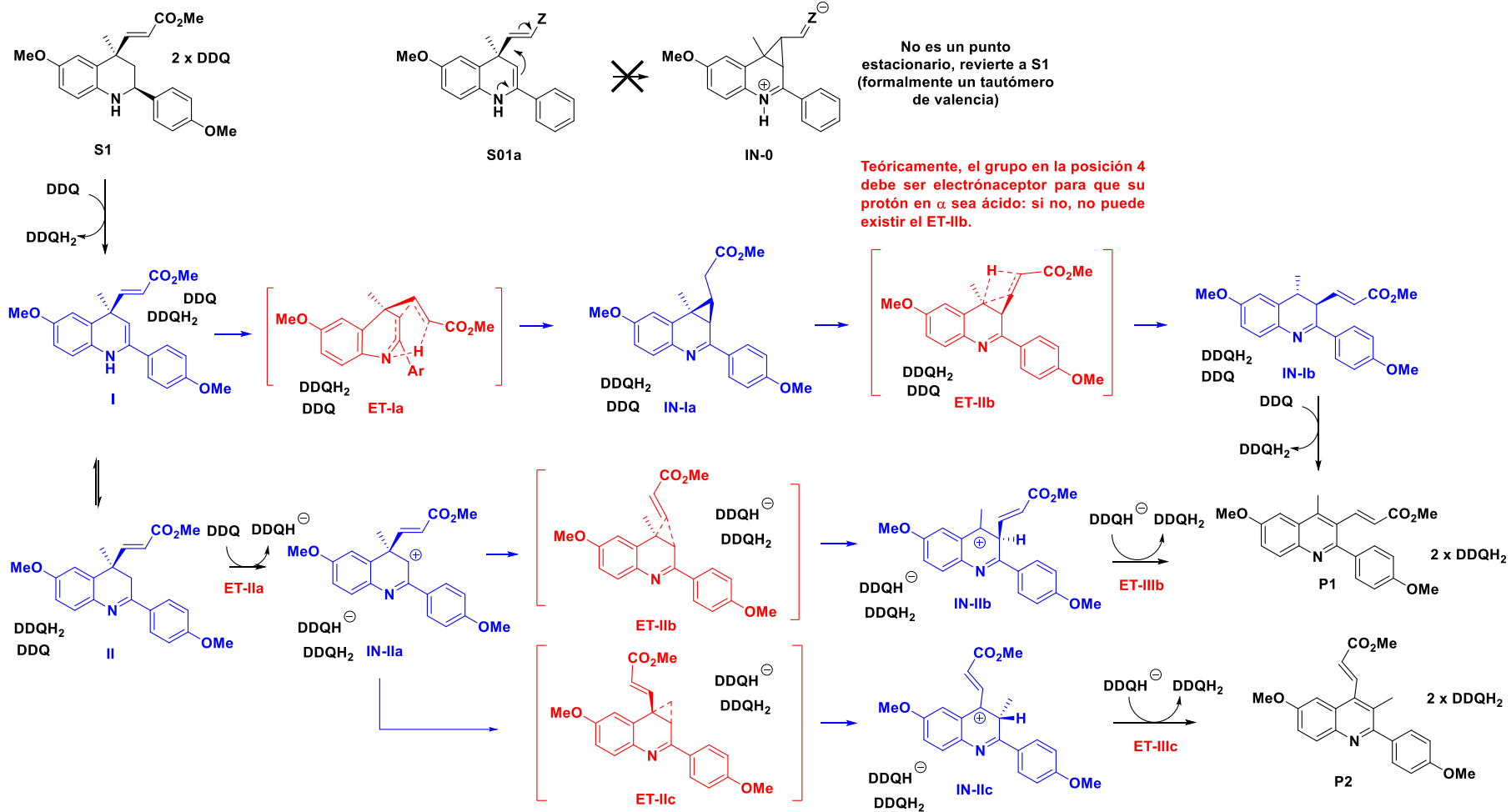


Figura 4.4. Diagrama de energía para la deshidrogenación/transposición del éster S1.

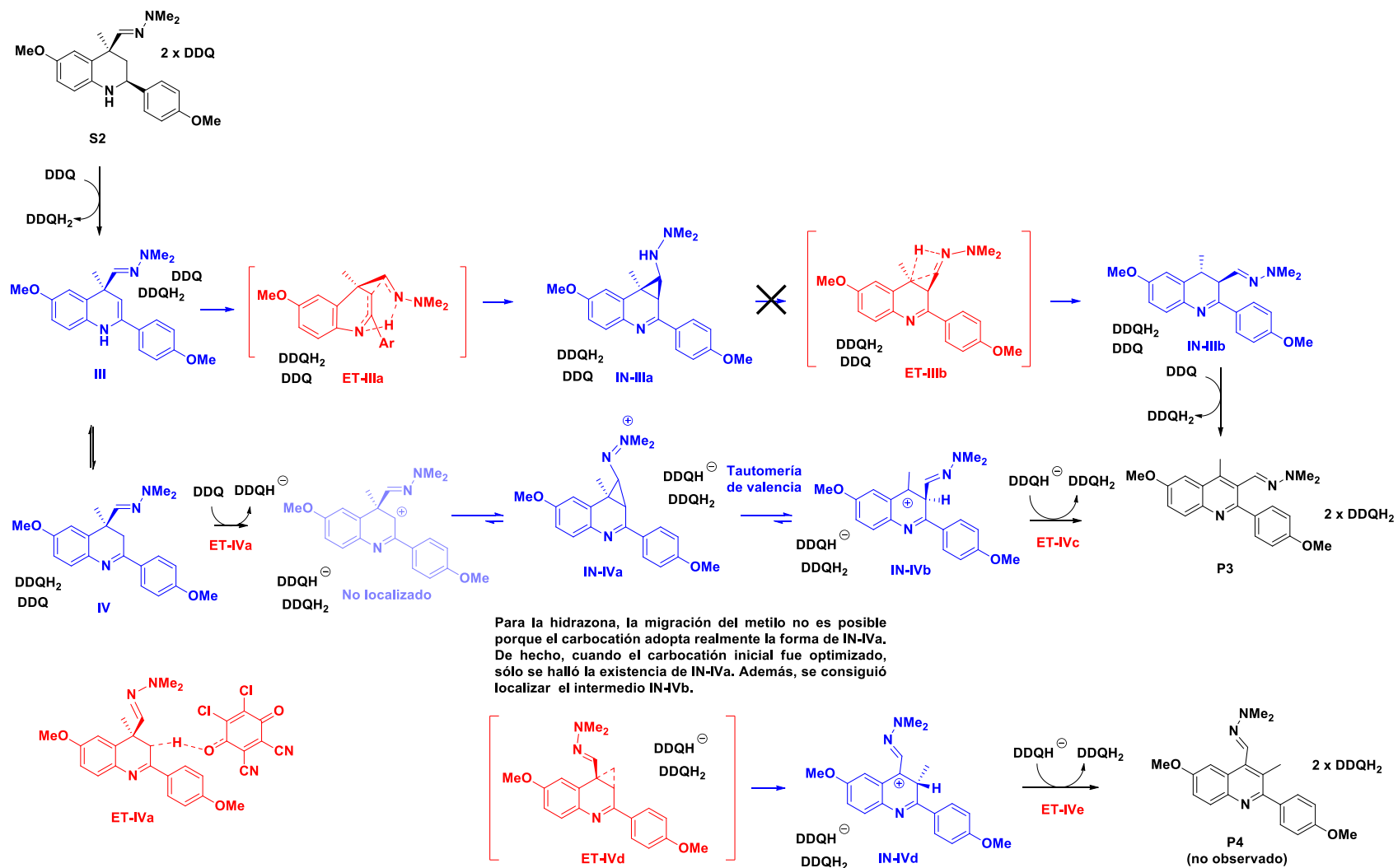
Por otra parte, la vía que parte desde la imina II no presenta importantes barreras energéticas, por lo que resulta el camino de elección a temperatura ambiente con la asistencia del DDQ. Comparando la formación de los dos posibles productos de transposición, si bien las diferencias no son grandes, la mayor facilidad de formación del estado de transición **ET-IIb** en términos energéticos parece determinar la formación de **P1** como único producto, como sucede en la realidad.



Esquema 4.14. Estudio DFT del mecanismo de la reacción de deshidrogenación/transposición sobre el éster S1

En definitiva, en presencia de DDQ el modelo sugiere un mecanismo que se iniciaría con la deshidrogenación de **S1** para generar la enamina **I**, en equilibrio tautomérico con la imina **II**. Ésta última sería la estructura que sufriría la transposición y la segunda deshidrogenación para formar **P1**, a través del estado de transición **ET-IIb**. Si la reacción sucede a una temperatura lo suficientemente elevada, la reacción transcurriría por la vía que parte de la enamina **I**.

Veamos ahora la predicción que realiza el modelo cuando el producto de partida es la hidrazona **S2**. El primer paso es análogo al del proceso descrito anteriormente: un equivalente de DDQ mediaría la primera deshidrogenación de **S2** dando lugar a la enamina **III**, la cual establece un equilibrio con su tautómero **IV**. De este punto parten también dos vías: por un lado, la enamina **III** procedería por un ataque de tipo aza-eno intramolecular sobre la hidrazona, con captación del protón del NH heterocíclico por parte de la propia hidrazona para generar, a través del estado de transición **ET-IIIa**, el ciclopropano **IN-IIIa**. A este ataque le debería seguir la apertura del ciclopropano, pasando por el estado de transición **ET-IIIb**, para formar la 3-hidrazonometildihidroquinolina **IN-IIIb**, pero la falta de acidez del protón de la hidracina impide la migración prevista en el mecanismo y lleva al modelo a emitir una predicción desfavorable sobre esta vía de reacción. Por otro lado, el DDQ puede arrancar un protón al carbono 3 de la dihidroquinolina **IV** para dar lugar al intermedio catiónico **IN-IVa**. Este paso transcurriría teóricamente a través del estado de transición catiónico **ET-IVa**, pero su naturaleza altamente inestable hace que el modelo ni siquiera pueda detectarlo como tal, observándose directamente la especie **IN-IVa**. Este intermedio también es bastante inestable, dando lugar rápidamente al carbocatión terciario mucho más estabilizado **IN-IVb** mediante la apertura del anillo de ciclopropano. Por último, el equivalente de DDQ parcialmente reducido arranca nuevamente un protón de la posición 3 de **IN-IVb**, formándose directamente el producto **P2**. Cabe destacar que el modelo, en este caso, descarta la posibilidad de que sea el grupo metilo el que migra para formar el intermedio **IN-IVc**, probablemente debido a que la rapidísima transformación de **IV** en el carbocatión estable **IN-IVa** hace que éste último sea el único intermedio posible (esquema 4.15).



Esquema 4.13. Estudio DFT del mecanismo de la deshidrogenación/transposición de la hidrazona S2.

El diagrama energético de este segundo proceso (figura 4.5) confirma que la vía de reacción que parte de la enamina I sería claramente desfavorable: el equilibrio inicial entre I y II estaría inclinado hacia la imina, después la transformación de I en **ET-IIIa** supondría una barrera energética considerable y, finalmente, la falta de acidez de la hidracina **IN-IIIa** impediría la progresión de la reacción. Por tanto, a altas temperaturas la reacción no funcionaría según este modelo, pues aunque se facilitase la formación de **ET-IIIa** se conduciría el proceso a una vía muerta. En cambio, el DDQ sí sería capaz de promover la reacción a temperatura ambiente desde la especie II, en ausencia de los obstáculos de los que adolece la alternativa anterior.

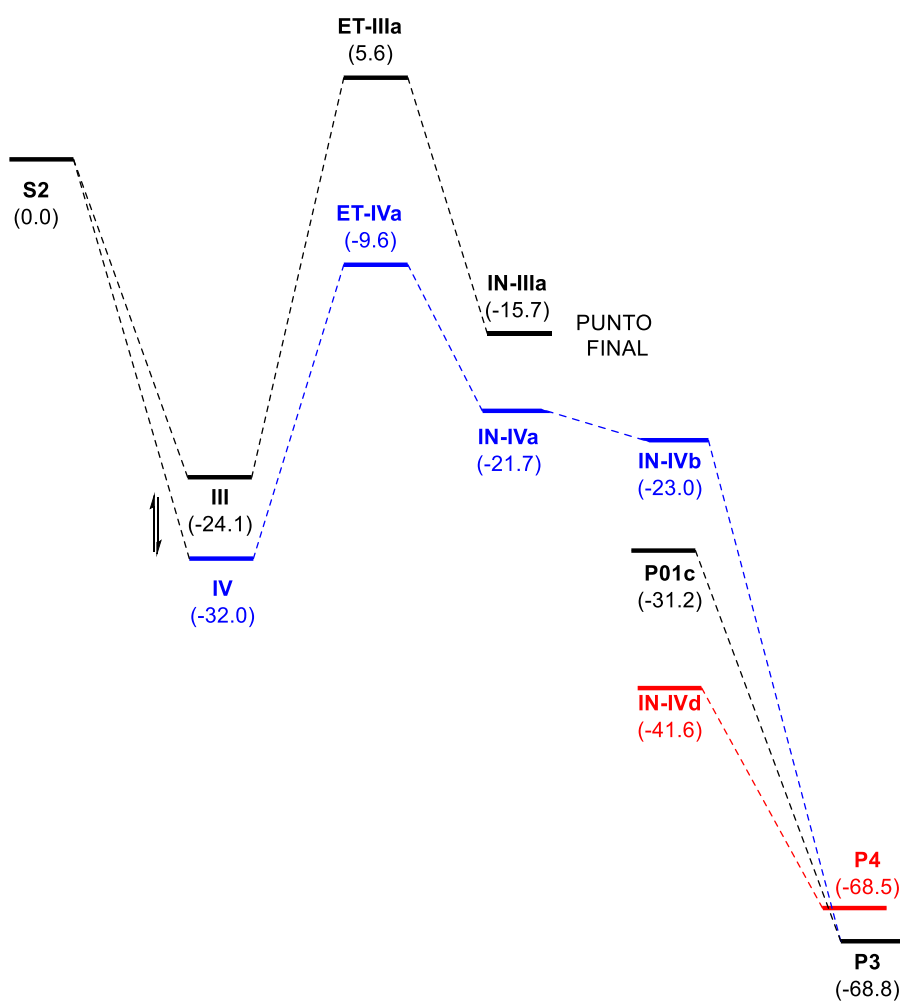
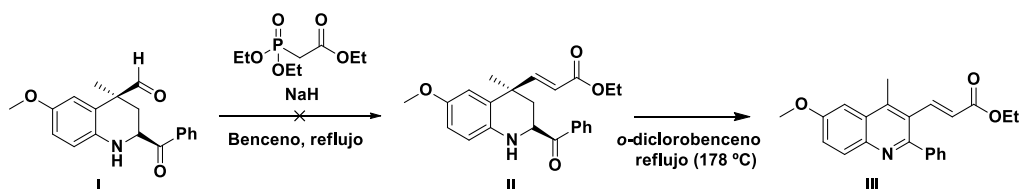


Figura 4.5. Diagrama energético para la reacción de deshidrogenación/transposición de la hidrazona S2.

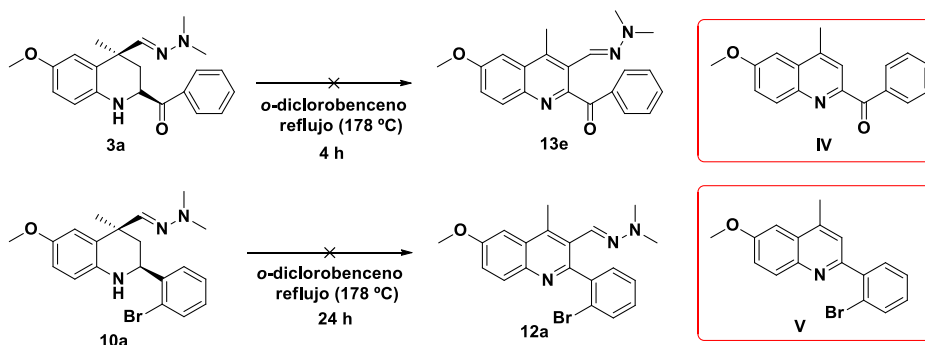
A la vista de estos resultados, decidimos realizar algunos experimentos adicionales para confirmar la validez del modelo y explorar algunos casos particulares. En primer lugar, se ensayó la reacción de deshidrogenación/transposición en condiciones térmicas

empleando como sustrato la olefina **II** para valorar la influencia del grupo carbonilo de la posición 2 en el resultado de la reacción. Desgraciadamente, la reacción de olefinación del aldehído **I** sólo condujo a la obtención de mezclas complejas donde el producto aparecía en cantidades muy pequeñas, probablemente debido a una indeseada falta de quimioselectividad.



Esquema 4.14. Olefinación fallida del compuesto **I**.

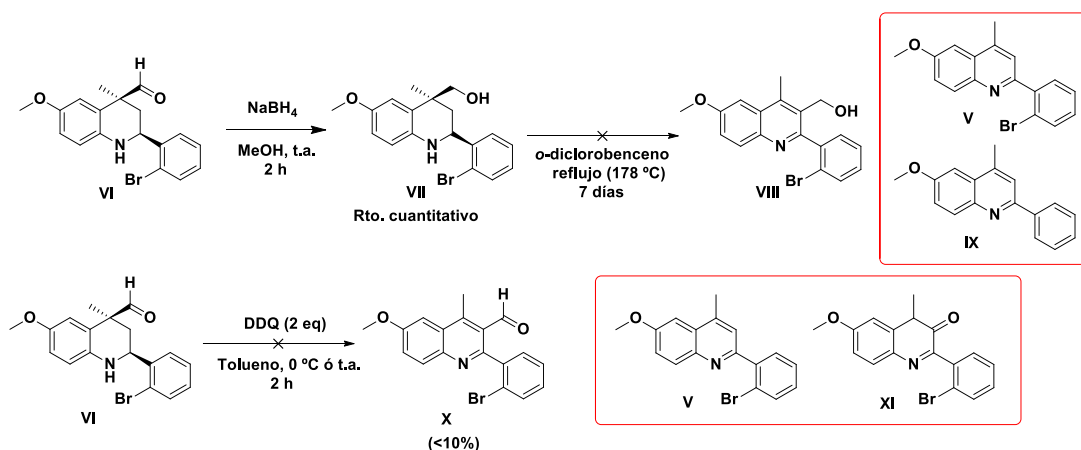
Cuando se sometió a las hidrazonas **3a** y **10a** a un intento de deshidrogenación/transposición en condiciones térmicas se observó la formación de las quinolinas **IV** y **V**, fruto de una oxidación con pérdida del grupo dimetilhidrazonometilo, en lugar de los productos de transposición, por lo que este aspecto de la predicción efectuada por el estudio DFT quedaba respaldado experimentalmente.



Esquema 4.15. Fracaso en la deshidrogenación/transposición de las hidrazonas **3a** y **10a** en condiciones térmicas.

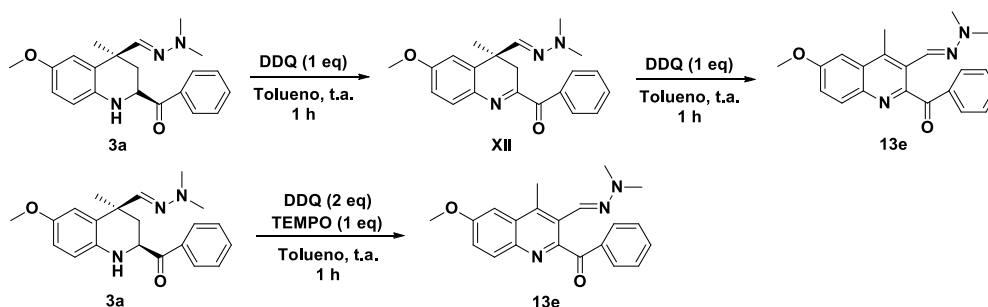
En vista del incómodo ejemplo del alcohol α,β -insaturado, capaz de sufrir la transposición térmica en contra de lo que sugiere el modelo por su carencia de un protón ácido en la posición adecuada, se quiso también estudiar la influencia de determinados cambios en la estructura del grupo migrante y, cuando procede, la correspondencia del resultado obtenido con las predicciones. El primer sustrato ensayado fue el alcohol **VII**, obtenido cuantitativamente por reducción del aldehído **VI**. Cuando una disolución de **VII** en *o*-diclorobenceno fue calentada a 178°C siguiendo el protocolo habitual, no se observó ni rastro del producto de transposición **VIII**, y sí de los productos de oxidación e incluso oxidación/deshalogenación **V** y **IX**. Una vez más, este

resultado concuerda con la predicción del estudio DFT, pues **VII** carece de un protón ácido que pueda migrar bajo estas condiciones. Por otra parte, se investigó la reacción del aldehído **VI** con dos equivalentes de DDQ, dado que al no poseer tampoco ningún protón ácido en el grupo migrante sólo habría opciones para lograr su transposición mediante este método. Las pruebas, realizadas tanto a temperatura ambiente como a 0 °C, condujeron a la formación de cantidades muy pequeñas del producto de transposición **X**, siendo los productos mayoritarios en el crudo de reacción la quinolina **V** y la 3-oxodihidroquinolina **XI**. La comparación en este caso con la predicción no es factible, ya que este ejemplo no fue considerado en el estudio DFT. Probablemente, la migración pasaría por un estado de transición cuya formación posiblemente resulte menos favorable en términos energéticos respecto a otros mecanismos como la desformilación del compuesto.



Esquema 4.16. Nuevos intentos fallidos para aplicar la deshidrogenación/transposición en condiciones térmicas u oxidativas para diversos grupos migrantes.

Respecto al mecanismo de actuación del DDQ, se hicieron dos pruebas. En primer lugar, se ensayó la deshidrogenación de **3a** con un solo equivalente de DDQ, obteniéndose la dihidroquinolina **XII** tal y como predecía el modelo. La adición del segundo equivalente condujo a la formación del producto esperado **13e**. También se probó la reacción de deshidrogenación/transposición catalizada por DDQ de la misma hidrazona en presencia del captador de radicales TEMPO, para descartar un mecanismo radicalario. La formación del producto **13e** confirmó que el proceso no discurre a través de un mecanismo de este tipo.

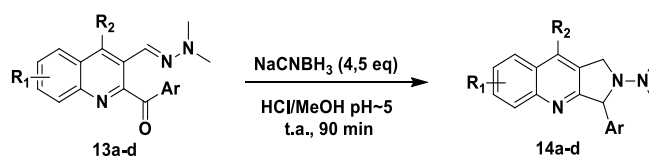


Esquema 4.17. Pruebas adicionales del mecanismo de la deshidrogenación/transposición mediada por DDQ.

4.3 Síntesis de derivados de pirrolo[3,4-*b*]quinolina

En este apartado se imbrican dos aspectos tan propios de la ciencia como la intencionalidad y la serendipia, habiendo permitido en este caso la preparación de dos clases diferentes de pirrolo[3,4-*b*]quinolinas partiendo de las 2-acilquinolinas cuya síntesis se ha descrito en el epígrafe anterior.

Las quinolinas **13** presentan un grupo cetónico en la posición 2 y una hidrazona en la posición 3, lo que constituye un patrón de funcionalización propicio para realizar una ciclación reductora intramolecular mediante el uso de un exceso de cianoborohidruro sódico, con la precaución de mantener el pH del medio de reacción ligeramente ácido. Tras 90 minutos de reacción a temperatura ambiente, se verificó la formación de los productos **14a-d** con rendimientos muy buenos o excelentes.

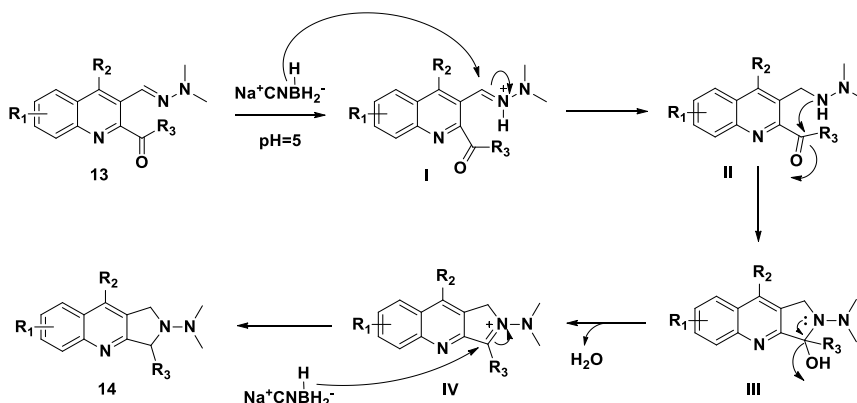


Compuesto	R ₁	R ₂	Ar	Rto. (%)
14a	7-OCH ₃	CH ₃	4-CH ₃ C ₆ H ₄	91
14b	7-OCH ₃	CH ₃	3-BrC ₆ H ₄	85
14c	7-OCH ₃	CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅	88
14d	7-OCH ₃	CH ₃	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃	99

Esquema 4.18. Tabla 4.3. Obtención de las pirrolo[3,4-*b*]quinolinas **14** a través de una ciclación reductora intramolecular.

El mecanismo de la reacción es el siguiente: la hidrazona se reduce de forma quimioselectiva para formar la hidracina II, cuyo grupo NH ejecuta a continuación un ataque intramolecular sobre la cetona con pérdida de una molécula de agua dando lugar

al iminio **IV**, que se reduce nuevamente en presencia de un exceso de cianoborohidruro para rendir los productos **14**.



Esquema 4.19. Detalles del mecanismo de la ciclación reductora intramolecular.

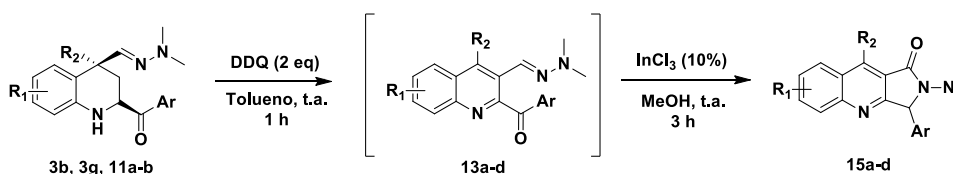
Por el contrario, la obtención de los derivados de pirrolo[3,4-*b*]quinolona **15a-d** encierra una curiosa intrahistoria. Cuando se estaba optimizando la purificación del producto de transposición **13a**, se advirtió que éste se transformaba progresivamente en otro compuesto si permanecía mucho tiempo en una columna cromatográfica de gel de sílice. Tras varios intentos se consiguió aislar el nuevo producto, cuya identificación con la estructura **15a** responde a la presencia de una señal a 167.6 ppm en el espectro de RMN ^{13}C , adjudicable a un grupo carbonilo del tipo amida; a la ausencia de las señales de los protones metilénicos que en el compuesto **14a** aparecen a 4,29-4,54 ppm en el espectro de RMN ^1H ; y finalmente a la masa exacta proporcionada por una espectrometría de masas de alta resolución. Este hallazgo nos animó a investigar si era posible reproducir esta transformación de manera intencionada y controlada, empezando por una simple adición de sílice sobre la mezcla de reacción una vez **13a** se había formado, empleando un protocolo *one-pot* (entrada 1). Veinticuatro horas después de la adición de sílice apenas se habían formado trazas de **15a** cuando se mantenía el tolueno como disolvente, pero se vio que su sustitución por la fase móvil utilizada en las cromatografías (hexano/acetato de etilo 7:3) en el momento de añadir la sílice conducía a una conversión del 75% tras 48 horas de reacción, alcanzándose el 100% tras sólo 24 horas si se utilizaba metanol (entradas 2 y 3). Encontrado el disolvente idóneo para llevar a cabo la nueva reacción, se pasó a la optimización de la catálisis con resultados muy satisfactorios, pues se vio que tanto la adición de un 10% de InCl_3 como ácido de Lewis, como la adición de unas gotas de una solución de HCl_{aq} en metanol hasta

un pH aproximado de 5 permitían la conversión total de **13a** en **15a** en sólo 3 horas. Aunque los resultados eran buenos, decidimos hacer una serie de pruebas partiendo del compuesto **13a** purificado, en lugar de trabajar mediante el método *one-pot*. En lo que respecta a la catálisis ácida, se observó que la conversión total a **15a** ajustando el pH a 5 mediante la solución metanólica de HCl acuoso tomaba hasta 24 horas en lugar de las 3 horas del protocolo *one-pot*, mientras que la acidificación hasta un pH de 3 conducía a la aparente descomposición del producto de partida. Cuando se usó InCl₃ partiendo de **13a** purificado los resultados también fueron notablemente inferiores, verificándose sólo un 10% de conversión tras 18 horas de reacción, y un 85% si se mantenía la reacción a 50 °C durante 3 horas. Estos resultados parecen sugerir que algún elemento (¿la hidroquinona procedente del DDQ?) presente en la mezcla de reacción original podría favorecer el segundo paso de ciclación y oxidación, aunque se desconoce la naturaleza exacta de este fenómeno.

Ent.	Catalizador	Disolvente	Comp. de partida	T (°C)	t (h)	Conversión (%)
1	SiO ₂	Tolueno	11a	25	24	Trazas
2	SiO ₂	Hex/AcOEt 7:3	11a	25	48	75
3	SiO ₂	MeOH	11a	25	24	100
4	HCl (pH=5)	MeOH	11a	25	3	100
5	InCl ₃ (10%)	MeOH	11a	25	3	100
6	HCl (pH=5)	MeOH	13a	25	24	100
7	HCl (pH=3)	MeOH	13a	25	5	0
8	InCl ₃ (10%)	MeOH	13a	25	18	10
9	InCl ₃ (10%)	MeOH	13a	50	3	85

Tabla 4.4. Optimización del procedimiento de obtención de las pirrolo-1-quinolonas **15a-d**.

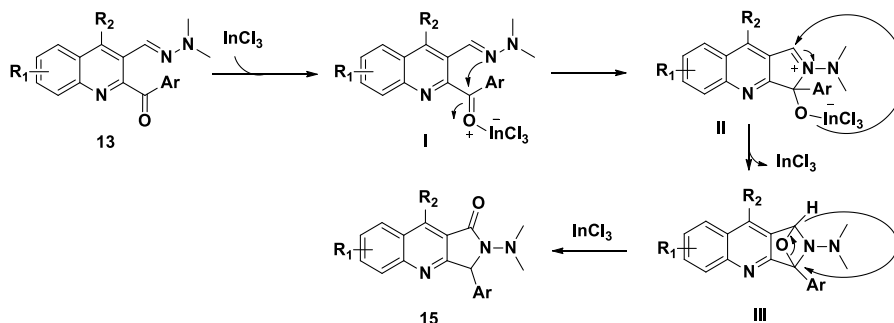
Sea como fuere, se eligió el procedimiento *one-pot* que prevé el uso de un 10% de InCl₃ y metanol como disolvente para obtener las pirrolo-1-quinolonas **15a-d** con unos rendimientos moderados. Se prefirió usar InCl₃ sobre la solución metanólica de HCl acuoso porque ésta última requiere efectuar un paso adicional de neutralización en el tratamiento del crudo de reacción. Las causas de que los rendimientos no sean demasiado elevados, aunque las conversiones sean completas, son las mismas que cuando se buscaba obtener los productos **13**: formación de cierta cantidad del producto aromatizado con pérdida del grupo dimetilhidrazonometilo en el primer paso de la transformación, y la dificultad para separar el DDQ reducido y los restos de DDQ de los productos en la columna cromatográfica.



Compuesto	R ₁	R ₂	Ar	Rto. (%)
15a	7-OCH ₃	CH ₃	4-CH ₃ C ₆ H ₄	46
15b	7-OCH ₃	CH ₃	3-BrC ₆ H ₄	36
15c	7-OCH ₃	CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅	35
15d	7-OCH ₃	CH ₃	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃	34

Esquema 4.20. Tabla 4.5. Obtención de las pirrolo-1-quinolonas **15a-d**.

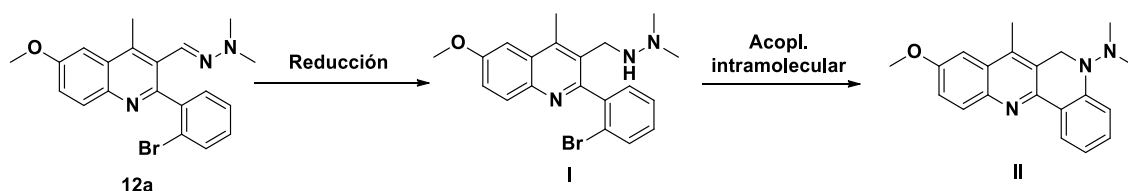
La propuesta que tenemos para el mecanismo de esta transformación es la siguiente: el proceso se iniciaría con una ciclación 5-*exo-trig* por el ataque del nitrógeno de la hidrazona sobre el grupo carbonilo de la posición 2 de la quinolina, que está activado por su coordinación con el InCl₃, para formar el intermedio **II**. Un segundo ataque intramolecular del oxígeno sobre el grupo iminio proporcionaría el intermedio bicíclico **III**, que finalmente se transformaría en el producto **15** a través de un reordenamiento de Meinwald catalizado por el InCl₃.



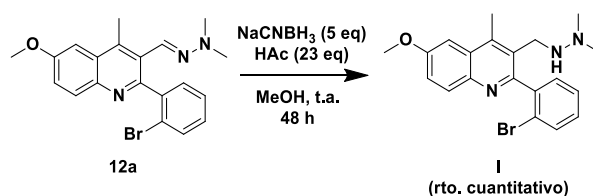
Esquema 4.21. Mecanismo de formación de las pirrolo-1-quinolonas **15a-d**.

Para finalizar con este apartado, hay que mencionar una última utilidad sintética que se trató de extraer de los compuestos **12**, concretamente de **12a**. Pensamos que la presencia de un halógeno en el anillo aromático unido al C-2 de la quinolina posibilitaba la síntesis del compuesto **II** (esquema 4.24), a través de un proceso que involucraría la reducción de la hidrazona y una aminación intramolecular de Buchwald-Hartwig o de Ullmann para acceder a la estructura tetracíclica deseada.

Para la reducción de la hidrazona se ensayó el panel de condiciones descrito en la tabla 4.6, escogiéndose la reducción con NaCNBH_3 catalizada por ácido acético al ser el único método que permitió la obtención de la hidracina **I**, si bien su purificación resultó imposible por su reoxidación a la hidrazona en la columna cromatográfica.



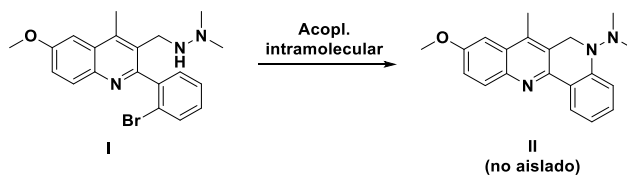
Esquema 4.22. Planteamiento para la síntesis del compuesto tetracíclico **II**.



Catalizador	Disolvente	T (°C)	t (h)	Conversión (%)
NaBH_4	MeOH	25	20	0
$\text{NaCNBH}_3/\text{AcOH}$	MeOH seco	25	48	100
$\text{NaCNBH}_3/\text{HCl}$ (pH=5)	MeOH	25	3	0
NaBH_4/HCl (pH=5)	MeOH	25	5	0
NaBH_4/HCl (pH=5)	MeOH	Reflujo (65)	12	0
Mg/I_2	MeOH seco	25	5	0
Mg/I_2	MeOH seco	Reflujo (65)	12	0

Esquema 4.23. Tabla 4.6. Obtención de la hidracina **I**.

A continuación, se probaron los dos acoplamientos anteriormente mencionados para intentar la ciclación de **I** con una suerte dispar: mientras que el acoplamiento de Ullmann dio lugar a una mezcla compleja, la reacción de Buchwald catalizada por un 10% de $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ sí que formó el compuesto **II** en un rendimiento que parecía bastante aceptable (en torno al 50-60%), pero su tendencia a degradarse durante procedimiento de purificación impidió su aislamiento.



Catalizador	Ligando	Base	Disolvente	T (°C)	t (h)	Rto. (%)
Pd₂(dba)₃ (0,1 eq)	BINAP	Cs ₂ CO ₃ tBuOK	Dioxano seco	120 (MW)	1	50 (aprox., no aislado)
CuI (0,1 eq)	-	Cs ₂ CO ₃	DMF seca	80 (MW)	1	-

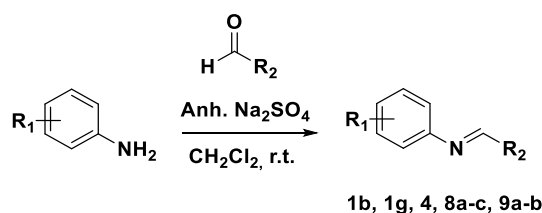
Esquema 4.24. Tabla 4.7. Tentativas fallidas para la síntesis del compuesto II.

4.4 Experimental section

General experimental details

All reagents (Aldrich, Fischer, Alpha Aesar) and solvents (Scharlau, Fischer) were of commercial quality and were used as received. Reactions were monitored by thin layer chromatography on aluminium plates coated with silica gel and fluorescent indicator (Macherey-Nagel Xtra SIL G/UV254). Mechanochemical reactions were carried out in a vibratory ball mill Anton Paar BM500 (Madrid, Spain) and a planetary ball mill Retsch PM 100 (Asturias, España), using grinding jars and balls of zirconium oxide and stainless steel with different volumes and diameters. Microwave-assisted reactions were performed on a CEM Discover focused microwave reactor. Separations by flash chromatography were performed using a Combiflash Teledyne automated flash chromatograph or on conventional silica gel columns (Scharlau 40–60 μm , 230–400 mesh ASTM). Melting points were determined using a Stuart Scientific apparatus, SMP3 Model, and are uncorrected. Infrared spectra were recorded with an Agilent Cary630 FTIR spectrophotometer with a diamond accessory for solid and liquid samples. NMR spectroscopic data were recorded using a Bruker Avance 250 spectrometer operating at 250 MHz for ^1H NMR and 63 MHz for ^{13}C NMR (CAI de Resonancia Magnética Nuclear, Universidad Complutense); Topspin (Bruker, Rivas-Vaciamadrid, Madrid, Spain) or Mestrenova (Mestrelab, Santiago de Compostela, Spain) software packages were used throughout for data processing; chemical shifts are given in ppm and coupling constants in Hertz. Elemental analyses were determined by the CAI de Microanálisis Elemental, Universidad Complutense, using a Leco 932 combustion microanalyzer. Exact mass data were recorded with a high-resolution mass spectrometer FTMS Bruker APEX Q IV coupled to 2DLC-NS-ESI-MALDI (Mass range: 200-10.000 uma) and a time-of-flight mass spectrometer MALDI-TOF/TOF Bruker ULTRAFLEX coupled to MALDI (Mass range: 300-150000 uma), operated by the CAI de Espectrometría de Masas, Universidad Complutense.

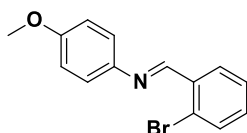
Synthesis of arylimines **4** and **8a-c**, and α -ketoimines **1b**, **1g** and **9a-b**.



Compuesto	R ₁	R ₂
4	4-OCH ₃	C ₆ H ₅
8a	4-OCH ₃	2'-Br-C ₆ H ₄
8b	4-OCH ₃	3'-ClC ₆ H ₄
8c	4-OCH ₃	3'-CH ₃ C ₆ H ₄
1b	4-OCH ₃	(CO)C ₆ H ₅
1g	4-OCH ₃	(CO)3',4'-Cl ₂ C ₆ H ₅
9a	4-OCH ₃	(CO)4'-CH ₃ C ₆ H ₄
9b	4-OCH ₃	(CO)3'-BrC ₆ H ₄

A solution of the suitable aniline (1 eq) and aldehyde (1 eq) or glyoxal derivative (1-1.8 eq) in CH₂Cl₂ (5 mL) was stirred vigorously in the presence of anhydrous Na₂SO₄ (5 g) for 30 minutes and then, the reaction mixture was filtered and the solvent evaporated under vacuum to afford the desired aryl or acylimines, that were used without further purification in the following reactions. In all cases the yields were quantitative.

N-(2-Bromobenzylidene)-4-methoxyaniline (8a)



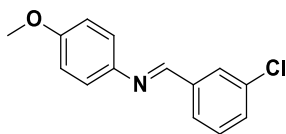
Prepared from *p*-anisidine (0.246 g, 2 mmol) and 2-bromobenzaldehyde (0.370 g, 2 mmol). Brown paste.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ : 8.81 (s, 1H), 8.16 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 7.38 – 7.29 (m, 1H), 7.27 – 7.19 (m, 3H), 6.93 – 6.86 (m, 2H), 3.78 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 159.0, 157.6, 144.8, 135.1, 133.6, 132.5, 129.2, 128.1, 126.3, 123.0, 114.8, 55.9 ppm.

IR (neat) ν : 1614.5 cm⁻¹.

***N*-(3-Chlorobenzylidene)-4-methoxyaniline (8b)**



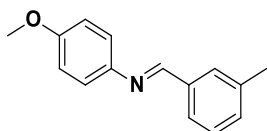
Prepared from *p*-anisidine (0.246 g, 2 mmol) and 3-chlorobenzaldehyde (0.281 g, 2 mmol). Brown oil.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.43 (s, 1H), 8.00 – 7.91 (m, 1H), 7.75 (dt, $J = 6.9, 1.6$ Hz, 1H), 7.51 – 7.36 (m, 2H), 7.33 – 7.23 (m, 2H), 7.03 – 6.92 (m, 2H), 3.85 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ : 159.0, 156.8, 144.4, 138.5, 135.2, 131.2, 130.3, 128., 127.3, 122.7, 114.8, 55.8 ppm.

IR (neat) ν : 1621.0 cm^{-1} .

4-Methoxy-*N*-(3-methylbenzylidene)aniline (8c)



Prepared from *p*-anisidine (0.246 g, 2 mmol) and *m*-tolualdehyde (0.240 g, 2 mmol). Brown oil.

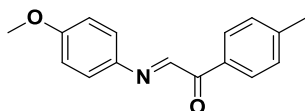
$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.52 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.43 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.38 – 7.28 (m, 3H), 7.08 – 6.96 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 2.49 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ : 159.0, 158.6, 145.2, 138.8, 136.7, 132.3, 129.1, 128.9, 126.5, 122.5, 114.7, 55.8, 21.6 ppm.

IR (neat) ν : 1621.7 cm^{-1} .

2-((4-Methoxyphenyl)imino)-1-(*p*-tolyl)ethanone (9a)

Prepared from *p*-anisidine (0.246 g, 2 mmol) and 4-methylphenylglyoxal (0.356 g, 2.4 mmol). Dark brown oil.

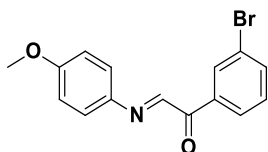


^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ 8.38 (s, 1H), 8.24 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.47 – 7.39 (m, 2H), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.04 – 6.95 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 2.47 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ 190.9, 160.9, 154.8, 144.9, 142.2, 133.3, 131.1, 129.6, 123.9, 115.0, 56.0, 22.2 ppm.

IR (neat) ν : 1644.7, 1577.1 cm^{-1}

1-(3-Bromophenyl)-2-((4-methoxyphenyl)imino)ethenone (9b)



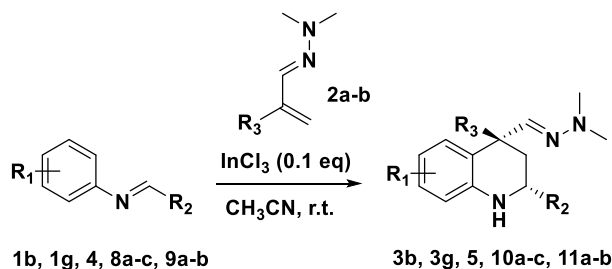
Prepared from *p*-anisidine (0.246 g, 2 mmol) and 3-bromophenylglyoxal (0.511 g, 2.4 mmol). Dark brown oil.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.48 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.28 (dt, $J = 7.9, 1.1$ Hz, 1H), 7.76 (ddd, $J = 7.9, 1.8, 1.0$ Hz, 1H), 7.49 – 7.37 (m, 3H), 7.06 – 6.95 (m, 2H), 3.89 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ 189.9, 161.3, 153.9, 141.6, 137.6, 136.5, 134.0, 130.3, 129.7, 124.2, 122.9, 115.1, 56.0 ppm.

IR (neat) ν : 1651.6, 1575.9 cm^{-1} .

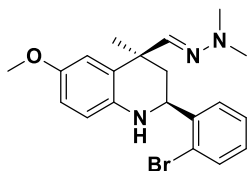
Synthesis of 2-aryl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines 5 and 10a-c, and 2-acyltetrahydroquinolines 3b, 3g and 11a-b.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
5	4-OCH ₃	C ₆ H ₅	CH ₃
10a	4-OCH ₃	2'-Br-C ₆ H ₄	CH ₃
10b	4-OCH ₃	3'-Cl-C ₆ H ₄	CH ₃
10c	4-OCH ₃	3'-CH ₃ C ₆ H ₄	CH ₂ CH ₃
3b	4-OCH ₃	(CO)C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₃
3g	4-OCH ₃	(CO)3',4'-Cl ₂ C ₆ H ₃	CH ₃
11a	4-OCH ₃	(CO)4'-CH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃
11b	4-OCH ₃	(CO)3'-BrC ₆ H ₄	CH ₃

To a stirred solution of the suitable imine (2.0 mmol) and InCl₃ (0.2 mmol, 0.044 g) in acetonitrile (20 mL) was added the corresponding hydrazone (2.2 mmol) dropwise. Stirring was continued for the time specified in the compound data sheet and, after completion of the reaction indicated by TLC, the reaction mixture was diluted with water (10 mL), extracted with CH₂Cl₂ (4 x 10 mL), dried and evaporated. The resulting crude was purified by silica gel column chromatography using the suitable mixture of solvents.

(±)-(2*S*,4*S*)-2-(2-Bromophenyl)-4-((*E*)-(2,2-dimethylhydrazineylidene)methyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (10a)



Prepared from imine **8a** (0.580 g, 2 mmol) and hydrazone **2a** (0.247 g, 2.2 mmol).

Reaction time: 3 h.

Purification: petroleum ether: ethyl acetate (9:1, v/v).

Yield: 0.306 g (38%). Pale yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.74 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 7.9, 1.1 Hz, 1H), 7.44 – 7.34 (m, 1H), 7.18 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 6.76 – 6.69 (m, 3H), 6.65 – 6.60 (m, 1H), 4.97 (dd, *J* = 11.1, 2.5 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 2.78 (s, 6H), 2.06 (dd, *J* = 13.1, 2.6 Hz, 1H), 1.99 – 1.85 (m, 1H), 1.69 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 152.7, 143.0, 138.9, 133.2, 129.2, 128.8, 128.3, 128.2, 123.4, 116.4, 114.7, 113.9, 56.2, 52.5, 43.8, 42.5, 41.7, 28.1 ppm.

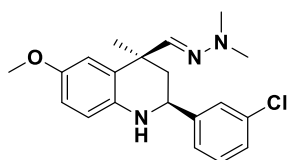
IR (neat) v: 3254.1, 1581.5 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₀H₂₄BrN₃O (M = 402.33): C, 59.71; H, 6.01; N, 10.44.

Found: C, 59.69; H, 6.08; N, 10.57

mp: 113-115 °C.

(±)-(2*S*,4*S*)-2-(3-Chlorophenyl)-4-((*E*)-(2,2-dimethylhydrazineylidene)methyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (10b)



Prepared from imine **8b** (0.491 g, 2 mmol) and hydrazone **2a** (0.247 g, 2.2 mmol).

Reaction time: 3 h.

Purification: petroleum ether: ethyl acetate (9:1, v/v).

Yield: 0.309 g (43%). Pale orange solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.52 – 7.48 (m, 1H), 7.38 – 7.29 (m, 3H), 6.73 – 6.67 (m, 2H), 6.65 (s, 1H), 6.61 – 6.56 (m, 1H), 4.51 (dd, *J* = 11.6, 2.6 Hz, 1H), 3.92 (bs, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.77 (s, 6H), 2.13 – 1.99 (m, 1H), 1.84 (dd, *J* = 13.2, 2.6 Hz, 1H), 1.59 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 152.7, 146.8, 144.4, 138.5, 134.9, 130.3, 128.6, 128.2, 127.3, 125.4, 116.1, 114.7, 113.9, 56.3, 53.4, 44.7, 43.8, 41.4, 28.6 ppm.

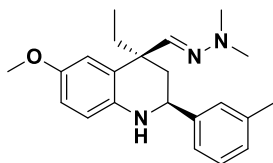
IR (neat) v: 3371.8, 1595.3 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₀H₂₄ClN₃O (M = 357.88): C, 67.12; H, 6.76; N, 11.74.

Found: C, 67.27; H, 6.54; N, 11.53

mp: 97-99°C.

(±)-(2S,4S)-4-((E)-(2,2-Dimethylhydrazineylidene)methyl)-4-ethyl-6-methoxy-2-(m-tolyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (10c)



Prepared from imine **8c** (0.451 g, 2 mmol) and hydrazone **2b** (0.277 g, 2.2 mmol).

Reaction time: 4 h

Purification: petroleum ether: ethyl acetate (9:1, v/v).

Yield: 0.316 g (45%). Orange oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.32 – 7.26 (m, 3H), 7.18 – 7.11 (m, 1H), 6.76 – 6.67 (m, 2H), 6.64 (s, 1H), 6.56 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.50 (dd, *J* = 10.6, 4.0 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 2.76 (s, 6H), 2.41 (s, 3H), 2.17 – 1.97 (m, 4H), 0.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H) ppm.

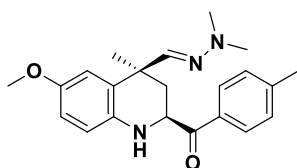
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 152.0, 145.1, 143.2, 138.9, 138.7, 128.9, 128.7, 127.9, 127.8, 124.1, 115.6, 115.1, 113.6, 56.3, 53.3, 44.2, 43.8, 40.5, 32.8, 21.9, 9.3 ppm.

IR (neat) v: 3360.5, 1605.3 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₂H₂₉N₃O (M = 351.49): C, 75.18; H, 8.32; N, 11.96.

Found: C, 74.91; H, 8.16; N, 11.58.

(±)-(2S,4S)-4-(2,2-Dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methyl-2-(4-methylbenzoyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (11a)



Prepared from imine **9a** (0.507 g, 2 mmol) and hydrazone **2a** (0.247 g, 2.2 mmol).

Diastereoselection: 80:20 (cis:trans).

Reaction time: 4 h.

Purification of cis isomer: petroleum ether: ethyl acetate (9:1, v/v).

Yield: 0.482 g (66%). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.74 (m, 2H), 6.68 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.09 (dd, *J* = 12.3, 2.7 Hz, 1H), 4.64 (bs, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.75 (s, 6H), 2.46 (s, 3H), 2.09 (dd, *J* = 12.9, 2.7 Hz, 1H), 1.81 – 1.65 (m, 4H) ppm.

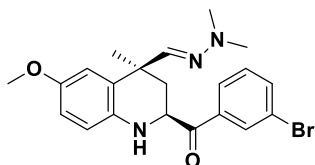
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 199.5, 152.5, 144.9, 143.4, 137.0, 132.5, 130.0, 128.8, 128.7, 117.5, 114.0, 56.2, 54.5, 43.7, 41.5, 39.4, 26.6, 22.2 ppm.

IR (neat) v: 3364.6, 1673.8, 1601.0 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₂H₂₇N₃O₂ (M = 365.47): C, 72.30; H, 7.45; N, 11.50. Found: C, 72.67; H, 7.15; N, 11.70.

mp: 118-120 °C.

(±)-(2*S*,4*S*)-2-(3-Bromobenzoyl)-(4-(2,2-dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (11b)



Prepared from imine **9b** (0.636 g, 2 mmol) and hydrazone **2a** (0.247 g, 2.2 mmol).

Diastereoselection: 83:17 (cis:trans).

Reaction time: 2.5 h.

Purification of cis isomer: petroleum ether: ethyl acetate (9:1, v/v).

Yield: 0.542 g (63%). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.11 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.79 – 7.71 (m, 1H), 7.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 6.68 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.05 (dd, *J* = 12.1, 2.8 Hz, 1H), 4.57 (bs, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.76 (s, 6H), 2.07 (dd, *J* = 12.9, 2.9 Hz, 1H), 1.78 (t, *J* = 12.6 Hz, 1H), 1.66 (s, 3H) ppm.

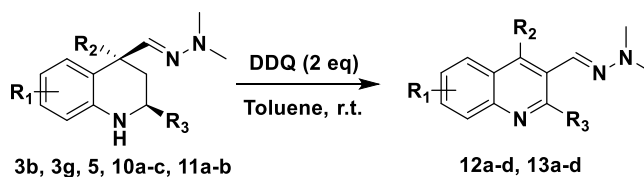
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 198.8, 152.7, 142.9, 136.8, 136.7, 131.8, 130.9, 128.6, 127.1, 123.7, 117.4, 114.0, 56.2, 54.9, 43.6, 41.4, 39.1, 26.8 ppm.

IR (neat) v: 3391.5, 1685.1, 1564.6 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₁H₂₄BrN₃O₂ (M = 430.34): C, 58.61; H, 5.62; N, 9.76. Found: C, 58.43; H, 5.32; N, 9.52.

mp: 104-106 °C.

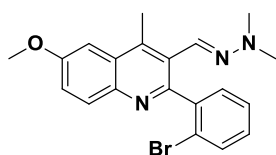
Synthesis of 2-arylquinolines **12a-d** and 2-acylquinolines **13a-d**.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
12a	6-OCH ₃	2-BrC ₆ H ₄	CH ₃
12b	6-OCH ₃	3-ClC ₆ H ₄	CH ₃
12c	6-OCH ₃	3-CH ₃ C ₆ H ₄	CH ₂ CH ₃
12d	6-OCH ₃	C ₆ H ₅	CH ₃
13a	6-OCH ₃	(CO)4-CH ₃ C ₆ H ₄	CH ₃
13b	6-OCH ₃	(CO)3-BrC ₆ H ₄	CH ₃
13c	6-OCH ₃	(CO)C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₃
13d	6-OCH ₃	(CO)3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃	CH ₃

To a stirred solution of the corresponding 2-aryltetrahydroquinoline or 2-acyltetrahydroquinoline (1 mmol) in toluene (15 mL) was added 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) (2 mmol) slowly. The solution was stirred at room temperature until the starting material disappeared as confirmed by TLC (1 h). The solvent was evaporated under reduced pressure. The solid residue was purified by flash column chromatography, eluting with an 8:2 (v/v) mixture of petroleum ether and ethyl acetate, to give compounds **12a-d** and **13a-d**.

2-(2-Bromophenyl)-3-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methylquinoline (**12a**)



Prepared from tetrahydroquinoline **10a** (0.402 g, 1 mmol) and DDQ (0.454 g, 2 mmol).

Yield: 0.211 g (53%). Dark yellow oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.66 – 7.60 (m, 1H), 7.45 – 7.24 (m, 5H), 7.17 (s, 1H), 4.01 (s, 3H), 2.87 (s, 3H), 2.76 (s, 6H) ppm.

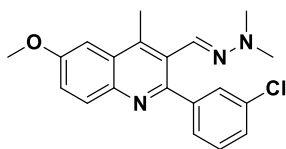
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 158.4, 156.7, 142.9, 142.3, 140.7, 132.7, 131.9, 131.7, 130.9, 129.7, 129.5, 128.0, 127.8, 122.9, 121.5, 102.9, 56.0, 42.9, 16.2 ppm.

IR (neat) ν: 1618.0 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for $C_{20}H_{20}BrN_3O$ ($M= 398.30$): C, 60.31; H, 5.06; N, 10.55.

Found: C, 60.00; H, 4.90; N, 10.34.

2-(3-Chlorophenyl)-3-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methylquinoline (12b)



Prepared from tetrahydroquinoline **10b** (0.358 g, 1 mmol) and DDQ (0.454 g, 2 mmol).

Yield: 0.258 g (73%). Yellow solid.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.04 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.67 – 7.62 (m, 1H), 7.52 – 7.47 (m, 1H), 7.41 – 7.36 (m, 3H), 7.32 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 4.01 (s, 3H), 2.92 (s, 6H), 2.85 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ : 158.4, 155.6, 143.4, 142.7, 141.6, 134.3, 132.3, 131.9, 130.5, 129.6, 129.3, 128.6, 128.4, 127.6, 121.8, 103.0, 56.0, 43.1, 16.4 ppm.

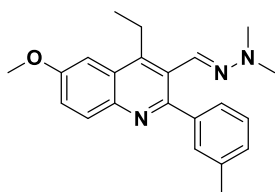
IR (neat) ν : 1615.7 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $C_{20}H_{20}ClN_3O$ ($M= 353.84$): C, 67.89; H, 5.70; N, 11.88.

Found: C, 67.56; H, 5.84; N, 11.54.

mp: 74-76 °C.

3-((2,2-Dimethylhydrazono)methyl)-4-ethyl-6-methoxy-2-(*m*-tolyl)quinoline (12c)



Prepared from tetrahydroquinoline **10c** (0.351 g, 1 mmol) and DDQ (0.454 g, 2 mmol).

Yield: 0.135 g (39%). Yellow solid.

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.10 – 8.03 (m, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.42 – 7.32 (m, 4H), 7.25 (s, 1H), 7.21 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.34 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.89 (s, 6H), 2.43 (s, 3H), 1.46 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 158.1, 157.7, 147.1, 143.2, 141.5, 138.1, 133.4, 132.1, 130.9, 129.1, 128.2, 128.1, 127.5, 127.0, 121.3, 102.9, 56.0, 43.1, 23.0, 21.9, 15.4 ppm.

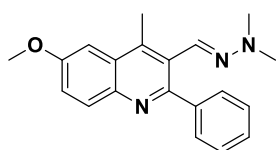
IR (neat) ν : 1601.9 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}$ (M=347.45): C, 76.05; H, 7.25; N, 12.09.

Found: C, 75.97; H, 7.08; N, 12.36.

mp: 89-90 $^\circ\text{C}$.

3-((2,2-Dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methyl-2-phenylquinoline (12d)



Prepared from tetrahydroquinoline **5** (0.323 g, 1 mmol) and DDQ (0.454 g, 2 mmol).

Yield: 0.163 g (51%). Pale yellow solid.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.06 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.65 – 7.58 (m, 2H), 7.50 – 7.32 (m, 5H), 7.24 (s, 1H), 4.01 (s, 3H), 2.90 (s, 6H), 2.87 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 158.2, 157.3, 142.7, 141.6, 141.4, 133.5, 131.9, 130.3, 129.2, 128.4, 127.7, 121.5, 103.1, 56.0, 43.2, 16.4 ppm.

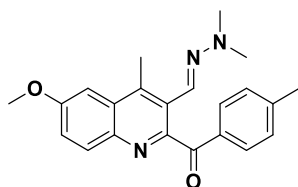
IR (neat) ν : 1616.4 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$ (M= 319.40): C, 75.21; H, 6.63; N, 13.16.

Found: C, 74.81; H, 6.50; N, 12.84.

mp: 119-121 $^\circ\text{C}$.

3-((2,2-Dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-2-(4-methylbenzoyl)-4-methylquinoline (13a)



Prepared from tetrahydroquinoline **11a** (0.365 g, 1 mmol) and DDQ (0.454 g, 2 mmol).

Yield: 0.217 g (60%). Pale yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.00 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.34 (dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 2.76 (s, 6H), 2.75 (s, 3H), 2.42 (s, 3H) ppm.

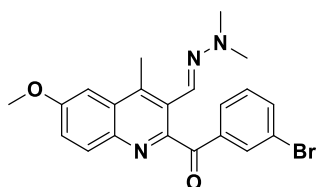
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 196.0, 158.8, 154.8, 143.6, 141.5, 139.0, 135.1, 132.2, 130.4, 129.3, 127.3, 125.8, 121.3, 102.5, 56.0, 42.4, 22.2, 14.9 ppm.

IR (neat) v: 1668.9, 1604.7 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₂H₂₃N₃O₂ (M = 361.44): C, 73.11; H, 6.41; N, 11.63. Found: C, 73.19; H, 6.20, N, 11.88.

mp: 196-198 °C.

2-(3-Bromobenzoyl)-3-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methylquinoline (13b)



Prepared from tetrahydroquinoline **11b** (0.430 g, 1 mmol) and DDQ (0.454 g, 2 mmol).

Yield: 0.204 g (48%). Orange solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.04 – 7.97 (m, 2H), 7.80 (dt, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 7.65 (m, 1H), 7.39 – 7.27 (m, 4H), 4.01 (s, 3H), 2.77 (s, 6H), 2.74 (s, 3H) ppm.

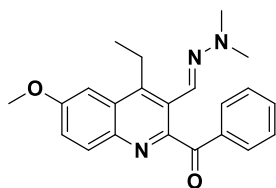
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 194.5, 159.0, 153.7, 141.5, 139.6, 139.0, 135.6, 133.0, 132.2, 130.2, 129.4, 128.8, 127.3, 125.2, 122.8, 121.5, 102.4, 56.0, 42.4, 14.8 ppm.

IR (neat) v: 1673.1, 1615.9 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₁H₂₀BrN₃O₂ (M = 426.31): C, 59.17; H, 4.73; N, 9.86. Found: C, 59.18, H, 5.07; N, 10.04.

mp: 166-167 °C.

2-Benzoyl-3-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-4-ethyl-6-methoxyquinoline (13c)



Prepared from tetrahydroquinoline **3b** (0.365 g, 1 mmol) and DDQ (0.454 g, 2 mmol).

Yield: 0.126 g (35%). Orange solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.02 (m, 1H), 7.92 – 7.86 (m, 2H), 7.53 (m, 1H), 7.46 – 7.37 (m, 3H), 7.37 – 7.32 (m, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.22 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.74 (s, 6H), 1.40 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 196.1, 158.9, 154.8, 144.6, 141.9, 137.6, 132.8, 132.3, 130.2, 128.5, 128.22, 126.4, 124.9, 121.2, 102.2, 56.0, 42.3, 21.8, 14.5 ppm.

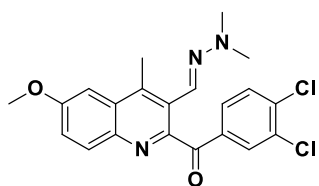
IR (neat) v: 1671.1, 1615.9 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₂H₂₃N₃O₂ (M = 361.44): C, 73.11; H, 6.41; N, 11.63.

Found: C, 73.09; H, 6.54; N, 11.30.

mp: 134-136 °C.

2-(3,4-Dichlorobenzoyl)-3-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methylquinoline (13d)



Prepared from tetrahydroquinoline **3g** (0.420 g, 1 mmol) and DDQ (0.454 g, 2 mmol).

Yield: 0.191 g (46%). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.01 – 7.95 (m, 2H), 7.73 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.39 (bs, 1H), 7.36 (dd, *J* = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 7.30 – 7.28 (m, 1H), 4.01 (s, 3H), 2.79 (s, 6H), 2.74 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 193.7, 159.1, 153.3, 141.5, 139.1, 137.6, 137.1, 133.1, 132.2, 132.0, 130.8, 129.4, 129.2, 127.3, 125.1, 121.6, 102.4, 56.0, 42.4, 14.8 ppm.

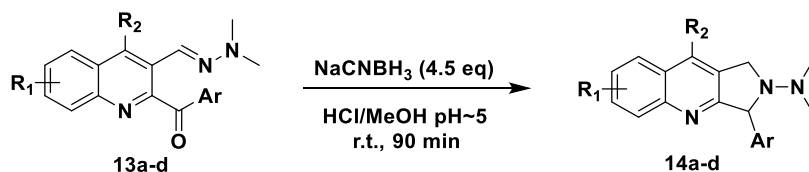
IR (neat) v: 1674.8, 1616.6 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₁H₁₉Cl₂N₃O₂ (M = 416.30): C, 60.59; H, 4.60; N, 10.09.

Found: C, 60.38, H, 4.62; N, 9.81.

mp: 237-239 °C.

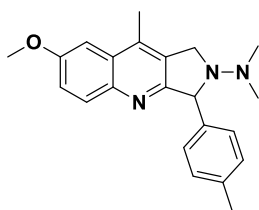
Synthesis of pyrrolo[3,4-*b*]quinolines **14a-d**.



Compuesto	R ₁	R ₂	Ar
14a	7-OCH ₃	CH ₃	4-CH ₃ C ₆ H ₄
14b	7-OCH ₃	CH ₃	3-BrC ₆ H ₄
14c	7-OCH ₃	CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅
14d	7-OCH ₃	CH ₃	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃

To a stirred solution of quinolines **13a-d** (1 eq) in methanol (3 mL) at room temperature, it was added dropwise a mixture of HCl conc/MeOH (pH=3) to adjust the pH of the mixture at 4-5. Then, NaCNBH₃ was added in a portion (1 eq), stirring was continued for 10 minutes, and pH was readjusted again to 4-5. This process was repeated until 4.5 eq of NaCNBH₃ were employed and pH set to 5. After 90 min of reaction, solvent was evaporated and the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL), washed with water (1 x 5 mL) and brine (1 x 5 mL). The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 5 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated under vacuum. The resulting residue was purified by a column chromatography in silica gel, using the suitable mixture of solvents.

2-Dimethylamino-7-methoxy-9-methyl-3-(*p*-tolyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrrolo[3,4-*b*]quinoline (**14a**)



Prepared from quinoline **13a** (0.072 g, 0.2 mmol) and NaCNBH₃ (0.057 g, 0.9 mmol).

Purification: 7:3 (hexane/ethyl acetate).

Yield: 0.063 g (91%). Dark orange solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.90 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.26 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.23 – 7.17 (m, 3H), 5.35 (s, 1H), 4.52 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 4.31 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 2.60 (s, 3H), 2.54 (s, 6H), 2.37 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 161.2, 157.6, 144.3, 139.5, 137.3, 136.2, 131.9, 129.5, 129.4, 129.0, 128.7, 120.3, 102.3, 68.5, 55.9, 46.5, 41.2, 21.7, 15.5 ppm.

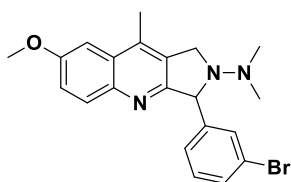
IR (neat) ν : 1619.6 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}$ (M = 347.45): C, 76.05; H, 7.25; N, 12.09.

Found: C, 75.77; H, 6.88; N, 11.97.

mp: 146-148 $^\circ\text{C}$.

2-Dimethylamino-3-(3-bromophenyl)-7-methoxy-9-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,4-*b*]quinoline (14b)



Prepared from quinoline **13b** (0.085 g, 0.2 mmol) and NaCNBH_3 (0.057 g, 0.9 mmol).

Purification: 8:2 (hexane/ethyl acetate).

Yield: 0.070 g (85%). Dark red oil.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 7.89 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.71 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.31 – 7.23 (m, 2H), 7.19 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 5.33 (s, 1H), 4.51 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 4.35 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.61 (s, 3H), 2.55 (s, 6H) ppm.

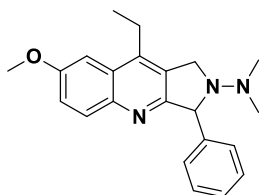
^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 160.1, 157.8, 145.0, 144.3, 136.6, 131.9, 131.8, 130.9, 130.3, 129.2, 128.8, 127.8, 122.9, 120.6, 102.3, 68.6, 55.9, 45.6, 41.2, 15.6 ppm.

IR (neat) ν : 1619.8 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{BrN}_3\text{O}$ (M = 412.32): C, 61.17; H, 5.38; N, 10.19.

Found: C, 61.20; H, 5.18; N, 10.23.

2-Dimethylamino-9-ethyl-7-methoxy-3-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,4-*b*]quinoline (14c)



Prepared from quinoline **13c** (0.072 g, 0.2 mmol) and NaCNBH_3 (0.057 g, 0.9 mmol).

Purification: 8:2 (hexane/ethyl acetate).

Yield: 0.061 g (88%). Brown solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.91 (m, 1H), 7.59 – 7.53 (m, 2H), 7.44 – 7.36 (m, 2H), 7.35 – 7.31 (m, 1H), 7.28 – 7.24 (m, 2H), 5.39 (s, 1H), 4.52 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 4.34 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.03 (q, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.54 (s, 6H), 1.38 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 161.3, 157.7, 144.9, 142.6, 142.1, 132.0, 129.1, 128.7, 128.7, 127.8, 127.6, 120.2, 102.3, 68.7, 55.9, 46.2, 41.3, 23.2, 14.1 ppm.

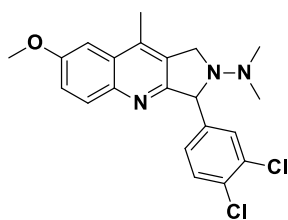
IR (neat) v: 1619.5 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₂H₂₅N₃O (M = 347.45): C, 76.05; H, 7.25; N, 12.09.

Found: C, 75.88; H, 6.99; N, 11.98.

mp: 120-122 °C.

2-Dimethylamino-3-(3,4-dichlorophenyl)-7-methoxy-9-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,4-*b*]quinoline (14d)



Prepared from quinoline **13d** (0.083 g, 0.2 mmol) and NaCNBH₃ (0.057 g, 0.9 mmol).

Purification: 8:2 (hexane/ethyl acetate).

Yield: 0.080 g (99%). Dark green paste.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.88 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.49 – 7.40 (m, 2H), 7.31 – 7.26 (m, 1H), 7.19 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 5.29 (s, 1H), 4.49 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 4.34 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.61 (s, 3H), 2.55 (s, 6H) ppm.

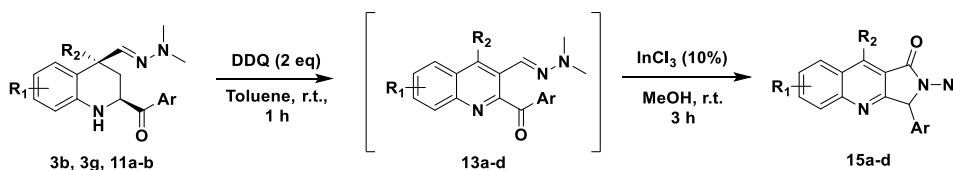
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 159.6, 157.9, 144.2, 142.9, 136.8, 132.7, 131.7, 131.6, 130.9, 130.7, 129.0, 128.8, 128.5, 120.7, 102.3, 68.4, 55.9, 44.9, 41.1, 15.6 ppm.

IR (neat) v: 1620.1 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₁H₂₁Cl₂N₃O (M = 402.32): C, 62.69; H, 5.26; N, 10.44.

Found: C, 62.77; H, 5.21; N, 10.05.

Synthesis of pyrrolo[3,4-*b*]quinolin-1-ones **15a-d**.

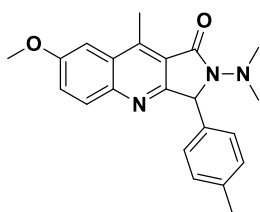


Compuesto	R ₁	R ₂	Ar
15a	7-OCH ₃	CH ₃	4-CH ₃ C ₆ H ₄
15b	7-OCH ₃	CH ₃	3-BrC ₆ H ₄
15c	7-OCH ₃	CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅
15d	7-OCH ₃	CH ₃	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃

To a stirred solution of the suitable 2-acetyltetrahydroquinoline (0.5 mmol) in toluene (10 mL), it was added 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) (1 mmol) slowly. The solution was stirred at room temperature until the starting material disappeared and compounds **13a-d** were formed, as confirmed by TLC (1 h). Then, toluene was evaporated under reduced pressure and the residue was redissolved in methanol (5 mL). InCl₃ (0.1 eq) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 3 h. When the reaction was finished, water (15 mL) was added to the mixture and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness under low pressure.

The residue was purified by silica gel flash chromatography, eluting with hexane/ethyl acetate (85:15 to 80:20).

2-(Dimethylamino)-7-methoxy-9-methyl-3-(*p*-tolyl)-2,3-dihydro-1*H*-pyrrolo[3,4-*b*]quinolin-1-one (**15a**)



Prepared from tetrahydroquinoline **11a** (0.183 g, 0.5 mmol), DDQ (0.227 g, 1 mmol) and InCl₃ (0.011 g, 0.05 mmol).

Yield: 0.083 g (46%). Brown solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.95 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.39 (dd, *J* = 9.1, 2.8 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.17 (s, 4H), 5.51 (s, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.14 (s, 3H), 2.90 (s, 6H), 2.35 (s, 3H) ppm.

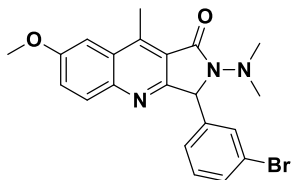
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 167.6, 160.4, 158.2, 145.6, 144.1, 138.6, 134.4, 131.7, 129.8, 129.5, 128.8, 123.4, 120.8, 102.9, 65.8, 55.9, 44.6, 21.6, 12.5 ppm.

IR (neat) v: 1687.5, 1620.4 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₂H₂₃N₃O₂ (M = 361.45): C, 73.11; H, 6.41; N, 11.63. Found: C, 72.87; H, 6.17; N, 11.32.

mp: 198-199 °C.

3-(3-Bromophenyl)-2-(dimethylamino)-7-methoxy-9-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,4-*b*]quinolin-1-one (15b)



Prepared from tetrahydroquinoline **11b** (0.215 g, 0.5 mmol), DDQ (0.227 g, 1 mmol) and InCl₃ (0.011 g, 0.05 mmol).

Yield: 0.077 g (36%). Orange solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.97 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.51 – 7.40 (m, 3H), 7.37 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.26 – 7.21 (m, 2H), 5.47 (s, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.15 (s, 3H), 2.91 (s, 6H) ppm.

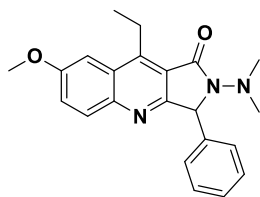
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 167.7, 159.6, 158.4, 145.7, 144.6, 139.9, 132.1, 132.0, 131.7, 130.7, 129.7, 127.7, 123.8, 123.1, 120.7, 103.00, 65.6, 56.0, 44.7, 12.6 ppm.

IR (neat) v: 1684.5, 1617.2 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₁H₂₀BrN₃O₂ (M = 426.31): C, 59.17; H, 4.73; N, 9.86. Found: C, 58.98; H, 4.65; N, 9.75.

mp: 167-169 °C.

2-(Dimethylamino)-9-ethyl-7-methoxy-3-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,4-*b*]quinolin-1-one (15c)



Prepared from tetrahydroquinoline **3b** (0.183 g, 0.5 mmol), DDQ (0.227 g, 1 mmol) and InCl_3 (0.011 g, 0.05 mmol).

Yield: 0.063 g (35%). Pale orange solid.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.01 – 7.94 (m, 1H), 7.44 – 7.34 (m, 5H), 7.32 – 7.27 (m, 2H), 5.53 (s, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.81 – 3.63 (m, 2H), 2.90 (s, 6H), 1.47 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H) ppm.

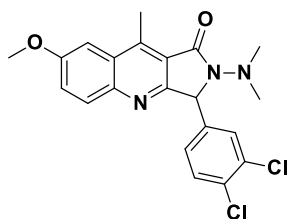
$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ : 167.2, 160.5, 158.3, 150.3, 146.2, 137.5, 131.9, 129.1, 128.9, 128.9, 128.4, 123.4, 120.0, 102.9, 66.2, 56.0, 44.6, 19.7, 15.4 ppm.

IR (neat) ν : 1685.7, 1602.3 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ ($M = 361.45$): C, 73.11; H, 6.41; N, 11.63. Found: C, 72.85; H, 6.45; N, 11.48.

mp: 145-146 °C.

3-(3,4-Dichlorophenyl)-2-(dimethylamino)-7-methoxy-9-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,4-*b*]quinolin-1-one (15d)



Prepared from tetrahydroquinoline **3g** (0.210 g, 0.5 mmol), DDQ (0.227 g, 1 mmol) and InCl_3 (0.011 g, 0.05 mmol).

Yield: 0.071 g (34%). Yellowish solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.96 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.13 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 5.46 (s, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.14 (s, 3H), 2.92 (s, 6H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 167.7, 159.2, 158.5, 145.7, 144.8, 137.9, 133.2, 133.1, 131.7, 131.1, 131.1, 129.8, 128.2, 123.9, 120.6, 103.0, 65.1, 56.03, 44.7, 12.6 ppm.

IR (neat) v: 1688.1, 1619.4 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₁H₁₉Cl₂N₃O₂ (M = 416.30): C, 60.59; H, 4.60; N, 10.09.

Found: C, 60.64; H, 4.67; N, 10.36.

mp: 87-89 °C.

**Capítulo 5. DISEÑO Y SÍNTESIS DE
COMPUESTOS DIAZABICÍCLICOS ANÁLOGOS
DE CITISINA CON ACTIVIDAD
NEUROPROTECTORA**

5.1 Introducción

5.1.1 Estrés oxidativo y Nrf2

En la introducción de esta tesis doctoral se ha examinado detenidamente el papel central que desempeña el estrés oxidativo en la degeneración patológica del sistema nervioso central. Por este motivo, parece un ámbito de actuación más que interesante la búsqueda de terapias cuyo objetivo sea anticiparse al progreso irreversible del daño neuronal. Como se comentó anteriormente, el estatus oxidativo celular es el resultado de un equilibrio entre las especies reactivas que se generan en el curso de la actividad fisiológica y las defensas antioxidantes de las que dispone la célula para neutralizarlas, por lo que cualquier aproximación terapéutica en este sentido debe actuar sobre uno de estos elementos, siendo el fármaco antioxidante ideal aquel capaz de neutralizar las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por sí mismo a la par que estimula los sistemas celulares de defensa antioxidante.

La estimulación farmacológica de los sistemas antioxidantes endógenos ha atraído en los últimos años un considerable interés en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, siendo la modulación del sistema Keap-1/Nrf2/ARE una de las mayores esperanzas en este campo²⁰⁷. El factor de transcripción Nrf2 es el eje central de uno de los sistemas de defensa antioxidante más importantes de las células eucariotas, controlando a través de las secuencias ARE (*Antioxidant Response Elements*) la expresión de numerosos genes que codifican para la síntesis de proteínas con función citoprotectora²⁰⁸.

En condiciones fisiológicas, Nrf2 es una proteína de vida media muy corta, debido a que sus niveles están rigurosamente controlados por varias vías, siendo la principal su unión a la proteína Keap-1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). Cuando Keap-1 se une a Nrf2, permite su reconocimiento por parte del complejo ligasa E3 CUL3/RBX1, que media su poliubiquitinación y degradación por el proteasoma. Cuando se produce un aumento en

²⁰⁷ Cuadrado, A., Manda, G., Hassan, A., Alcaraz, M. J., Barbas, C., Daiber, A., Ghezzi, P., León, R., López, M., Oliva, B., Pajares, M., Rojo, A. I., Robledinos-Antón, N., Valverde, A. M., Guney, E., Schmidt, H. *Pharmacol. Rev.* **2018**, *70*, 348.

²⁰⁸ Dinkova-Kostova, A. T., Kostov, R. V., Kazantsev, A. G. *FEBS J.* **2018**, *285*, 3576.

la concentración citosólica de especies de carácter oxidante y/o electrófilo, de origen tanto endógeno como exógeno, Keap1 es capaz de detectar estos cambios gracias a que es una proteína rica en residuos de cisteína. Los grupos sulfhidrilo presentes en estos aminoácidos se encuentran estabilizados por coordinación a iones de zinc en condiciones fisiológicas, pero son capaces de atrapar directamente moléculas electrófilas mediante reacciones de adición, o de dar lugar a reacciones redox con especies oxidantes, dando lugar a la formación de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína involucrados. En ambos casos, la consecuencia es similar: se induce un cambio estructural de la proteína Keap-1 que permite la liberación de Nrf2 en el citoplasma. Esto le faculta para traslocarse al núcleo, donde forma heterodímeros con proteínas pequeñas del tipo MAF (*MusculoAponeurotic Fibrosarcoma proteins*), y se une posteriormente a los elementos de respuesta antioxidante del ADN²⁰⁹. ¿Esto en qué se traduce? En una respuesta general de protección celular^{210,211}, mediada por:

- Proteínas y enzimas antioxidantes: es quizá la función más estudiada de Nrf2. Este factor de transcripción estimula la expresión de la hemoxigenasa 1, la enzima encargada del catabolismo del grupo hemo. Esta actividad cursa con la liberación de Fe²⁺ (del que también favorece su salida de la célula)^{212,213}, monóxido de carbono²¹⁴, al que se atribuyen diversos efectos neuroprotectores a través de la regulación de la función mitocondrial, la señalización mediada por calcio e incluso la inducción de Nrf2; y biliverdina, cuya reducción genera bilirrubina, un pigmento que a concentraciones fisiológicas posee una potente actividad antioxidante. Además, también incrementa los niveles de la NAD(P)H deshidrogenasa (quinona) 1 (NQO1), una enzima reductora de numerosas especies oxidantes. Por otra parte, estimula la expresión de numerosas enzimas relacionadas con la homeostasis del glutatión, como la glutatión peroxidasa, las subunidades catalítica y moduladora de la glutamato cisteína ligasa (enzima

²⁰⁹ Buendia, I., Michalska, P., Navarro, E., Gameiro, I., Egea, J., León, R. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *157*, 84.

²¹⁰ Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 199.

²¹¹ Dodson, M., De La Vega, M. R., Cholanians, A. B., Schmidlin, C. J., Chapman, E., Zhang, D. D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2019**, *59*, 555.

²¹² Chen, J. *Rev. Neurosci.* **2014**, *25*, 269.

²¹³ Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., Dulak, J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 3221.

²¹⁴ Mahan, V. L. *Med. Gas Res.* **2012**, *2*, 1.

responsable de la síntesis *de novo* de glutatión) y la glutatión reductasa. Asimismo, controla la expresión de otras enzimas antioxidantes como las tiorreductasas o las peroxirredoxinas. En definitiva, Nrf2 es un regulador esencial de la gran mayoría de enzimas antioxidantes de las que disponen las células.

- Metabolismo de xenobióticos: Nrf2 activa la expresión de numerosas enzimas relacionadas con el metabolismo de fármacos y xenobióticos, tanto de fase I (aldo-ceto reductasas, aldehído deshidrogenasas), como de fase II (UDP glucuronosiltransferasas, glutatión-S-transferasas), y de fase III (proteínas de multirresistencia a fármacos y otros transportadores encargados de la expulsión de xenobióticos a través de la membrana celular).
- Homeostasis proteica: se ha demostrado que Nrf2 interviene en la regulación de la expresión de varios genes relacionados con el proceso de autofagia. El caso más paradigmático es el de la proteína p62/SQSTM1, que reconoce proteínas ubiquitinadas y las dirige a su degradación por la vía autofágica. De hecho, la expresión de p62/SQSTM1 mediada por Nrf2 supone una estrategia de auto-activación, debido a que ambas proteínas compiten por la unión a Keap1, y esta proteína de función autofágica también interviene en la degradación de Keap1 cuando ésta ha reaccionado con oxidantes o electrófilos²¹⁵. También Nrf2 estimula la expresión de algunas proteínas constitutivas del proteasoma²¹⁶.
- Inflamación: el papel de Nrf2 en la regulación de la inflamación parece un asunto complicado, a pesar de haber sido profusamente estudiado. En principio, todo apunta a que la activación de Nrf2 conduce a una reducción del estatus inflamatorio en linfocitos, macrófagos y microglía; pero la relación es más compleja. Por un lado, Nrf2 es capaz de estimular de manera directa la expresión de algunos elementos proinflamatorios como los receptores MARCO y CD36, o la citoquina IL-17D; pero también bloquea la expresión de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β o la IL-6. También hay un carácter un tanto contradictorio en la relación entre Nrf2 y el sistema inflamasoma/NF- κ B: el

²¹⁵ Pajares, M., Jiménez-Moreno, N., García-Yagüe, Á. J., Escoll, M., de Ceballos, M. L., Van Leuven, F., Rábano, A., Yamamoto, M., Rojo, A. I., Cuadrado, A. *Autophagy* **2016**, *12*, 1902.

²¹⁶ Wardyn, J. D., Ponsford, A. H., Sanderson, C. M. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 621.

estrés oxidativo activa ambos factores de transcripción y NF-κB estimula la activación de Nrf2, pero también es verdad que hay una serie de interferencias en el funcionamiento de ambas vías que las lleva a ser en cierto modo antagónicas, desempeñando Nrf2 en este caso un papel antiinflamatorio²⁰⁹. No hay que soslayar también el papel antiinflamatorio de la HO-1, mediado tanto por la misma enzima como por el monóxido de carbono que genera su actividad.

- Regulación metabólica: Nrf2 tiene una notable influencia en el metabolismo celular. Sin ánimo de entrar en detalles, dada la complejidad del tema a tratar, Nrf2 estimula la β-oxidación de los ácidos grasos frente a la lipogénesis, favorece la desviación del metabolismo de la glucosa hacia la vía de las pentosas fosfato, regula el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, incrementa la regeneración del NADPH y la biosíntesis *de novo* de purinas. También interviene en el metabolismo del hierro, a través de la regulación de la HO-1, la ferritina y el procesamiento de la biliverdina. La interregulación entre Nrf2 y PGC-1α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) constituye un sistema muy importante para el control de la biogénesis mitocondrial y la garantía de su correcto funcionamiento²¹⁷.
- Regulación de la actividad génica y prevención de la apoptosis: Nrf2 también parece ser capaz de regular la expresión de otros factores de transcripción como el receptor de ácido retinoico alfa (RXRA), de modo que controlaría indirectamente la expresión de otros genes carentes de secuencias ARE. Además, induce la expresión de genes relacionados con la reparación del ADN y proteínas antiapoptóticas, como es el caso de la proteína Bcl-2.

5.1.2 Modulación terapéutica de la actividad de Nrf2

El papel defensivo de Nrf2 parece estar comprometido en el proceso de neurodegeneración. Todo apunta a que no sólo sería un problema de incapacidad de la vía Nrf2/ARE para hacer frente al creciente estrés oxidativo y daño celular que

²¹⁷ Navarro, E., Gonzalez-Lafuente, L., Pérez-Liéñana, I., Buendia, I., López-Bernardo, E., Sánchez-Ramos, C., Prieto, I., Cuadrado, A., Satrústegui, J., Cadenas, S., Monsalve, M., López, M. G. *Antioxid. Redox Signal.* **2017**, 27, 93.

caracterizan al envejecimiento y la neurodegeneración, sino que además los distintos procesos patológicos y la disfunción de diversas cascadas de señalización celular podrían reducir la efectividad de este sistema defensivo antioxidante ²¹⁸ , ²¹⁹ .

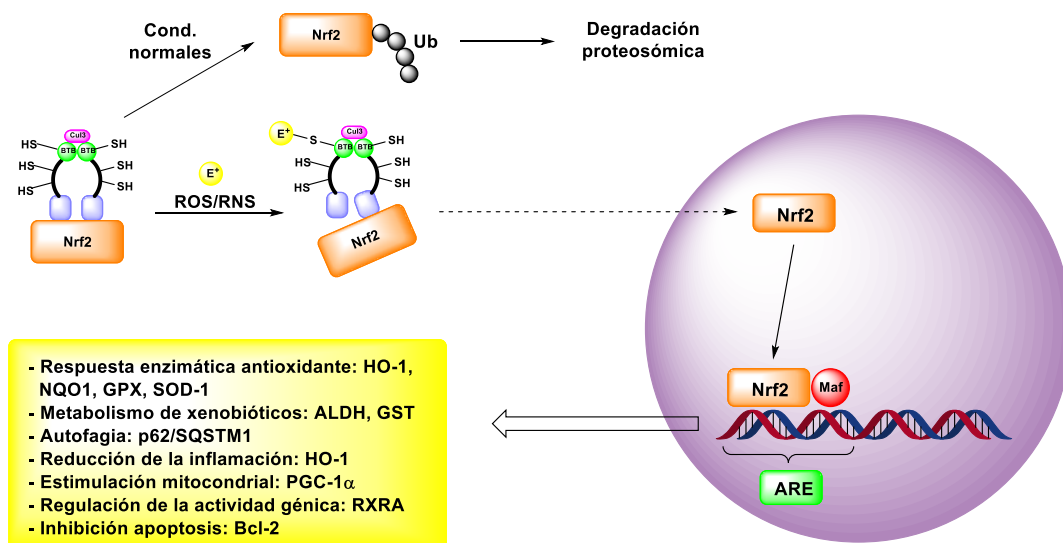


Figura 5.1. Regulación de la actividad de Nrf2 en condiciones fisiológicas o de estrés oxidativo. Consecuencias de la activación de la vía Nrf2/ARE.

Los mecanismos por los que se alcanza este estatus podrían ser diferentes según la enfermedad neurodegenerativa: en la enfermedad de Alzheimer se ha observado una reducción de la capacidad de Nrf2 para translocarse al núcleo en las áreas cerebrales más afectadas, como el hipocampo, dejándolas en un estado de mayor susceptibilidad a los estragos causados por el estrés oxidativo y otros estímulos deletéreos²²⁰. En cambio, en el caso de otras enfermedades como la de Parkinson o la ELA, parece que la capacidad de Nrf2 para activarse y traslocarse al núcleo en respuesta a este tipo de situaciones se encuentra conservada incluso en las regiones más afectadas, pero por motivos que aún no están bien dilucidados esto no se traduce en una adecuada respuesta antioxidante y citoprotectora²²¹. Así, se puede deducir que los distintos fenómenos subyacentes a estas patologías, como los depósitos de proteínas o la neuroinflamación, pueden interferir de algún modo con determinados elementos de la

²¹⁸ Shenvi, S. V., Smith, E., Hagen, T. M. *Aging Cell.* **2012**, *11*, 297.

²¹⁹ Schmidlin, C. J., Dodson, M. B., Madhavan, L., Zhang, D. D. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *134*, 702.

²²⁰ Ramsey, C. P., Glass, C. A., Montgomery, M. B., Lindl, K. A., Ritson, G. P., Chia, L. A., Hamilton, R. A., Chu, C. T., Jordan-Sciutto, K. L. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2007**, *66*, 75.

²²¹ Mimoto, T., Miyazaki, K., Morimoto, N., Kurata, T., Satoh, K., Ikeda, Y., Abe, K. *Brain Res.* **2012**, *1446*, 109.

vía Nrf2/ARE. La importancia de esta vía en el proceso de neurodegeneración está documentada por una gran cantidad de trabajos que muestran los beneficios de la inducción de Nrf2, ya sea a través de técnicas genéticas o mediante fármacos, en términos de atenuación e incluso reversión del daño celular observable en diversos modelos de toxicidad neuronal²²².

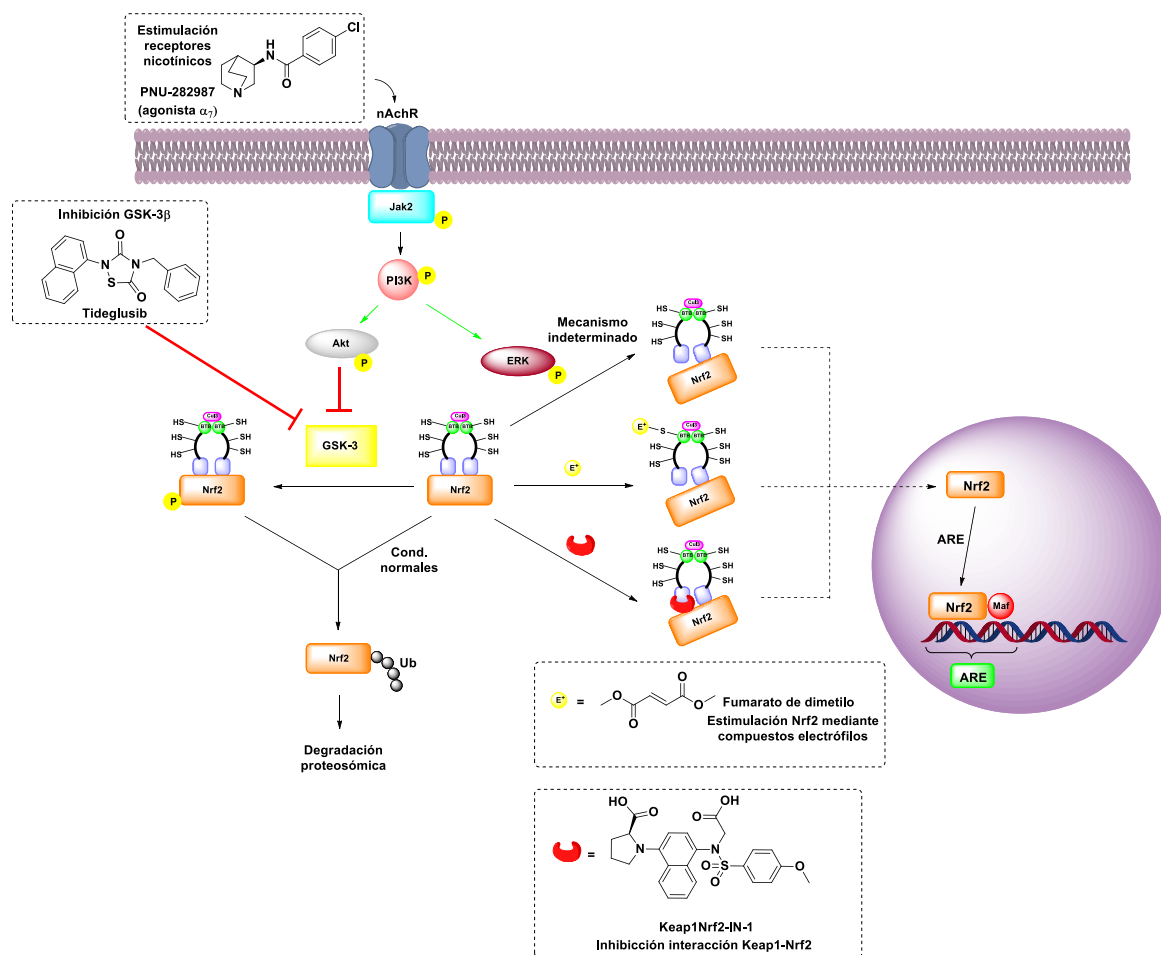


Figura 5.2. Principales vías para la estimulación farmacológica de Nrf2, y ejemplos representativos de compuestos que actúan por cada una de ellas.

Teniendo en cuenta el protagonismo del estrés oxidativo en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas, y la importancia de la vía Nrf2/ARE como sistema defensivo endógeno frente a esta amenaza, el empleo de fármacos activadores de este factor de transcripción parece una estrategia terapéutica muy prometedora. Llegados a

²²² Ejemplos de revisiones sobre este tema son. a) Gerfo, A. L., Petrozzi, L., Chico, L., Siciliano, G. *A Master Regulator of Oxidative Stress-The Transcription Factor Nrf2*. IntechOpen, 2016. b) Li, Q., Xing, S., Chen, Y., Liao, Q., Li, Q., Liu, Y., He, S., Feng, F., Chen, Y., Zhang, J., Liu, W., Guo, Q., Sun, Y., Sun, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *185*, 111862.

esta conclusión, resulta necesario tratar brevemente las distintas aproximaciones farmacológicas que se han propuesto para la estimulación de esta vía²²³:

- Interacción directa con Keap-1: la estrategia de activación de Nrf2 que cuenta con un mayor bagaje reside en el empleo de moléculas electrófilas, cuya reacción con los residuos clave de cisteína de Keap-1 induce el cambio conformacional necesario para estimular la liberación y estabilización de Nrf2. En este apartado merece especial mención el fumarato de dimetilo, un fármaco utilizado en el tratamiento de la esclerosis múltiple gracias a su capacidad atenuante del estrés oxidativo y la inflamación, y único activador de Nrf2 aprobado por la EMA y la FDA. Su mecanismo de acción, en línea con muchos de los inductores de Nrf2 propuestos hasta el momento, se basa en su naturaleza de compuesto carbonílico α,β -insaturado, de modo que funciona como aceptor de Michael frente a los grupos tiol de Keap-1. Otros ejemplos de esta clase de inductores serían algunos polifenoles como la curcumina y el resveratrol, determinados triterpenoides como la bardoxolona, o la minociclina. No todos los inductores de Nrf2 presentan el mismo tipo de función electrófila: el sulforafano induce la liberación de Nrf2 a través de su grupo isotiocianato, mientras que la DL-3-n-butiltalida lo hace gracias a un anillo de lactona.

Algunos trabajos publicados en los últimos años precisan que no todos los residuos de cisteína de Keap-1 desempeñan el mismo papel en la regulación de su actividad: por ejemplo, las cisteínas 273 y 288 estarían relacionadas con la interacción entre Keap-1 y Nrf2, pero la alquilación de la cisteína 151 se interpondría en cambio en el reclutamiento del complejo de ligasa CUL3/RBX1, de modo que Keap-1 queda “secuestrada” por Nrf2 al ser incapaz de dirigir su degradación, y el Nrf2 que la célula va generando *de novo* tiene vía libre para traslocarse al núcleo. Esto quiere decir que los inductores electrofílicos de Nrf2

²²³ Robledinos-Antón, N., Fernández-Ginés, R., Manda, G., Cuadrado, A. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, 2019.

pueden actuar a través de dos mecanismos de acción diferentes o incluso en algunos casos mediante ambos a la vez^{224,225}.

Esta estrategia, aunque sin duda interesante y exitosa si se tiene en cuenta el caso del fumarato de dimetilo, tiene un inconveniente que no puede ser obviado: las moléculas electrófilas tienen la capacidad de reaccionar con otros muchos nucleófilos endógenos, con el consecuente aumento de los posibles efectos no deseados o tóxicos. Este problema ha motivado la exploración de nuevas vías de inducción de Nrf2.

- Inhibidores de la interacción entre Keap-1 y Nrf2: una aproximación que ha ido ganando adeptos en los últimos tiempos se basa en el empleo de moléculas capaces de interponerse en la interacción proteína-proteína entre Keap-1 y Nrf2, forzando la liberación de este último²²⁶. Si bien los primeros compuestos que dieron resultados positivos fueron peptidomiméticos y péptidos cíclicos, hoy en día se han caracterizado varios tipos de moléculas pequeñas capaces de reproducir dicho efecto, entre las que se encuentran derivados de tetrahidroisoquinolinas, de urea o triazoles, entre otras. Uno de los retos inherentes a esta estrategia consiste en lograr un efecto selectivo para la interacción entre Keap-1 y Nrf2, evitando la obstrucción de la función reguladora que tiene Keap-1 sobre otras proteínas como la IKK, que a su vez controla la actividad del factor de transcripción NF- κ B, o la proteína antiapoptótica Bcl-2. Aunque con un mecanismo un poco diferente, se podrían incluir en este epígrafe aquellos compuestos capaces de incrementar los niveles de determinadas proteínas que compiten con Nrf2 por la unión a Keap-1, como es el caso de p62/SQSTM-1²²⁷.

²²⁴ Saito, R., Suzuki, T., Hiramoto, K., Asami, S., Naganuma, E., Suda, H., Iso, T., Yamamoto, H., Morita, M., Furusawa, Y., Negishi, T., Ichinose, M., Yamamoto, M. *Mol. Cell. Biol.* **2016**, *36*, 271.

²²⁵ Rachakonda, G., Xiong, Y., Sekhar, K. R., Stamer, S. L., Liebler, D. C., Freeman, M. L. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 705.

²²⁶ Kerr, F., Sofola-Adesakin, O., Ivanov, D. K., Gatliff, J., Gómez Pérez-Nievas, B., Bertrand, H. C., Martínez, P., Callard, R., Snoeren, I., Cochemé, H. M., Adcott, J., Khericha, M., Castillo-Quan, J. I., Wells, G., Noble, W., Thornton, J., Partridge, L. *PLoS Genet.* **2017**, *13*.

²²⁷ Katsuragi, Y., Ichimura, Y., Komatsu, M. *Curr. Opin. Toxicol.* **2016**, *1*, 54.

- Modulación no dependiente de Keap-1: a medida que se amplía la información disponible sobre la regulación de la actividad de Nrf2, surgen nuevas estrategias que ponen el foco en otras vías independientes de Keap-1. Hoy en día, la aproximación más explorada en este ámbito consiste en la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), una enzima que participa en numerosos procesos fisiológicos e implicada en la hiperfosforilación de la proteína Tau, así como en la regulación de Nrf2. Más concretamente, GSK-3 β fosforila a Nrf2 de forma que crea un dominio de reconocimiento para la proteína β -TrCP (*Beta-transducin repeats-containing protein*), que al unirse a este factor de transcripción lo dirige a su degradación mediante el sistema ubiquitina-proteasoma²²⁸. Algunos compuestos, como el tideglusib, han demostrado una actividad inductora de Nrf2 a través de este mecanismo²²⁹.

En un estado cuasi embrionario se encuentran otras posibles aproximaciones como la inhibición de la interacción entre Nrf2 y β -TrCP, los inhibidores de ligasas como HRD-1 involucradas en la degradación de Nrf2 independiente de Keap-1²³⁰ y el bloqueo de BACH1, una proteína nuclear que forma heterodímeros con las proteínas Maf impidiendo hacer lo propio a Nrf2, de modo que causa la pérdida de su actividad transcripcional²²³.

En los últimos años se ha desvelado el papel que ciertos subtipos de receptores nicotínicos, principalmente el α_7 , tienen en la activación de Nrf2 a través de diversas vías de señalización. Este descubrimiento abre otra vía para el desarrollo de inductores indirectos de dicho factor de transcripción, siendo básico para entender el diseño de los compuestos descritos en este capítulo.

²²⁸ Rada, P., Rojo, A. I., Evrard-Todeschi, N., Innamorato, N. G., Cotte, A., Jaworski, T., Tobón-Velasco, J., Devijver, H., García-Mayoral, M. F., Van Leuven, F., Hayes, J., Bertho, G., Cuadrado, A. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 3486.

²²⁹ Armagan, G., Sevgili, E., Gürkan, F. T., Köse, F. A., Bilgiç, T., Dagcı, T., Saso, L. *Molecules.* **2019**, *24*, 1377.

²³⁰ Wu, T., Zhao, F., Gao, B., Tan, C., Yagishita, N., Nakajima, T., Wong, P. K., Chapman, E., Fang, D., Zhang, D. D. *Genes Dev.* **2014**, *28*, 708.

5.1.3 Papel neuroprotector y regulador de Nrf2 de los receptores nicotínicos de acetilcolina

Ya hace tiempo que se comenzó a estudiar el papel de los receptores nicotínicos de acetilcolina en la protección neuronal y los procesos de neurodegeneración, centrándose el interés sobre todo en los subtipos $\alpha_4\beta_2$ y α_7 debido a su especial abundancia a nivel del sistema nervioso central, donde son imprescindibles para determinados procesos cerebrales como la memoria, la atención o el aprendizaje^{231,232,233}. Respecto a los receptores nicotínicos del subtipo $\alpha_4\beta_2$, en general se acepta su implicación en el efecto neuroprotector y antiinflamatorio ejercido por determinados agonistas nicotínicos en diversos modelos de daño neuronal^{234,235,236}, aunque otros estudios los desvinculan de estos efectos²³⁷ o incluso parecen indicar que su estimulación podría incrementar la sensibilidad neuronal a los efectos neurotóxicos del péptido β -amiloide²³⁸.

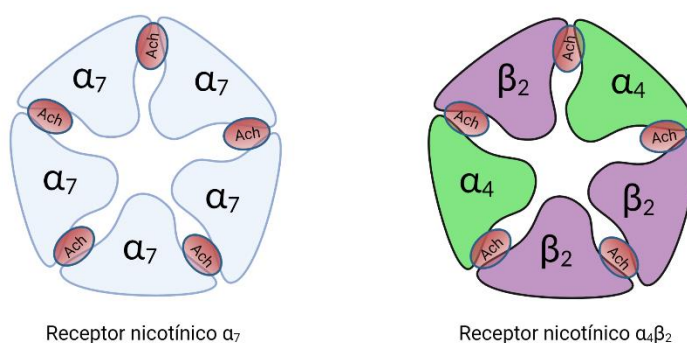


Figura 5.3. Representación simplificada de la estructura pentamérica de los receptores nicotínicos α_7 y $\alpha_4\beta_2$; en rojo, las zonas de unión de la acetilcolina.

²³¹ Braidia, D., Ponzoni, L., Martucci, R., Sparatore, F., Gotti, C., Sala, M. *Psychopharmacology*. **2014**, 231, 1975.

²³² Sun, Y., Yang, Y., Galvin, V. C., Yang, S., Arnsten, A. F., Wang, M. *J. Neurosci*. **2017**, 37, 5366.

²³³ Lendvai, B., Kassai, F., Szájlí, Á., Némethy, Z. *Brain Res Bull*. **2013**, 93, 86.

²³⁴ Takeuchi, H., Yanagida, T., Inden, M., Takata, K., Kitamura, Y., Yamakawa, K., Sawada, H., Izumi, Y., Yamamoto, N., Kihara, T., Uemura, K., Inoue, H., Taniguchi, T., Akaike, A., Takahashi, R., Shimohama, S. *J. Neurosci. Res*. **2009**, 87, 576.

²³⁵ Akaike, A., Takada-Takatori, Y., Kume, T., Izumi, Y. *J. Mol. Neurosci*. **2010**, 40, 211.

²³⁶ Hosur, V., Loring, R. H. *Mol. Pharmacol*. **2011**, 79, 167.

²³⁷ Alzoubi, K. H., Srivareerat, M., Tran, T. T., Alkadhi, K. A. *Int. J. Neuropsychopharmacol*. **2013**, 16, 1105.

²³⁸ Arora, K., Cheng, J., Nichols, R. A. *J. Biol. Chem*. **2015**, 290, 21409.

El papel neuroprotector de los receptores nicotínicos del subtipo α_7 parece más asentado: la literatura recoge diversos estudios donde su estimulación resulta beneficiosa para el control de la neuroinflamación²³⁹, el estrés oxidativo neuronal²⁴⁰ y la inhibición de la apoptosis²⁴¹, por citar sólo algunos ejemplos.

Los receptores nicotínicos del subtipo α_7 presentan una estructura homopentamérica y revisten un carácter dual ionotrópico/metabotrópico. Son canales iónicos dependientes de ligando, de modo que su activación por un agonista permite la entrada de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} a la célula, siendo su permeabilidad al calcio (diez a veinte veces mayor que al sodio) especialmente elevada si se compara con otros subtipos de receptores nicotínicos. Aunque en un principio se creía que éste era su único mecanismo de acción, posteriormente se observó que también se encuentra acoplado a diversas proteínas G y de otro tipo, lo que le dota de la capacidad de mediar la activación de numerosas vías de señalización celular a través de segundos mensajeros²⁴². Como se explicará más adelante, este mecanismo dual es importante para explicar su papel neuroprotector.

En lo que respecta a su localización y función, la presencia de este subtipo de receptores es especialmente relevante a nivel del sistema nervioso central en determinados grupos neuronales del hipotálamo, la corteza o algunas regiones límbicas subcorticales²⁴². Como ya se mencionó anteriormente, allí cumplen numerosas funciones relacionadas con la cognición, la memoria o el procesamiento de la información sensorial, entre otras. No obstante, también se ha revelado la presencia de estos receptores en otras células no neuronales del SNC como la microglía, los astrocitos, los precursores de oligodendrocitos o las células endoteliales, donde estarían implicados en respuestas de neuroprotección y control de la respuesta inmune. Asimismo, diversos estudios realizados en los últimos años han puesto de manifiesto la expresión de los receptores α_7 en otras regiones fuera del sistema nervioso central como los sistemas nerviosos periférico y entérico, el epitelio respiratorio y digestivo, los queratinocitos cutáneos, los

²³⁹ Tyagi, E., Agrawal, R., Nath, C., Shukla, R. *Neurochem. Int.* **2010**, *56*, 135.

²⁴⁰ Han, Z., Shen, F., He, Y., Degos, V., Camus, M., Maze, M., Young, W. L., Su, H. *PLoS One*, **2014**, *9*, e105711.

²⁴¹ Hua, Y., Yang, B., Chen, Q., Zhang, J., Hu, J., Fan, Y. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*.

²⁴² Corradi, J., Bouzat, C. *Mol. Pharmacol.* **2016**, *90*, 288.

testículos, etcétera^{243, 244}. Un caso que merece ser estudiado aparte es el de los receptores α_7 que se expresan en numerosos tipos celulares del sistema inmune, donde median lo que se ha dado en llamar la “respuesta colinérgica antiinflamatoria”: se ha observado que la estimulación del nervio vago en el contexto de una respuesta inflamatoria sistémica es capaz de detener la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos y otras células inmunitarias, tornando su actividad antioxidante y reparadora²⁴⁵.

En el contexto de la neurodegeneración, la estimulación de los receptores nicotínicos α_7 parece interesante por varios motivos. En primer lugar, por el beneficio directo que se podría obtener sobre algunos procesos que se ven afectados en este tipo de patologías, como la cognición y la memoria. Además, la respuesta mediada por estos receptores en las células neuronales y no neuronales del sistema nervioso central parece ser de un carácter netamente neuroprotector e inmunomodulador.

¿Cómo median los receptores α_7 estos efectos beneficiosos de cara al combate de la neurodegeneración? Se ha observado que la activación de estos receptores estimula varias vías de señalización celular que conforman una respuesta citoprotectora, orquestada eminentemente a través de su papel como receptor metabotrópico, pero en la que su permeabilidad al calcio también desempeña un papel importante. En primer lugar, los receptores α_7 median la activación de la vía de señalización JAK2/STAT3, que conduce a la inhibición de la traslocación al núcleo del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B, de modo que se produce una inhibición de la secreción de citoquinas citotóxicas y proinflamatorias. Este mecanismo constituiría un equivalente a la respuesta colinérgica antiinflamatoria a nivel del SNC, promoviendo la reorientación de la respuesta inflamatoria de la microglía y los astrocitos (y eventualmente, de

²⁴³ Wessler, I., Kirkpatrick, C. J. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *154*, 1558.

²⁴⁴ Bouzat, C., Lasala, M., Nielsen, B. E., Corradi, J., Esandi, M. D. C. *J. Physiol.* **2018**, *596*, 1847.

²⁴⁵ 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.* **2003**, *421*, 384.

cualquier otra célula inmune que pudiera hallarse en esos dominios) hacia una de tipo reparador y neuroprotector^{246,247}.

Por otra parte, también median la estimulación de la ruta PI3K/Akt: la quinasa Akt es capaz de fosforilar selectivamente a la enzima GSK-3 β en el residuo de serina-9, lo que implica su inactivación. Hay que recordar que GSK-3 β participa en una de las vías de degradación proteasómica de Nrf2 a través de la ligasa β -TrCP. Por tanto, la estimulación de la vía PI3K/Akt constituye un mecanismo indirecto de inducción de Nrf2, y de esta manera permite la consecución de una respuesta antioxidante y antiinflamatoria adicional a la provista por la vía JAK/STAT^{248,249}. Además, la estimulación de Akt tiene como consecuencia una importante respuesta antiapoptótica mediada por el aumento en los niveles de la proteína Bcl-2 y la disminución de la actividad de la caspasa-9 y de las proteínas del tipo Forkhead FOXO y FKHRL1²⁵⁰.

Por último, también se ha relacionado con los receptores α_7 la estimulación de la vía mediada por las quinasas MAPK/ERK: aunque su papel en la neurodegeneración aún no se encuentra bien establecido e incluso se contempla que podría ser beneficioso o perjudicial según las circunstancias, parece que podría conllevar la estimulación indirecta de Nrf2, además de inhibir GSK-3 β y la activación de la caspasa-3²⁵¹.

El carácter ionotrópico de los receptores nicotínicos α_7 también contribuye a su actividad neuroprotectora, ya que el aumento de los niveles de calcio citosólico que son capaces de mediar se traduce en la activación de diversas proteínas, entre las que se encuentra la proteína quinasa C (PKC). Ésta a su vez es capaz de fosforilar a Nrf2 en el residuo de serina-40, produciendo la disrupción de su interacción con Keap-1 y su traslocación ulterior al núcleo; además, ejerce otros efectos neuroprotectores como el aumento de la actividad de la proteína antiapoptótica Bcl-2²⁴⁶.

²⁴⁶ Parada, E., Egea, J., Buendia, I., Negro, P., Cunha, A. C., Cardoso, S., Soares, M. P., López, M. G. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 1135.

²⁴⁷ Patel, H., McIntire, J., Ryan, S., Dunah, A., Loring, R. *J. Neuroinflamm.* **2017**, *14*, 192.

²⁴⁸ Martin D, Rojo, A. I., Salinas, M, Díaz, R., Gallardo, G., Alam, J., Ruiz de Galarreta, C. M., Cuadrado, A. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 8919.

²⁴⁹ Rada, P., Rojo, A. I., Evrard-Todeschi, N., Innamorato, N. G., Cotte, A., Jaworski, T., Tobón-Velasco, J. C., Devijver, H., García-Mayoral, M. F., Van Leuven, F., Hayes, J. D., Bertho, G., Cuadrado, A. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 3486.

²⁵⁰ Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J., Rishi, A. K. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 1978.

²⁵¹ Xu, S., Yang, B., Tao, T., Zhang, J., Liu, Y., Hu, J., Fan, Y., Zhang, G. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 18480.

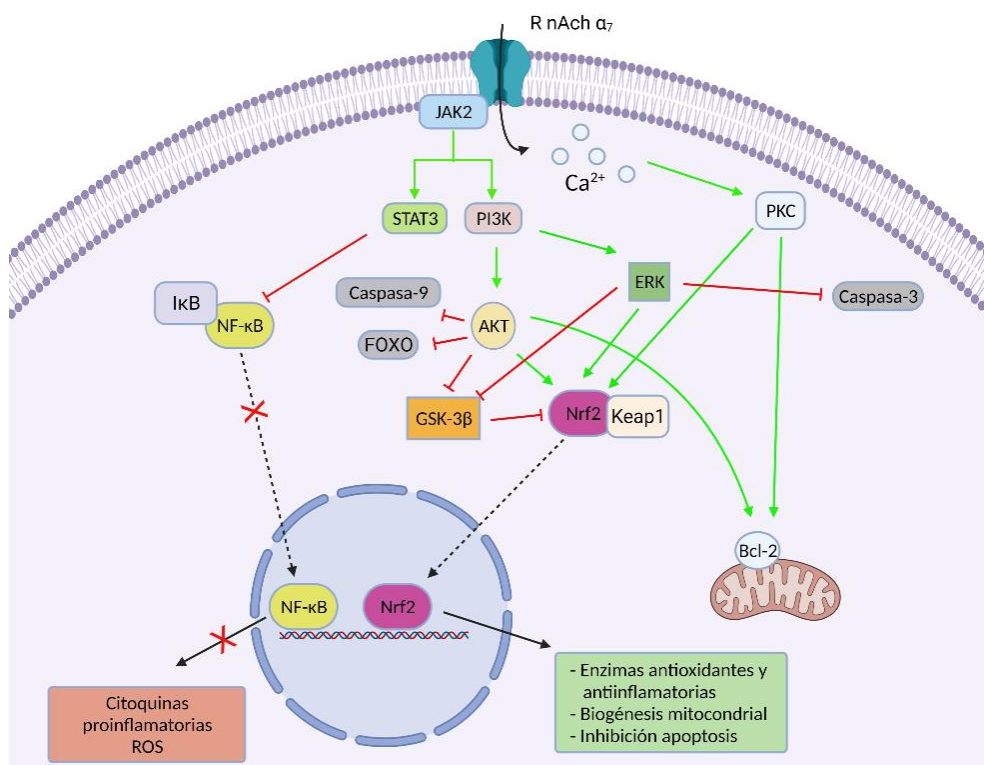


Figura 5.4. Efectos citoprotectores relacionados con la activación de los receptores nicotínicos α_7 .

A la vista de la función fisiológica que cumplen los receptores nicotínicos α_7 y de los efectos positivos que pueden mediar en el contexto de la degeneración neuronal asociada a la edad, han sido propuestos como una diana potencialmente interesante en la búsqueda de un tratamiento eficaz para las enfermedades neurodegenerativas.

En lo que atañe a la modulación farmacológica de estos receptores, hay que resaltar la existencia de dos estrategias diferentes: la primera, y la que goza de un mayor recorrido, es el empleo de agonistas ortostéricos, capaces de unirse al receptor a través del mismo dominio que reconoce al agonista endógeno. Por otro lado, en los últimos años se está explorando el empleo de moduladores alostéricos positivos, que se unirían al receptor por un sitio distinto al utilizado por la acetilcolina y serían capaces de potenciar el efecto del neurotransmisor endógeno, sin ser capaces de producir una respuesta *per se*. Una variante de este enfoque la proporciona el diseño de agonistas alostéricos, que sí serían capaces de estimular de forma directa el receptor a pesar de no unirse a su sitio ortostérico, además de potenciar el efecto del agonista endógeno. ¿Por qué se trabaja en estas estrategias alternativas? Por varias razones: en primer lugar, el sitio de unión a

acetilcolina presenta un elevado grado de homología entre los distintos subtipos de receptores nicotínicos, lo que constituye inevitablemente un obstáculo en términos de selectividad. En cambio, los sitios alostéricos presentan un mayor grado de variabilidad, lo que permite evitar este problema. Por otra parte, el hecho de que los moduladores alostéricos positivos sólo sean activos en presencia del neurotransmisor endógeno permite que su acción se asemeje más a la activación fisiológica habitual del receptor. Finalmente, esta aproximación permite una mayor diversidad estructural en los ligandos y un control más fino de la respuesta deseada, disminuyéndose además el riesgo de desensibilización del receptor que aqueja a los agonistas ortostéricos²⁴⁴.

Algunas moléculas, entre las que se encuentran representantes de todos estos mecanismos de acción, han arrojado resultados positivos en la fase preclínica de desarrollo, de modo que han sido seleccionados para la realización de diversos ensayos clínicos en aras de validar su potencial terapéutico contra algunas patologías neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer o de Parkinson, pero también para otros desórdenes neuropsiquiátricos como la esquizofrenia o el trastorno de déficit de atención y hiperactividad, e incluso para el tratamiento de la adicción a la nicotina y el dolor^{252,253}. En la figura adyacente se recogen algunos de estos fármacos que han alcanzado esta última fase del desarrollo farmacéutico:

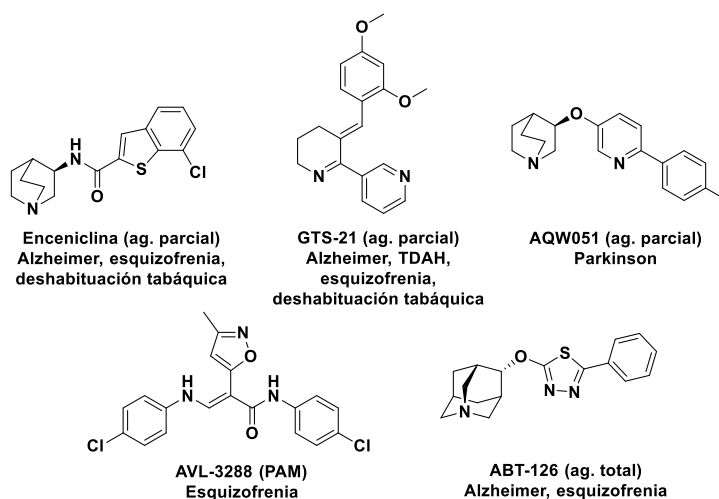


Figura 5.5. Estructura de algunos de los moduladores del receptor nicotínico α_7 que han alcanzado la fase clínica de desarrollo farmacéutico.

²⁵² Yang, T., Xiao, T., Sun, Q., Wang, K. *Acta Pharm. Sin. B.* **2017**, *7*, 611.

²⁵³ Russo, P., Del Bufalo, A., Frustaci, A., Fini, M., Cesario, A. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 6014.

El fármaco de esta clase que más cerca ha estado de conseguir su aprobación y comercialización fue la enceniclina, también conocida como EVP-6124. Tras unos resultados esperanzadores en diversos estudios de fase I y II para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer leve a moderada y la esquizofrenia, los ensayos de fase III enterraron las expectativas al no consolidarse los datos sobre eficacia compilados para ambas patologías en los estudios previos, además de haberse generado algunas dudas sobre su seguridad tras registrarse algunos efectos adversos gastrointestinales, especialmente en los individuos de edad más avanzada²⁵⁴.

Por tanto, ninguna de las moléculas que actúan a través de este mecanismo de acción ha conseguido aún, por distintas razones, conseguir su aprobación para el tratamiento de alguna patología neurodegenerativa. Esto no debe aún invalidar esta aproximación, ya que la estimulación de los receptores nicotínicos α_7 ha demostrado sobradamente su papel central en la consecución de una respuesta antioxidante y antiinflamatoria a nivel del sistema nervioso central, y su potencial terapéutico resta intacto a la espera de que los trabajos futuros en este campo aporten más claves sobre si esta diana puede contribuir a la solución del problema, y de ser así en qué medida y de qué manera puede resultar útil su modulación.

5.2 El alcaloide citisina como base para el diseño de nuevos agentes moduladores de los receptores nicotínicos

5.2.1 Citisina: un alcaloide con actividad nicotínica. Diseño de análogos con actividad neuroprotectora.

La citisina es un alcaloide que se identificó y aisló en el siglo XIX de la especie *Laburnum anagyroides* de la familia de las fabáceas, aunque posteriormente se ha localizado en otros géneros de la misma familia como *Anagyris*, *Cytisus*, *Genista* o *Sophora*, entre otros. Habitualmente, su concentración es mayor en las semillas de la planta, aunque suele ser detectable también en el resto del organismo²⁵⁵.

²⁵⁴ Deardorff, W. J., Shobassy, A., Grossberg, G. T. *Expert Rev. Neurother.* **2015**, *15*, 7.

²⁵⁵ Pérez, E. G., Méndez-Gálvez, C., Cassels, B. K. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 555.



Figura 5.6. Estructura bidimensional y tridimensional de la (-)-citisina, numeradas según las normas de la IUPAC.

Su distribución en la planta responde a su función fisiológica: es un alcaloide tóxico a las concentraciones presentes en la naturaleza debido a su carácter agonista sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina, si bien esta actividad es ciertamente compleja y no es igual para todos los subtipos. Así, se ha observado que la citisina tiene una afinidad muy grande por los receptores $\alpha_4\beta_2$, hasta siete veces mayor que la nicotina. Por el contrario, la afinidad por los receptores $\alpha_3\beta_4$ no es tan elevada, pero se ha observado que el tipo de subunidad β que presentan los receptores influye notablemente sobre la potencia de la citisina como agonista, siendo mucho más elevada sobre aquéllos que contienen la subunidad β_4 respecto a los que presentan la subunidad β_2 . Por otro lado, la citisina también es capaz de unirse a los receptores nicotínicos α_7 , aunque con una afinidad bastante baja y con una potencia menor que en el caso de los receptores nicotínicos heteroméricos. En resumen: la citisina se considera un agonista parcial de los receptores nicotínicos $\alpha_4\beta_2$ con una afinidad muy elevada, mientras que es un agonista puro de los receptores $\alpha_3\beta_4$ y α_7 , con mayor potencia y afinidad sobre el primer tipo que sobre el segundo^{256,257}.

El uso farmacológico de este alcaloide no es precisamente una novedad: al parecer, el consumo de semillas ricas en citisina forma parte de la medicina tradicional de los nativos americanos desde hace milenios. Ya viajando al siglo XX, se ha registrado un uso ocasional de este compuesto como diurético en los países occidentales, mientras que en los países de la antigua Unión Soviética se empleaba como agente analéptico respiratorio²⁵⁸.

²⁵⁶ Chavez-Noriega, L. E., Crona, J. H., Washburn, M. S., Urrutia, A., Elliott, K. J., Johnson, E. C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *280*, 346.

²⁵⁷ Houlihan, L. M., Slater, Y., Guerra, D. L., Peng, J. H., Kuo, Y. P., Lukas, R. J., Cassels, B. K., Bermudez, I. J. *Neurochem.* **2001**, *78*, 1029.

²⁵⁸ Tzankova, V., Danchev, N. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2007**, *21*, 151.

De todas formas, la aplicación terapéutica más conocida de la citisina es para el tratamiento de deshabituación tabáquica. Precisamente fue en los países exsoviéticos, con Bulgaria a la cabeza, donde se impulsaron estudios al respecto y se comenzó a comercializar la citisina con esta indicación, ya que se observó que este compuesto tenía un perfil farmacológico bastante similar a la nicotina, pero con un efecto central más suave y menores efectos secundarios a nivel cardiovascular. A pesar del largo recorrido de la citisina como agente antitabáquico en esta región geopolítica, el resto de países estiman que los ensayos clínicos realizados en su momento no cumplían con los criterios de calidad científica exigibles para avalar esta indicación, de modo que en los últimos años se están impulsando nuevos ensayos para dilucidar si la citisina podría ser una alternativa a las terapias de reemplazo tabáquico habituales, con las ventajas añadidas de su bajo coste y un perfil de seguridad adecuado²⁵⁹.

Volviendo ya al *leitmotiv* de esta tesis doctoral, los estudios farmacológicos realizados sobre la citisina en las últimas décadas han sugerido su utilidad como agente neuroprotector. En el año 1998 se publicaron dos estudios en los que se demostraba que la estimulación de los receptores $\alpha_4\beta_2$ por la citisina revertía parcialmente la neurotoxicidad provocada por el péptido β -amiloide en cultivos de células corticales de rata²⁶⁰, y también que este compuesto era capaz de reducir los efectos deletéreos causados por la administración de la toxina MPTP a ratones para simular un síndrome parkinsoniano²⁶¹. Curiosamente, en este último caso los autores ensayaron la citisina no por su actividad colinérgica, sino porque su estructura química les sugería un gran potencial como molécula quelante de iones ferrosos, inhibiendo de esta forma la generación de especies reactivas de oxígeno. Aunque este mecanismo puede que tenga cierta relevancia, después se ha observado que la activación de algunos subtipos de receptores nicotínicos puede contrarrestar el declive de los niveles estriatales de dopamina típico de la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson, de modo que la citisina actuaría posiblemente a través de este mecanismo²⁶². Por otra parte, la citisina

²⁵⁹ Prochaska, J. J., Das, S., Benowitz, N. L. *BMJ*. **2013**, *347*, 5198.

²⁶⁰ Kihara, T., Shimohama, S., Urushitani, M., Sawada, H., Kimura, J., Kume, T., Maeda, T., Akaike, A. *Brain Res*. **1998**, *792*, 331.

²⁶¹ Ferger, B., Spratt, C., Teismann, P., Seitz, G., Kuschinsky, K. *Eur. Jo. Pharmacol*. **1998**, *360*, 155.

²⁶² Pérez, X. A., Quik, M. *Mol. Cell. Pharmacol*. **2011**, *3*, 1.

también reduce la excitotoxicidad por *N*-metil-D-aspartato (NMDA) en células corticales murinas y la causada por inflicción de un ciclo de isquemia-reperfusión a ratones^{263,264}. El mecanismo por el que este alcaloide reduce la excitotoxicidad podría estar relacionado con su capacidad para regular a la baja, o incluso antagonizar, ciertas subunidades de los receptores NMDA de glutamato.

Aunque estos resultados alientan las opciones de la citisina como un agente potencialmente útil en el tratamiento de la neurodegeneración, hay que tener en cuenta que este compuesto tiene algunas propiedades poco favorables para su empleo con este propósito, en especial la baja lipofilia, que compromete su permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica²⁶⁵. Además, hay ciertas consideraciones importantes respecto a su farmacodinamia: la citisina tiene una afinidad especialmente elevada por los receptores del subtipo $\alpha_4\beta_2$, mientras que ésta es baja por los receptores α_7 . Obviamente esto resulta interesante en lo tocante a algunos efectos como la estimulación de la liberación de dopamina en un contexto de daño parkinsoniano o la prevención de la toxicidad por el péptido β -amiloide, pero deja de lado otros efectos como la inducción de Nrf2 o la limitación de la respuesta inflamatoria, mediados por el segundo de los subtipos. Otro problema reside en la elevada afinidad de la citisina por los receptores $\alpha_3\beta_4$, cuya amplia presencia en los ganglios autonómicos y la médula adrenal, sumada a la pobre capacidad de la citisina para acceder al SNC, determinan el perfil de toxicidad periférica que presenta este alcaloide. Por tanto, puede ser muy interesante la búsqueda de nuevos análogos estructurales de la citisina cuyo perfil farmacológico se adecúe más a los propósitos de la terapia antineurodegenerativa y con unas características farmacocinéticas que permitan la predominancia de sus efectos centrales sobre los periféricos.

La literatura sobre la síntesis y evaluación de compuestos con una estructura análoga a la de la citisina es muy extensa²⁶⁶, y su análisis en detalle excede ampliamente el objetivo

²⁶³ Li, Y. J., Yang, Q., Zhang, K., Guo, Y. Y., Li, X. B., Yang, L., Zhao, M. G., Wu, Y. M. *Neurotoxicology*. **2013**, *34*, 219.

²⁶⁴ Zhao, P., Yang, J. M., Wang, Y. S., Hao, Y. J., Li, Y. X., Li, N., Wang, J., Niu, Y., Sun, T. *Neurochem. Res.* **2018**, *43*, 1575.

²⁶⁵ Reavill, C., Walther, B., Stolerman, I. P., Testa, B. *Neuropharmacology*. **1990**, *29*, 619.

²⁶⁶ Para revisiones sobre este tema: a) Rouden, J., Lasne, M. C., Blanchet, J., Baudoux, J. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 712. b) Huang, X., Xu, H. *Mini Rev. Med. Chem.* **2020**, *20*, 369.

de esta parte introductoria. Baste decir que se han sintetizado compuestos derivados de este alcaloide con todo tipo de sustituyentes en la mayoría de las posiciones, especialmente sobre el anillo de piridona y la amina secundaria original, y también se han llevado a cabo modificaciones estructurales de mayor calado: supresión del grupo carbonilo o sustitución por un grupo tiocarbonilo, modificación de la posición del nitrógeno piridínico o su supresión (“*all-carbon analogues*”), derivados totalmente saturados, extensiones o reducciones de las cadenas alifáticas del sistema bicíclico, etcétera. En la figura 5.7 se recoge un resumen de todas estas transformaciones.

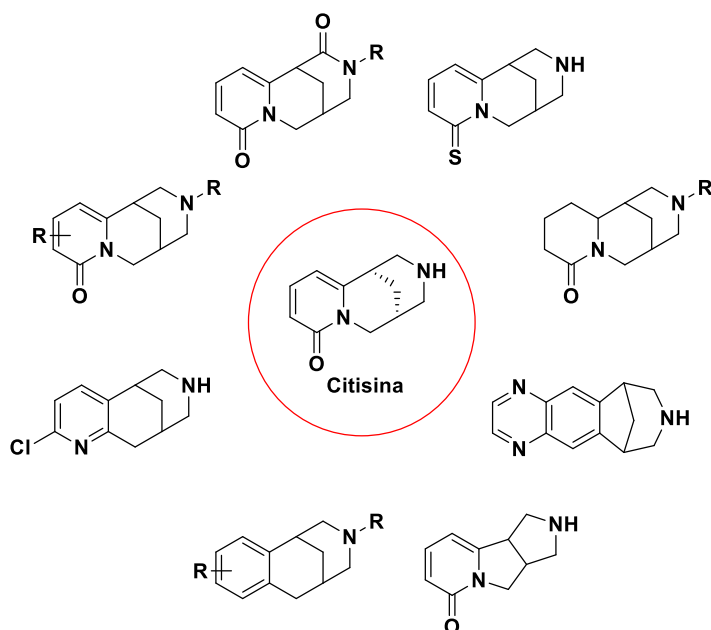


Figura 5.7. Ejemplos de algunas modificaciones realizadas sobre la estructura de la citisina para la obtención de nuevos derivados con actividad colinérgica.

Si bien sobre muchos de estos compuestos sólo está disponible la información sobre su síntesis, afortunadamente en otros casos también se ha llevado a cabo el ensayo farmacológico de los nuevos derivados. Los resultados disponibles avalan la modificación estructural como una estrategia para modular el perfil farmacológico, si bien los cambios pueden tener consecuencias muy distintas: por ejemplo, la introducción de halógenos en el anillo de piridona mejora la afinidad por los receptores α_7 ²⁶⁷, mientras que los derivados cuya amina es menos básica o presenta sustituyentes relativamente voluminosos pierden afinidad por todos los subtipos, pero mejoran la

²⁶⁷ Imming, P., Klaperski, P., Stubbs, M. T., Seitz, G., Gündisch, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, 36, 375.

selectividad hacia los efectos centrales debido a que esta pérdida es mucho mayor para los receptores $\alpha_3\beta_4$ que para los $\alpha_4\beta_2$ ²⁶⁸.

Estos ejemplos ilustran que los datos deben ser minuciosamente analizados, ya que una pérdida moderada de actividad no tiene por qué ser perjudicial si a cambio se consigue mejorar la selectividad del nuevo derivado por el objetivo deseado. En el caso que nos ocupa, sería deseable el hallazgo de compuestos que:

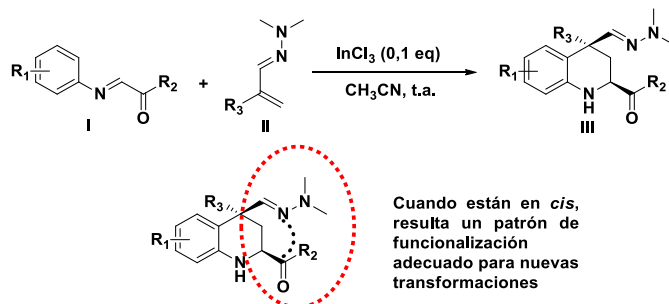
- Sean más lipófilos que la citisina, de modo que su permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica sea suficiente para que alcancen las concentraciones necesarias a nivel central.
- Tengan una menor afinidad por los receptores $\alpha_3\beta_4$ respecto a los receptores $\alpha_4\beta_2$ y α_7 , garantizando la prevalencia de los efectos centrales sobre los periféricos, lo que redundará en una eficacia y una seguridad reforzadas.
- Respecto a los subtipos de receptores abundantes a nivel central, quizá lo más delicado sea conseguir que los compuestos muestren una afinidad suficiente por los receptores α_7 , en contraste con la citisina y muchos de los derivados que se han ensayado hasta ahora. No obstante, estos antecedentes no deberían ser disuasorios, ya que realmente el papel de la citisina y los receptores α_7 en neuroprotección ha sido muy poco explorado en comparación con los esfuerzos para el hallazgo de nuevos compuestos que mantuviesen o mejorasen su actividad sobre los receptores $\alpha_4\beta_2$, en aras de postularlos como fármacos para el cese del hábito tabáquico. Por otra parte, su selectividad sobre los receptores α_7 no es un requisito (ni tan siquiera un objetivo), ya que los receptores $\alpha_4\beta_2$ también son muy importantes en la función cognitiva y pueden mediar efectos interesantes en términos de neuroprotección.

5.2.2 Diseño de los análogos de citisina: contexto y antecedentes.

En el capítulo 3 de esta tesis doctoral ya se explicó detenidamente la nueva reacción de Povarov aza-viníloga desarrollada en nuestro grupo de investigación. Recuérdese que se puede aplicar eficazmente a la síntesis de las 2-aciltetrahydroquinolinas **III**, cuyo patrón

²⁶⁸ Boido, C. C., Tasso, B., Boido, V., Sparatore, F. *Il Fármaco*. **2003**, *58*, 265.

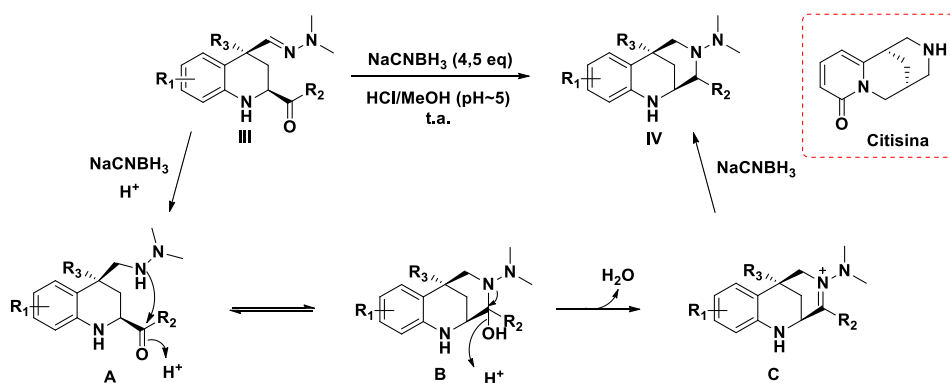
de sustitución en las posiciones 2 y 4 del anillo resulta ideal para efectuar nuevas modificaciones que permiten acceder a estructuras más complejas.



Esquema 5.1. Síntesis de las 2-aciltetrahydroquinolinas III a través de la reacción de Povarov aza-viníloga. Posibilidades sintéticas del esqueleto obtenido.

En relación con la obtención de compuestos de tipo bispidina, la primera transformación que se acometió fue la ciclación reductora intramolecular de los productos de Povarov III, que rinde los compuestos diazabíclicos IV (esquema 5.2).

Este proceso dominó, que tiene lugar en presencia de cianoborohidruro sódico y un medio ligeramente ácido, se inicia con la reducción quimioselectiva de la hidrazona, que da lugar a la hidracina A. La amina secundaria generada reacciona de inmediato con el grupo carbonilo vecino, formándose tras la pérdida de una molécula de agua el iminio C, el cual se convierte en el diazabíclico deseado IV en presencia del agente reductor en exceso²⁰⁶.



Esquema 5.2. Obtención de los compuestos diazabíclicos IV a través de una ciclación reductora intramolecular. Nótese la similitud del esqueleto sintetizado con el de la citisina.

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
IVa	6-CH ₃ O	C ₆ H ₅	CH ₃
IVb	6-CH ₃ O	4-FC ₆ H ₄	CH ₃
IVc	6-CH ₃ O	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	CH ₃
IVd	5,7-(CH ₃) ₂	4-FC ₆ H ₄	CH ₃
IVe	6,8-(CH ₃) ₂	4-FC ₆ H ₄	CH ₃
IVf	6-CH ₃ O	4-FC ₆ H ₄	CH ₂ CH ₃
IVg	6-CH ₃ O	2-furil	CH ₃
IVh	6-CH ₃ O	2-tienil	CH ₃

Tabla 5.1. Compuestos IV obtenidos mediante la ciclación reductora intramolecular.

Estos compuestos, dada su analogía estructural con la citisina, se sometieron a una serie de ensayos para evaluar sus posibilidades como nuevos agentes neuroprotectores. Los resultados fueron, en resumidas cuentas, los siguientes:

- Los compuestos de esta nueva familia no resultaron tóxicos ni en cultivos de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano ni de células BV2 de microglía murina inmortalizada.
- Exhibieron una moderada actividad neuroprotectora (25-45%) en dos modelos distintos de neurodegeneración, rotenona/oligomicina A y ácido okadaico.
- Los estudios orientados a la explicación de este efecto protector permitieron conocer que estos compuestos eran captadores de radicales libres, moduladores nicotínicos e inductores del factor de transcripción Nrf2. En cambio, no mostraron actividad antiinflamatoria.

En definitiva, los resultados de los ensayos de neuroprotección confirmaron que estos compuestos suponían un buen punto de partida para continuar trabajando sobre este tipo de estructuras, y los ensayos mecanísticos apuntaron en la dirección propuesta en la hipótesis inicial: la modulación nicotínica como estrategia para estimular la actividad antioxidante y citoprotectora de Nrf2.

Teniendo en cuenta este bagaje, se desarrolló una segunda familia de análogos de citisina cuya síntesis y actividad farmacológica se abordarán pormenorizadamente en el apartado de resultados de este capítulo.

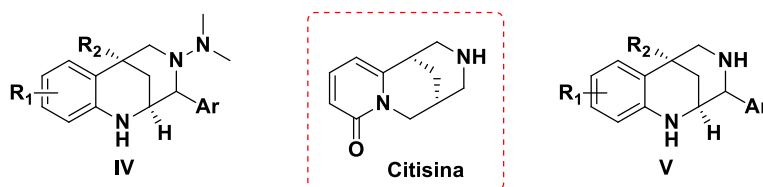


Figura 5.8. Comparativa entre la primera familia de análogos de citisina IV y la nueva familia de compuestos V presentada en esta tesis doctoral.

5.3 Síntesis de una familia de metanobenzodiazocinas con analogía estructural con el alcaloide citisina.

La síntesis de los análogos de citisina propuestos arrancó con la preparación de los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de Povarov aza-viníloga¹⁰⁰, conducente a los derivados de 2-aciltetrahydroquinolina que constituyen la base de esta ruta sintética. Las α -cetoiminas **1b-c**, **9a-b** y **16** se obtuvieron haciendo reaccionar derivados de anilina con distintos fenilglioxales en presencia de sulfato sódico anhidro, a temperatura ambiente y utilizando diclorometano como disolvente. Gracias al rendimiento cuantitativo de este proceso, las iminas obtenidas se pudieron utilizar en el paso siguiente sin requerir purificación de ningún tipo, más allá de la eliminación del disolvente. Si bien el fenilglioxal está disponible comercialmente en forma de monohidrato, el resto de glioxales empleados debieron ser sintetizados a partir de las acetofenonas apropiadas utilizando dióxido de selenio como agente oxidante²⁶⁹. Este método proporciona los glioxales con un número desconocido de moléculas de agua de hidratación, lo que obligó a determinar para cada caso la estequiometría más adecuada que permita la obtención de las iminas con la máxima pureza y sin restos de alguno de los materiales de partida en exceso.



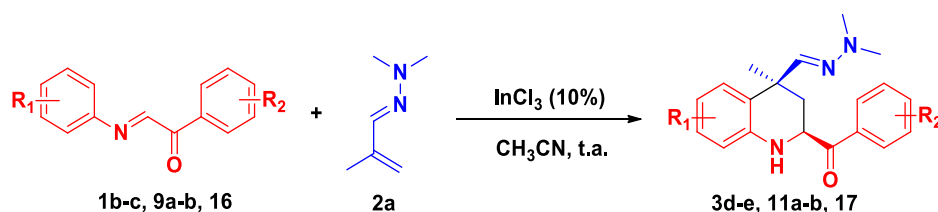
²⁶⁹ Saldabol N. O., Popelis J., Slavinska V. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2002**, *38*, 783.

Compuesto	R ₁	R ₂
1b	3,5-(CH ₃) ₂	H
1c	3-CH ₃	H
9a	4-OCH ₃	4-CH ₃
9b	4-OCH ₃	3-Br
16	4-OCH ₃	4-Cl

 Esquema 5.3. Tabla 5.2. Síntesis de las α -cetoiminas **1b-c**, **9a-b** y **16**.

Por otro lado, la *N,N*-dimetilhidrazona **2a** requerida como dienófilo en la reacción de Povarov se preparó siguiendo el método ya descrito en el capítulo 3.

Con el dieno y el dienófilo ya en mano, se procedió a llevar a cabo la reacción de Povarov aza-viníloga en las condiciones clásicas: usando un 10% de tricloruro de indio como catalizador, acetonitrilo como disolvente y a temperatura ambiente.



Compuesto	R ₁	R ₂	t (h)	Rendimiento* (%)	d.r. (<i>cis:trans</i>)
3d	3,5-(CH ₃) ₂	H	5	81	55:45
3e	3-CH ₃	H	4	79	81:19
11a	4-OCH ₃	4-CH ₃	4	82	80:20
11b	4-OCH ₃	3-Br	2,5	76	83:17
17	4-OCH ₃	4-Cl	3	84	79:21

 Esquema 5.4. Tabla 5.3. Síntesis de las 2-acil-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas **3d-e**, **11a-b** y **17**.

*Los rendimientos se refieren a la mezcla diastereomérica.

A diferencia de la reacción de Povarov aza-viníloga que parte de ariliminas sin grupo carbonilo, caracterizada por una diastereoselección total en favor del isómero con sus grupos 2-acilo y 4-dimetilhidrazonometilo en una disposición *cis*, las 2-aciltetrahidroquinolinas deseadas se obtuvieron como una mezcla de diastereoisómeros. Afortunadamente, esto no supuso un grave inconveniente para la síntesis planteada pues, como se puede observar en la tabla 5.3, en la mayor parte de los casos la reacción se saldó con una elevada diastereoselección en favor del isómero *cis*. En el esquema 5.5. se puede ver cómo sólo este isómero es compatible con las transformaciones proyectadas a continuación, ya que sus grupos funcionales se encuentran en una disposición ecuatorial. Todo esto se sabe gracias a que la estructura de ambos isómeros fue caracterizada mediante un experimento NOESY 2D, apoyándose

en los datos extraídos de un análisis previo por difracción de rayos X de uno de los compuestos de la familia de las 2-ariltetrahydroquinolinas²⁰⁶.

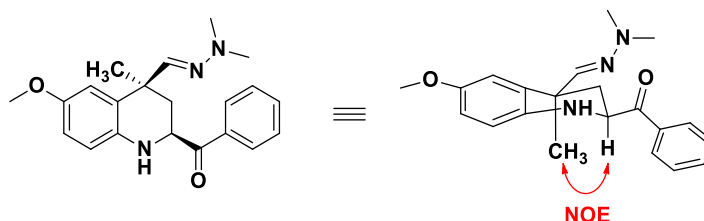
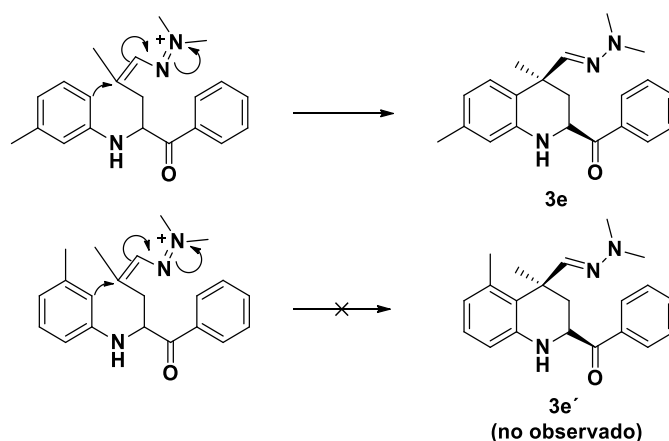


Figura 5.9. Justificación de la estructura de los derivados de tetrahydroquinolina **3d-e**, **11a-b** y **17** a través de un experimento NOESY-2D.

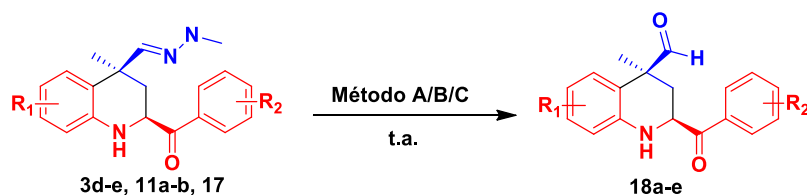
El hecho de que la reacción que da lugar al compuesto **3b** curse sin ningún tipo de diastereoselección parece deberse a la interferencia estérica causada por la presencia de un sustituyente en la posición 5 de la tetrahydroquinolina, especialmente con el grupo 4-dimetilhidrazonometilo cuando éste se encuentra en disposición ecuatorial. También merece la pena destacar que la formación de **3e** ocurre de manera regioselectiva, pues sólo se forma dicho compuesto y no el otro regioisómero posible **3e'**.



Esquema 5.5. Regioselectividad en la obtención de **3e**.

El siguiente paso consistió en la hidrólisis de las hidrazonas para generar los aldehídos **18a-e**. El aspecto más delicado residió en conseguir dicha hidrólisis sin comprometer la estabilidad del anillo de tetrahydroquinolina, fácilmente oxidable. Basándonos en nuestra experiencia previa¹¹⁹ se decidió tratar las hidrazonas con una mezcla de una solución de ácido glioxílico al 50% en agua y el mismo volumen de THF a temperatura ambiente, accediéndose a los productos **18a-c** con rendimientos moderados. Sorprendentemente, estas condiciones condujeron sólo a mezclas complejas en el caso de los compuestos **18d** y **18e**, para los que el espectro de RMN del crudo de reacción

permitía vaticinar un rendimiento de los productos deseados muy por debajo de lo acostumbrado. Consecuentemente, se requirió un nuevo cribado de condiciones suaves de hidrólisis para estos dos compuestos, que se recoge en las tablas 5.5 y 5.6.



Método A: Ácido glioxílico 50% sol. en H₂O-THF (1:1), t.a.

Método B: HCl 5 N/THF (1:2), t.a.

Método C: HCl 2 N/THF (1:2), 0 °C

Compuesto	R ₁	R ₂	Método	Tiempo (h)	Rendimiento(%)
18a	4-OCH ₃	4-CH ₃	A	24	60
18b	4-OCH ₃	3-Br	A	24	48
18c	4-OCH ₃	4-Cl	A	24	57
18d	3,5-(CH ₃) ₂	H	B	48	75
18e	3-CH ₃	H	C	6	64

Esquema 5.6. Tabla 5.4. Síntesis de los aldehídos **18a-e**.

Reactivo	T(°C)	Tiempo (h)	Rendimiento(%)
,Ac. Glioxílico/THF (1:1)	25	17	Trazas
HCl 5 M/THF (1:1)	50	4	-
HCl 5 M/THF (2:3)	0	7	-
HCl 5 M/THF (1:2)	25	48	75
CuCl ₂ ·2H ₂ O/THF	25	6	-

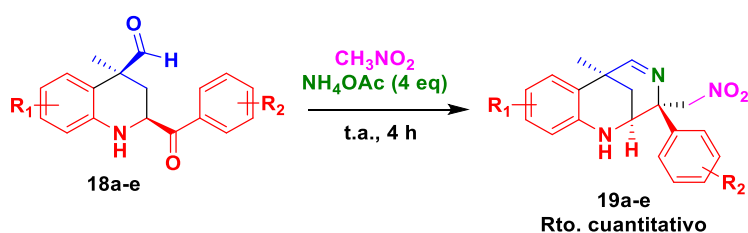
Tabla 5.5. Optimización de la obtención del compuesto **18d**.

Reactivo	T(°C)	Tiempo (h)	Rendimiento(%)
,Ac. Glioxílico/THF (1:1)	25	24	Trazas
HCl 5 M/THF (1:2)	0	18	70 (crudo)
HCl 5 M/THF (1:2)	25	24	32
HCl 2 M/THF (1:2)	0	68	64

Tabla 5.6. Optimización de la obtención del compuesto **18e**.

El compuesto **18d** se pudo obtener con buen rendimiento mediante el tratamiento de **3d** con una mezcla de HCl 5 M/THF (1:2) a temperatura ambiente durante dos días, mientras que para la obtención del derivado **18e** lo que mejor funcionó fue una mezcla de HCl 2 M/THF (1:2), manteniendo la reacción durante 6 horas a una temperatura entre 0 y 5 °C. Esta hidrólisis se sitúa en un equilibrio muy frágil entre la oxidación o degradación de la hidrazona inicial si se fuerzan las condiciones de reacción un poco más de lo debido, y la recuperación del compuesto de partida si éstas resultan algo más suaves de lo conveniente.

La transformación de los aldehídos **18** en los compuestos tricíclicos **19** supone quizá el paso más curioso de esta ruta sintética, si se atiende a los reactivos empleados y al mecanismo de la reacción, ya que a primera vista lo que cabría esperar es una reacción de Henry clásica en lugar del proceso que se describe a continuación. En realidad, lo que ocurre es una reacción multicomponente a temperatura ambiente entre los aldehídos **18**, acetato amónico y nitrometano que, a través de una ciclación intramolecular y una reacción de nitro-Mannich, genera los derivados **19** con rendimientos prácticamente cuantitativos. El nitrometano no sólo actúa como reactivo, sino que además es el disolvente de la reacción.



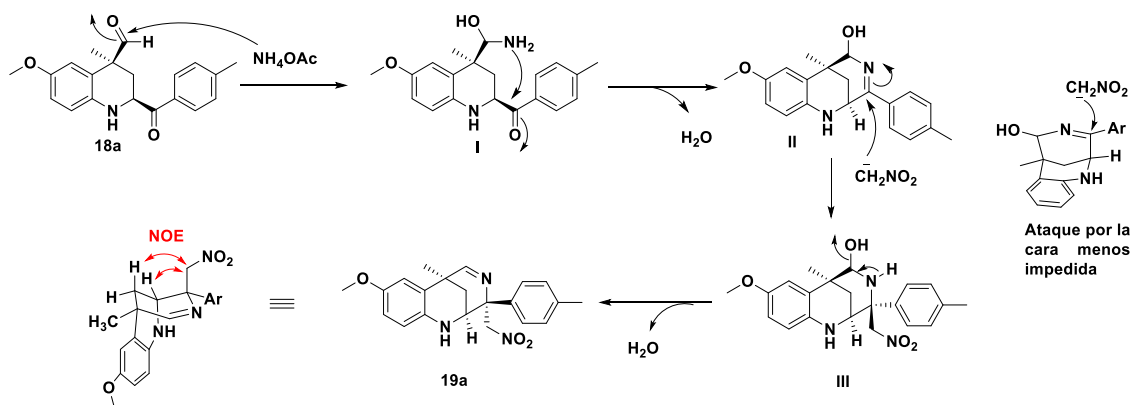
Compuesto	R ₁	R ₂
19a	4-OCH ₃	4-CH ₃
19b	4-OCH ₃	3-Br
19c	4-OCH ₃	4-Cl
19d	3,5-(CH ₃) ₂	H
19e	3-CH ₃	H

Esquema 5.7. Tabla 5.7. Síntesis de los compuestos **19a-e**.

La asignación de esta estructura a los compuestos **19** se basa, tomando como referencia **19a**, en la presencia de dos carbonos cuaternarios a 35,6 y 68,9 ppm, y una señal atribuible a un carbono imínico a 169,6 ppm, en el espectro de RMN ¹³C.

El mecanismo propuesto para la reacción está representado en el esquema 5.8: en primer lugar, el acetato amónico actúa como donador de amoníaco y reacciona con el aldehído, dando lugar al hemiaminal **I**. Esta primera reacción se produce de manera totalmente regioselectiva a favor del aldehído respecto a la cetona. A continuación, en vez de ocurrir la eliminación de agua a partir de **I**, tiene lugar una condensación intramolecular para generar el intermedio **II**, en la que el grupo amino reacciona con la cetona gracias a la disposición ecuatorial de ambos grupos que sólo ocurre en el isómero *cis* de la tetrahydroquinolina. El proceso continúa con una reacción de nitro-Mannich en la que se produce una adición de una molécula de nitrometano, desprotonada en

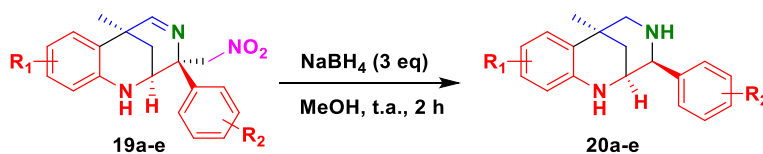
presencia del acetato amónico (que en esta ocasión actúa como base) sobre el carbono electrófilo de la imina. Esta adición, que genera el intermedio **III**, se produce de manera totalmente diastereoselectiva por la cara menos impedida de la imina. Por último, la deshidratación de **III** da lugar al producto de la reacción, **19a**. La configuración relativa del nuevo estereocentro cuaternario de los compuestos **19** fue confirmada por experimentos NOE¹¹⁹.



Esquema 5.8. Mecanismo de la reacción multicomponente que conduce a los compuestos **19**. Efectos NOE que permitieron justificar su estructura.

Esta reacción multicomponente, por tanto, suscita un gran interés al permitir la generación de un compuesto tricíclico con un nuevo carbono cuaternario de manera totalmente regioselectiva y diastereoselectiva. Además, el rendimiento de la reacción es prácticamente cuantitativo de modo que, aunque a veces se puedan detectar algunas impurezas (principalmente la quinolina producto de la desformilación y oxidación de **18**), no se requiere la purificación de los productos para su empleo en el paso final de la síntesis planteada. Este hecho resulta muy conveniente ya que estas iminas no poseen una gran estabilidad, motivando que diversos intentos de purificación mediante columna cromatográfica en gel de sílice, gel de alúmina básica e incluso gel de alúmina desactivada con un 10% de agua desembocaran en la descomposición del producto.

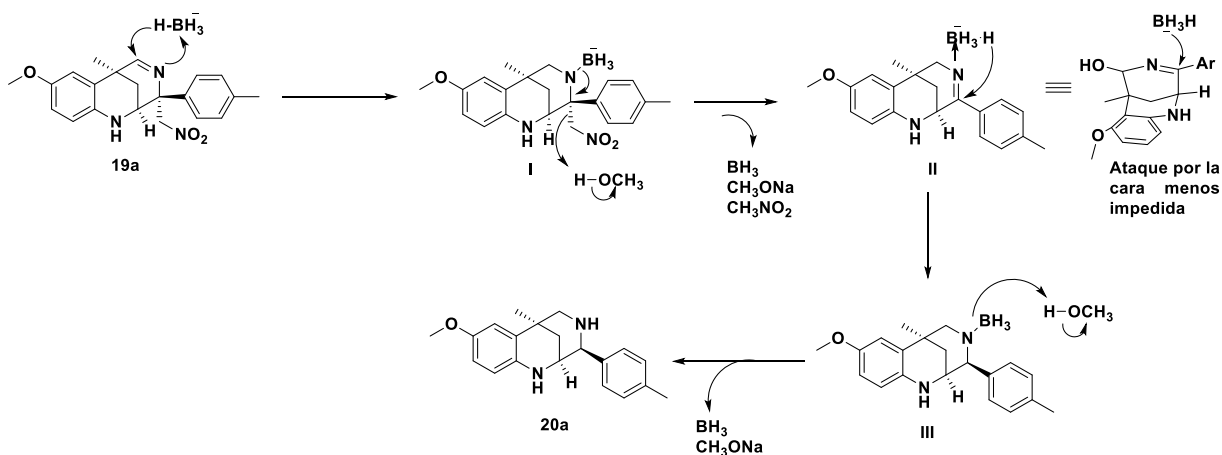
La última reacción de la ruta sintética consistió en una reducción de las iminas **19** tratándolas con un exceso de borohidruro sódico en metanol a temperatura ambiente, en un proceso que implica también la eliminación del grupo nitrometilo.



Compuesto	R ₁	R ₂	Rendimiento(%)
20a	4-OCH ₃	4-CH ₃	63
20b	4-OCH ₃	3-Br	77
20c	4-OCH ₃	4-Cl	73
20d	3,5-(CH ₃) ₂	H	63
20e	3-CH ₃	H	59

Esquema 5.9. Tabla 5.8. Síntesis de los diazabíclicos **20a-e**.

El mecanismo de la reacción, reflejado en el esquema 5.10, es el siguiente: un primer hidruro ataca a la imina, produciéndose un movimiento electrónico que finaliza con la eliminación del grupo nitrometilo a través de una reacción de retro nitro-Mannich y la formación del intermedio imínico **II**. Esta segunda imina recibe nuevamente el ataque de otro hidruro por la cara menos impedida, generando el compuesto final **20a**. Un experimento NOE permitió confirmar la estructura de los compuestos **20**, con el protón de la posición 2 en disposición axial y por tanto con el grupo arilo en disposición ecuatorial¹¹⁹.

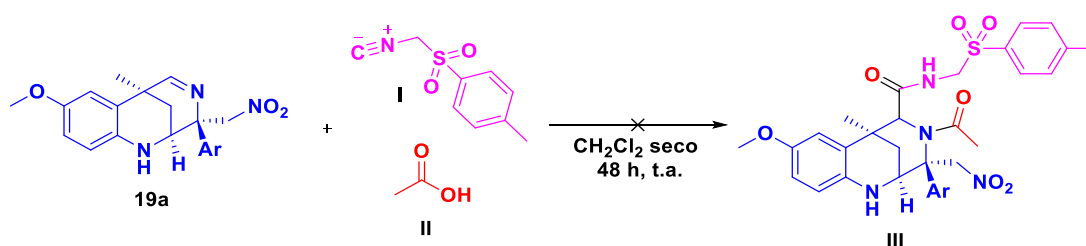


Esquema 5.10. Mecanismo de la reducción con NaBH₄ y explicación de su estereoquímica.

5.4 Intentos de funcionalización de los compuestos **19**

Desgraciadamente, es habitual que una parte importante de los esfuerzos dedicados en un laboratorio de química no lleguen a buen puerto, pero resulta igualmente interesante compartir ese trabajo porque un resultado negativo puede llegar a ser igual de útil que uno positivo. Ése fue nuestro caso con las iminas **19**, cuya estructura novedosa y aparente elevada reactividad las hacían atractivas para tratar de sacarles algún partido sintético más allá del trabajo expuesto en el apartado anterior.

El primer intento que realizamos fue una reacción de Ugi. Ésta es una reacción multicomponente entre un aldehído, una amina, un isonitrilo y un ácido carboxílico, que resulta en la formación de diamidas ²⁷⁰. En vista de que el primer paso del mecanismo consiste en la condensación del aldehído y la amina para formar una imina, pensamos que las iminas **19** podrían ser un sustrato adecuado para este proceso. Así, pusimos a reaccionar el compuesto **19a** con isocianuro de *p*-toluenosulfonilmetilo y ácido acético en diclorometano a temperatura ambiente. Mas, tras 48 horas de reacción, se recuperó una mezcla de reacción muy compleja en la que no se pudo identificar el compuesto esperado ni siquiera tras la realización de una columna cromatográfica.



Esquema 5.11. Tentativa de aplicación de la reacción de Ugi sobre el compuesto **19a**.

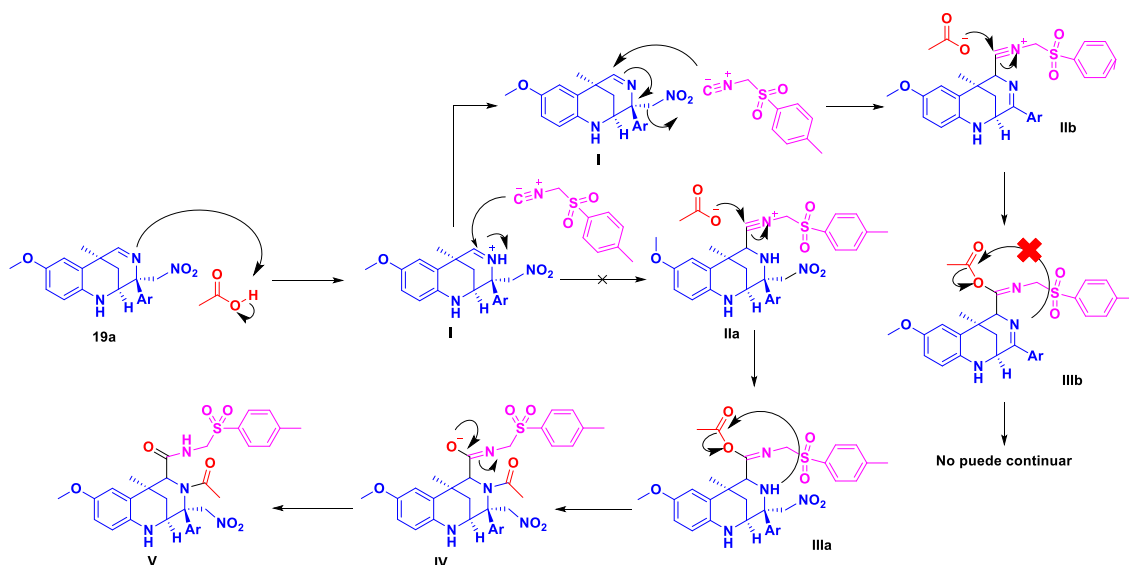
Una posible explicación para este fracaso residiría en el propio mecanismo de la reacción: el isonitrilo debe realizar un ataque de tipo Mannich sobre la imina protonada por el ácido carboxílico, pero en nuestro caso esta adición es susceptible de producir la eliminación del grupo nitrometilo mediante una reacción del tipo retro nitro-Mannich como la descrita anteriormente en la síntesis de los compuestos **20**. El problema es que esto generaría una nueva imina incapaz de sufrir el reordenamiento de Mumm necesario para llegar al producto previsto (esquema 5.12).

Después se decidió probar suerte con una reacción del tipo Reissert modificada ²⁷¹, en la que la acilación de la imina permitiría generar un intermedio en forma de iminio que puede ser atrapado con cianuro. A pesar de realizar varios intentos tanto a 0 °C como a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte, la reacción multicomponente entre la imina **19a**, cianuro de trimetilsililo (una sal de cianuro soluble en disolventes orgánicos) y cloruro de acetilo no arrojó ningún resultado (esquema 5.13). Se ensayó a su vez la realización del proceso en dos pasos, primero acilando la imina para luego

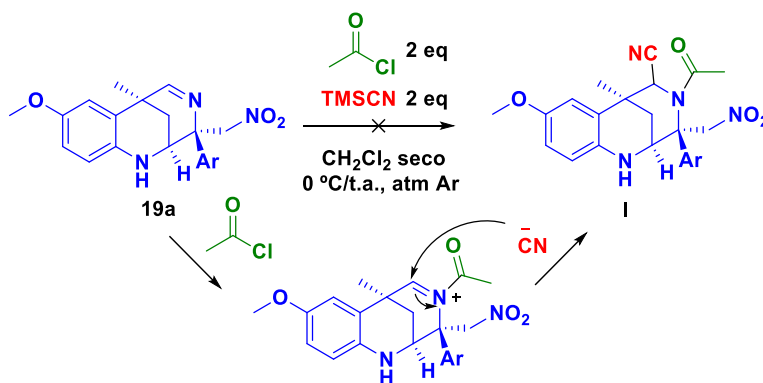
²⁷⁰ Ugi, I. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1962**, *1*, 8.

²⁷¹ Anderson, W. K., Mcpherson Jr., H. L., New, J. S. J. *Heterocycl. Chem.* **1980**, *17*, 513.

añadir la sal de cianuro, pero tampoco se consiguió el compuesto esperado.



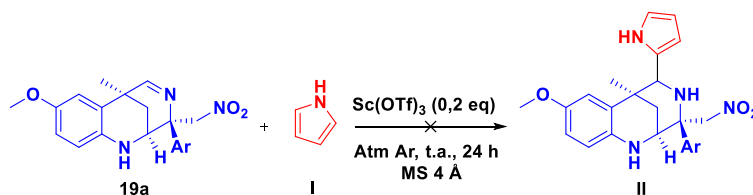
Esquema 5.12. Mecanismo esperado para la reacción de Ugi, y posible explicación para su fracaso.



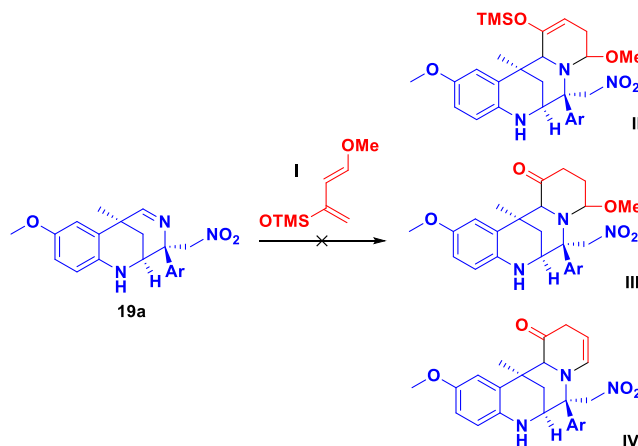
Esquema 5.13. Intento de reacción del tipo Reissert.

Otro intento que no dio fruto alguno fue la reacción de la imina **19a** con pirrol catalizada por triflato de escandio²⁷². Se esperaba que este ácido de Lewis fuera capaz de facilitar un ataque nucleófilo del pirrol sobre la imina activada, como se refleja en el esquema 5.14. La realidad fue que tras 24 horas de reacción a temperatura ambiente se obtuvo un crudo de reacción muy complejo, del que no fue posible aislar ningún producto reconocible.

²⁷² Roy, S., Reiser, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 47225.


 Esquema 5.14. Intento de funcionalización del compuesto **19a** con pirrol.

Otra posibilidad que se nos ocurrió fue hacer reaccionar **19a** con el dieno de Danishefsky (*trans*-1-metoxi-3-trimetilsililoxi-1,3-butadieno), esperando que tuviera lugar una ciclación del tipo aza Diels-Alder que habría podido formar uno o varios de los productos reseñados en el esquema 5.15, en función de si las condiciones de reacción conllevaran o no la desprotección del grupo hidroxilo y la eliminación del grupo metoxilo^{273,274,275}. En la tabla 5.9 se recogen los distintos experimentos realizados, que desgraciadamente no condujeron a la formación de ninguno de los productos esperados.



Ent.	Catalizador	Disolvente	MS/Atm Ar	T (°C)	t (h)
1	-	CH ₂ Cl ₂ seco	Sí/Sí	25	30
2	-	CH ₂ Cl ₂ seco	-	100 (tubo sellado)	3
3	-	CH ₃ CN seco	-	140	16
4	InCl ₃ (0,2 eq)	CH ₂ Cl ₂ seco	Sí/Sí	25	5
5	Yb(OTf) ₃ (0,2 eq)	CH ₂ Cl ₂ seco	Sí/Sí	25	16
6	ZnCl ₂ (0,3 eq)	THF seco	Sí/Sí	25	24
7	ZnCl ₂ (1,2 eq)	THF seco	Sí/Sí	0 → 25	6
8	ZnCl ₂ (1,2 eq)	CH ₂ Cl ₂ seco	Sí/Sí	100 (tubo sellado)	6

 Esquema 5.15. Posibles productos de la reacción entre **19a** y el dieno de Danishefsky.

 Tabla 5.9. Intentos de reacción entre **19a** y el dieno de Danishefsky.

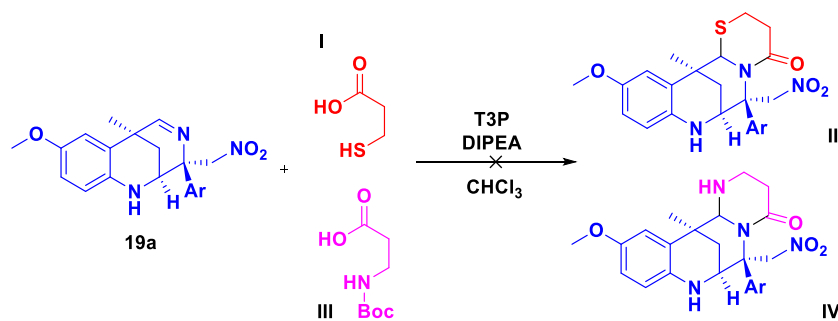
²⁷³ Vacca, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 1277.

²⁷⁴ Pérez, J. M., Vidal, L., Grande, M. T., Menéndez, J. C., Avendaño, C. *Tetrahedron* **1994**, 50, 7923.

²⁷⁵ Girling, P. R., Batsanov, A. S., Calow, A. D., Shen, H. C., Whiting, A. *Tetrahedron* **2016**, 72, 1105.

El dieno de Danishefsky requiere un manejo delicado debido a su limitada estabilidad, por lo que es preceptivo el empleo de disolventes secos y atmósfera inerte. A pesar de haberse ensayado diversos ácidos de Lewis como catalizadores, tiempos de reacción, temperaturas e incluso condiciones de presión en tubo sellado, los resultados fueron nulos: o bien se recuperaba el producto de partida, o se detectaba la degradación de los reactivos sin darse la reacción en la dirección deseada.

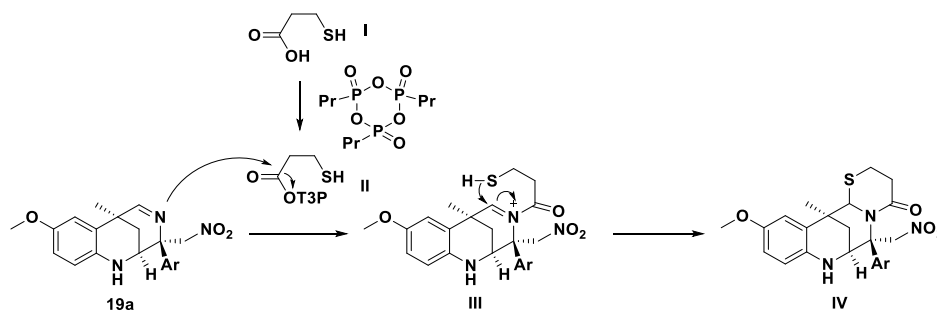
Por último, decidimos probar con una reacción conocida como DIA por sus siglas en inglés (*Direct Imine Acylation*) para tratar de construir nuevos compuestos heterocíclicos a partir de nuestras iminas **19**²⁷⁶. Este propósito se pretendía conseguir mediante su tratamiento con ácidos carboxílicos que presentan una función nucleófila en la posición β , en presencia de anhídrido propilfosfónico (T3P) y DIPEA. El mecanismo es sencillo: el ácido carboxílico es desprotonado por la DIPEA y reacciona con el T3P, dando lugar al anhídrido I. Éste recibe inmediatamente el ataque del nitrógeno imínico para formar el iminio II, que a su vez es atrapado por la función nucleófila en β a través de un ataque de tipo Mannich, alcanzándose el compuesto final III. Se ensayaron dos ácidos carboxílicos distintos, el ácido 3-mercaptopropiónico y la *N*-Boc- β -alanina, mas los distintos intentos realizados (tabla 5.10) fueron infructuosos, recuperándose los productos de partida o mezclas complejas.



Nucleófilo	T (°C)	Tiempo (h)
I	25	4
I	Reflujo (61)	24
III	25	22
III	100 (tubo sellado)	2

Esquema 5.16. Tabla 5.10. Intento de DIA sobre el compuesto **19a**.

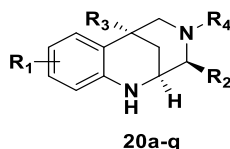
²⁷⁶ Unsworth, W. P., Coulthard, G., Kitsiou, C., Taylor, R. J. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 1368.



Esquema 5.17. Mecanismo propuesto para la malograda transformación.

5.5 Ensayo farmacológico de los compuestos 20a-q

Los compuestos **20a-q** fueron enviados al grupo del Dr. Rafael León, perteneciente al Hospital Universitario de la Princesa y al Instituto Teófilo Hernando, dependiente a su vez de la Universidad Autónoma de Madrid, donde fueron evaluados por las doctoras Sheila Abril e Izaskun Buendía con el objetivo de determinar su potencial como agentes neuroprotectores y estudiar su posible mecanismo de acción. En la tabla 5.11 se resumen todos los compuestos cuya actividad se va a describir a continuación.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
20a	8-OCH₃	4-CH₃C₆H₄	CH₃	H
20b	8-OCH₃	3-BrC₆H₄	CH₃	H
20c	8-OCH₃	4-ClC₆H₄	CH₃	H
20d	8-OCH₃	C₆H₅	CH₃	H
20e	8-OCH₃	C₆H₅	CH₃	H
20f	8-OCH₃	4-FC₆H₄	CH₃	H
20g	8-OCH₃	C₆H₅	CH₃	H
20h	8,10-(CH₃)₂	C₆H₅	CH₃	H
20i	8-OCH₃	2-tienil	CH₃	H
20j	8-OCH₃	C₆H₅	C₂H₅	H
20k	8,10-(CH₃)₂	4-OCH₃C₆H₄	CH₃	H
20l	8-OCH₃	C₆H₅	CH₃	N(CH₃)₂
20m	8-OCH₃	4-FC₆H₄	CH₃	N(CH₃)₂
20n	8-OCH₃	4-OCH₃C₆H₄	CH₃	N(CH₃)₂
20o	7,9-(CH₃)₂	4-FC₆H₄	CH₃	N(CH₃)₂
20p	8,10-(CH₃)₂	4-FC₆H₄	CH₃	N(CH₃)₂
20q	8-OCH₃	2-tienil	CH₃	N(CH₃)₂

Figura 5.10. Tabla 5.11. Derivados de bispidina sometidos a evaluación farmacológica. En negrita, los compuestos sintetizados en el marco de esta tesis doctoral.

En este apartado se incluyen no sólo los resultados farmacológicos de los productos **20a-e**, sino que se añaden otros compuestos de la misma serie sintetizados por los doctores Giulia Bianchini y Pascual Ribelles, de modo que se pueda hacer una comparación general y sacar alguna conclusión sobre las relaciones estructura-actividad de estos derivados de citisina.

En primer lugar, se evaluó la toxicidad en cultivos celulares de neuroblastoma (SH-SY5Y) y microglía (BV2), con los resultados que se recogen en la tabla 5.12. Ninguno de los compuestos manifestó toxicidad a una concentración inferior a 30 μM en ninguna de las dos líneas celulares, por lo que se consideró que todos pasaban esta primera criba.

Compuesto	Toxicidad SH-SY5Y (μM)	Toxicidad BV2 (μM)
20a	≥ 100	≥ 30
20b	≥ 100	≥ 30
20c	≥ 100	≥ 30
20d	≥ 100	≥ 30
20e	≥ 100	≥ 30
20f	$= 30$	≥ 30
20g	$= 30$	≥ 30
20h	≥ 100	≥ 30
20i	≥ 100	≥ 30
20j	≥ 100	≥ 30
20k	≥ 100	≥ 30
20l	≥ 30	≥ 30
20m	≥ 100	≥ 30
20n	≥ 100	≥ 30
20o	≥ 30	≥ 30
20p	$= 30$	$= 30$
20q	≥ 100	≥ 30

Tabla 5.12. Datos de toxicidad de los compuestos **20a-q** en cultivos de células SH-SY5Y y BV2. Se realizaron al menos tres experimentos diferentes para cada compuesto, cada uno de ellos por triplicado. Posteriormente se calculó la CI_{50} mediante un ajuste no lineal.

En segundo lugar, se evaluó su actividad neuroprotectora en cultivos de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Para llevar a cabo estos ensayos, se aplicaron dos tratamientos diferentes a estos cultivos para generar los modelos de neurotoxicidad: rotenona/oligomicina A y ácido okadaico. El tratamiento con rotenona/oligomicina A (R/O) simula las condiciones de estrés oxidativo que participan del proceso de neurodegeneración, puesto que la rotenona inhibe el complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y la oligomicina A bloquea el canal de protones de la ATP sintasa. De este modo, producen una disfunción mitocondrial que conduce al

aumento del estrés oxidativo y, finalmente, a la muerte celular por apoptosis^{277,278}. El ácido okadaico, por su parte, inhibe varias fosfatasa entre las que destaca la PP2A por su papel en la regulación de los niveles de fosforilación de la proteína Tau, y además altera el estatus oxidativo celular y el metabolismo del péptido β -amiloide, de modo que la administración de esta toxina simula algunas de las alteraciones características de la enfermedad de Alzheimer²⁷⁹. En el modelo de R/O los resultados fueron eminentemente positivos, pues prácticamente todos los compuestos redujeron en al menos un 25% la mortalidad celular causada por el tóxico. Especial mención merece el compuesto **20b**, cuyo porcentaje de neuroprotección superó el 60%. En el ensayo con ácido okadaico, los porcentajes de neuroprotección fueron en general algo más modestos, destacando la reducción de la muerte celular superior al 40% observada para los compuestos **20e**, **20k** y **20p**.

Compuesto	Viabilidad (%)	Neuroprotección (%)	Sig. estadística
R/O (30/10 μ M)*	54,13 \pm 10,93	-	###
20a	68,61 \pm 7,72	31,6	n.s.
20b	82,43 \pm 9,90	61,7	**
20c	72,64 \pm 20,65	40,3	*
20d	71,38 \pm 10,83	37,6	n.s.
20e	66,70 \pm 16,36	27,4	n.s.
R/O (30/10 μ M)*	60,40 \pm 5,42	-	###
20f	71,81 \pm 6,69	25,0	*
20g	78,36 \pm 7,19	36,8	**
20h	79,89 \pm 5,26	46,5	***
20i	73,56 \pm 3,38	29,6	***
20j	71,90 \pm 3,604	35,9	**
20k	80,66 \pm 2,69	51,7	***
20l	71,79 \pm 3,50	28,1	**
20m	75,58 \pm 3,54	35,6	***
20n	66,54 \pm 7,49	11,6	n.s.
20o	76,53 \pm 3,14	39,7	***
20p	78,28 \pm 4,25	41,0	***
20q	75,23 \pm 2,55	34,1	***

²⁷⁷ Newhouse, K., Hsuan, S. L., Chang, S. H., Cai, B., Wang, Y., Xia, Z. *Toxicol. Sci.* **2004**, *79*, 137.

²⁷⁸ Hasegawa, K., Yasuda, T., Shiraishi, C., Fujiwara, K., Przedborski, S., Mochizuki, H., Yoshikawa, K. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1.

²⁷⁹ Kamat, P. K., Rai, S., Nath, C. *Neurotoxicology.* **2013**, *37*, 163.

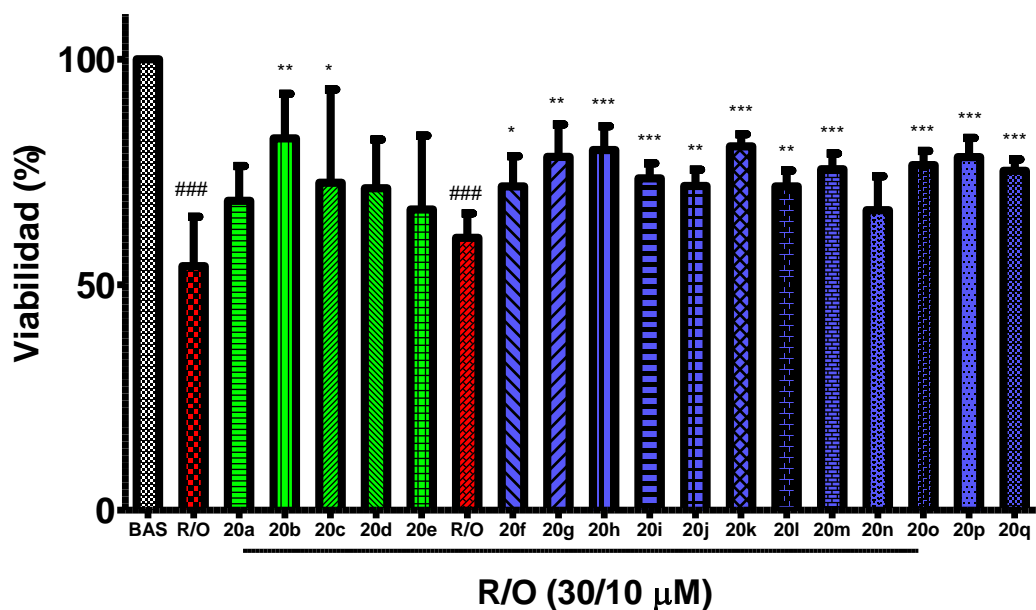


Tabla 5.13. Figura 5.11. Neuroprotección de los compuestos **20a-q** (1 μ M) en el modelo de R/O. Los datos están expresados como la media $\pm \sigma$ de tres experimentos, cada uno de ellos por triplicado. El tratamiento estadístico consistió en una prueba ANOVA de una vía y un post-test de Newman-Keuls: ### $p < 0.001$; comparado con la viabilidad basal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; comparado con la viabilidad de la condición tóxica.

*Se referencian dos datos de viabilidad celular tras el tratamiento con R/O porque los compuestos fueron ensayados en dos tandas realizadas en momentos diferentes: por un lado los derivados **20a-e**, y por otro los compuestos **20f-q**.

Compuesto	Viabilidad (%)	Neuroprotección (%)	Sig. estadística
AO (20 nM)*	43,99 \pm 10,83	-	###
20a	54,37 \pm 6,72	18,5	n.s.
20b	54,42 \pm 11,68	18,6	n.s.
20c	61,39 \pm 10,07	31,1	*
20d	64,98 \pm 17,20	37,5	**
20e	66,70 \pm 13,97	40,5	**
AO (20 nM)*	57,10 \pm 9,59	-	###
20f	69,86 \pm 4,68	34,0	*
20g	68,98 \pm 4,71	33,2	**
20h	68,78 \pm 6,24	26,9	n.s.
20i	64,39 \pm 3,29	30,2	n.s.
20j	74,85 \pm 1,45	35,6	***
20k	80,53 \pm 4,30	48,9	**
20l	66,60 \pm 3,84	32,5	*
20m	75,75 \pm 2,14	39,6	***
20n	66,68 \pm 5,49	16,9	n.s.
20o	69,44 \pm 2,91	31,6	**
20p	75,77 \pm 2,87	43,1	***
20q	72,74 \pm 2,68	39,8	**

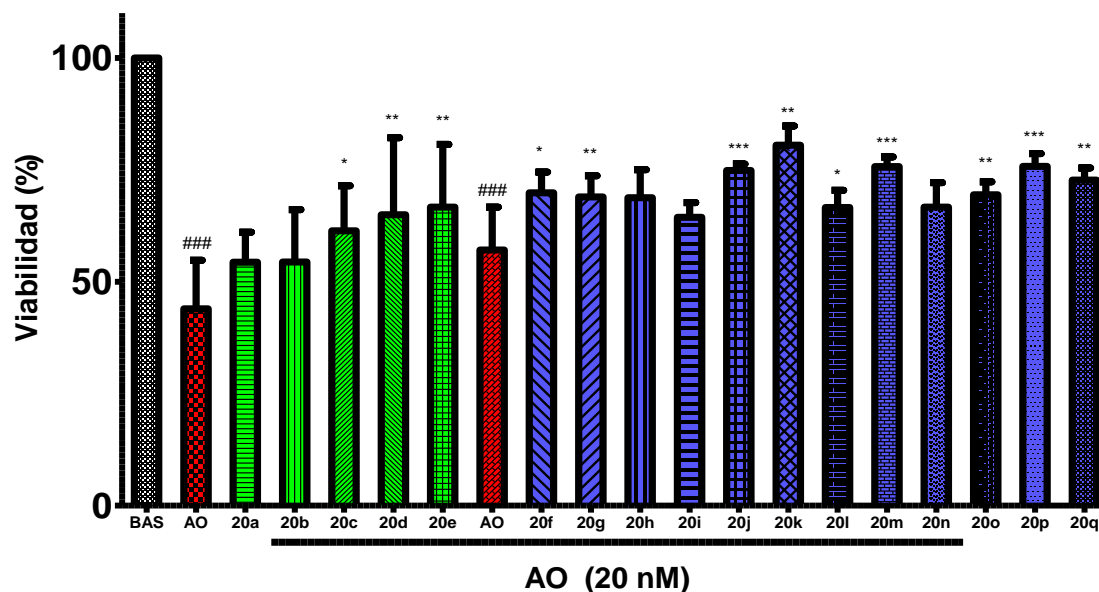


Tabla 5.14. Figura 5.12. Neuroprotección de los compuestos **20a-q** (1 μ M) en el modelo de AO. Los datos están expresados como la media $\pm \sigma$ de tres experimentos, cada uno de ellos por triplicado. El tratamiento estadístico consistió en una prueba ANOVA de una vía y un post-test de Newman-Keuls: ### $p < 0.001$; comparado con la viabilidad basal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; comparado con la viabilidad de la condición tóxica.

*Se referencian dos datos de viabilidad celular tras el tratamiento con AO porque los compuestos fueron ensayados en dos tandas realizadas en momentos diferentes: por un lado los derivados **20a-e**, y por otro los compuestos **20f-q**.

Comparando ambos modelos, se observa que los compuestos **20k** y **20p** son los que exhiben un perfil más equilibrado, con una actividad bastante reseñable en ambos modelos de toxicidad neuronal. Si nos centramos en los compuestos cuya síntesis se describe en este capítulo, son los derivados **20c** y **20d** los que muestran un mejor balance de actividad neuroprotectora.

Una vez se comprobó que estos compuestos tenían actividad neuroprotectora, se llevaron a cabo algunos ensayos para investigar su mecanismo de acción. El ensayo ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) permite, como su propio nombre indica, evaluar la capacidad de un compuesto para captar especies radicalarias de oxígeno. En este experimento, que se realiza a 37 °C, se mezclan los compuestos a ensayar con fluoresceína y APPH (dihidrocloreuro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina)). Éste último es un reactivo que a la temperatura del experimento se descompone generando un radical inestable, que reacciona con el oxígeno molecular para formar un radical peroxilo de una naturaleza similar a los que se observan en condiciones fisiológicas. En estas condiciones, la fluoresceína reacciona con dicho radical peroxilo generando una especie no fluorescente, por lo que en el ensayo se observa una pérdida progresiva de la señal

fluorescente según avanza el tiempo de reacción. Si el compuesto ensayado es capaz de captar radicales de oxígeno, será él el que reaccione con el radical peroxilo en lugar de la fluoresceína, lo que se traduce en un mantenimiento de la señal fluorescente en el tiempo. En este ensayo se utiliza el trolox (un análogo hidrosoluble de la vitamina E) como antioxidante de referencia, de modo que la capacidad captadora de radicales de los compuestos evaluados se expresa en equivalentes de trolox. Este experimento detecta principalmente la reactividad con radicales libres mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT, *Hydrogen Atom Transfer*) y por adición directa, y reúne una serie de ventajas: la temperatura del ensayo y la naturaleza del radical empleado son análogas a las encontradas en condiciones fisiológicas, lo que dota de mayor significatividad a los resultados observados; además, funciona tanto con compuestos hidrófobos como hidrófilos. Como se observa en la tabla 5.15, el derivado **20n** mostró la mayor actividad de toda la familia con $2,71 \pm 0,09$ equivalentes de trolox, seguido por los compuestos **20i**, **20f** y **20e**.

Compuesto	Actividad antioxidante (eq. trolox)
Melatonina	$2,41 \pm 0.17$
20a	$2,03 \pm 0.17$
20b	$1,12 \pm 0.06$
20c	$1,23 \pm 0.27$
20d	$2,43 \pm 0.88$
20e	$2,48 \pm 0.29$
20f	$2,52 \pm 0,54$
20g	$2,43 \pm 0,16$
20h	$1,67 \pm 0,26$
20i	$2,58 \pm 0,35$
20j	$2,11 \pm 0,22$
20k	$1,63 \pm 0,34$
20l	$2,04 \pm 0,34$
20m	$0,33 \pm 0,03$
20n	$2,71 \pm 0,09$
20o	$1,66 \pm 0,16$
20p	$0,13 \pm 0,02$
20q	$1,50 \pm 0,19$

Tabla 5.15. Actividad captadora de radicales de oxígeno de los compuestos **20a-q**. Los experimentos fueron realizados por quintuplicado ($n=5$).

En general, los compuestos que no presentan sustituyente sobre el nitrógeno de la posición 3 exhibieron una capacidad captadora de radicales mayor que los que

presentan un grupo dimetilamino en dicha posición, con la notable excepción del compuesto **20n**, que como ya hemos dicho es el más activo de todos.

Uno de los objetivos fundamentales que perseguía el diseño de estos compuestos es la inducción del factor de transcripción Nrf2, por lo que evaluar su actividad en este sentido resultaba perentorio. Este ensayo se realizó en la línea celular AREc32 de tumor mamario humano, que está transfectada con un plásmido que contiene varias copias del elemento de respuesta a electrófilos (ARE) fusionadas con el gen que codifica para la luciferasa. Las secuencias ARE constituyen la zona de unión de Nrf2 al ADN, de modo que su activación y traslocación al núcleo inducen también la transcripción del gen de la luciferasa en las células transfectadas. Tras 24 horas de incubación de las células con los compuestos a ensayar, se lisan y se lleva a cabo un ensayo de bioluminiscencia, midiendo la cantidad de luz que se libera cuando se añade al lisado un sustrato de la luciferasa. Lógicamente, cuanto mayor sea la capacidad de un compuesto para inducir la actividad de Nrf2, mayor será la intensidad de emisión luminosa que se genere al añadir el reactivo de la luciferasa, de modo que constituye un método indirecto para evaluar la potencia inductora de Nrf2 de un compuesto.

Compuesto	CD (μM)
20a	21,11 \pm 1,39
20b	27,05 \pm 5,63
20c	47,89 \pm 3,77
20d	21,27 \pm 3,27
20e	46,74 \pm 2,85
20f	20,40 \pm 2,48
20g	21,08 \pm 1,62
20h	44,39 \pm 9,09
20i	21,37 \pm 3,11
20j	8,75 \pm 0,40
20k	40,90 \pm 5,71
20l	1,92 \pm 1,03
20m	2,38 \pm 0,46
20n	7,30 \pm 0,37
20o	59,88 \pm 0,13
20p	>60
20q	4,21 \pm 1,08
Citisina	>60

Tabla 5.16. Concentración que dobla los niveles basales de actividad de Nrf2 para los compuestos **20a-q**. Se realizó para cada compuesto un ensayo por triplicado ($n=3$) a cuatro concentraciones diferentes (ajustadas para cada compuesto). Su CD se calculó gracias a un ajuste no lineal de los datos recogidos para cada compuesto.

Los resultados reflejados en la tabla 5.16 hacen referencia a la concentración a la que los compuestos ensayados doblan la actividad basal de la luciferasa (CD), de modo que los valores más bajos pertenecen a los compuestos con una actividad inductora de Nrf2 más potente. Los compuestos más activos fueron **20l** y **20m**, con unas CD de 1,92 y 2,38 μM , respectivamente. También destacan **20q**, **20n** y **20j**, todos ellos con una CD por debajo de 10 μM . En general, se observa que los derivados que presentan un grupo dimetilamino sobre el nitrógeno de la posición 3 tienen una mayor capacidad para inducir Nrf2, aunque con cierta variabilidad. Dentro de los compuestos con ese nitrógeno libre, entre los que se encuentran los cinco recién añadidos a la serie, sólo **20j** tiene una potencia inductora interesante, mientras que el resto tienen unas CD de entre 20 y 50 μM , lo que los convierte en inductores débiles o moderados de este factor de transcripción. No obstante, aunque los resultados puedan parecer un tanto mediocres, la actividad del grueso de los derivados mejora notablemente la del compuesto de referencia para su diseño, la citisina. Además, hay que tomar en consideración el hecho de que estos compuestos supuestamente inducen Nrf2 a través de un mecanismo metabotrópico, que se podría calificar como indirecto, frente a los inductores de Nrf2 clásicos que se unen a Keap-1 gracias a su carácter oxidante o a su electrofilia. Aunque la potencia de las moléculas que actúan por este tipo de mecanismos pueda ser menor, sortean los problemas de toxicidad ya mencionados de los que adolecen los compuestos electrófilos u oxidantes.

Por último, se estudió la actividad nicotínica de los compuestos **20** para avanzar en la comprensión de su mecanismo citoprotector e inductor de Nrf2. Dicha actividad se evaluó mediante dos experimentos distintos, siempre empleando células de la línea SH-SY5Y: capacidad para bloquear la respuesta a acetilcolina y a citisina. La medida de la actividad nicotínica es indirecta, pues se basa en el aumento del calcio intracelular que se sigue a la estimulación de los receptores nicotínicos (recuérdese que son canales de calcio), fenómeno que se puede medir gracias a la incubación previa de las células con la sonda de calcio fluorescente Fluo-4. Las células, tras el periodo de incubación con la sonda, se ponen en contacto con los compuestos cuya actividad nicotínica se pretende cuantificar a la concentración de 10 μM , después de lo cual se inyecta el agonista nicotínico correspondiente sobre las células (acetilcolina o citisina). Si un compuesto es

capaz de unirse a los receptores nicotínicos sobre los que actúa el agonista se apreciará una reducción en la respuesta que éste es capaz de evocar, que se puede cuantificar mediante este experimento.

Para el primer experimento se inyectó, tras una breve incubación con los compuestos a 10 μ M, acetilcolina a la concentración de 100 μ M. Los resultados, recogidos en la tabla 5.17, muestran que la mayoría de los compuestos producen una ligera reducción de la respuesta a acetilcolina, siendo en general más potentes que la citisina, aunque en ninguno de los casos esta reducción es estadísticamente significativa. Destacan especialmente los compuestos **20a** y **20b** con porcentajes de reducción de la respuesta superiores al 15%. No es de extrañar que los compuestos exhiban modestos porcentajes de reducción de la respuesta en este experimento, pues la acetilcolina es un agonista potente de todos los subtipos de receptores nicotínicos, mientras que estos compuestos tienen como diana sólo alguno de ellos.

Compuesto	Respuesta (%)	Sig. estadística
Citisina	98,22 \pm 4,81	n.s.
20a	84,86 \pm 18,41	n.s.
20b	80,53 \pm 17,88	n.s.
20c	88,07 \pm 19,80	n.s.
20d	89,30 \pm 15,12	n.s.
20e	90,84 \pm 24,90	n.s.
20f	89,58 \pm 8,51	n.s.
20g	94,21 \pm 13,40	n.s.
20h	91,75 \pm 5,54	n.s.
20i	97,66 \pm 8,68	n.s.
20j	95,33 \pm 4,99	n.s.
20k	92,74 \pm 13,08	n.s.
20l	93,46 \pm 11,87	n.s.
20m	86,69 \pm 8,98	n.s.
20n	93,58 \pm 14,87	n.s.
20o	105,37 \pm 15,46	n.s.
20p	98,49 \pm 17,06	n.s.
20q	99,35 \pm 4,65	n.s.

Tabla 5.17. Respuesta basal a acetilcolina de las células SH-SY5Y y en presencia de citisina o los compuestos **20a-q**. Los datos están expresados como la media \pm σ de tres experimentos, cada uno de ellos por duplicado. El tratamiento estadístico consistió en una prueba ANOVA de una vía y un post-test de Newman-Keuls: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; comparado con la respuesta a acetilcolina.

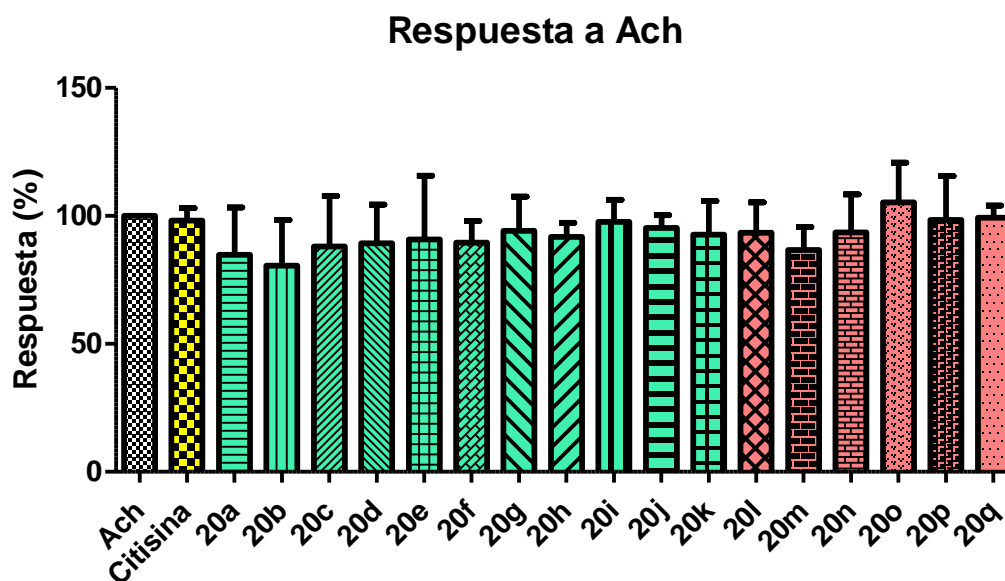


Figura 5.13. Respuesta basal a acetilcolina de las células SH-SY5Y y en presencia de citisina o los compuestos 20a-q.

Por otro lado, se realizó otro experimento inyectando citisina a 20 μ M, que al ser en la práctica un agonista con mayor afinidad por los receptores $\alpha_4\beta_2$ permite extraer más información sobre el perfil de selectividad de los derivados a evaluar.

Compuesto	Respuesta (%)	Sig. estadística
20a	42,70 \pm 28,07	**
20b	50,93 \pm 30,24	**
20c	59,37 \pm 31,43	*
20d	34,23 \pm 22,79	**
20e	50,80 \pm 24,10	*
20f	64,77 \pm 3,65	**
20g	55,59 \pm 8,95	***
20h	54,90 \pm 16,08	***
20i	68,32 \pm 13,32	***
20j	58,12 \pm 17,12	***
20k	35,70 \pm 5,16	***
20l	54,41 \pm 5,06	***
20m	58,47 \pm 10,15	***
20n	58,93 \pm 4,07	***
20o	55,74 \pm 13,95	***
20p	80,56 \pm 12,68	*
20q	57,80 \pm 4,88	***

Tabla 5.18. Respuesta basal a citisina de las células SH-SY5Y y en presencia de los compuestos 20a-q. Los datos están expresados como la media \pm σ de tres experimentos, cada uno de ellos por duplicado. El tratamiento estadístico consistió en una prueba ANOVA de una vía y un post-test de Newman-Keuls. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; comparado con la respuesta a citisina.

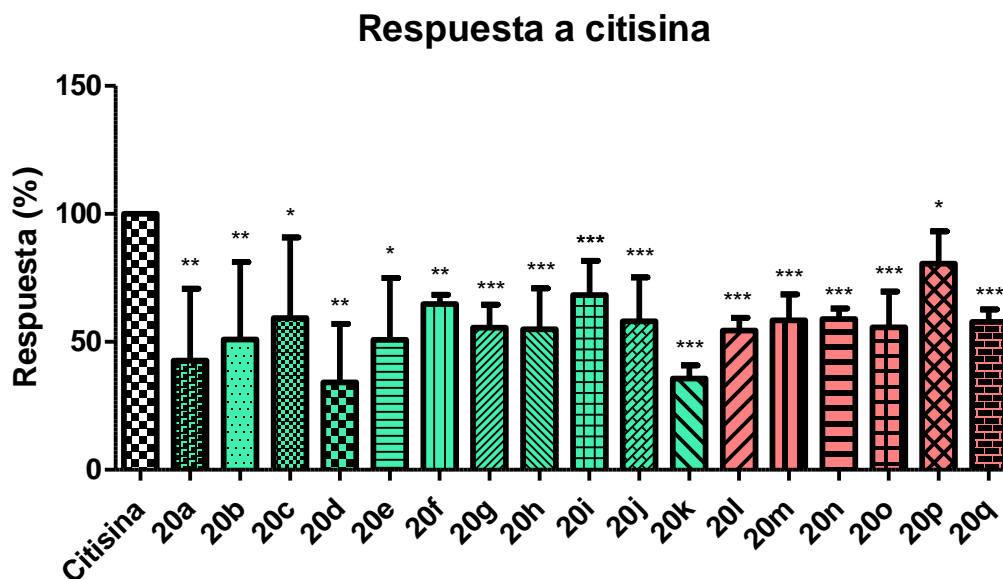


Figura 5.14. Respuesta basal a citisina de las células SH-SY5Y y en presencia de los compuestos 20a-q.

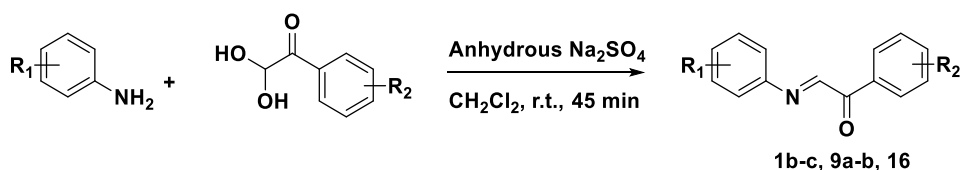
Como se observa en la tabla 5.18, la actividad exhibida por esta familia de compuestos es francamente prometedora: todos bloquean significativamente la entrada de calcio evocada por la citisina, con porcentajes de reducción de la respuesta que en su mayoría superan el 40%, e incluso el 60% en el caso de los derivados **20d** y **20k**. Estos resultados ponen de manifiesto la posibilidad de que los compuestos en cuestión modulen los receptores nicotínicos $\alpha_4\beta_2$, una hipótesis que se deberá confirmar en el futuro repitiendo el mismo experimento sobre cultivos celulares que sobreexpresen este subtipo de receptores nicotínicos.

5.6 Experimental section

General experimental details

All reagents (Aldrich, Fischer, Alpha Aesar) and solvents (Scharlau, Fischer) were of commercial quality and were used as received. Reactions were monitored by thin layer chromatography on aluminium plates coated with silica gel and fluorescent indicator (Macherey-Nagel Xtra SIL G/UV254). Mechanochemical reactions were carried out in a vibratory ball mill Anton Paar BM500 (Madrid, Spain) and a planetary ball mill Retsch PM 100 (Asturias, España), using grinding jars and balls of zirconium oxide and stainless steel with different volumes and diameters. Microwave-assisted reactions were performed on a CEM Discover focused microwave reactor. Separations by flash chromatography were performed using a Combiflash Teledyne automated flash chromatograph or on conventional silica gel columns (Scharlau 40–60 μm , 230–400 mesh ASTM). Melting points were determined using a Stuart Scientific apparatus, SMP3 Model, and are uncorrected. Infrared spectra were recorded with an Agilent Cary630 FTIR spectrophotometer with a diamond accessory for solid and liquid samples. NMR spectroscopic data were recorded using a Bruker Avance 250 spectrometer operating at 250 MHz for ^1H NMR and 63 MHz for ^{13}C NMR (CAI de Resonancia Magnética Nuclear, Universidad Complutense); Topspin (Bruker, Rivas-Vaciamadrid, Madrid, Spain) or Mestrenova (Mestrelab, Santiago de Compostela, Spain) software packages were used throughout for data processing; chemical shifts are given in ppm and coupling constants in Hertz. Elemental analyses were determined by the CAI de Microanálisis Elemental, Universidad Complutense, using a Leco 932 combustion microanalyzer. Exact mass data were recorded with a high-resolution mass spectrometer FTMS Bruker APEX Q IV coupled to 2DLC-NS-ESI-MALDI (Mass range: 200-10.000 uma) and a time-of-flight mass spectrometer MALDI-TOF/TOF Bruker ULTRAFLEX coupled to MALDI (Mass range: 300-150000 uma), operated by the CAI de Espectrometría de Masas, Universidad Complutense.

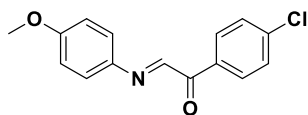
Synthesis of α -ketoimines **1b-c**, **9a-b**, **16**



Compuesto	R ₁	R ₂
1b	3,5-(CH ₃) ₂	H
1c	3-CH ₃	H
9a	4-OCH ₃	4-CH ₃
9b	4-OCH ₃	3-Br
16	4-OCH ₃	4-Cl

A solution of the suitable aniline (1 eq) and glyoxal derivative (1-1,2 eq) in CH₂Cl₂ (5 mL) was stirred vigorously in the presence of anhydrous Na₂SO₄ (5 g) for 30 minutes. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent evaporated under vacuum to afford the desired acylimines, that were used without further purification in the following reactions. In all cases the yields were quantitative.

1-(4-Chlorophenyl)-2-((4-methoxyphenyl)imino)ethanone (**16**)



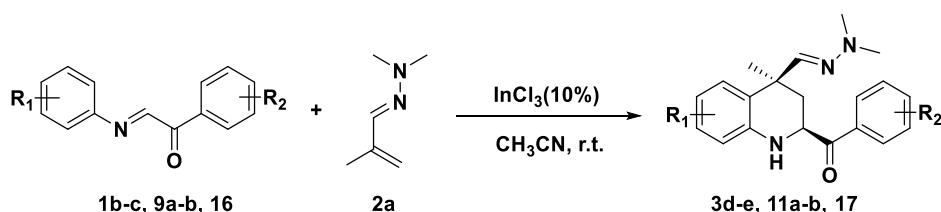
Prepared from *p*-anisidine (2 mmol, 0.246 g) and 4-chlorophenylglyoxal (2.4 mmol, 0.405 g). Brown oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ : 8.35 – 8.28 (m, 3H), 7.53-7.47 (m, 2H), 7.46-7.39 (m, 2H), 7.04-6.95 (m, 2H), 3.89 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 190.1, 161.2, 154.3, 141.7, 140.3, 134.2, 132.6, 129.1, 124.1, 115.1, 56.0 ppm.

IR ν : 1648.2, 1578.7 cm⁻¹.

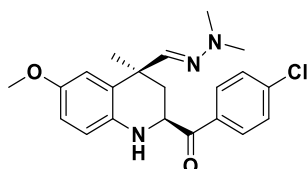
Synthesis of 2-acyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines **3d-e**, **11a-b**, **17**.



Compuesto	R ₁	R ₂
3d	3,5-(CH ₃) ₂	H
3e	3-CH ₃	H
11a	4-OCH ₃	4-CH ₃
11b	4-OCH ₃	3-Br
17	4-OCH ₃	4-Cl

To a stirred solution of imine (2.0 mmol) and InCl₃ (0.2 mmol, 0.044 g) in acetonitrile (20 mL) was added **2a** (2.4 mmol, 0.269 g). Stirring was continued for the time specified in the compound data sheet and, after completion of the reaction indicated by TLC, the reaction mixture was diluted with water (10 mL), extracted with CH₂Cl₂ (4 x 10 mL), dried and evaporated. The resulting crude was purified by silica gel column chromatography using the suitable mixture of solvents.

(±)-(2*S*,4*S*)-(4-Chlorophenyl)-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-2-yl)methanone (**17**)



Prepared from imine **16** (0.547 g, 2 mmol), **2a** (0.269 g, 2.4 mmol) and InCl₃ (0.2 mmol, 0.044 g).

Reaction time: 3 h.

Purification of cis isomer: petroleum ether: ethyl acetate (9:1, v/v).

Yield: 0.648 g (84%). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.97 – 7.86 (m, 2H), 7.54 – 7.46 (m, 2H), 6.74 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H), 6.69 – 6.66 (m, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.06 (dd, *J* = 12.2, 2.8 Hz, 1H), 4.58 (bs, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.75 (s, 6H), 2.06 (dd, *J* = 13.0, 2.8 Hz, 1H), 1.77 (t, *J* = 12.6 Hz, 1H), 1.66 (s, 3H) ppm.

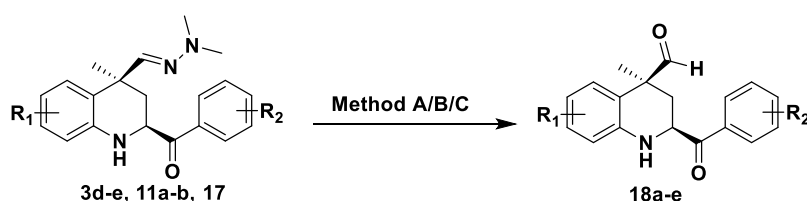
^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ 198.8, 152.7, 142.9, 140.4, 136.7, 133.4, 130.1, 129.7, 128.7, 117.5, 114.0, 114.0, 56.2, 54.8, 43.6, 41.4, 39.3, 26.8 ppm.

IR ν : 3326.2, 2964.5, 1683.2, 1588.5 cm^{-1}

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClN}_3\text{O}_2$ ($M = 385.89$): C, 65.36; H, 6.27 ; N, 10.89
Found: C, 65.74 ; H, 6.31 ; N, 11.24.

mp: 100-102 $^\circ\text{C}$.

Synthesis of 1,2,3,4-tetrahydroquinoline-4-carbaldehydes **18a-e**.



Method A: Glyoxylic acid 50% sol. in H_2O -THF (1:1), r.t.

Method B: HCl 5 N/THF (1:2), r.t.

Method C: HCl 2 N/THF (1:2), 0 $^\circ\text{C}$

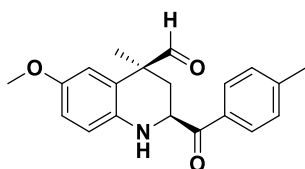
Method A: To a stirred solution of tetrahydroquinolines **11a-b**, **17** (0.6 mmol) in THF (4 mL), 2 mL of glyoxylic acid solution (50 wt % in water) were added. The mixture was stirred at room temperature until the starting material disappeared as indicated by TLC (the reaction times are indicated in the table). Then, THF was removed under reduced pressure and the residue was dissolved with CH_2Cl_2 (10 mL) and neutralised with a saturated solution of NaHCO_3 . The organic phase was washed with brine, and the ensemble of aqueous phases was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 , and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography on silica gel eluting with a gradient from neat petroleum ether to 9:1 petroleum ether–ethyl acetate.

Method B: To a solution of compound **3d** in THF (4 mL), 5N HCl (2 mL) was added dropwise, and the mixture was vigorously stirred at room temperature for 48 hours. Then, the reaction mixture was quenched with a saturated solution of NaHCO_3 . The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was removed under vacuum, and the obtained residue was purified by flash chromatography on silica gel eluting with a

gradient from neat petroleum ether to 9:1 petroleum ether–ethyl acetate, giving the aldehyde **18d**.

Method C: To a solution of compound **3e** in THF (4 mL), 2N HCl (4 mL) was added dropwise, and the mixture was vigorously stirred at 0-5°C for 6 hours. The reaction mixture was then quenched with a saturated solution of NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL) and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under vacuum and the obtained residue was purified by flash chromatography on silica gel eluting with a gradient from neat petroleum ether to 9:1 petroleum ether–ethyl acetate, giving the aldehyde **18e**.

(±)-(2S,4S)-6-Methoxy-4-methyl-2-(4-methylbenzoyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-4-carbaldehyde (18a)



Prepared from tetrahydroquinoline **11a** (0.219 g, 0.6 mmol) by method A.

Reaction time: 19 h.

Yield: 0.116 g (60%). Pale yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 9.33 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.81 (m, 2H), 6.42 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 4.97 (dd, *J* = 11.4, 2.8 Hz, 1H), 4.66 (bs, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.47 (s, 3H), 2.02 (dd, *J* = 12.9, 3.0 Hz, 1H), 1.96 – 1.83 (m, 1H), 1.62 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 201.6, 198.7, 152.9, 145.4, 137.5, 132.2, 130.2, 128.8, 121.4, 118.4, 115.8, 113.5, 56.2, 53.2, 50.2, 34.3, 23.6, 22.2 ppm.

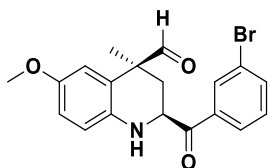
IR (neat) v: 3391.8, 1717.0, 1676.5 cm⁻¹

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₀H₂₁NO₃ (M = 323.39): C, 74.28; H, 6.55; N, 4.33.

Found: C, 74.22; H, 6.44; N, 4.39.

mp: 158-160 °C.

(±)-(2S,4S)-2-(3-Bromobenzoyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-4-carbaldehyde (18b)



Prepared from tetrahydroquinoline **11b** (0.258 g, 0.6 mmol) by method A.

Reaction time: 15 h.

Yield: 0.112 g (48%). Brown solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 9.34 (s, 1H), 8.10 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.90 – 7.83 (m, 1H), 7.79 (ddd, *J* = 8.0, 1.9, 1.0 Hz, 1H), 7.43 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.81 (m, 2H), 6.44 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.93 (dd, *J* = 10.2, 4.2 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.09 – 1.88 (m, 2H), 1.62 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 201.4, 198.0, 153.1, 137.2, 137.2, 136.5, 131.8, 131.0, 127.1, 123.9, 121.3, 118.3, 115.8, 113.5, 56.2, 53.7, 50.0, 34.1, 23.8 ppm.

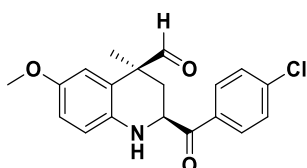
IR (neat) v: 3399.1, 2954.9, 1703.4, 1680.6 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₁₉H₁₈BrNO₃ (M = 388.26): C, 58.78; H, 4.67; N, 3.61.

Found: C, 59.10; H, 4.83 ; N, 3.99.

mp: 152-154 °C.

(±)-(2S,4S)-2-(4-Chlorobenzoyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-4-carbaldehyde (18c)



Prepared from tetrahydroquinoline **17** (0.232 g, 0.6 mmol) by method A.

Reaction time: 24 h.

Yield: 0.120 g (57%). Pale yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 9.34 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.88 – 6.74 (m, *J* = 1.4 Hz, 2H), 6.44 (s, 1H), 4.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.60 (bs, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.12 – 1.84 (m, 2H), 1.61 (s, 3H) ppm.

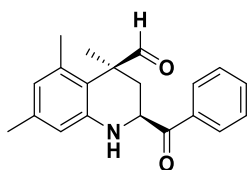
^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 201.4, 198.0, 153.1, 140.9, 137.3, 133.1, 130.1, 129.9, 121.3, 118.4, 115.9, 113.5, 56.2, 53.5, 50.0, 34.1, 23.8 ppm.

IR (neat) ν : 3394.4, 2957.6, 1703.4, 1684.8 cm^{-1}

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{ClNO}_3$ ($M = 343.80$): C, 66.38; H, 5.28; N, 4.07.
Found: C, 66.06; H, 5.10 ; N, 4.17.

mp: 155-157 $^\circ\text{C}$.

(\pm)-(2S,4S)-2-Benzoyl-4,5,7-trimethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-4-carbaldehyde (18d)



Prepared from tetrahydroquinoline **3d** (0.210 g, 0.6 mmol) by method B.

Reaction time: 48 h.

Yield: 0.138 g (75%). Off-white solid.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 9.41 (s, 1H), 8.03 – 7.89 (m, 2H), 7.71 – 7.61 (m, 1H), 7.59 – 7.50 (m, $J = 7.4$ Hz, 2H), 6.55 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 5.05 – 4.92 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.82 (dd, $J = 12.8, 2.2$ Hz, 1H), 1.74 – 1.61 (m, 4H) ppm.

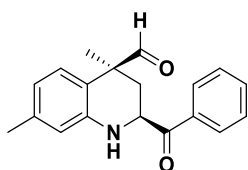
^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 203.4, 198.8, 143.8, 138.9, 137.0, 134.7, 134.4, 129.5, 128.7, 122.7, 116.6, 115.1, 52.6, 49.7, 35.5, 21.4, 20.7 ppm.

IR (neat) ν : 3369.5, 2959.2, 1711.8, 1676.6 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_2$ ($M = 307.39$): C, 78.15; H, 6.89; N, 4.56.
Found: C, 78.39; H, 6.96 ; N, 4.74.

mp: 207-209 $^\circ\text{C}$.

(\pm)-(2S,4S)-2-Benzoyl-4,7-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-4-carbaldehyde (18e).



Prepared from tetrahydroquinoline **3e** (0.201 g, 0.6 mmol) by method C.

Reaction time: 6 h.

Yield: 0.111 g (64%). Pale yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 9.31 (s, 1H), 8.01 – 7.91 (m, 2H), 7.72 – 7.62 (m, 1H), 7.61 – 7.50 (m, 2H), 6.75 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.64 – 6.56 (m, 1H), 5.01 (dt, $J = 11.5$, 2.6 Hz, 1H), 4.89 (bs, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.05 (dd, $J = 12.8$, 2.9 Hz, 1H), 1.99 – 1.84 (m, 1H), 1.60 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ 201.7, 199.0, 143.4, 139.3, 134.8, 134.3, 129.5, 128.6, 128.6, 119.7, 117.2, 117.0, 53.1, 49.5, 34.1, 23.6, 21.7 ppm.

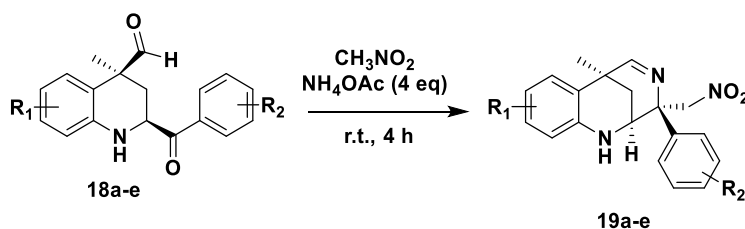
IR (neat) ν : 3369.5, 2959.2, 1711.8, 1676.6 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ ($M = 293.36$): C, 77.79; H, 6.53; N, 4.77.

Found: C, 77.39; H, 6.39; N, 5.02.

mp: 160-162 $^\circ\text{C}$.

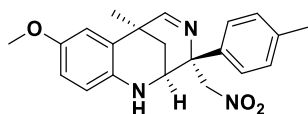
Synthesis of 1,2,3,6-tetrahydro-2,6-methanobenzo[e][1,4] diazocines 19a-e.



Compound	R ₁	R ₂
19a	4-OCH ₃	4-CH ₃
19b	4-OCH ₃	3-Br
19c	4-OCH ₃	4-Cl
19d	3,5-(CH ₃) ₂	H
19e	3-CH ₃	H

A mixture of the corresponding aldehyde **18** (1 mmol), ammonium acetate (4 mmol) and nitromethane (5 mL) was stirred at room temperature for 6 h, filtered and concentrated. The obtained oily residue was dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL), washed with water (10 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 . Evaporation of the solvent provided the products that were used directly for the next step without purification.

(±)-(2*S*,3*R*,6*S*)-8-Methoxy-6-methyl-3-(nitromethyl)-3-(*p*-tolyl)-1,2,3,6-tetrahydro-2,6-methanobenzo[*e*][1,4]diazocine (19a)



Prepared from aldehyde **18a** (0.097 g, 0.3 mmol) in 2 mL of nitromethane and ammonium acetate (0.092 g, 1.2 mmol).

Yield: 0.110 g (quantitative). Yellow oil.

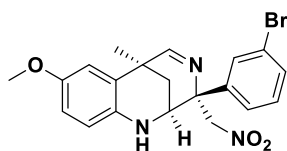
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.92 (s, 1H), 7.22 (s, 4H), 6.74 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.56 (dd, *J* = 8.7, 2.8 Hz, 1H), 6.12 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.87 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 4.16 – 4.08 (m, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.64 (bs, *J* = 7.4 Hz, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.99 (d, *J* = 2.8 Hz, 2H), 1.67 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 169.6, 152.0, 137.9, 137.9, 136.6, 130.2, 126.4, 122.6, 114.5, 113.8, 111.2, 83.4, 68.9, 56.3, 50.4, 35.6, 29.8, 22.4, 21.5 ppm.

IR (neat) v: 3401.0, 2923.1, 1646.1, 1549.5, 1374.6 cm⁻¹.

HRMS (ESI): calcd. for C₂₁H₂₄N₃O₃[M+H]⁺ 366.1739, found 366.1823.

(±)-(2*S*,3*R*,6*S*)-3-(3-Bromophenyl)-8-methoxy-6-methyl-3-(nitromethyl)-1,2,3,6-tetrahydro-2,6-methanobenzo[*e*][1,4]diazocine (19b)



Prepared from aldehyde **18b** (0.116 g, 0.3 mmol) in 2 mL of nitromethane and ammonium acetate (0.092 g, 1.2 mmol).

Yield: 0.129 g (quantitative). Yellow oil.

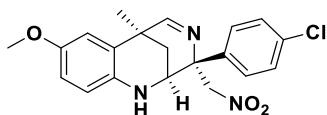
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.90 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.52 – 7.44 (m, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.58 (dd, *J* = 8.7, 2.8 Hz, 1H), 6.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.85 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.69 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.13 (s, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.68 (s, 1H), 2.10 – 1.89 (m, 2H), 1.68 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 169.9, 152.1, 143.7, 136.4, 131.3, 130.8, 130.1, 125.2, 123.8, 122.2, 114.3, 114.0, 111.2, 83.0, 68.7, 56.3, 50.3, 35.8, 29.7, 22.2 ppm.

IR (neat) v: 3418.9, 2930.0, 1646.9, 1550.6, 1375.3 cm^{-1} .

HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 430.0761, found 430.0786.

(±)-(2S,3R,6S)-3-(4-Chlorophenyl)-8-methoxy-6-methyl-3-(nitromethyl)-1,2,3,6-tetrahydro-2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocine (19c)



Prepared from aldehyde **18c** (0.103 g, 0.3 mmol) in 2 mL of nitromethane and ammonium acetate (0.092 g, 1.2 mmol).

Yield: 0.116 g (quantitative). Yellow oil.

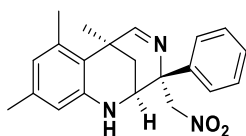
^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 7.90 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.42 – 7.36 (m, 2H), 7.34 – 7.27 (m, 2H), 6.75 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.58 (dd, $J = 8.7, 2.8$ Hz, 1H), 6.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.86 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 4.70 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 4.12 (bs, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.61 (bs, 1H), 2.04 – 1.97 (m, 2H), 1.68 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 169.9, 152.1, 139.7, 136.3, 134.0, 129.6, 128.1, 122.3, 114.4, 114.0, 111.3, 83.1, 68.7, 56.3, 50.3, 35.7, 29.7, 22.3 ppm.

IR (neat) v: 3411.6, 2928.6, 1649.5, 1549.6, 1374.4 cm^{-1} .

HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClN}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 386.1266, found 386.1282.

(±)-(2S,3R,6S)-6,7,9-Trimethyl-3-(nitromethyl)-3-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocine (19d)



Prepared from aldehyde **18d** (0.092 g, 0.3 mmol) in 2 mL of nitromethane and ammonium acetate (0.092 g, 1.2 mmol).

Yield: 0.105 g (quantitative). Yellow oil.

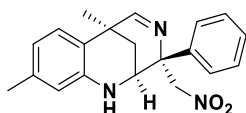
^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.24 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.45 – 7.31 (m, 5H), 6.25 (s, 1H), 5.82 (s, 1H), 4.87 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 4.75 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 4.11 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 3.77 (bs, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.29 – 2.20 (m, $J = 9.7, 7.2$ Hz, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.88 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 169.0, 143.6, 141.1, 137.7, 136.5, 129.4, 128.1, 126.5, 123.0, 117.6, 113.4, 83.5, 68.6, 50.0, 36.7, 33.3, 26.0, 24.7, 21.0 ppm.

IR (neat) ν : 3406.2, 2918.9, 1609.0, 1551.0, 1376.3 cm^{-1} .

HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$ [M+H] $^+$ 350.1863, found 350.1880.

(±)-(2*S*,3*R*,6*S*)-6,9-Dimethyl-3-(nitromethyl)-3-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-2,6-methanobenzo[*e*][1,4]diazocine (19e)



Prepared from aldehyde **18e** (0.088 g, 0.3 mmol) in 2 mL of nitromethane and ammonium acetate (0.092 g, 1.2 mmol).

Yield: 0.101 g (quantitative). Yellow oil.

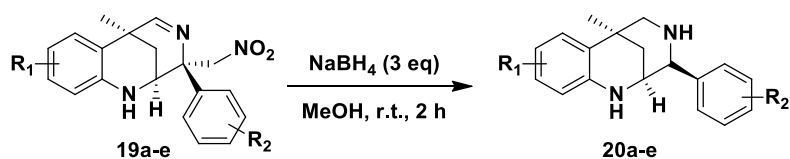
^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 7.90 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.48 – 7.36 (m, 5H), 7.02 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.49 (dd, J = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 4.88 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 4.75 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 4.22 (dd, J = 6.2, 3.5 Hz, 1H), 3.81 (bs, 1H), 2.15 (s, 3H), 2.07 – 1.92 (m, 2H), 1.68 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 167.0, 142.3, 141.3, 138.3, 129.4, 128.1, 126.6, 124.7, 118.7, 118.3, 114.1, 83.3, 68.6, 50.5, 35.4, 29.8, 22.3, 21.5 ppm.

IR (neat) ν : 3420.3, 2918.7, 1645.3, 1549.4, 1376.1 cm^{-1} .

HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2$ [M+H] $^+$ 336.1706, found 336.1715.

Synthesis of 1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[*e*][1,4] diazocines 20a-e.

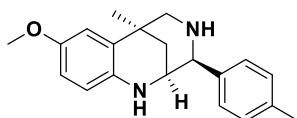


Compuesto	R ₁	R ₂
20a	4-OCH ₃	4-CH ₃
20b	4-OCH ₃	3-Br
20c	4-OCH ₃	4-Cl
20d	3,5-(CH ₃) ₂	H
20e	3-CH ₃	H

To a stirred solution of compounds **19a-e** (0.3 mmol) in methanol (5 mL), NaBH₄ (0.9 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h until the starting material disappeared. Then, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved with ethyl acetate (15 mL). The resulting solution was washed with water (15 mL) and brine (10 mL), and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, and then the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography on silica gel eluting with a gradient from neat petroleum ether to 7:3 petroleum ether: ethyl acetate.

Data of compounds, and the experimental conditions employed for their syntheses are indicated below.

(±)-(2S,3S,6S)-8-Methoxy-6-methyl-3-(*p*-tolyl)-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[*e*][1,4]diazocine (20a)



Prepared from crude imine **19a** (0.110 g, 0.3 mmol) and sodium borohydride powder (0.034 g, 0.9 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate (from 9:1 to 4:1, v/v).

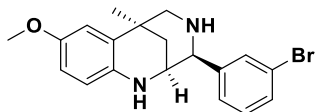
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.22 – 7.14 (m, 4H), 6.79 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J* = 8.6, 2.8 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.98 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.43 (t, *J* = 3.9 Hz, 1H), 2.97 – 2.84 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.12 (ddd, *J* = 12.3, 3.6, 2.1 Hz, 1H), 1.96 (dd, *J* = 12.5, 2.7 Hz, 1H), 1.38 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 151.8, 140.2, 139.0, 137.1, 129.6, 129.0, 126.8, 113.7, 113.1, 112.0, 66.3, 61.6, 56.3, 51.4, 37.8, 32.7, 24.3, 21.5 ppm.

IR (neat) v: 3372.1, 2920.2, 1576.7, 1497.0 cm⁻¹.

HRMS (Q-TOF) m/z: calcd. for C₂₀H₂₅N₂O[M+H]⁺ 309.1922, found 309.1951.

(±)-(2S,3S,6S)-3-(3-Bromophenyl)-8-methoxy-6-methyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocine (20b)



Prepared from crude imine **19b** (0.129 g, 0.3 mmol) and sodium borohydride powder (0.034 g, 0.9 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate (3:1, v/v).

Yield: 0.086 g (77%). Orange paste.

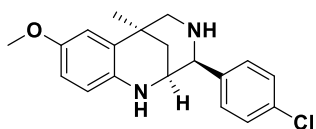
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.49 – 7.40 (m, 2H), 7.26 – 7.18 (m, *J* = 6.8, 4.6 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.68 (dd, *J* = 8.6, 2.8 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.97 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.46 (bs, 1H), 2.91 (s, 2H), 2.16 – 2.03 (m, 1H), 1.95 (dd, *J* = 12.5, 2.4 Hz, 1H), 1.38 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 151.9, 144.7, 140.0, 130.6, 130.5, 130.3, 128.9, 125.7, 123.2, 113.6, 113.2, 112.0, 66.2, 61.5, 56.3, 51.2, 37.8, 32.7, 24.3 ppm.

IR (neat) v: 3398.4, 2922.9, 1563.0, 1497.7 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₁₉H₂₁BrN₂O (M = 373.29): C, 61.13; H, 5.67; N, 7.50. Found: C, 57.11; H, 5.37; N, 6.56.

(±)-(2S,3S,6S)-3-(4-Chlorophenyl)-8-methoxy-6-methyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocine (20c)



Prepared from crude imine **19c** (0.116, 0.3 mmol) and sodium borohydride powder (0.034 g, 0.9 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate (4:1, v/v).

Yield: 0.072 g (73%). Orange paste.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.39 – 7.32 (m, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J* = 8.6, 2.8 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.00 (s, 1H), 3.79 (s, 3H),

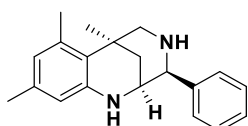
3.43 (bs, 1H), 2.99 – 2.84 (m, 2H), 2.17 – 2.06 (m, 1H), 1.96 (dd, $J = 12.5, 2.6$ Hz, 1H), 1.38 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 151.9, 140.7, 140.0, 133.2, 129.0, 129.0, 128.5, 113.6, 113.1, 112.1, 66.1, 61.5, 56.3, 51.3, 37.8, 32.7, 24.3 ppm.

IR (neat) ν : 3399.5, 2921.9, 1579.2, 1498.9 cm^{-1} .

HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{ClN}_2\text{O}[\text{M}+\text{H}]^+$ 329.1415, found 329.1398.

(±)-(2S,3S,6S)-6,7,9-trimethyl-3-phenyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocine (20d)



Prepared from crude imine **19d** (0.105 g, 0.3 mmol) and sodium borohydride powder (0.034 g, 0.9 mmol).

Purification: ether petroleum: ethyl acetate (4:1, v/v).

Yield: 0.055 g (63%). Orange solid.

^1H NMR (250 MHz, MeOD) δ : 7.39 – 7.18 (m, 5H), 6.20 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.95 (s, 1H), 3.37 (bs, 1H), 3.13 (dd, $J = 12.9, 2.7$ Hz, 1H), 2.79 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H), 2.33 (s, 3H), 2.20 – 2.04 (m, 4H), 1.92 (dd, $J = 12.5, 2.6$ Hz, 1H), 1.49 (s, 3H) ppm.

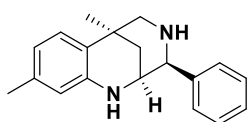
^{13}C NMR (63 MHz, MeOD) δ : 148.7, 143.2, 138., 137.9, 129.8, 128.5, 128.2, 122.7, 122.3, 113.8, 67.5, 59.4, 52.2, 42.8, 34.4, 27.3, 24.6, 21.3 ppm.

IR (neat) ν : 3293.0, 2923.4, 1606.1, 1461.9 cm^{-1} .

HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2[\text{M}+\text{H}]^+$ 293.2012, found 293.2012.

mp: 85-87 °C.

(±)-(2S,3S,6S)-6,9-Dimethyl-3-phenyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocine (20e)



Prepared from imine **19e** (0.101 g, 0.3 mmol) and sodium borohydride powder (0.034 g, 0.9 mmol).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate (3:1, v/v).

Yield: 0.049 g (59%). Yellow pale solid.

¹H NMR (250 MHz, MeOD) δ: 7.43 – 7.19 (m, 5H), 7.00 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.40 (dd, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 3.99 (s, 1H), 3.57 – 3.43 (m, 1H), 2.90 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 2.79 (dd, *J* = 12.8, 2.3 Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.02 (dd, *J* = 12.3, 2.5 Hz, 1H), 1.95 – 1.85 (m, 1H), 1.34 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, MeOD) δ: 147.2, 142.6, 138.6, 129.9, 128.7, 128.3, 126.6, 124.5, 118.5, 114.6, 67.4, 62.1, 52.5, 38.7, 33.1, 24.7, 21.7 ppm.

IR (neat) ν: 3284.5, 2922.3, 1613.1, 1490.9 cm⁻¹.

HRMS (ESI): calcd. for C₁₉H₂₃N₂[M+H]⁺ 279.1856, found 279.1856.

mp: 93-94 °C.

**Capítulo 6. DISEÑO Y SÍNTESIS DE
LIGANDOS MULTIDIANA ANÁLOGOS DE
CITISINA PARA EL TRATAMIENTO DE LA
NEURODEGENERACIÓN**

6.1 Introducción

6.1.1 Diseño de ligandos multidiana: una nueva aproximación para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

Hasta hace unos pocos años, la labor de búsqueda de nuevas terapias estuvo dominada por el concepto de “bala mágica” propuesto por Paul Ehrlich, en un contexto en el que dominaba el modelo de “una enfermedad, una diana, un fármaco”²⁸⁰. Este paradigma se apoya en la identificación de una diana especialmente relevante para el tratamiento de una enfermedad, y el posterior desarrollo de una entidad química capaz de actuar exclusivamente sobre esa diana. Teóricamente, la actuación de este nuevo fármaco sobre su objetivo debería permitir la resolución del cuadro clínico a tratar, mientras que el riesgo de aparición de otros efectos no deseados asociados a la promiscuidad del fármaco debería quedar anulado. Aunque lógicamente el cumplimiento absoluto de estos propósitos pueda resultar muy complicado (o directamente utópico) en muchas ocasiones, esta aproximación ha permitido la entrada en el mercado de millares de fármacos para todo tipo de patologías, a veces con un perfil de eficacia y seguridad próximo al ideal y otras no tanto, pero siempre sin duda suponiendo una mejora terapéutica.

Desgraciadamente, este enfoque no siempre ha logrado proporcionar una solución para todos los retos que se plantean en el campo del descubrimiento de fármacos. Especialmente cabe destacar su fracaso en el abordaje terapéutico de las entidades clínicas multifactoriales, entre las que se encuentran las enfermedades neurodegenerativas. En la aparición de este tipo de patologías, como ya se ha explicado anteriormente, concurren muchos actores con diversos grados de participación y de interconexión. Esta circunstancia torna mucho más complicada la elección de la diana a modular, además de que se debe tener en cuenta la naturaleza de la relación entre los factores implicados conocidos y la posible existencia de mecanismos compensatorios. Estos mecanismos, que realmente tienen un significado fisiológico protector ya que fomentan la resiliencia celular frente a un fallo en un momento o punto concreto,

²⁸⁰ Morphy, R., Kay, C., Rankovic, Z. *Drug Discov. Today*. **2004**, *9*, 641.

pueden convertir en inútil cualquier intento de intervención farmacológica en un solo punto de la “red” patogénica con propósitos terapéuticos²⁸¹. Quizá por este motivo muchos fármacos con una actividad excelente en los ensayos *in vitro* han terminado quedando por el camino debido a su incapacidad para reproducir posteriormente estos resultados en los ensayos *in vivo*, donde se topan con las circunstancias explicadas anteriormente.

¿Cómo se puede superar este obstáculo? Teniendo en cuenta las características de las enfermedades multifactoriales, la modulación de varias dianas a un tiempo parece una estrategia prometedora²⁸¹. A su vez, esta aproximación terapéutica polifarmacológica se puede abordar de varias maneras: mediante la administración simultánea al paciente de varios medicamentos cuyos principios activos tienen mecanismos de acción diferentes (“cóctel de fármacos”), administrando un solo medicamento que reúna varios principios activos diferentes (medicamento combinado), o bien utilizando ligandos multidiana. Los ligandos multidiana reúnen en una sola entidad química la capacidad de modular varias dianas simultáneamente. En la tabla 6.1 se recogen, a modo de comparación, las principales ventajas y desventajas de cada una de estas aproximaciones²⁸².

Aunque el concepto sea relativamente nuevo y el interés por él se haya disparado en los últimos años, hay que recordar que no pocos de los fármacos “tradicionales” son en realidad ligandos multidiana²⁸³. La diferencia radica en que el efecto terapéutico de éstos últimos fue establecido antes de conocer realmente su mecanismo de acción completo, mientras que el trabajo que se realiza actualmente en este campo se encamina al diseño racional de nuevos fármacos que exhiban unas determinadas actividades fijadas de antemano. En lo que se podría considerar como una mezcla de desgracia y paradoja, la serendipia ha introducido en el mercado numerosos fármacos multidiana, mientras que los diseñados a propósito acumulan un fracaso tras otro. Más adelante se analizará esta circunstancia con un poco más de detalle.

²⁸¹ Cavalli, A., Bolognesi, M. L., Minarini, A., Rosini, M., Tumiatti, V., Recanatini, M., Melchiorre, C. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 347.

²⁸² Zhou, J., Jiang, X., He, S., Jiang, H., Feng, F., Liu, W., Qu, W., Sun, H. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8881.

²⁸³ Talevi, A. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 205.

Tipo de terapia	Ventajas	Desventajas
Cóctel de fármacos	<ul style="list-style-type: none"> - Se dispone de información previa de los medicamentos para los ensayos clínicos - Mayor flexibilidad en el ajuste de dosis 	<ul style="list-style-type: none"> - Mayor riesgo de interacciones y efectos adversos - Cumplimiento terapéutico comprometido - Perfil FC y FD complejo
Medicamento combinado	<ul style="list-style-type: none"> - Se dispone de información previa de los principios activos para los ensayos clínicos - Tratamiento simplificado: mejor adherencia al tratamiento 	<ul style="list-style-type: none"> - Mayor riesgo de interacciones y efectos adversos - No se pueden ajustar las dosis individuales de cada fármaco
Ligando multidiana	<ul style="list-style-type: none"> - Reducción de posibles interacciones y efectos adversos - FC y FD simplificadas - Mejora del cumplimiento terapéutico 	<ul style="list-style-type: none"> - No se dispone de información previa: ensayos clínicos “desde cero”, pero sobre una única especie química - Necesidad de equilibrar la potencia sobre las distintas dianas

Tabla 6.1. Comparación de los pros y contras de las distintas estrategias empleadas en polifarmacoterapia.

El diseño racional de nuevos ligandos multidiana puede llevarse a cabo con un enfoque más tradicional, partiendo de la información disponible sobre grupos farmacóforos activos para las dianas seleccionadas e investigando el mejor modo de integrarlas en una sola entidad química, o ayudándose de las nuevas herramientas computacionales para diseñar nuevas moléculas basadas en grupos farmacóforos ya conocidos o nuevos, integrando diferentes técnicas de cribado *in silico* como los modelos de farmacología de sistemas y los programas de acoplamiento molecular ligando-diana. Esta última aproximación permite, en definitiva, el cribado de un gran número de compuestos y/o dianas para la selección de los mejores candidatos a trasladar al ámbito experimental²⁸⁴. Por otra parte, la conexión entre los distintos grupos farmacóforos que darán lugar al nuevo ligando multidiana también se puede efectuar de tres formas diferentes^{282,284} (figura 6.1):

²⁸⁴ Ramsay, R. R., Popovic-Nikolic, M. R., Nikolic, K., Uliassi, E., Bolognesi, M. L. *Clin. Transl. Med.* **2018**, 7, 3.

- Enlace (*linking*): la estrategia más sencilla para componer un ligando multidiana consiste en emplear una cadena o grupo químico que permita enlazarlos. La elección de este grupo y su posicionamiento en la molécula final pueden ser importantes para la acción del fármaco por varias razones. En primer lugar, su longitud y disposición espacial pueden ser críticos para la interacción de los grupos farmacóforos con sus dianas, e incluso a veces el propio grupo enlazante puede interactuar también con alguna de ellas. Lógicamente, éste debe conectar dos posiciones de los farmacóforos iniciales cuya modificación no comprometa su actividad biológica. Además, su estabilidad también es un factor a tener en cuenta: puede ser metabólicamente lábil, liberando los distintos fragmentos activos luego de su administración o llegada a un determinado tejido, o puede ser estable, de modo que el ligando ejerza sus actividades manteniendo la estructura original. Una desventaja de esta metodología es que genera habitualmente moléculas muy voluminosas y con un peso molecular muy elevado, lo que puede comprometer su acceso al lugar de acción.
- Fusión (*fusing*): se diseña un nuevo ligando multidiana en el que hay una superposición parcial de los farmacóforos constituyentes, aprovechando que comparten la presencia de un determinado grupo o fragmento. Como se puede deducir fácilmente, esto permite generar compuestos con un peso molecular menor que en el caso anterior, aunque hay que vigilar la posible pérdida de actividad si estos motivos compartidos son claves para los fragmentos fusionados en términos de actividad farmacológica.
- Integración (*merging*): en este caso, se busca la mayor superposición posible de los fragmentos bioactivos: se identifican los posibles motivos estructurales compartidos y las funciones de cada farmacóforo que resultan claves para la actividad, tratando de simplificar al máximo la estructura final. Así, se obtienen compuestos multidiana del menor tamaño y peso molecular posibles, con un perfil fisicoquímico y farmacocinético potencialmente más favorable.

Hay determinados campos de la química farmacéutica en los que el diseño de ligandos multidiana parece resultar más prometedor que el paradigma tradicional de “un fármaco, una diana”. Como ya se señaló antes, es el caso de las enfermedades de

etiología multifactorial como las patologías neurodegenerativas, el cáncer o los trastornos neuropsiquiátricos. Al potencial beneficio terapéutico derivado de la modulación de la red patogénica en varios puntos distintos se suman las ventajas prácticas de esta estrategia, como la simplificación del tratamiento y la reducción de efectos adversos, que resultan cruciales en este tipo de pacientes. También los ligandos multidiana pueden representar un arma eficaz contra los casos de resistencias a fármacos, ya que la probabilidad de que las mutaciones o la variabilidad interindividual de las dianas que están comúnmente detrás de estos fenómenos provoquen la ineficacia del tratamiento es menor cuando hay varios puntos de inhibición o modulación simultáneos. Resulta obvio señalar el avance que supone esta perspectiva para el hallazgo de nuevos agentes antiinfecciosos, pero también supone un paso adelante en el tratamiento de otras enfermedades con una alta tasa de refractariedad al tratamiento, como la epilepsia²⁸³.

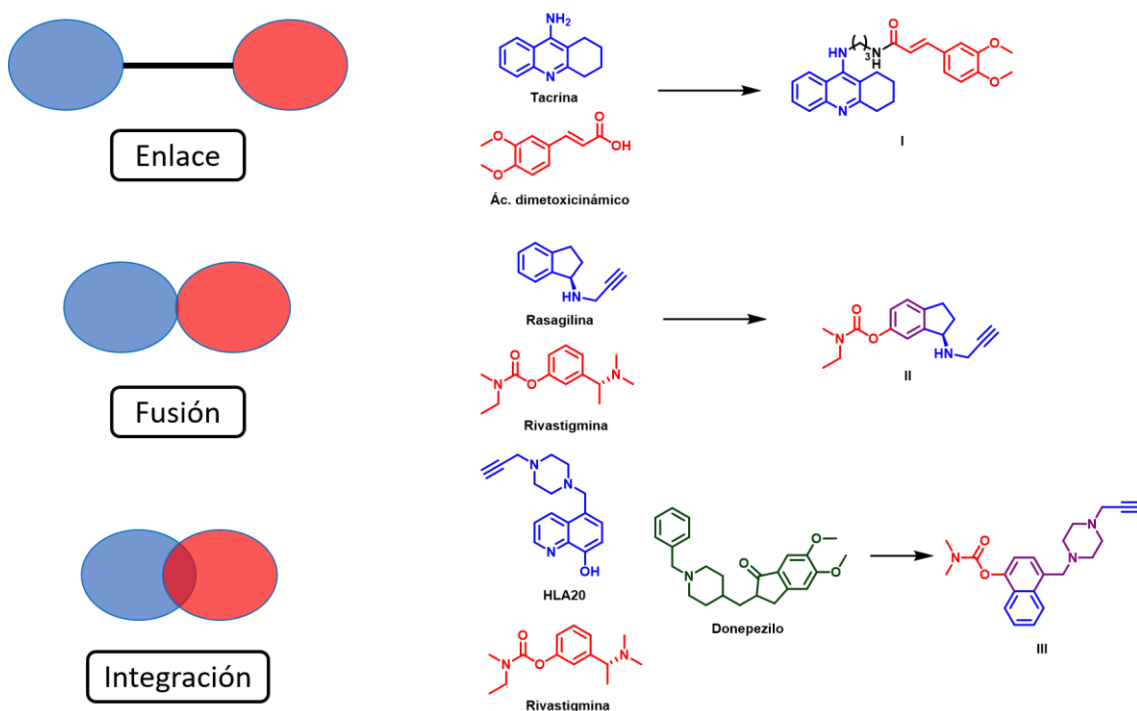


Figura 6.1. Diferentes estrategias para el diseño de ligandos multidiana.

Hasta este punto, se ha hecho una acerbada defensa de los ligandos multidiana como una solución para llegar a donde no lo consiguieron otras estrategias previas. Muchos fármacos aprobados por una actividad concreta han demostrado que su mecanismo de acción era realmente más complejo de lo que se pensaba anteriormente, pasando a

engrosar la lista de fármacos multidiana en el mercado. Pero ¿qué hay de los obtenidos mediante un diseño racional? Realmente, casi nada. Ninguno de los nuevos ligandos multidiana que han alcanzado los ensayos clínicos ha conseguido llegar al mercado, generalmente por su incapacidad para reproducir en los ensayos clínicos los esperanzadores resultados mostrados en la fase preclínica de desarrollo. Un caso particular lo representan los inhibidores de tirosina-quinasa (imatinib, sumitinib y sorafenib, entre otros) aprobados en los últimos años para el tratamiento de determinados tipos de cáncer: son ligandos multidiana en cuanto son capaces de inhibir varias enzimas tirosina-quinasa distintas y se ha visto que esta promiscuidad es útil en los tipos de tumores para los que están aprobados. Si bien esta característica era previamente conocida en algunos casos y se tuvo en cuenta para su incorporación a la medicina clínica, realmente no es fruto de un diseño premeditado sino más bien de la dificultad para diseñar inhibidores específicos de quinasas^{285,286}. Por tanto, realmente no se puede decir que sean un ejemplo de ligandos multidiana diseñados racionalmente con éxito.

A pesar de este panorama desalentador, no es conveniente enterrar la aproximación basada en ligandos multidiana para el tratamiento de algunas enfermedades complejas. Desde un punto de vista racional, parece una estrategia más que justificada, y no ha de extrañar su escaso éxito en tanto es una aproximación aún bastante reciente que se enfrenta a unas patologías cuya naturaleza es muy complicada. Baste el ejemplo de las enfermedades neurodegenerativas: realmente sigue habiendo muchas incertidumbres sobre el funcionamiento del sistema nervioso central, y la biología de sistemas que aspira a trazar un mapa completo de todos los factores que intervienen en la fisiología y la fisiopatología del cerebro, además de su interconexión y los posibles mecanismos compensatorios existentes, presenta aún demasiados vacíos y demasiadas incógnitas. En este contexto, sería casi casualidad elegir correctamente las dianas más apropiadas para tratar una patología en concreto, y la manera en que deben ser moduladas. El

²⁸⁵ Smyth, L. A., Collins, I. J. *Chem. Biol.* **2009**, *2*, 131.

²⁸⁶ Bhullar, K. S., Lagarón, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P., Rupasinghe, H. V. *Mol. Cancer.* **2018**, *17*, 1.

mismo razonamiento se puede aplicar a muchos tipos de cáncer o a las enfermedades psiquiátricas.

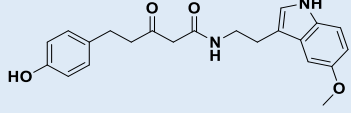
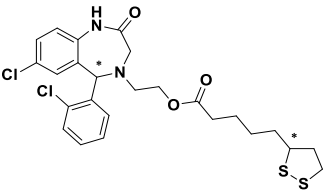
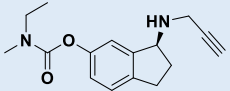
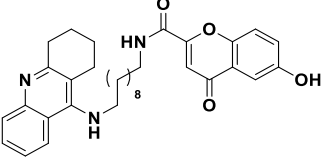
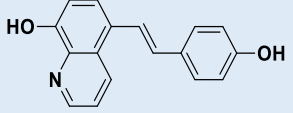
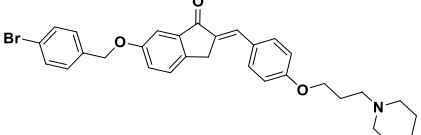
Estructura	Fragmentos	Dianas	Aplicaciones
	Curcumina y melatonina ²⁸⁷	-Agregación β -amiloide -Estrés oxidativo	Enf. de Alzheimer
	CGP-37157 y ácido lipoico ²⁸⁸	-Modulación intercambiador sodio/calcio NCXm -Estrés oxidativo	Neuroprotector genérico
	Rivastigmina y rasagilina (ladostigil) ²⁸⁹	-AChE/BuChE -MAO-A y MAO-B	Enf. de Alzheimer y Parkinson
	Tacrina y 4-oxocromeno ²⁹⁰	-AChE y BuChE -BACE-1 -Captación ROS	Enf. de Alzheimer
	Clioquinol y resveratrol ²⁹¹	-Quelación de metales -Captación de ROS	Neuroprotector genérico
	Indanona y grupo amino básico ²⁹²	-MAO-B -Receptor H ₃ de histamina	Enf. de Parkinson

Tabla 6.2. Algunos ejemplos de fármacos multidiana dirigidos al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

A pesar de que se parte de unos conocimientos fisiológicos y bioquímicos aún bastante precarios, los químicos farmacéuticos no se han dejado llevar por el desánimo y apuestan crecientemente por el diseño de ligandos multidiana para prevenir y tratar la neurodegeneración, como atestigua la ingente cantidad de trabajos publicados en los

²⁸⁷ Chojnacki, J. E., Liu, K., Yan, X., Toldo, S., Selden, T., Estrada, M., Rodríguez-Franco, M. I., Halquist, M. S., Ye, D., Zhang, S. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 690.

²⁸⁸ Michalska, P., Tenti, G., Satriani, M., Cores, A., Ramos, M. T., García, A. G., Menéndez, J. C., León, R. *Drug Dev. Res.* **2020**, *81*, 283.

²⁸⁹ Weinreb, O., Amit, T., Bar-Am, O., Youdim, M. *Curr. Drug Targets.* **2012**, *13*, 483.

²⁹⁰ Fernández-Bachiller, M. I., Pérez, C., Monjas, L., Rademann, J., Rodríguez-Franco, M. I. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1303.

²⁹¹ Mao, F., Yan, J., Li, J., Jia, X., Miao, H., Sun, Y., Huang, L., Li, X. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5936.

²⁹² Affini, A., Hagenow, S., Zivkovic, A., Marco-Contelles, J., Stark, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *148*, 487.

últimos años al respecto. Por la extensión del tema no es pertinente revisarlo de una manera exhaustiva, basten algunos ejemplos recogidos en la tabla 6.2.

En resumidas cuentas, la gran mayoría de los ligandos multidiana con actividad antineurodegenerativa que han visto la luz fueron diseñados para las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. Asimismo, hay una serie de dianas “estrella”: la acetilcolinesterasa (y butilcolinesterasa), la MAO-B, la agregación del péptido β -amiloide, la quelación de iones metálicos y la capacidad de atrapar radicales libres aparecen frecuentemente como objetivos en este tipo de trabajos. No obstante, hay que hacer notar que el diseño de nuevos compuestos multidiana también ha ido evolucionando desde unas posiciones iniciales en las que simplemente se partía de las dianas tradicionalmente investigadas para estas enfermedades según el modelo “un fármaco, una diana”, hacia enfoques basados bien en la modulación de nuevas dianas, o bien en mecanismos de acción más generales que tendrían un impacto universal sobre el proceso de neurodegeneración, más que sobre una enfermedad en concreto.

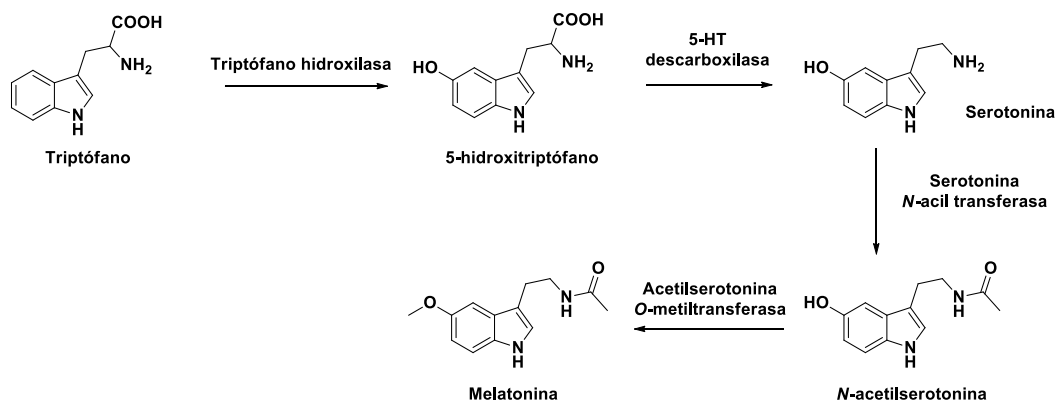
6.1.2 Melatonina: una hormona endógena, un neuroprotector pleiotrópico.

Fisiología general de la melatonina

La melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) es una sustancia endógena que reúne una serie de características que la hacen sumamente interesante en la lucha contra la neurodegeneración. Se ha evitado definirla como neurohormona (como se ha hecho tradicionalmente) porque, aunque es producida fundamentalmente por la glándula pineal, se ha demostrado que otros tejidos también son capaces de generarla con diversos propósitos²⁹³. La melatonina se sintetiza a partir del triptófano, a través de la ruta biosintética mostrada en el esquema 6.1²⁹⁴.

²⁹³ Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., Rosales-Corral, S., Tan, D. X., Reiter, R. J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 2997.

²⁹⁴ Amaral, F. G. D., Cipolla-Neto, J. *Arch. Endocrinol. Metab.* **2018**, *62*, 472.



Esquema 6.1. Ruta sintética de la melatonina en la glándula pineal.

Como se ha señalado, el principal lugar de producción de melatonina endógena es la glándula pineal, de donde se distribuye fácilmente por todo el organismo gracias a su carácter anfifílico. La melatonina está implicada en numerosas funciones fisiológicas²⁹⁵, aunque destaca por encima de todas ellas su papel en la regulación de los ritmos circadianos y estacionales. Así, la secreción de esta molécula por parte de los pinealocitos está controlada por los ciclos de luz/oscuridad: el eje retino-hipotalámico permite la detección y transmisión de la información relacionada con el estatus lumínico al núcleo supraquiasmático, el cual está conectado con la glándula pineal a través de fibras simpáticas; los receptores β -adrenérgicos que expresan los pinealocitos permiten el control de la liberación de melatonina. La luz inhibe la síntesis y liberación de melatonina, de modo que éstas tienen lugar fundamentalmente de noche.

La melatonina liberada desde la glándula pineal controla los ritmos circadianos y estacionales de todas las funciones orgánicas: ciclos vigilia/sueño, metabolismo, función endocrina y cardiovascular, respuesta inmunitaria, reproducción, gestación, etcétera. Aunque los niveles de esta sustancia en sangre oscilan de acuerdo con su producción, la melatonina actúa tanto por mecanismos inmediatos como retardados, lo que redundaría en un control más fino de todas estas funciones²⁹⁴. Otros muchos órganos y tipos celulares también son capaces de producir melatonina: cerebro, retina, epitelio respiratorio y gastrointestinal, hígado, células inmunes, y un largo etcétera. No obstante, en general la producción extrapineal de melatonina no parece seguir patrones

²⁹⁵ Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D. W., Maestroni, G. J., Zisapel, N., Cardinali, D. P. *Prog. Neurobiol.* **2008**, *85*, 335.

día/noche y su función parece más restringida a la regulación de la homeostasis celular y la protección frente al estrés oxidativo e inflamatorio, siempre con un carácter eminentemente local²⁹³.

Los mecanismos moleculares de acción de la melatonina resultan bastante diversos^{296,297}:

- Dependientes de receptor: la melatonina es capaz de unirse a varios tipos de receptores.
 - Receptores de membrana: existen dos tipos, MT₁ y MT₂, ambos acoplados a proteínas G. Se expresan en numerosos territorios tisulares, incluyendo muchas estructuras del sistema nervioso central. Buena parte de las funciones fisiológicas de la melatonina, incluida la adaptación corporal a los ritmos circadianos y estacionales, están mediadas por estos dos receptores.
 - Receptores nucleares: los receptores RZR/ROR α (del inglés, *Retinoid-related Orphan hormone Receptors*) también participan en la regulación de la respuesta inmune por la melatonina, así como en la de otros procesos relacionados con la proliferación y diferenciación celular. Se expresan en numerosos órganos: cerebro, hígado, piel, músculo esquelético, hueso, etcétera.
- No dependientes de receptor: la melatonina, por su estructura química, tiene una capacidad intrínseca para captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, cualidad que contribuye a su acción protectora contra el estrés oxidativo. Además, la melatonina accede fácilmente al citosol celular gracias a su carácter anfifílico, donde interacciona con proteínas citosólicas como la calmodulina, la calreticulina y la tubulina; de este modo interviene en numerosos aspectos de la fisiología celular como la homeostasis del calcio y el control del citoesqueleto²⁹⁵. Cabría incluir en este apartado el antiguamente considerado receptor de melatonina MT₃, que en realidad resultó ser la enzima quinona reductasa 2,

²⁹⁶ Emet, M., Ozcan, H., Yayla, M., Halici, Z., Hacimuftuoglu, A. *Eurasian J. Med.* **2016**, *48*, 135.

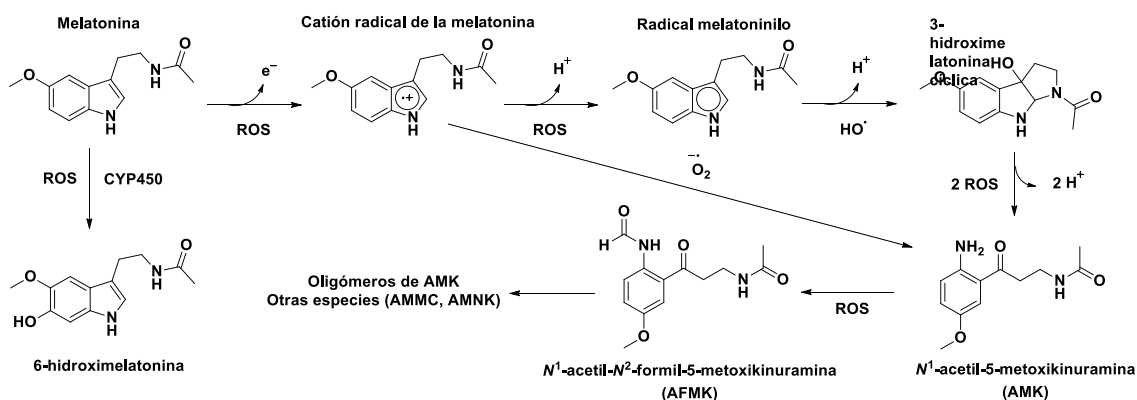
²⁹⁷ Liu, J., Clough, S. J., Hutchinson, A. J., Adamah-Biassi, E. B., Popovska-Gorevski, M., Dubocovich, M. L. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2016**, *56*, 361.

expresada en numerosos órganos con una función destoxicadora de quinonas oxidantes²⁹⁸.

Melatonina y neurodegeneración

Dentro del abanico de funciones que cumple la melatonina en el organismo, destaca su actividad citoprotectora. La variedad y especial relevancia de estos mecanismos defensivos a nivel del sistema nervioso central hacen que la melatonina sea definida a menudo como un neuroprotector pleiotrópico:

- En primer lugar, la melatonina es un antioxidante muy potente que ejerce su acción *in situ* gracias a su libertad para atravesar membranas, y a través de mecanismos directos e indirectos²⁹⁹. La melatonina, por su estructura química, es capaz de donar electrones con mucha facilidad, lo que le confiere una actividad captadora de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno muy elevada. Además, la melatonina tiene una particularidad: los derivados que se generan cuando reacciona con estas especies también poseen una notable capacidad captadora de radicales: es lo que se conoce como la “cascada antioxidante de la melatonina”. Algunos metabolitos de la cascada como la *N*¹-acetil-5-metoxikinuramina (AMK) tienen un poder antioxidante global incluso mayor que el de la propia melatonina.



Esquema 6.2. Cascada antioxidante de la melatonina.

²⁹⁸ Nosjean, O., Ferro, M., Cogé, F., Beauverger, P., Henlin, J. M., Lefoulon, F., Fauchère, J. L., Delagrangre, P., Canet, E., Boutin, J. A. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 31311.

²⁹⁹ Hacısevki, A., Baba, B. *Melatonin molecular biology, clinical and pharmaceutical approaches*. IntechOpen, 2018.

- Además de su reactividad directa con las ROS y RNS, la melatonina también combate el estrés oxidativo de manera indirecta. Destaca especialmente su capacidad para inducir el factor de transcripción Nrf2, a través de múltiples mecanismos: la activación de la vía PI3K/Akt y de la PKC mediadas por los receptores MT1 y MT2, y también a través de la modulación de los receptores nicotínicos α_7 ^{300,301}. Por otra parte, tanto la melatonina como algunos de sus metabolitos exhiben una importante capacidad quelante de iones Fe(II) y Cu(II), implicados en la generación de radicales libres³⁰².
- Otra actividad relevante de la melatonina, muy relacionada con la anterior, involucra la protección de la función mitocondrial. Es obvio que la reducción del estrés oxidativo celular contribuye al mantenimiento de la actividad de la mitocondria e impide su colapso, pero se han demostrado algunos mecanismos adicionales. Por ejemplo, la melatonina y algunos de sus metabolitos como la AMK estimulan la actividad de los complejos mitocondriales I y IV, de modo que se mejora la eficacia funcional de este orgánulo²⁹⁹. Además, la estimulación de los receptores MT1 por su ligando endógeno aumenta los niveles del coactivador transcripcional PGC-1 α , un regulador esencial de la biogénesis y la función mitocondriales³⁰³. Finalmente, la modulación de la respuesta inmune por parte de la melatonina también desempeña una labor importante en la salvaguarda del funcionamiento de estos orgánulos.
- La melatonina es un potente inmunomodulador, siendo de hecho ésta una de sus funciones principales en sus lugares de secreción extrapineales. Reduce la sensibilidad del receptor tipo Toll TLR-4 y del inflamasoma NRLP-3, lo que atenúa la respuesta inflamatoria leucocitaria³⁰⁴. También modula el acceso de macrófagos y otras células inmunes al SNC disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión como la ICAM-1. Asimismo, se ha observado que limita la

³⁰⁰ Ahmadi, Z., Ashrafizadeh, M. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2020**, *34*, 11.

³⁰¹ Parada, E., Buendía, I., León, R., Negredo, P., Romero, A., Cuadrado, A., López, M. G., Egea, J. J. *Pineal Res.* **2014**, *56*, 204-212.

³⁰² Romero, A., Ramos, E., de Los Ríos, C., Egea, J., Del Pino, J., Reiter, R. J. *J. Pineal Res.* **2014**, *56*, 343.

³⁰³ Guo, P., Pi, H., Xu, S., Zhang, L., Li, Y., Li, M., Cao, Z., Tian, L., Xie, J., Li, R., He, M., Lu, Y., Liu, C., Duan, W., Yu, Z., Zhou, Z. *Toxicol. Sci.* **2014**, *142*, 182.

³⁰⁴ Favero, G., Franceschetti, L., Bonomini, F., Rodella, L. F., Rezzani, R. *Int. J. Endocrinol.* **2017**, 2017.

actividad del factor de transcripción NF- κ B, reduciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 o TNF- α , entre otras³⁰⁵. La melatonina, y algunos de sus metabolitos como la AMK y su precursora AFMK (*N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxikinuramina), inhiben la expresión y la actividad de las enzimas iNOS, LOX y COX-2, lo que redundará en la mitigación de la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo asociado a ésta²⁹⁹. En definitiva, la melatonina tiene un papel decisivo en el control de la actividad inflamatoria de la microglía y los astrocitos a nivel del SNC, además de intervenir también en el posible acceso de otras células inmunes al mismo. Los efectos antes enunciados pueden ser directos, o mediados por los receptores MT1, MT2, los RZR/ROR nucleares e incluso los receptores nicotínicos α_7 .

- También interviene la melatonina en la agregación de proteínas, otro evento patológico clave en la neurodegeneración. Tomando como modelo el caso del péptido β -amiloide, de largo el más estudiado, se ha visto que la melatonina puede interferir en todos los pasos del proceso de formación de las placas neurotóxicas³⁰⁶. Está bien caracterizado que la melatonina, gracias a su estructura, es capaz de intercalarse entre las fibrillas y placas de péptido β -amiloide, por lo que puede impedir la constitución de los depósitos tóxicos o disgregar aquellos ya establecidos. No obstante, para abordar la neurodegeneración es mejor respetar el proverbio “mejor prevenir que curar”, lo que llevó a analizar el papel que la melatonina podía desempeñar en los pasos previos a la aparición de los depósitos amiloides. En este contexto, se ha observado que la melatonina estimula el procesamiento del APP por la vía no amiloidogénica, favoreciendo la actividad de las α -secretasas y disminuyendo la expresión de las β - y γ -secretasas responsables del procesamiento anómalo del péptido precursor. Aunque se haya usado el APP como ejemplo, se ha

³⁰⁵ Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Sureda, A., Xiao, J., Dehpour, A. R., Shirooie, S., Sanches, A., Baldi, A., Khan, H., Daglia, M. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59*, S4.

³⁰⁶ Vincent, B. *Pharmacol. Res.* **2018**, *134*, 223.

demostrado que este mecanismo protector de la melatonina es extensible a otras proteínas potencialmente perjudiciales, como la α -sinucleína³⁰⁷.

La melatonina también inhibe la hiperfosforilación de Tau gracias a la reducción de la actividad de GSK-3 β mediante varios mecanismos. En primer lugar, a través de la activación de la vía PI3K/Akt, mediada por los receptores MT-1 y MT-2. Además, cuando el APP es procesado por la vía amiloidogénica, se forma otro péptido conocido como dominio intracelular del β -APP, capaz de aumentar la actividad de GSK-3 β . El procesamiento no amiloidogénico de la proteína inducido por la melatonina evita la activación de esta vía patológica³⁰⁶.

La autofagia es realmente un proceso dual en la neurodegeneración: puede ser beneficiosa o perjudicial en función de su grado de activación y la situación fisiopatológica. El papel de la melatonina respecto a ésta parece ser interesante, ya que sería capaz de estimularla en procesos como el envejecimiento o la neurodegeneración temprana donde la autofagia está en declive; mientras que podría limitarla cuando su grado de funcionamiento es excesivo y compromete la supervivencia neuronal, como ocurre en los procesos de isquemia/reperfusión o la exposición a sustancias neurotóxicas³⁰⁸.

- La melatonina modula la activación de los receptores NMDA de glutamato, de modo que también puede contribuir al control de la excitotoxicidad característica de la neurodegeneración³⁰⁹. Por otra parte, no hay que olvidar que la melatonina interactúa directamente con algunas proteínas implicadas en la fisiología del calcio intracelular, como la calmodulina y calreticulina²⁹⁵.
- Cabe destacar que varios estudios han demostrado la actividad neurogénica de la melatonina, a través de sus receptores MT-1 y MT-2. Más concretamente, parece que la melatonina promueve la proliferación y diferenciación de células madre neuronales, aumenta la supervivencia de las neuronas recién

³⁰⁷ Ono, K., Mochizuki, H., Ikeda, T., Nihira, T., Takasaki, J. I., Teplow, D. B., Yamada, M. *Neurobiol. Aging*. **2012**, *33*, 2172.

³⁰⁸ Boga, J. A., Caballero, B., Potes, Y., Pérez-Martínez, Z., Reiter, R. J., Vega-Naredo, I., Coto-Montes, A. *J. Pineal Res.* **2019**, *66*, e12534.

³⁰⁹ Escames, G., Macías, M., León, J., García, J., Khaldy, H., Martín, M., Vives, F., Acuña-Castroviejo, D. *J. Neuroendocrinol.* **2001**, *13*, 459.

diferenciadas, y promueve la génesis y maduración de dendritas³¹⁰. También, a través de los receptores MT-1, incrementa los niveles del factor BDNF, que a su vez estimula la neurogénesis y el crecimiento neuronal³¹¹.

- Curiosamente, el efecto de la melatonina sobre el aprendizaje y la memoria parece ser un arma de doble filo: parece que en condiciones no patológicas reduce la potenciación a largo plazo en el hipocampo, un proceso involucrado en la generación de la memoria. Su efecto parece ser beneficioso, por el contrario, en individuos cuya función melatoninérgica o cognitiva se encuentra en decadencia³¹².

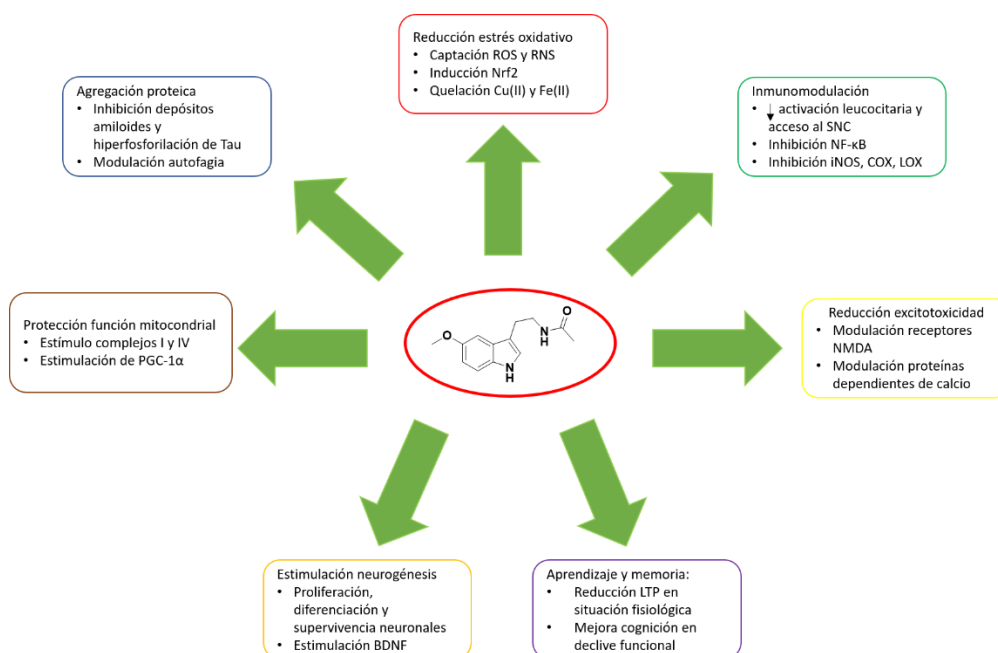


Figura 6.2. Resumen de los efectos beneficiosos de la melatonina en el contexto de la neurodegeneración.

Además de todos los efectos beneficiosos que potencialmente puede mediar la melatonina, hay que tener en cuenta que su fisiología se altera durante el envejecimiento, y aún más cuando la neurodegeneración está en curso. Este declive funcional alcanza todos los aspectos: en primer lugar, se produce menos melatonina porque disminuye la actividad de la mayoría de las enzimas involucradas en su síntesis, lo que se refleja en un descenso progresivo de los niveles séricos y en LCR de melatonina

³¹⁰ Hossain, M. F., Uddin, M. S., Uddin, G. S., Sumsuzzman, D. M., Islam, M. S., Barreto, G. E., Mathew, B., Ashraf, G. M. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 8255.

³¹¹ Imbesi, M., Uz, T., Manev, H. J. *Neural Transm.* **2008**, *115*, 1495.

³¹² Bauman, N. L. *Sci. J. Land. Coll. Arts Sci.* **2012**, *6*, 2.

en sujetos ancianos. A esto se le añade una disminución de la expresión de los receptores MT-1 y MT-2. Incluso el metabolismo de la melatonina hacia otras especies también activas se resiente paulatinamente. Un hallazgo importante es que esta situación se agrava aún más en los pacientes de algunas enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer y la de Parkinson, lo que sugiere que podría haber una cierta relación entre la pérdida de función melatoninérgica y la neurodegeneración³¹³.

En definitiva, la melatonina reúne un amplio repertorio de actividades muy interesantes en el contexto del envejecimiento neurológico, y además está bien establecido que sus niveles y su funcionamiento dejan de ser los adecuados en los individuos que sufren este proceso. Estas dos premisas convierten a la melatonina en un compuesto a tener en cuenta en el diseño de estrategias que aborden el tratamiento de la neurodegeneración desde estadios tempranos a través de un enfoque holístico, que busquen entender y enfrentar el proceso como un conjunto en lugar de “parchar” algunas partes del mismo.

Uso clínico de la melatonina

La melatonina ha sido objeto de numerosos ensayos preclínicos y clínicos, sobre todo por su papel en la regulación de los ciclos vigilia/sueño. Aunque el nivel de evidencia arrojado por esos ensayos es un tanto desigual, es habitual el empleo de la melatonina en monoterapia o combinada con otros hipnóticos para el tratamiento de diversos trastornos del sueño: insomnio, parasomnias, síndrome del “jet-lag”, apneas del sueño, etcétera^{314, 315}. En relación con las enfermedades neurodegenerativas, también se encuentran en la literatura científica numerosos ensayos clínicos donde se ensaya la melatonina como parte del abordaje terapéutico de la enfermedad de Parkinson o la demencia asociada a la edad, con el objetivo de reducir los trastornos del sueño característicos de estas patologías. En general, la melatonina ha acreditado en estos

³¹³ Sarlak, G., Jenwitheesuk, A., Chetsawang, B., Govitrapong, P. J. *Pharmacol. Sci.* **2013**, 123, 9.

³¹⁴ Polimeni, G., Esposito, E., Bevelacqua, V., Guarneri, C., Cuzzocrea, S. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **2014**, 19, 429.

³¹⁵ Zakharov, A., Khivintseva, E. *Melatonin: the hormone of darkness and its therapeutic potential and perspectives*. IntechOpen, 2020.

ensayos su capacidad para mejorar la calidad del sueño en este tipo de pacientes, reduciendo la actividad y los episodios de agitación nocturnos. En algunos casos, estos beneficios incluso se acompañan de una ralentización del deterioro cognitivo³¹⁶.

En vista del beneficio potencial de la melatonina para detener el deterioro progresivo del sistema nervioso central, se han llevado a cabo numerosos ensayos en modelos celulares y animales de las principales enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson y ELA) con resultados generalmente muy prometedores. Sin embargo, el foco en los ensayos clínicos suele estar puesto en la mejora de la sintomatología asociada (sobre todo el insomnio) y no tanto en el progreso clínico. En 2014 se publicaron los resultados de un ensayo que mostraba que la adición de melatonina al tratamiento con inhibidores de la acetilcolinesterasa para enfermos de Alzheimer retrasaba o revertía en cierto grado el deterioro cognitivo, además de mejorar la calidad del sueño³¹⁷.

El perfil farmacológico de la melatonina la convierte en una molécula muy apropiada para el diseño de nuevos ligandos multidiana, como demuestra la cantidad de trabajos publicados en este sentido³¹⁸. En ellos, se describen diversas entidades químicas multidiana en las que la melatonina se combina con fragmentos inhibidores de la acetilcolinesterasa, cinamatos (antioxidantes), curcumina (antiagregante del péptido β -amiloides), sulforafano (inductor de Nrf2), etcétera.

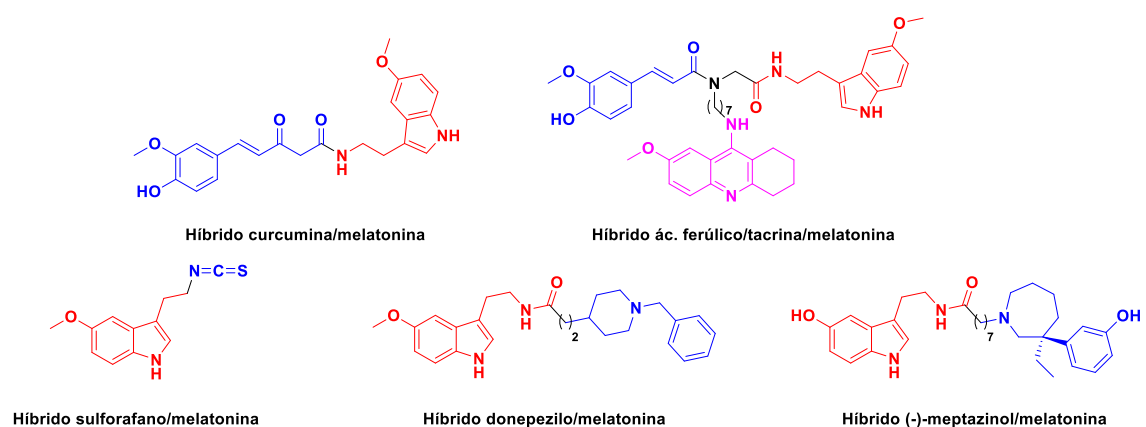


Figura 6.3. Algunos ejemplos de ligandos multidiana propuestos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que incluyen estructuras derivadas de la melatonina.

³¹⁶ Cardinali, D. P. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 480.

³¹⁷ Wade, A. G., Farmer, M., Harari, G., Fund, N., Laudon, M., Nir, T., Frydman-Marom, A., Zisapel, N. *Clin. Inter. Aging.* **2014**, *9*, 947.

³¹⁸ Ramos, E., Egea, J., de Los Ríos, C., Marco-Contelles, J., Romero, A. *Future Med. Chem.* **2017**, *9*, 765.

Los buenos resultados arrojados por algunos de estos compuestos en los ensayos *in vitro* e *in vivo* corroboran la viabilidad de esta nueva estrategia terapéutica, y animan a seguir trabajando para conseguir compuestos multidiana derivados de melatonina que puedan constituir una alternativa real para el abordaje de las enfermedades neurodegenerativas.

6.1.3 Compuestos antioxidantes naturales derivados del ácido cinámico

Los ácidos hidroxicinámicos son metabolitos secundarios vegetales pertenecientes al grupo de los compuestos fenólicos. Su presencia en el medio vegetal es ubicua, y se ha observado una gran variedad tanto en las funciones que cumplen como en su forma de presentación: se pueden encontrar en su forma simple, formando dímeros o conjugados, componiendo estructuras insolubles que forman parte de la pared celular, etcétera³¹⁹. En la figura 6.4 se recoge la estructura de los ácidos hidroxicinámicos más habituales.

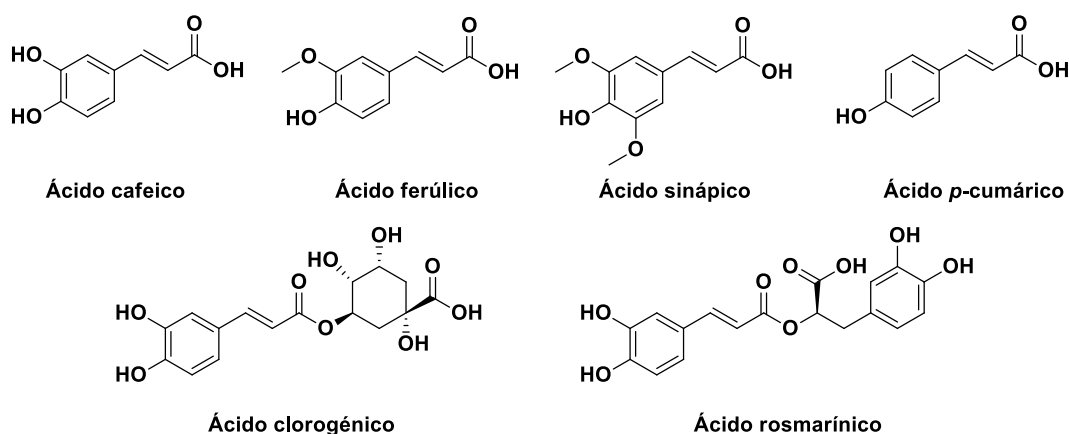


Figura 6.4. Estructura de algunos ácidos fenólicos y otros compuestos relacionados.

Son compuestos muy presentes en nuestra vida cotidiana, habida cuenta de su amplia presencia en muchos de los elementos habituales de la dieta: frutas, verduras, té, café... Su estructura química les confiere un elevado poder antioxidante, lo que atrajo el interés de muchos investigadores desde que este tipo de terapia se puso “de moda”. En efecto, ésta es su actividad farmacológica más relevante³²⁰. Los ácidos hidroxicinámicos tienen

³¹⁹ Abramovič, H. *Coffee in Health and Disease Prevention*; Academic Press, 2015.

³²⁰ El-Seedi, H. R., El-Said, A. M., Khalifa, S. A., Göransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A. K., Verpoorte, R. *J. Agr. Food Chem.* **2012**, *60*, 10877.

una gran capacidad para neutralizar especies radicalarias a través de la donación de los átomos de hidrógeno fenólicos, ya que el radical fenoxilo resultante muestra una elevada estabilización por resonancia gracias a la presencia de un sistema conjugado extendido a través del anillo aromático y el doble enlace conjugado con el grupo carboxílico de la cadena lateral. Las diferencias de potencia antioxidante entre los distintos ácidos dependen de las variaciones en el patrón de sustitución y en cómo éstas influyen en la acidez de los grupos fenólicos, si bien es difícil establecer un orden de actividad debido a la dependencia del tipo de ensayo y de las condiciones experimentales aplicadas³²¹. Más allá de esta consideración, hay numerosos trabajos que avalan el poder neuroprotector de los ácidos hidroxicinámicos frente a condiciones de estrés oxidativo, siendo el ácido cafeico, el ferúlico y el sinápico los más estudiados^{322,323}. Además de su acción antioxidante directa, los ácidos hidroxicinámicos son capaces de aumentar la actividad del factor de transcripción Nrf2. Aunque el mecanismo de inducción más obvio recae en el hecho de que presenten en su estructura un grupo carbonilo α,β -insaturado, lo que los convierte en aceptores de Michael, parece que la vía MAPK/ERK estaría también implicada en este efecto³²⁴. Por último, en este apartado se debe citar también la capacidad quelante de los ácidos hidroxicinámicos que presentan dos grupos hidroxilo en posición *orto*, como es el caso del ácido cafeico³²⁵.

Algunos estudios señalan que los ácidos hidroxicinámicos poseen otras actividades interesantes para combatir la degeneración neuronal. Por ejemplo, se ha demostrado su capacidad para modular la respuesta inflamatoria al reducir la expresión de mediadores de la respuesta a citoquinas proinflamatorias y glucoproteínas de adhesión leucocitaria como la ICAM-1³²⁶. También se ha confirmado que pueden activar la vía PI3K/Akt, con la consecuente inactivación de la enzima GSK-3 β (reduciendo la

³²¹ Shang, Y. J., Liu, B. Y., Zhao, M. M. *Czech J. Food Sci.* **2015**, *33*, 210.

³²² Ren, Z., Zhang, R., Li, Y., Li, Y., Yang, Z., Yang, H. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40*(5), 1444.

³²³ Jeong, C. H., Jeong, H. R., Choi, G. N., Kim, D. O., Lee, U. K., Heo, H. J. *Chin. Med.* **2011**, *6*, 1.

³²⁴ Yang, S. Y., Pyo, M. C., Nam, M. H., Lee, K. W. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19*, 1.

³²⁵ Genaro-Mattos, T. C., Maurício, Â. Q., Rettori, D., Alonso, A., Hermes-Lima, M. *PLoS One.* **2015**, *10*, e0129963.

³²⁶ Cheng, C. Y., Ho, T. Y., Lee, E. J., Su, S. Y., Tang, N. Y., Hsieh, C. L. *Am. J. Chin. Med.* **2008**, *36*, 1105.

hiperfosforilación de Tau) y de algunas proteínas proapoptóticas como Bad³²⁷. Asimismo, algunos ácidos hidroxicinámicos como el ácido ferúlico y el ácido cafeico tienen la capacidad de interferir en la formación de los oligómeros y fibrillas de péptido β -amiloide, así como de paliar la toxicidad generada por este péptido en algunos ensayos *in vitro*³²⁸. Merece la pena destacar también el papel neuroprotector de los ácidos cafeico y ferúlico frente a la excitotoxicidad inducida por glutamato, para el que se proponen varios mecanismos: modulación de los receptores NMDA, reducción de la liberación de glutamato inducida por calcio y moderación de la entrada de calcio a las neuronas como consecuencia de la excitación de receptores glutamatérgicos³²⁹. Por último, se ha propuesto que el ácido ferúlico estimula la neurogénesis³³⁰.

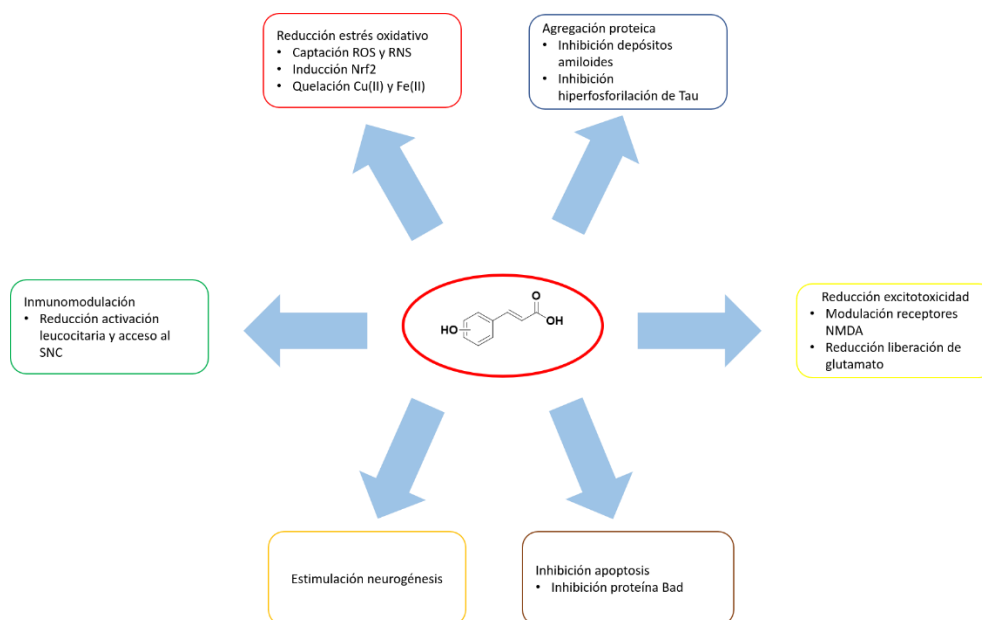


Figura 6.5. Resumen de los efectos neuroprotectores de los ácidos hidroxicinámicos.

La aplicación terapéutica directa de estos compuestos no es viable a causa de su baja biodisponibilidad, su modesta eficacia en modelos más complejos y su pobre permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica³³¹. Sin embargo, la aproximación

³²⁷ Sul, D., Kim, H. S., Lee, D., Joo, S. S., Hwang, K. W., Park, S. Y. *Life Sci.* **2009**, *84*, 257.

³²⁸ Cui, L., Zhang, Y., Cao, H., Wang, Y., Teng, T., Ma, G., Li, Y., Li, K., Zhang, Y. *J. Alzheimer's Dis.* **2013**, *37*, 19-28.

³²⁹ Lorigooini, Z., Nouri, A., Balali-Dehkordi, S., Bijad, E., Dehkordi, S. H., Soltani, A., Amini-Khoei, H. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **2020**, *1*.

³³⁰ Yabe, T., Hirahara, H., Harada, N., Ito, N., Nagai, T., Sanagi, T., Yamada, H. *Neuroscience.* **2010**, *165*, 515.

³³¹ Zhang, X., He, X., Chen, Q., Lu, J., Rapposelli, S., Pi, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 543.

multidiana al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas no ha ignorado el prometedor perfil farmacológico de los ácidos hidroxicinámicos, de modo que se pueden encontrar en la literatura algunos ejemplos de compuestos multidiana en los que se incorporan este tipo de estructuras en forma de ésteres o amidas para esquivar algunos de los inconvenientes citados anteriormente^{331,332,333}. La combinación más frecuente es con fragmentos inhibidores de la AChE y la BuChE: donepezilo, tacrina, β -carbazol, dibencilaminas, aminas cuaternarias, etcétera. También se ha recurrido a la incorporación de estructuras inhibitoras de la agregación de proteínas como la curcumina y los segmentos C-terminales del péptido β -amiloide. Otros compuestos multidiana derivados de los ácidos hidroxicinámicos incluyen triptaminas, inhibidores de la MAO e incluso donadores de óxido nítrico. Los buenos resultados *in vitro* (y en algunos casos, *in vivo*) de estos candidatos anima a seguir explorando el diseño de nuevos derivados de este tipo para combatir la neurodegeneración.

6.1.4 Ácido α -lipoico

Otro ácido orgánico de origen natural que destaca por su poder antioxidante es el ácido α -lipoico, también conocido como ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico. Es una molécula de presencia universal producida por células eucariotas y procariotas, lo que quiere decir que su síntesis endógena convive con su incorporación a través de la ingesta de alimentos de origen vegetal y animal. De su estructura química hay que destacar que se trata de una molécula quiral, aunque sólo el enantiómero (*R*) es natural, mientras que el ácido lipoico que se emplea como suplemento dietético suele estar en forma racémica³³⁴.

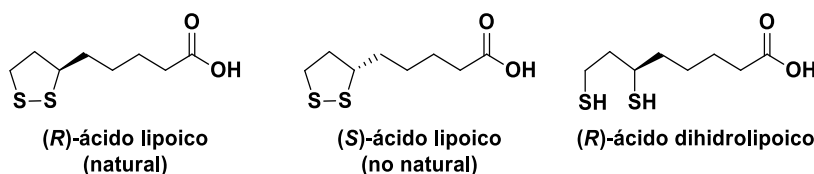


Figura 6.6. Estructura de los dos enantiómeros del ácido lipoico.

³³² Ghafary, S., Najafi, Z., Mohammadi-Khanaposhtani, M., Nadri, H., Edraki, N., Ayashi, N., Larijani, B., Amini, M., Mahdavi, M. *Arch. Pharm.* **2018**, *351*, 1800115.

³³³ Chainoglou, E., Siskos, A., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D. *Molecules.* **2020**, *25*, 4958.

³³⁴ Shay, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Smith, A. R., Hagen, T. M. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2009**, *1790*, 1149.

Su síntesis endógena se verifica en la mitocondria a partir del octanoil-ACP (del inglés *Acyl Carrier Protein*), a través de una secuencia de tres pasos que rinde el enantiómero (*R*) del ácido lipoico en su forma activa, esto es, formando lipoamidas con diversos residuos conservados de lisina presentes en las enzimas que requieren el concurso del ácido lipoico como grupo prostético. ¿Cuáles son estas enzimas? Por un lado, el sistema de degradación de la glicina, que cataliza la descarboxilación de la glicina acoplada con la síntesis del 5,10-metilen-tetrahidrofolato, un cofactor importante en la síntesis de ácidos nucleicos. Por otra parte, es esencial para la actividad de cuatro complejos α -cetoácido deshidrogenasa, a saber: piruvato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, 2-oxoadipato deshidrogenasa y la deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada. Con la evidencia disponible hasta este momento, parece que sólo el ácido lipoico endógeno puede cumplir esta función fisiológica³³⁵.

También existe un aporte dietético de ácido lipoico gracias a su presencia en los alimentos de origen vegetal y animal, si bien no parece que sea suficiente para que alcance unos niveles plasmáticos o celulares detectables. En cambio, esto sí ocurre cuando se consumen suplementos dietéticos de ácido lipoico libre en una dosis suficiente (mayor de 50 mg), sea en su forma natural o como la mezcla de los dos enantiómeros³³⁵. Aunque el organismo no parece capaz de incorporar este ácido lipoico exógeno a las rutas que permiten convertirlo en un grupo prostético, se ha observado que tiene una serie de actividades interesantes desde el punto de vista farmacológico:

- Tanto el ácido lipoico como su forma reducida, el ácido dihidrolipoico, atrapan diversas especies reactivas como los radicales hidroxilo y peroxinitrito, actuando como terminadores de la cadena de reacción radicalaria. No obstante, existen dudas sobre la relevancia *in vivo* de esta actividad, al no existir la seguridad de que las concentraciones y el tiempo de permanencia de estos compuestos en el citosol sean suficientes, teniendo en cuenta que este efecto del ácido lipoico sólo se ha observado a tiempos de incubación largos³³⁶.

³³⁵ Higdon J. Lipoic acid, 2002. Oregon State University. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/lipoic-acid>.

³³⁶ Smith, A. R., Shenvi, S. V., Widlansky, M., Suh, J. H., Hagen, T. M. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1135.

- Asimismo, el ácido dihidrolipoico es un potente agente reductor capaz de regenerar la forma activa de varios antioxidantes fisiológicos, entre los que se encuentran la vitamina C, la coenzima Q₁₀ y el glutatión. Sobre su eficacia real se ciernen las mismas incertidumbres que en el caso anterior³³⁵.
- Mejor establecida está la capacidad de ambos ácidos para quelar iones Fe(II) y Cu(II), tanto *in vitro* como *in vivo*³³⁶.
- La actividad antioxidante del ácido lipoico se ve reforzada por su condición de inductor del factor de transcripción Nrf2³³⁷. En primer lugar, el propio puente disulfuro intramolecular presente en su estructura puede oxidar los residuos de cisteína de Keap-1 encargados de controlar la unión a Nrf2, o incluso el ácido lipoico puede formar disulfuros mixtos con Keap-1, permitiendo la liberación de Nrf2 o incapacitando a Keap-1 para secuestrar el Nrf2 sintetizado *de novo*. Curiosamente, se atribuye al ácido lipoico un moderado efecto pro-oxidante a tiempos cortos de incubación que podría ser consecuencia de la reactividad de su grupo disulfuro, de su actividad desacoplante en la mitocondria y de la inducción de la enzima NADPH oxidasa³³⁸. De este modo, estimularía la activación de mecanismos antioxidantes en la célula, entre los que se encuentra la vía Nrf2/ARE. Asimismo, el ácido lipoico es capaz de activar las vías PI3K/Akt y ERK, lo que podrían constituir mecanismos adicionales de activación de Nrf2³³⁹.
- El ácido lipoico también ha demostrado propiedades inmunomoduladoras, ya que evita la traslocación del factor de transcripción NF-κB al núcleo a través de la inhibición de la quinasa IKK-β³³⁵.
- Se ha constatado la capacidad *in vitro* de las dos especies, ácido lipoico y dihidrolipoico, para impedir la formación de fibrillas de péptido β-amiloide y desestabilizar las ya formadas³⁴⁰.
- Además de su función fisiológica esencial como cofactor de varias enzimas fundamentales para el mantenimiento de la actividad mitocondrial, el ácido

³³⁷ Koriyama, Y., Nakayama, Y., Matsugo, S., Kato, S. *Brain Res.* **2013**, *1499*, 145.

³³⁸ Dicter, N., Madar, Z., Tirosh, O. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 3001.

³³⁹ Molz, P., Schröder, N. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 849

³⁴⁰ Ono, K., Hirohata, M., Yamada, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *341*, 1046.

lipoico también promueve, a través de la estimulación de la AMP quinasa, la actividad del factor de transcripción PGC-1 α , que como ya se ha mencionado anteriormente es un importante promotor de la biogénesis y actividad mitocondrial³⁴¹.

- El ácido lipoico ejerce un efecto positivo sobre la plasticidad neuronal al estimular el crecimiento de neuritas, mediante la activación de la quinasa ERK. Al parecer, la capacidad del ácido lipoico para inducir una producción moderada de ROS sería clave para la activación de este mecanismo³⁴².

Numerosos estudios *in vivo* en modelos de neurodegeneración y envejecimiento han corroborado el potencial del ácido lipoico para frenar el deterioro cognitivo y funcional asociado a estos procesos, a través de los mecanismos señalados anteriormente³³⁹. Estos resultados positivos han allanado la entrada del ácido lipoico en la fase clínica de desarrollo, si bien la información disponible hoy en día es escasa.

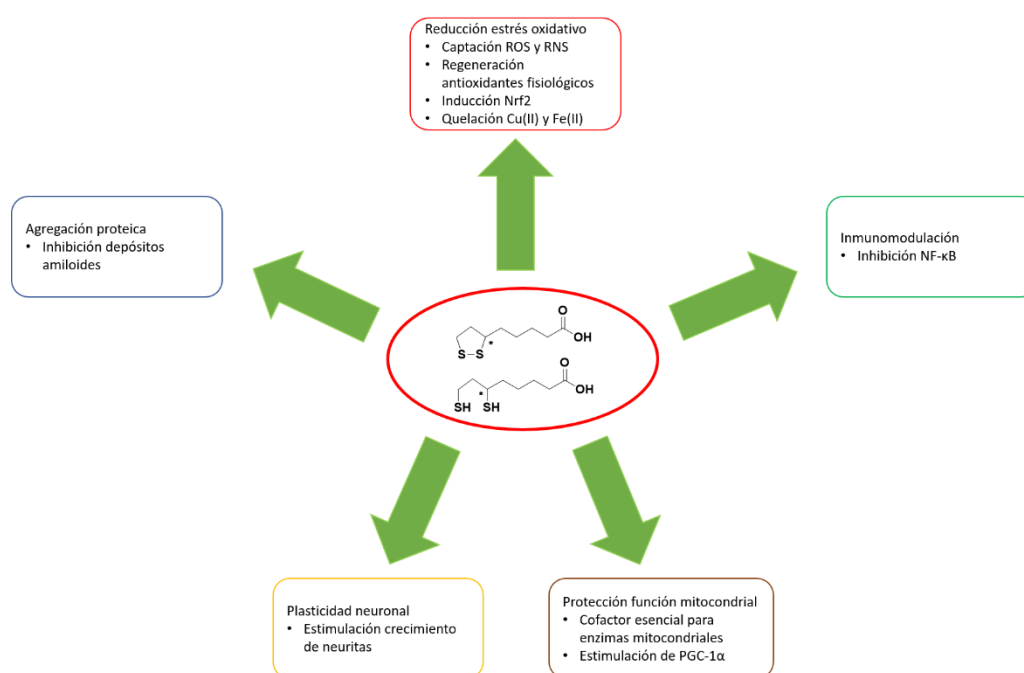


Figura 6.7. Efectos neuroprotectores más relevantes de los ácidos lipoico y dihidrolipoico.

En cuanto a la seguridad, ha demostrado un perfil adecuado en pacientes de la enfermedad de Alzheimer y de la parálisis supranuclear progresiva. El equipo del doctor

³⁴¹ Wang, Y., Li, X., Guo, Y., Chan, L., Guan, X. *Metabolism*. **2010**, *59*, 967.

³⁴² Wang, X., Wang, Z., Yao, Y., Li, J., Zhang, X., Li, C., Cheng, Y., Ding, G., Liu, L., Ding, Z. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 827.

Münch publicó dos ensayos clínicos de fase I y II en los que la adición del ácido lipoico al tratamiento habitual con inhibidores de la acetilcolinesterasa en enfermos de Alzheimer frenaba significativamente el deterioro cognitivo respecto a la evolución típica de estos pacientes en un periodo de hasta cuatro años, si bien el hecho de que los ensayos no fueran aleatorizados y carecieran de un control tratado con placebo invita a leer los resultados con precaución^{343,344}. Por su parte, otro ensayo de fase II arrojó como resultado que el tratamiento combinado de pacientes de la enfermedad de Alzheimer con ácido lipoico y ácidos grasos ω -3 ralentizaba significativamente el deterioro cognitivo y funcional durante un periodo de un año respecto a los pacientes tratados con placebo o sólo con los ácidos grasos ω -3³⁴⁵.

El ácido lipoico es otro ejemplo de molécula integrada en el diseño de ligandos multidiana contra la neurodegeneración, comúnmente en forma de lipoamidas. En la literatura se encuentran híbridos del ácido lipoico con inhibidores de la acetilcolinesterasa³⁴⁶ (tacrina, rivastigmina y *N*-bencilpiperidina, entre otros), ácidos fenólicos³⁴⁷, con un aza-derivado del CGP-37157 (antagonista del intercambiador mitocondrial de sodio y calcio NCX)²⁸⁸ y con fasudil (inhibidor de la ROCK, una quinasa implicada en procesos de degeneración neuronal)³⁴⁸, por destacar algunos ejemplos. Los resultados de los ensayos *in vitro* permiten, como en el caso de los ácidos hidroxicinámicos, bendecir el uso del ácido lipoico en la concepción de nuevos ligandos multidiana como fragmento antioxidante y neuroprotector.

³⁴³ Hager, K., Marahrens, A., Kenklies, M., Riederer, P., Münch, G. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **2001**, *32*, 275.

³⁴⁴ Hager, K., Kenklies, M., McAfoose, J., Engel, J., Münch, G. *Neuropsychiatric Disorders An Integrative Approach*; Springer, 2007.

³⁴⁵ Shinto, L., Quinn, J., Montine, T., Dodge, H. H., Woodward, W., Baldauf-Wagner, S., Waichunas, D., Bumgarner, L., Bourdette, D., Silbert, L., Kaye, J. J. *Alzheimer's Dis.* **2014**, *38*, 111.

³⁴⁶ Rosini, M., Simoni, E., Bartolini, M., Tarozzi, A., Matera, R., Milelli, A., Hrelia, P., Andrisano, V., Bolognesi, M. L., Melchiorre, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5435.

³⁴⁷ Pagoni, A., Marinelli, L., Di Stefano, A., Ciulla, M., Turkez, H., Mardinoglu, A., Vassiliou, S., Cacciatore, I. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *186*, 111880.

³⁴⁸ Chen, M., Liu, Q., Liu, A., Tan, M., Xie, Z., Uri, A., Chen, Z., Huang, G., Sun, Y., Ge, H., Liu, P., Li, M., Li, X., Wen, S., Pi, R. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 37266.

6.2 Diseño de tres familias de ligandos multidiana derivados de citisina.

Teniendo en cuenta la vasta evidencia científica expuesta de manera sucinta en el apartado precedente, se planteó el diseño y síntesis de tres nuevas familias de ligandos multidiana con una potencial actividad neuroprotectora. El diseño de estos nuevos compuestos tiene en cuenta todo el trabajo previo realizado en nuestro grupo en torno al diseño de estructuras análogas de citisina con actividad sobre receptores nicotínicos de los subtipos $\alpha_4\beta_2$ y α_7 , y trata de producir un efecto sinérgico combinándolas con los fragmentos derivados de melatonina, ácidos hidroxicinámicos y ácido lipoico.

La primera familia está compuesta por un fragmento de triptamina enlazado directamente a un núcleo de metanodibenzoazocina, que constituiría un deaza-análogo de la citisina y de los compuestos descritos en el capítulo 5 de esta tesis doctoral. La posición 5 de la triptamina puede estar no sustituida, sustituida con un grupo metoxilo (como la melatonina) o con un grupo hidroxilo (como la serotonina). Además, el diseño prevé la unión de la triptamina con el resto del ligando a través de un enlace amida, a imitación de la amina primaria acetilada que presenta la melatonina. Esta característica es importante para mantener la actividad captadora de radicales libres de este fragmento y para permitir la formación ulterior de los metabolitos que componen la cascada antioxidante de la melatonina²⁹⁹. Del fragmento análogo de citisina hay que destacar, por encima de todo, la supresión del nitrógeno básico del anillo de diazocina, sustituido por una cadena lateral por donde se une la triptamina a través de una amida α,β -insaturada. Por un lado, la presencia de este motivo estructural aceptor de Michael tiene como objetivo el aumento de la potencia inductora de Nrf2 de la molécula. Por otro lado, la pérdida del nitrógeno básico puede comprometer la interacción de estos compuestos con los receptores nicotínicos de acetilcolina, si bien no se puede emitir sentencia sobre este particular a falta de resultados que determinen inequívocamente la naturaleza de la interacción entre este tipo de estructuras y su diana. Otras variantes introducidas, como la reducción del doble enlace en α a la amida o la metilación del nitrógeno del anillo de tetrahydroquinolina, permiten ampliar la información sobre la relación estructura-actividad de esta nueva familia. La disposición tridimensional de

estos ligandos debería exhibir una notable similitud con la adoptada por la citisina y los derivados de metanobenzodiazocina descritos en el capítulo anterior.

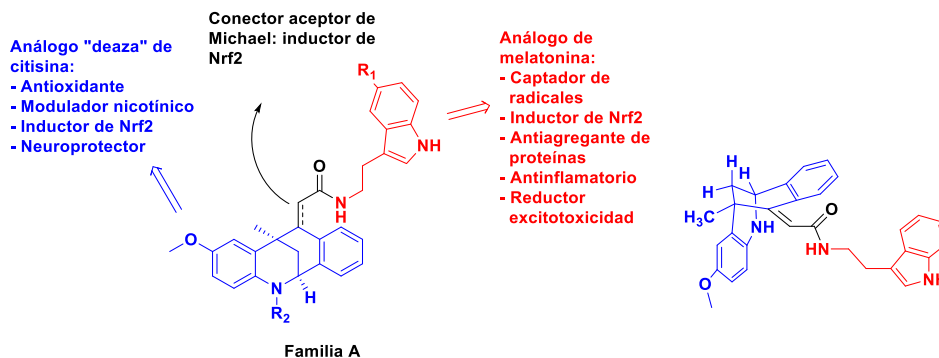


Figura 6.8. Diseño de la familia A de compuestos multidiana. Disposición tridimensional.

La segunda familia tiene en común con la primera su composición: un fragmento análogo de citisina y una triptamina. En relación con la triptamina, se mantienen vigentes las consideraciones tenidas en cuenta para la primera familia: unión con el resto de la molécula mediante un enlace amida, y mismas variaciones sobre la posición 5 para explorar la relación estructura-actividad. En cambio, el fragmento análogo de citisina resulta más ortodoxo, ya que consiste en un núcleo de metanobenzodiazocina que presenta el nitrógeno básico canónico para la interacción con los receptores nicotínicos. Un grupo espaciador permite la conexión entre el grupo amino primario de la triptamina y la amina aromática que forma parte del núcleo diazabicclico.

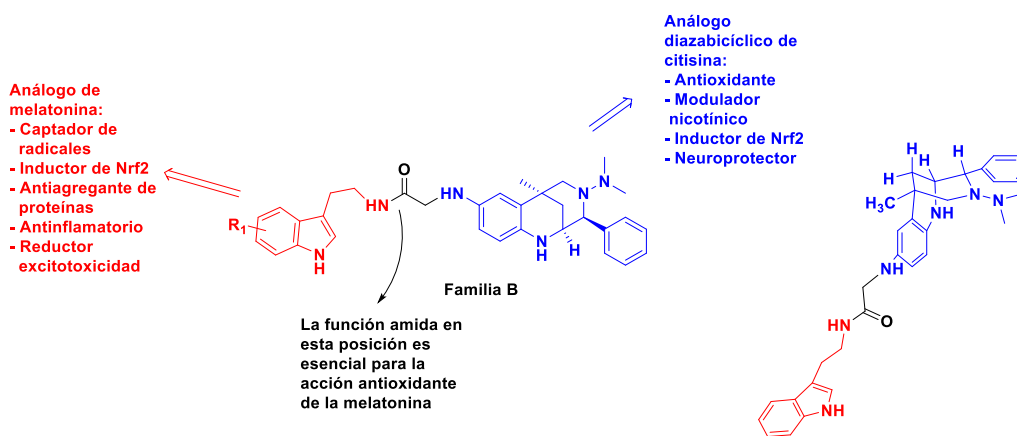


Figura 6.9. Diseño de la familia B de compuestos multidiana. Disposición tridimensional.

En los compuestos de la tercera familia se enlazan directamente diversos ácidos cinámicos o el ácido lipoico con el mismo núcleo de metanobenzodiazocina empleado para construir los ligandos de la segunda familia, a través de un enlace amida que no

parece resultar perjudicial para la actividad de estos ácidos, a tenor de los resultados obtenidos con otros ligandos multidiana construidos de la misma forma³⁴⁹. Para cada uno de los ácidos cinámicos seleccionados se han sintetizado dos derivados: uno que mantiene el fragmento de la amida α,β -insaturada, y otro que no presenta este doble enlace. Aunque a simple vista la supresión de esta insaturación podría comprometer la capacidad inductora de Nrf2, algunos trabajos aún no publicados realizados en nuestro grupo de investigación ponen en duda este temor, de modo que se ha preferido sintetizar ambas posibilidades para estudiarlas posteriormente. En cuanto al ácido lipoico, para esta primera prueba de concepto se ha preferido usar el compuesto racémico.

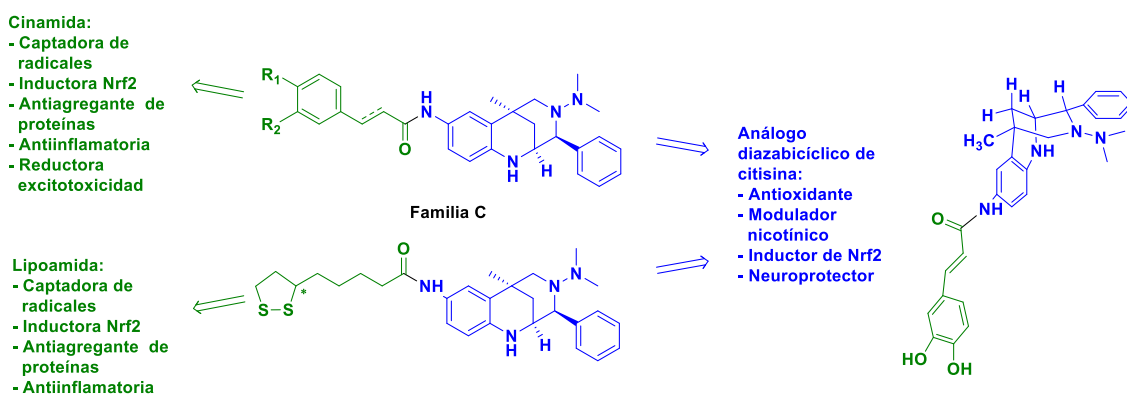


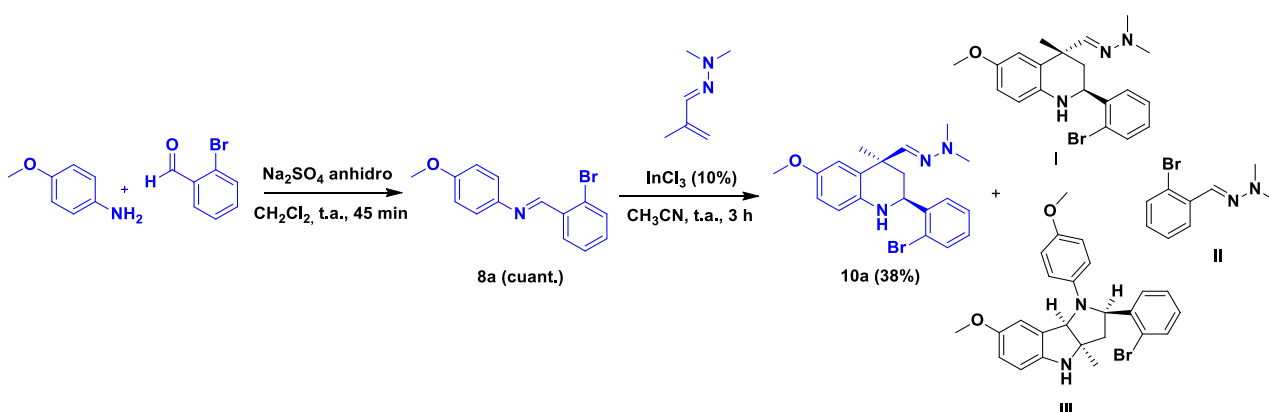
Figura 6.10. Diseño de la familia C de compuestos multidiana. Disposición tridimensional.

En el caso de las familias B y C, se prevé la obtención del núcleo de metanobenzodiazocina en forma de mezcla racémica en esta primera fase del proyecto para, a través de una síntesis más o menos rápida, poder obtener una quimioteca cuya evaluación farmacológica permita entender algunas claves de la relación estructura-actividad. Una vez se lleve a cabo este análisis, sería preceptivo intentar la obtención de los derivados más prometedores en su forma enantiopura¹¹⁹, lo que permitiría extraer más información sobre la actividad de estos compuestos y el mecanismo de interacción con su diana.

³⁴⁹ Chai, T., Zhao, X. B., Wang, W. F., Qiang, Y., Zhang, X. Y., Yang, J. L. *Molecules*. **2018**, *23*, 2663.

6.3 Síntesis de derivados híbridos de metanodibenzoazocina-melatonina (familia A)

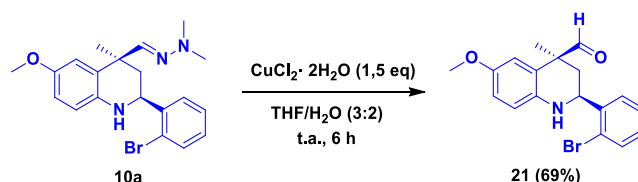
La síntesis de la primera familia de ligandos multidiana comenzó con la condensación de 2-bromobenzaldehído y *p*-anisidina para generar con rendimiento cuantitativo la arilimina **8a**, requerida como dieno para la subsecuente reacción de Povarov. La reacción de Povarov entre **8a** y la hidrazona **2a**, cuya obtención se describió en el capítulo 3, en presencia de un 10% de InCl₃ permitió obtener la tetrahidroquinolina **10a** con un rendimiento del 38%, mucho más bajo de lo deseable si se tiene en cuenta que se trata del segundo paso de una ruta sintética que se alarga hasta los siete u ocho, erigiéndose como su principal obstáculo.



Esquema 6.3. Síntesis secuencial de la arilimina **8a** y la hidrazona **10a**. Productos secundarios de la reacción de Povarov.

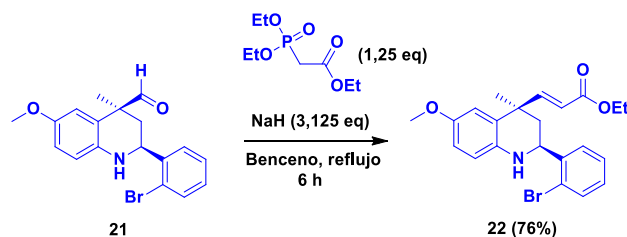
Como ya se explicó en el capítulo 3, la síntesis de 2-ariltetrahydroquinolinas a través de la reacción de Povarov aza-viníloga suele venir acompañada de la formación de varios productos secundarios. En el caso de la reacción que nos ocupa, **10a** no se forma con la habitual preponderancia sobre esos productos, observándose en el crudo de reacción una gran cantidad del producto de transimación **II** y algo del hexahidropirrolindol **III**. Hay que añadir también que, aunque la formación de 2-ariltetrahydroquinolinas por este método suele proceder de una manera totalmente diastereoselectiva, en este caso se observó la formación de una pequeña cantidad del isómero *trans* **I**. Todo ello explica que el rendimiento de esta reacción de Povarov sea notablemente más bajo de lo acostumbrado.

A continuación, se llevó a cabo la hidrólisis de la hidrazona **10a** en condiciones suaves, utilizando CuCl_2 en una mezcla de agua y THF³⁵⁰ para obtener el aldehído **21** con muy buen rendimiento, gracias a un método que ya había demostrado su eficacia anteriormente para este tipo de derivados²⁰⁶.



Esquema 6.4. Síntesis del aldehído **21**.

También basándonos en nuestra experiencia previa, el compuesto **21** fue a su vez convertido en el éster α,β -insaturado **22** por medio de una reacción de Horner-Wadsworth-Emmons, empleando fosfonoacetato de trietilo como reactivo olefinante e hidruro sódico como base. Afortunadamente, la reacción también proporcionó un rendimiento muy bueno del producto **22** y una selectividad total en favor del isómero (*E*), como suele ser habitual en este tipo de olefinación.



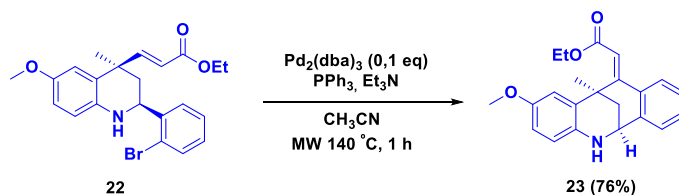
Esquema 6.5. Obtención de la olefina **22**.

El siguiente paso supone uno de los puntos clave de esta ruta sintética, pues es aquí donde se ensambla el esqueleto tetracíclico de las moléculas objetivo. Concretamente, se proyectó llevar a cabo una reacción de Heck intramolecular para convertir **22** en el tetraciclo **23**, gracias a que el compuesto **22** dispone de un grupo vinilo y de un haluro aromático a la distancia adecuada para poder formar un nuevo ciclo de seis átomos de carbono mediante una reacción de acoplamiento carbono-carbono. Las primeras pruebas se realizaron en presencia de acetato de paladio o cloruro de paladio en condiciones térmicas empleando distintos disolventes (DMF, *N*-metil-2-pirrolidona y tolueno, entradas 1-4, tabla 6.3), pero condujeron sólo a la recuperación del producto

³⁵⁰ Mino, T., Fukui, S., Yamashita, M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 734.

de partida. Posteriormente, se ensayó un procedimiento publicado por Allam y Singh³⁵¹ que comprende la catálisis por el complejo Pd(L-prolina)₂ (obtenido cuantitativamente haciendo reaccionar acetato de paladio con L-prolina en presencia de trietilamina) y la irradiación con microondas. El primer intento, en el que se efectuó la reacción en agua y en presencia de un catalizador de transferencia de fase como describe el trabajo original, permitió por vez primera aislar **23**, aunque con un rendimiento muy bajo (entrada 5) que no pudo ser mejorado con la sustitución del agua por metanol como disolvente de la reacción (entrada 6). En vista de este resultado, se pensó que quizá el proceso requería unas condiciones de reacción más enérgicas que las ensayadas hasta el momento, debido a la tensión estructural necesaria para la consecución del acoplamiento intramolecular. Esta suposición llevó a probar la reacción en un tubo sellado a 140 °C usando acetato de paladio como catalizador y acetonitrilo como disolvente, unas condiciones que tras 48 horas de reacción permitieron la formación de **23** con un rendimiento del 33% (entrada 7). Este resultado llevó a explorar la posibilidad de emplear la irradiación con microondas para intentar acortar el tiempo de reacción, expectativa que se vio confirmada por el aumento del rendimiento del proceso hasta el 67% tras sólo una hora de reacción (entrada 8). Después se ensayaron otros disolventes polares bajo estas nuevas condiciones (entradas 9-12), pero ninguno consiguió mejorar los resultados proporcionados por el acetonitrilo. Sin embargo, la sustitución del acetato de paladio por Pd₂(dba)₃ sí que permitió elevar el rendimiento de **23** hasta el 76% (entrada 13), observándose finalmente que un acortamiento del tiempo de reacción a la mitad también motivaba una moderada pérdida de rendimiento (entrada 14). Este acoplamiento rinde sólo uno de los isómeros geométricos del alqueno, que se identificó como el isómero (*E*) mediante un experimento de 2D-NOESY gracias a la observación de un acoplamiento espacial entre el protón vinílico y el protón aromático situado en la posición 17 del tetraciclo, como se muestra en la figura 6.11.

³⁵¹ Allam, B. K., Singh, K. N. *Synthesis*. **2011**, *7*, 1125.



Ent.	Catalizador	Ligando	Base	Disolvente	T (°C)	t (h)	Rto. (%)
1	$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq)	PPh_3	Et_3N	DMF	120	48	-
2	$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq)	PPh_3	Et_3N	NMP	100	48	-
3	$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq)	PPh_3	Et_3N	Tolueno	110	16	-
4	PdCl_2 (0,1 eq)	PPh_3	Et_3N	DMF	120	48	Trazas
5	$\text{Pd}(\text{L-Pro})_2$ (0,1 eq)	-	AcONa	H_2O (TEBAC)	160 (MW)	1,25	12
6	$\text{Pd}(\text{L-Pro})_2$ (0,1 eq)	-	AcONa	Metanol	130 (MW)	1	-
7	$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq)	PPh_3	Et_3N	CH_3CN	140 (t. sel.)	48	33
8	$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq)	PPh_3	Et_3N	CH_3CN	140 (MW)	1	67
9	$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq)	PPh_3	Et_3N	DMF	140 (MW)	1,5	32
10	$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq)	PPh_3	Et_3N	Tolueno	130 (MW)	1	10
11	$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq)	PPh_3	Et_3N	THF	140 (MW)	1	51
12	$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq)	PPh_3	Et_3N	Dioxano	140 (MW)	1	Trazas
13	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0,1 eq)	PPh_3	Et_3N	CH_3CN	140 (MW)	1	76
14	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0,1 eq)	PPh_3	Et_3N	CH_3CN	140 (MW)	0,5	59

Esquema 6.6. Síntesis del tetraciclo **23**.

Tabla 6.3. Optimización de la reacción de Heck intramolecular.

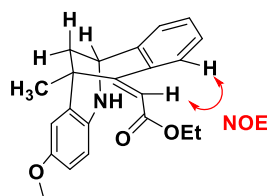
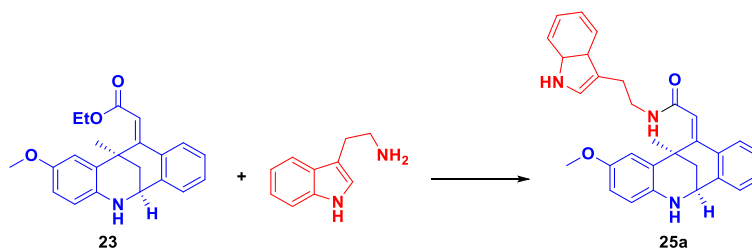


Figura 6.11. Justificación de la isomería de **23** a través de un experimento NOESY 2D.

La existencia de algunos métodos³⁵² que permiten obtener amidas haciendo reaccionar una amina con un éster nos animó a probar directamente la reacción de la triptamina con **23**, buscando omitir el paso intermedio de hidrólisis que alargaría aún más la ruta sintética. En la tabla 6.4 se recogen los distintos intentos que se llevaron a cabo para la formación directa de la amida, que no dieron su fruto a pesar de la diversidad de condiciones ensayadas: adición de bases o ácidos de Lewis, temperaturas elevadas e incluso irradiación con microondas. Generalmente, sólo se constató la recuperación de los productos de partida, o como mucho la hidrólisis del éster.

³⁵² a) Chojnacki, J. E., Liu, K., Yan, X., Toldo, S., Selden, T., Estrada, M., Rodríguez-Franco, M. I., Halquist, M. S., Ye, D., Zhang, S. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, 5, 690. b) Morimoto, H., Fujiwara, R., Shimizu, Y., Morisaki, K., Ohshima, T. *Org. Lett.* **2014**, 16, 2018.

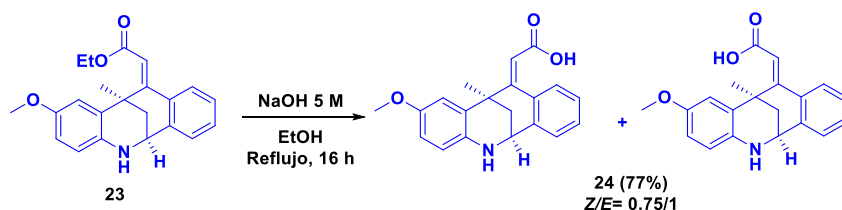


Reactivo	Disolvente	T(°C)	t (h)	Producto
^tBuOK	THF seco	25	6	Prod. partida
^tBuOK	THF seco	66	2	(Z)-ácido
AlCl₃/Et₃N	CH ₃ CN	25 → reflujo (82)	18	Prod. partida
-	Xileno	Reflujo (139)	24	Prod. partida
InCl₃	Xileno	Reflujo (139)	24	Prod. Partida + (Z)-ácido
-	Xileno	160 (MW)	0,5	Prod. partida
InCl₃	Xileno	160 (MW)	0,5	Prod. partida

Esquema 6.7. Intento de reacción entre la triptamina y el éster **23**.

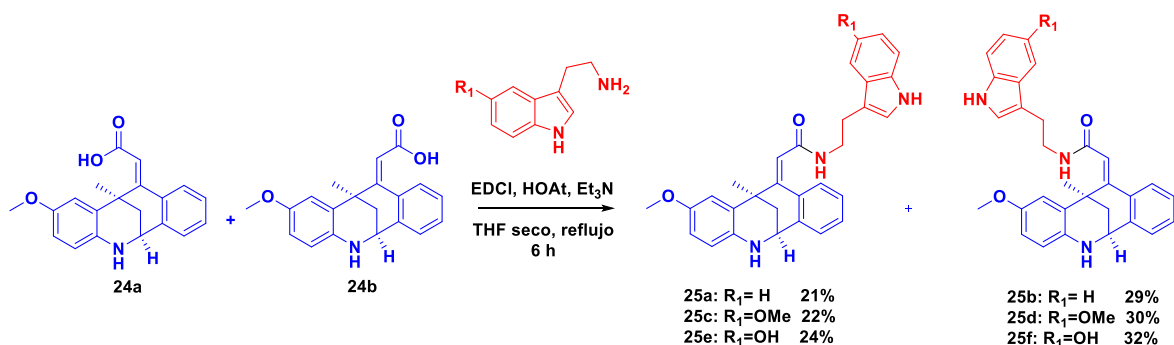
Tabla 6.4. Resumen de los intentos de formación de la amida **25a**.

En vista de la imposibilidad de encontrar un atajo hacia los productos finales, nos resignamos a seguir la ruta más ortodoxa, que pasaba por la hidrólisis del éster. Ésta se consiguió sin mayores problemas disolviendo **23** en una solución etanólica de NaOH 5 M, que fue calentada a reflujo durante toda la noche para obtener los ácidos **24a** y **24b** con un buen rendimiento del 77%. Además, se observó que esta hidrólisis alcalina provocaba una isomerización parcial del éster de partida, de modo que rendía el producto como una mezcla de los isómeros *Z* y *E* en una proporción de 0,75:1. Aunque en un primer momento pudiera parecer un inconveniente fastidioso, se valoró la posibilidad inesperada de obtener los productos finales a partir de los dos posibles isómeros geométricos, de modo que se adoptaron estas condiciones de hidrólisis. Si bien se comprobó que era posible su separación cromatográfica, ésta resultaba verdaderamente dificultosa y acababa por causar una degradación parcial de los productos, por lo que en aras de una mayor practicidad se decidió emplear la mezcla de ambos ácidos en las reacciones siguientes, esperando una separación más fácil de los productos finales en los casos en los que aún existiese dicha mezcla diastereomérica.



Esquema 6.8. Hidrólisis de **23** para obtener el ácido **24** en forma de una mezcla de isómeros.

Desde aquí, la ruta sintética se divide en dos caminos distintos con el objetivo de generar cierta diversidad estructural en los productos finales. Por un lado, se llevó a cabo la reacción de la mezcla de **24a** y **24b** con las tres triptaminas seleccionadas utilizando reactivos de acoplamiento peptídico, concretamente 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt). La reacción, realizada en THF seco a reflujo y en presencia de trietilamina, permitió la obtención de los productos finales **25a-f** con rendimientos moderados. Afortunadamente, la expectativa de poder separar los isómeros *Z* y *E* tras este último paso de reacción se cumplió, pero la dificultad para separarlos entre sí y de otros subproductos probablemente derivados de los reactivos de acoplamiento convirtió la purificación en un proceso realmente farragoso, con columnas cromatográficas muy largas y requiriendo en algunos casos una separación adicional mediante placas de capa preparativa para obtener los productos con el grado de pureza requerido.

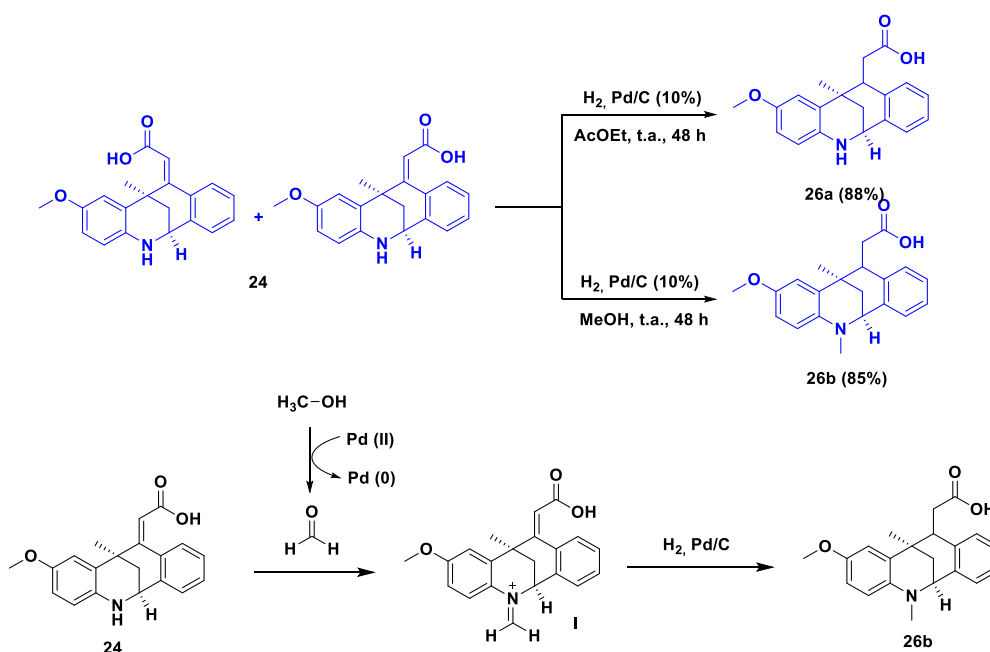


Esquema 6.9. Acoplamiento entre los ácidos **24** y distintos derivados de triptamina para formar las amidas finales **25a-f**.

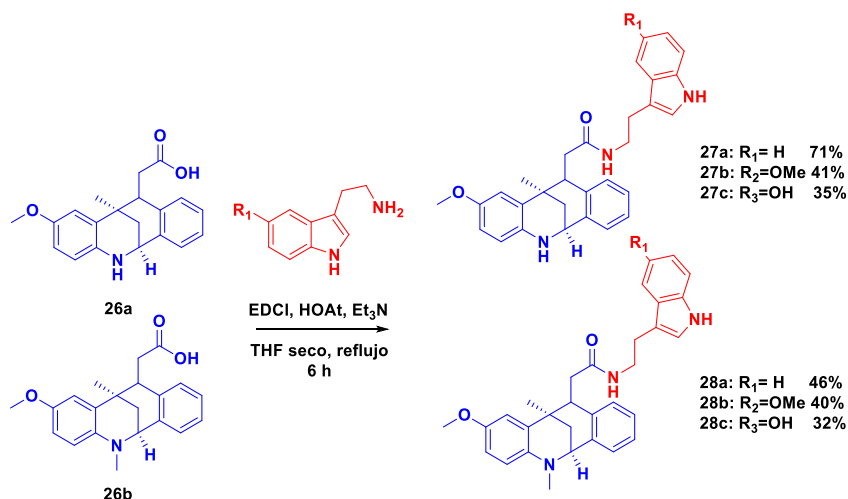
Por otro lado, se decidió sintetizar los derivados sin la insaturación de la posición 11, para evaluar la influencia de la electrofilia de ese fragmento aceptor de Michael en la actividad farmacológica. La reducción de la mezcla de **24a** y **24b** mediante una hidrogenación catalítica utilizando unas condiciones clásicas, esto es, Pd/C al 10% y metanol como disolvente a temperatura ambiente, condujo sorprendentemente a la

formación del compuesto **26b** con un sustituyente *N*-metilo en lugar del derivado esperado **26a**. La explicación más plausible para este fenómeno viene recogida en el esquema 6.10: el metanol podría oxidarse en presencia del paladio o de trazas de oxígeno a formaldehído, el cual podría sufrir un ataque por parte del grupo NH del tetraciclo, para generar **26b** a través de una aminación reductora. La sustitución del metanol por acetato de etilo permitió acceder al producto **26a** sin evidencias de esta reactividad indeseada, mientras que con etanol se observó la etilación del nitrógeno libre, hechos ambos que parecen corroborar el mecanismo propuesto. Nuevamente, se tomó provecho de esta inesperada diversidad en los productos obtenidos, empleando tanto **26a** como **26b** para la síntesis de nuevos productos finales.

En ambos casos los rendimientos fueron cuantitativos, por lo que de forma rutinaria se emplearon los crudos de reacción sin purificar para la síntesis de las amidas finales utilizando las mismas triptaminas y condiciones de reacción que se han descrito anteriormente, logrando la obtención de los productos **27a-c** y **28a-c**. En este caso la purificación de los compuestos finales resultó más fácil gracias a la inexistencia de una mezcla de isómeros, aunque los rendimientos en general fueron igualmente modestos (esquema 6.11).



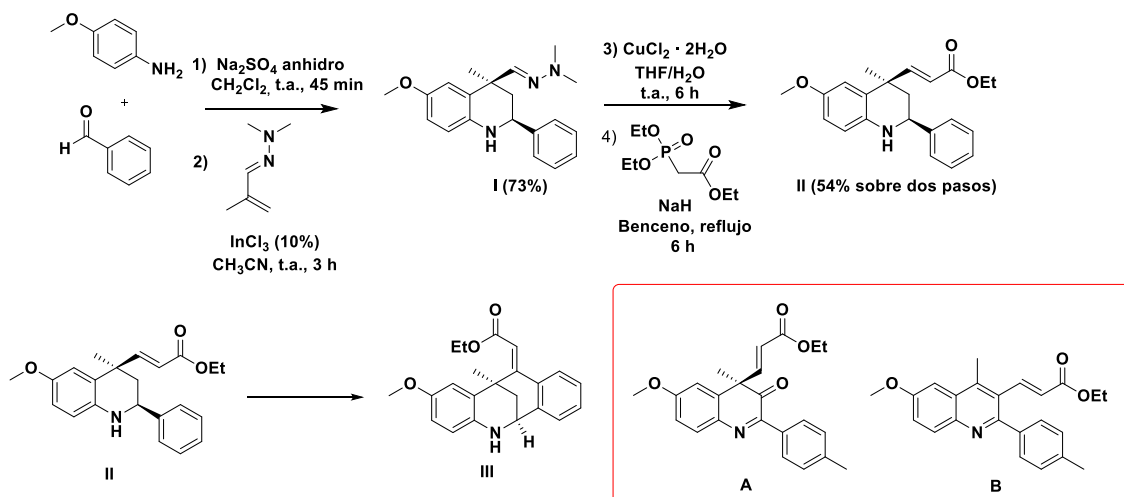
Esquema 6.10. Hidrogenación catalítica conducente a los compuestos **26a-b**. Mecanismo de formación del compuesto **26b**.



Esquema 6.11. Obtención de las amidas 27a-c y 28a-c.

Para terminar, hay que mencionar brevemente una alternativa sintética que se planteó en vista del perjuicio que parecía suponer la presencia de un bromo en la posición 2 del benzaldehído de partida para la reacción de Povarov, cuyo mal rendimiento condicionaba el desarrollo de la ruta sintética planteada. La propuesta pasaba por utilizar simplemente benzaldehído para obtener la tetrahydroquinolina **I**, y luego tratar de formar el tetraciclo **III** mediante la activación catalítica del enlace C-H adecuado del anillo aromático, en lugar de la reacción de Heck descrita anteriormente³⁵³. Si bien la reacción de Povarov, la hidrólisis de la hidrazona y la posterior olefinación del aldehído correspondiente transcurrieron con buenos rendimientos, siendo significativa la mejora en el paso de formación de la tetrahydroquinolina, los distintos intentos para efectuar la ciclación intramolecular a través de una activación C-H fueron infructuosos, llevando sólo a la obtención de crudos de reacción complejos en los que se podían reconocer algunos productos de oxidación como **A** y **B**. Entre las causas probables de este fracaso se pueden citar la inestabilidad de **II** bajo las drásticas condiciones de reacción ensayadas y la falta de un grupo director adecuado que facilitase y orientase la activación del enlace C-H deseado.

³⁵³ Jin, W., Wong, W. T., Law, G. L. *ChemCatChem*. **2014**, *6*, 1599.



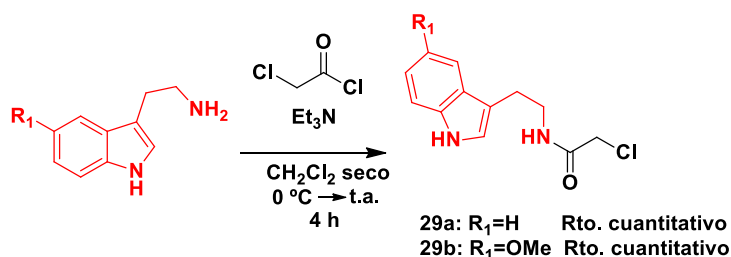
Catalizador	Ligando	Oxidante	Disolvente	T (°C)	t (h)	Productos
$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq)	-	$\text{Cu}(\text{OAc})_2$	CH_3CN	140 (MW)	1	A, B
$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq)	1,10-fenantrolina	<i>p</i> -Benzoquinona	CH_3CN	140 (MW)	1,5	A, B
$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq) <i>p</i> -TsOH (1 eq)	-	<i>p</i> -Benzoquinona	Dioxano	25 → reflujo (101)	5	Mezcla compleja
$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq) <i>p</i> -TsOH (1 eq)	1,10-fenantrolina	<i>p</i> -Benzoquinona	CH_3CN	Reflujo (82)	7	B
$\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (0,1 eq) <i>p</i> -TsOH (1 eq)	1,10-fenantrolina	-	CH_3CN	140 (MW)	1,5	B

Esquema 6.12. Planteamiento sintético para la obtención del compuesto III.

Tabla 6.5. Condiciones ensayadas para la formación de III mediante una activación C-H.

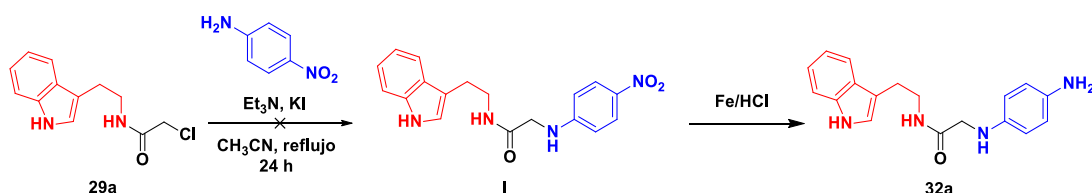
6.4 Síntesis de derivados híbridos de metanobenzodiazocina-melatonina (familia B)

La síntesis de la segunda familia de compuestos multidiana, que en este caso incorporan a su estructura final un fragmento de metanobenzodiazocina y otro de triptamina, comenzó con la reacción de acilación de las triptaminas seleccionadas con cloruro de cloroacetilo, formándose de manera cuantitativa los productos **29a** y **29b**. Para obtener este rendimiento óptimo, se debe tomar la precaución de añadir gota a gota el cloruro de cloroacetilo diluido sobre la suspensión de la triptamina correspondiente y trietilamina en diclorometano seco a cero grados, después de lo cual se permite a la mezcla de reacción alcanzar gradualmente la temperatura ambiente.



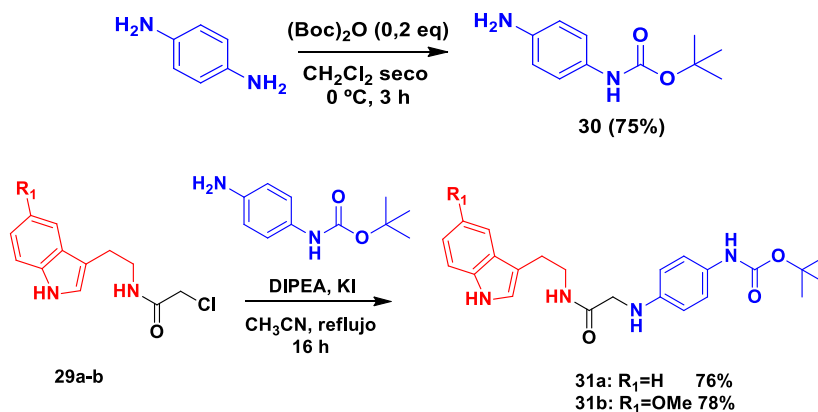
Esquema 6.13. Acilación de triptaminas para la obtención de **29a-b**.

A continuación, se intentó hacer una reacción de sustitución nucleófila entre el compuesto **29a** y *p*-nitroanilina para, tras la posterior reducción del grupo nitro, obtener la anilina necesaria para la construcción de la tetrahydroquinolina. Sin embargo, debido al fuerte efecto desactivante del grupo nitro, la reacción SN₂ deseada no tuvo lugar.



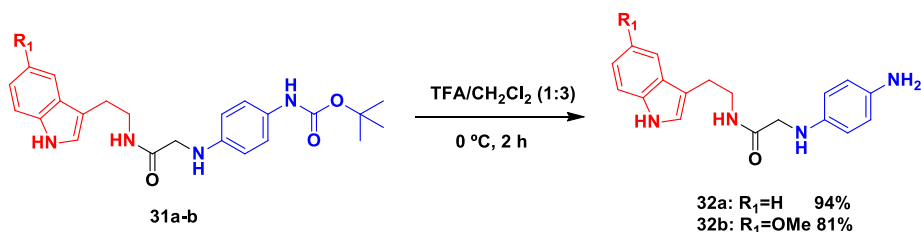
Esquema 6.14. Intento fallido para acceder al compuesto **32a** a través de **I**.

Teniendo en cuenta el motivo del fracaso anterior, se optó por partir de la *p*-fenilenediamina, que primero fue monoprottegida con dicarbonato de di-*terc*-butilo (Boc₂O) a cero grados y con un gran exceso de anilina (5:1). La reacción SN₂ entre la *p*-fenilenediamina monoprottegida y los compuestos **29** sí llegó a buen puerto, obteniéndose con buenos rendimientos los productos **31a-b**. Resultó importante para optimizar la eficacia de la reacción la selección de una base no nucleófila, observándose una notable mejora cuando se utilizó diisopropiletilamina (DIPEA) en lugar de trietilamina.



Esquema 6.15. Obtención de las anilinas protegidas **31a-b**.

La desprotección de los compuestos **31a** y **31b** requirió un pequeño cribado de condiciones (tabla 6.6), pues el intento inicial en ácido trifluoroacético no dio el resultado esperado. Se comprobó que el empleo de una mezcla de TFA/CH₂Cl₂ (1:3) a cero grados permitía la obtención de las anilinas **32a-b** con rendimientos muy elevados.

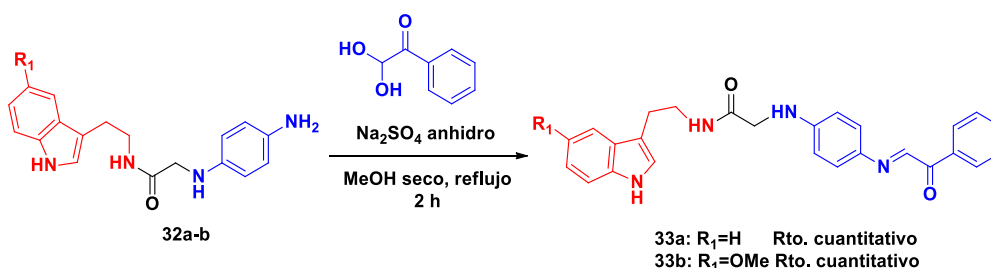


Reactivo	Disolvente	T (°C)	t (h)	Rendimiento (%)
-	TFA	0	2	24
I ₂	CH ₂ Cl ₂	25	5	-
Tiofenol	TFA/CH ₂ Cl ₂ (1:3)	0	2	Cuantitativo
-	TFA/CH ₂ Cl ₂ (1:3)	0	2	94

Esquema 6.16. Síntesis de las anilinas **32a-b**.

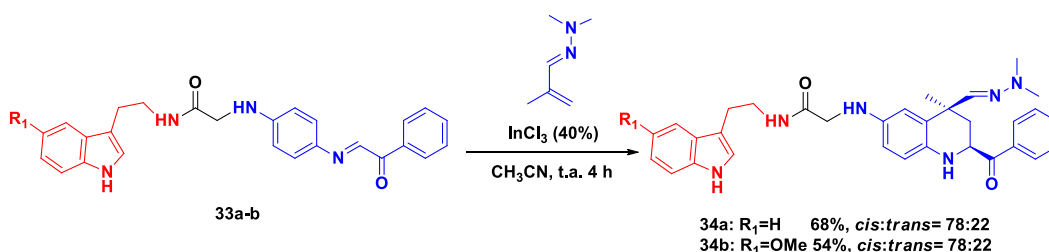
Tabla 6.6. Optimización del paso de desprotección.

La formación de la α -cetoimina necesaria para llevar a cabo la reacción de Povarov, a través de la condensación de **32a-b** con el comercialmente disponible monohidrato de fenilglioxal, requirió una variación de las condiciones habituales, esto es, diclorometano como disolvente y a temperatura ambiente. Se comprobó primero que la solubilidad de **32a** en diclorometano era bastante pobre, por lo que se decidió realizar la reacción en metanol. Después se vio que a temperatura ambiente la condensación no progresaba adecuadamente, un obstáculo que se consiguió sortear calentando a reflujo la mezcla de reacción. Así, se logró la obtención de las iminas **33a-b** con un rendimiento cuantitativo que permitía el uso de los crudos de reacción directamente en el siguiente paso.



Esquema 6.17. Formación de las α -cetoiminas **33a-b**.

La reacción de Povarov de **33a-b** con la hidrazona **2a**, conducente al aislamiento de las tetrahydroquinolinas **34a-b**, precisó el ajuste de la cantidad de catalizador, puesto que la prueba inicial usando tricloruro de indio al 10% condujo a la obtención de **34a** con sólo un 42% de rendimiento, que consiguió mejorarse hasta el 68% cuando se aumentó la cantidad de InCl_3 hasta un 40%. Probablemente la mayor voluminosidad de la imina de partida y el menor carácter electrodonador de la sustitución sobre el anillo aromático de la anilina motivaran una reactividad más limitada respecto a lo observado habitualmente en este proceso. También merece la pena destacar que la diastereoselectividad del proceso, con una proporción *cis:trans* 78:22 en ambos casos, se mantuvo en los márgenes habituales a pesar de las dificultades mencionadas, lo cual es una buena noticia pues sólo el diastereoisómero *cis* exhibe la disposición estructural necesaria para la obtención del producto final deseado.

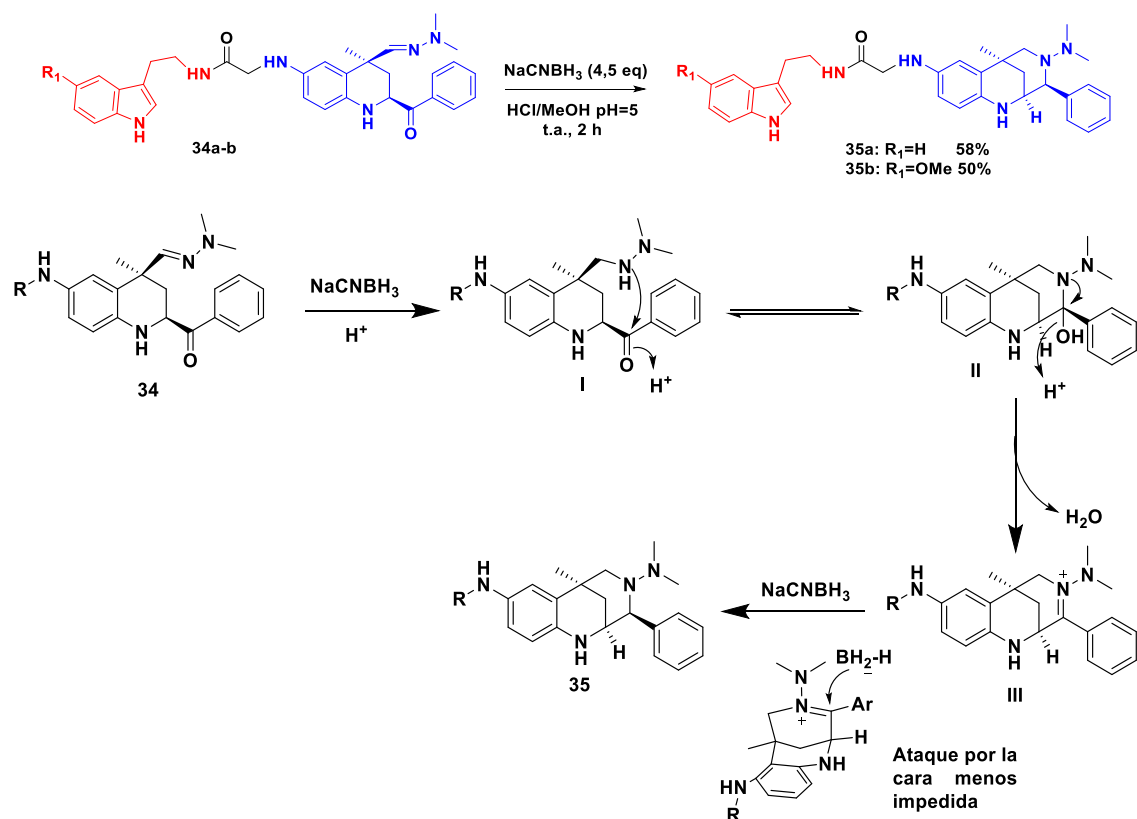


Esquema 6.18. Reacción de Povarov para la obtención de las tetrahydroquinolinas **34a-b**.

Finalmente, el tratamiento de los derivados **34a-b** con un exceso de cianoborohidruro sódico, en una solución de HCl acuoso en metanol con un pH ligeramente ácido y a temperatura ambiente, permitió la preparación de los ligandos multidiana finales **35a** y **35b** con rendimientos moderados y en forma de un único diastereoisómero. Esta ciclación reductora intramolecular se basa en el mismo proceso dominó que ya se ha descrito varias veces a lo largo de esta tesis: la hidrazona inicial se reduce quimioselectivamente a la hidracina **I**, tras lo cual se produce una condensación intramolecular que da lugar al intermedio **II**. La deshidratación del hemiaminal resulta en la formación de **III**, que a su vez se reduce al producto final **35** por acción de un segundo equivalente de hidruro, que entra por la cara superior de la molécula al ser la menos impedida (esquema 6.19).

Como en el caso de la familia A, la intención original era obtener tres ligandos multidiana que divergiesen en el fragmento de triptamina, un objetivo que no se cumplió para la 5-

hidroxitriptamina, si bien las numerosas variantes requeridas en su finalmente fallida ruta sintética merecen una breve mención.

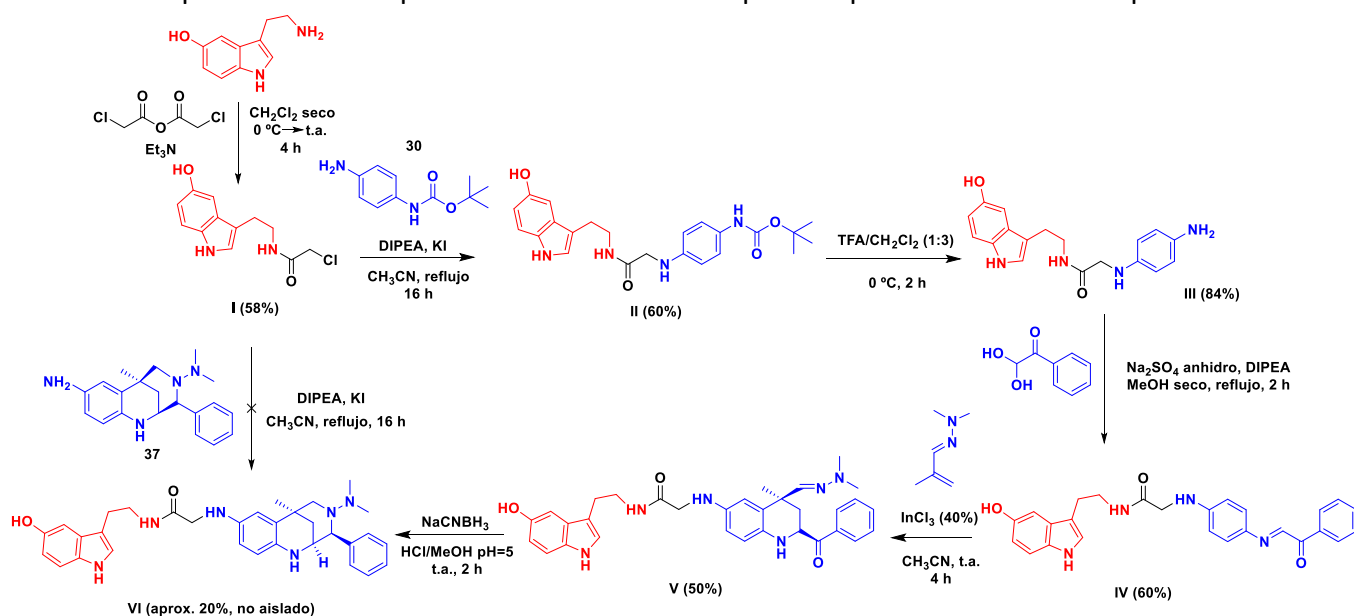


Esquema 6.19. Obtención de los compuestos finales 35a-b. Mecanismo de la ciclación reductora intramolecular.

En primer lugar, se observó que la reacción de acilación de la 5-hidroxitriptamina con cloruro de cloroacetilo no daba resultado alguno, un problema que se consiguió superar empleando anhídrido cloroacético como reactivo acilante para obtener I con un rendimiento del 58%. La reacción de SN₂ entre I y la anilina 30 rindió el compuesto II, para cuya desprotección hubo que endurecer sustancialmente las condiciones optimizadas para los derivados 32a-b puesto que en éstas apenas se apreciaba liberación de la amina. Finalmente, se consiguió una buena conversión en una mezcla de THF/CH₂Cl₂/MeOH 3:3:1 (el metanol permitió solucionar los problemas de solubilidad que también presentaba II) a temperatura ambiente durante 24 horas. Aquí vino el siguiente problema: la elevada hidrosolubilidad de III impedía llevar a cabo un tratamiento acuoso básico del producto para liberarlo de su sal trifluoroacética, lo que obligó a tratar de hacerlo reaccionar directamente con el monohidrato de fenilglioxal en presencia de DIPEA para intentar disociar la sal *in situ* y poder formar la α -cetoimina IV.

El éxito de esta estrategia fue relativo, pues se consiguió una conversión aproximada del 70% pero el crudo de reacción carecía de la limpieza aconsejable para ser empleado tal cual en la reacción de Povarov. Aun así, se hizo un intento usando como dienófilo nuevamente la hidrazona **2a**, obteniendo la tetrahidroquinolina **V** en un rendimiento cercano al 50%. Los problemas de solubilidad y las dificultades encontradas durante la purificación impidieron el aislamiento del producto puro, pero se decidió intentar la ciclación reductora con NaCNBH₃. Si bien se observó la formación del compuesto final **VI**, su purificación fue imposible a pesar de los numerosos intentos por columna cromatográfica y por placa de capa preparativa que se llevaron a cabo. La alta proporción de impurezas en el crudo de reacción, sumado a su bajo rendimiento y los problemas de solubilidad impidieron sumar este producto a los otros dos ligandos multidiana de la familia B ya obtenidos. También se intentó una reacción SN2 entre el compuesto **I** y la anilina **37**, que constituye el fragmento diazabicclico construido por separado y cuya síntesis se detallará en el siguiente apartado, mas el resultado fue el mismo.

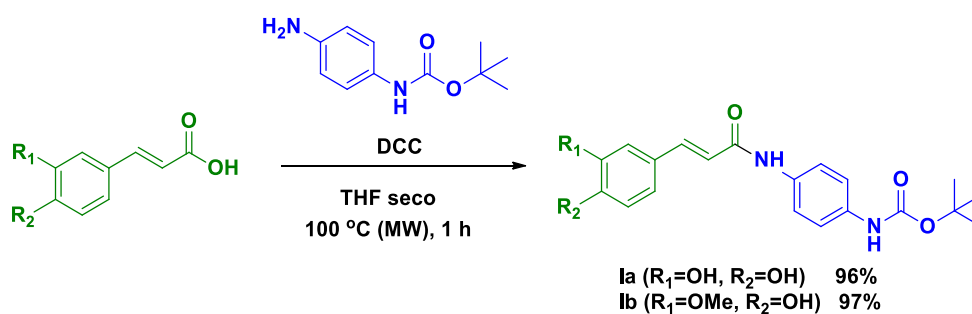
Al no haber conseguido alcanzar la síntesis del producto final, no se incluye la descripción de los compuestos de esta ruta en la parte experimental de este capítulo.



Esquema 6.20. Intentos fallidos de obtención del compuesto VI.

6.5 Síntesis de derivados híbridos de metanobenzodiazocina-ácidos cinámicos/ácido lipoico (familia C)

La síntesis de la familia C de compuestos multidiana presenta la particularidad de haberse completado siguiendo un orden totalmente contrario al que preveía el diseño original de la ruta sintética. El plan inicial contemplaba, en primer lugar, la unión de los distintos ácidos con la *p*-fenilenodiamina monoprottegida mediante química de péptidos. En la tabla 6.7 se recogen los distintos intentos efectuados, utilizando el ácido cafeico: inicialmente, el uso de EDCI en presencia o ausencia de HOAt con distintas bases, disolventes y temperaturas arrojó rendimientos muy modestos, inaceptables teniendo en cuenta que se trataba del primer paso de la ruta de síntesis. Se exploró también la posibilidad de convertir el ácido cafeico en su cloruro para después hacer una sencilla acilación, pero el tratamiento del ácido cafeico con cloruro de tionilo no proporcionó el producto esperado. Finalmente se observó que el empleo de DCC, aparentemente una carbodiimida más rudimentaria, permitía la obtención de **1a** con un rendimiento del 96% cuando la reacción se efectuaba a 100 °C en el microondas y en THF seco.



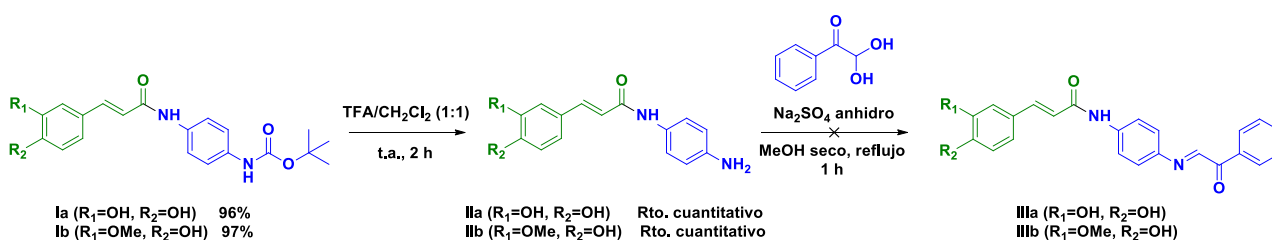
Reactivos	Disolvente	T (°C)	t (h)	Rendimiento (%)
EDC·HCl, Et ₃ N	THF seco	Reflujo (66)	7	17
EDC·HCl, HOAt, Et ₃ N	THF seco	Reflujo (66)	120	27
EDC·HCl, Et ₃ N	THF seco	100 (MW)	0,75	42
EDC·HCl, DIPEA	THF seco	100 (MW)	1	41
SOCl ₂ , DMF	CH ₂ Cl ₂ seco	75	24	-
DCC	THF seco	100 (MW)	1	96

Esquema 6.21. Acoplamiento mediado por DCC conducente a la obtención de **1a-b**.

Tabla 6.7. Optimización del paso de formación de la amida.

El único inconveniente de este método reside en la dificultad para separar el producto deseado de la diciclohexilurea que se forma como subproducto del acoplamiento.

La desprotección de **1a** en una mezcla de THF/CH₂Cl₂ a temperatura ambiente funcionó igualmente bien, pero las expectativas se vinieron abajo en el siguiente paso, que comprendía la reacción de la anilina libre **11a** con el monohidrato de fenilgloxal para formar la α -cetoimina **111a**. A pesar de las numerosas y variadas condiciones ensayadas, recogidas en la tabla 6.8, no se pudo obtener la cetoimina buscada. De hecho, en algunos de los casos se observó por RMN cómo la imina se empezaba a formar y luego parecía revertirse el proceso, lo que parece apuntar a una gran inestabilidad de este tipo de iminas como la causa del fracaso.



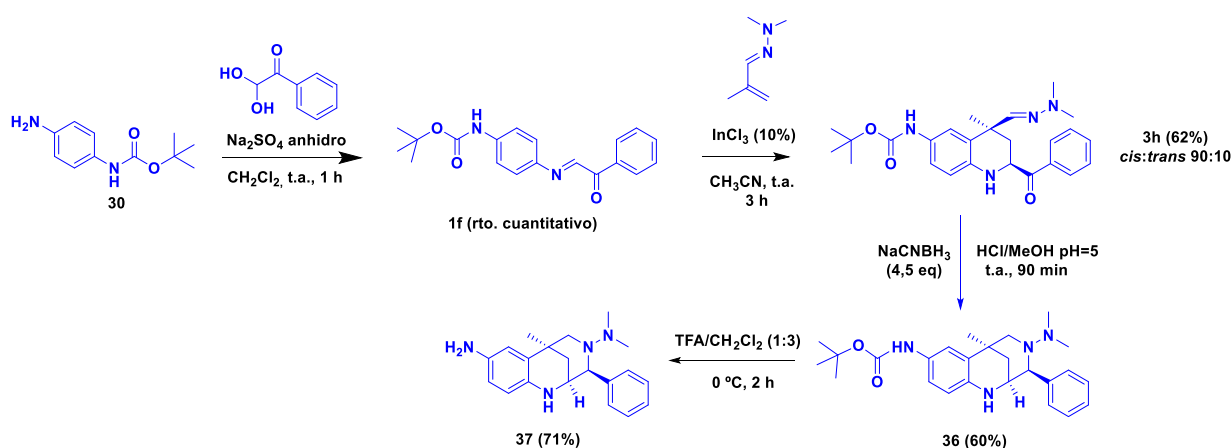
Disolvente	React./Cat.	T (°C)	t (h)	Conversión (%)
MeOH seco	Na ₂ SO ₄ anh.	Reflujo (65)	4	-
EtOH seco	Na ₂ SO ₄ anh.	Reflujo (78)	16	25% a las 3 h 0% a las 16 h
EtOH seco	Na ₂ SO ₄ anh., AcOH	Reflujo (78)	4	-
EtOH seco	Na ₂ SO ₄ anh., InCl ₃ (0,2 eq)	Reflujo (78)	4	-
EtOH seco	Na ₂ SO ₄ anh. -/AcOH	100 (MW)	1	-
No (HSVM 20 Hz)	Na ₂ SO ₄ anh. -/AcOH	25	1	-
Tolueno seco	-	Reflujo en Dean Stark (110)	3	25% a las 3 h 0% a las 16 h
THF seco	-	40	4	-
EtOH seco	-	80 (MW)	0,25	-

Esquema 6.22. Estrategia prevista para la obtención de **111a-b**.

Tabla 6.8. Tentativas fallidas de formación de las α -cetoiminas **111**.

En vista del poco éxito obtenido, se decidió invertir el orden de los pasos de la ruta: primero se buscaría obtener el núcleo diazabíclico, y luego se acoplaría con los distintos ácidos antioxidantes. Esta nueva estrategia se inició con la síntesis de la α -cetoimina de partida **1f** a partir de *p*-fenilenodiamina monoprottegida y monohidrato de fenilgloxal en las condiciones habituales, esto es, usando diclorometano como

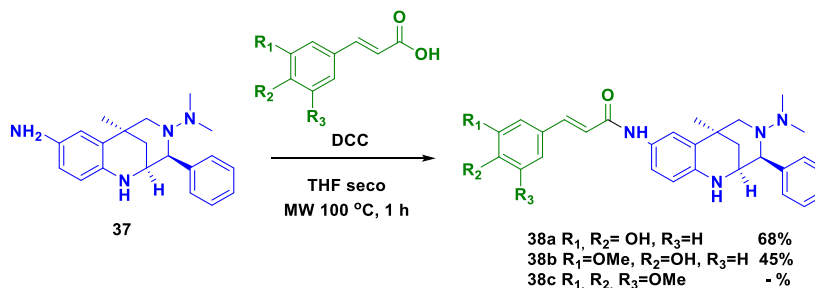
disolvente, sulfato sódico anhidro como agente desecante y a temperatura ambiente. A continuación, se efectuó una reacción de Povarov aza-viníloga entre **1f** y la hidrazona **2a** en presencia de un 10% de tricloruro de indio, generándose la tetrahydroquinolina **3h** con buen rendimiento y, sobre todo, con muy buena diastereoselectividad (90:10 en favor del isómero *cis*). El tratamiento de **3h** con un exceso de cianoborohidruro sódico en un medio ligeramente ácido permitió la obtención de **36**, a través de la ciclación reductora intramolecular descrita ya en varios apartados anteriores. La preparación de **37**, el último intermedio común de la ruta sintética, se verificó mediante la desprotección de **36** en una mezcla de TFA/CH₂Cl₂ a 0 °C.



Esquema 6.23. Ruta sintética para la obtención del fragmento común **37**.

Llegado el momento de buscar un método que permitiese introducir todos los ácidos carboxílicos elegidos en la estructura final de los compuestos multidiana, se quiso aprovechar el trabajo de optimización realizado previamente para su acoplamiento con la anilina **30** (tabla 6.7). Se comprobó que la reacción de los ácidos cafeico y ferúlico con **37** en presencia de DCC, siguiendo el mismo protocolo escogido para la síntesis de **1a-b**, procuraba los productos finales **38a-b** con rendimientos aceptables, persistiendo como único inconveniente la dificultosa eliminación de la diciclohexilurea formada en el proceso como subproducto. Hay que destacar que, mientras que el ácido cafeico reaccionaba por completo bajo estas condiciones, la reacción con ácido ferúlico sólo evolucionaba hasta consumir un 60-70% del mismo, sugiriendo la influencia de los hidroxilos libres en la reactividad del ácido. Esta suposición se vio apuntalada por la imposibilidad de hacer reaccionar **37** con el ácido trimetoxicinámico, ni en estas condiciones ni empleando EDCI como reactivo de acoplamiento, hecho que obligó a

buscar una estrategia alternativa: formar el cloruro de ácido para efectuar una posterior reacción de acilación.



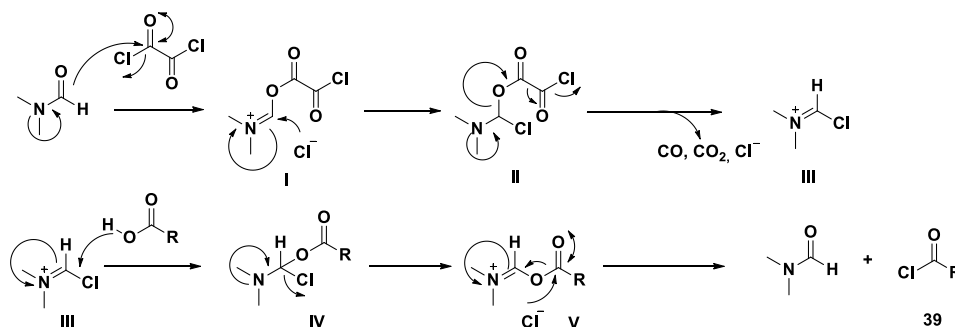
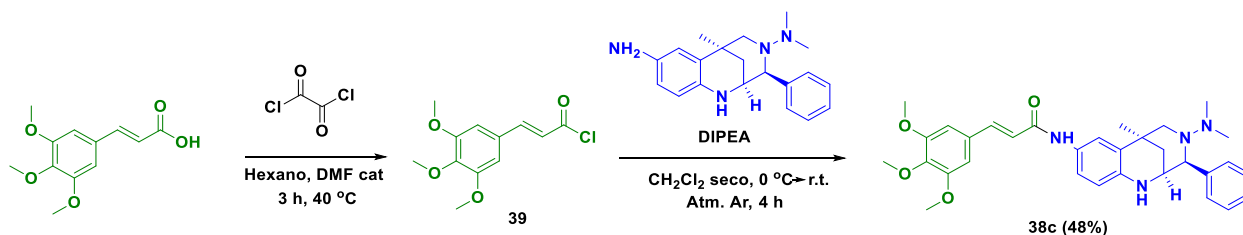
Esquema 6.24. Síntesis de las amidas **38a-b**.

Para transformar el ácido trimetoxicinámico en su cloruro se utilizó un método bibliográfico consistente en el tratamiento con cloruro de oxalilo usando hexano como disolvente y DMF como catalizador, siguiendo dicha transformación un mecanismo que en parte recuerda al de la reacción de Vilsmeier³⁵⁴ (esquema 6.25). Tras tres horas de reacción a 40 °C se verificó la conversión completa del ácido en el cloruro **39**, el cual fue además fácilmente recuperable del medio de reacción ya que quedó en suspensión en el hexano, mientras que el cloruro de oxalilo en exceso permanecía adherido al matraz de reacción. La acilación de **37** con el cloruro **39** en presencia de DIPEA y con diclorometano seco como disolvente permitió la obtención del producto deseado **38c**, siendo necesario realizar la adición del cloruro sobre la amina (ambos ya en disolución) a una temperatura próxima a 0 °C y un estricto mantenimiento de la atmósfera inerte para optimizar el rendimiento al máximo, si bien a pesar de todas las precauciones no se consiguió rebasar el 48%. También es muy aconsejable utilizar el cloruro de ácido recién sintetizado, ya que es sensible a la humedad del ambiente y se va degradando lentamente tras su obtención. Cuando se hizo una prueba para ver si se podía aplicar este segundo método a la síntesis de **38b**, se comprobó con sorpresa que la reacción del cloruro de feruloilo con **37** rendía una mezcla compleja con un rendimiento muy bajo del producto esperado.

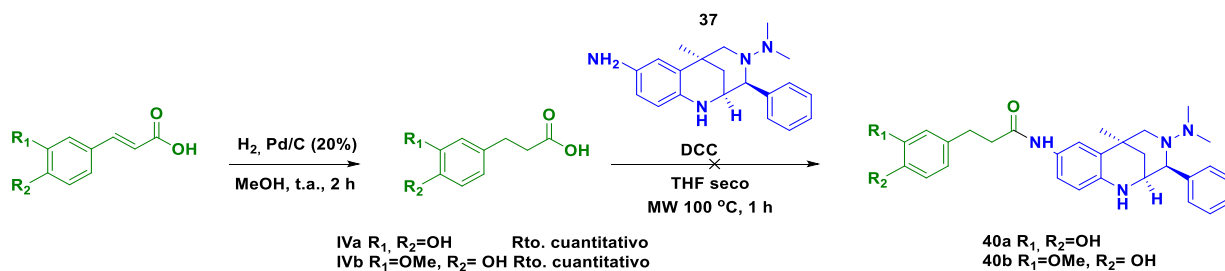
En un principio se pensó utilizar también el protocolo de acoplamiento peptídico con DCC para unir los ácidos cinámicos reducidos al compuesto **37**. Si bien la hidrogenación catalítica de los ácidos cafeico y ferúlico rindió cuantitativamente los productos **IVa-b**,

³⁵⁴ Kourra, C., Klotter, F., Sladojevich, F., Dixon, D. J. *Org. Lett.* **2012**,*14*, 1016.

éstos no fueron capaces de reaccionar con **37** en las condiciones seleccionadas, ni siquiera aumentando la temperatura hasta 120-130 °C (esquema 6.26).

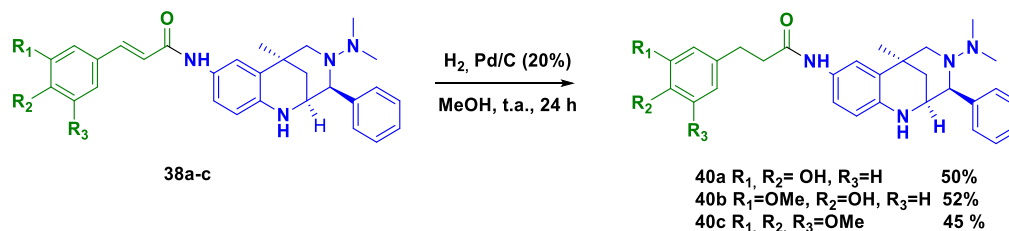


Esquema 6.25. Síntesis de **38c**. Mecanismo de formación del cloruro de ácido.



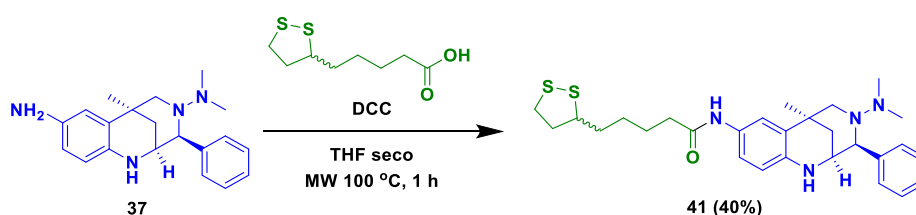
Esquema 6.26. Estrategia fallida para la obtención de los compuestos **40a-b**.

Se optó entonces por cambiar el enfoque e intentar reducir directamente los compuestos **38a-b**, observándose afortunadamente que su hidrogenación en presencia de un 20% de Pd/C durante 24 horas generaba los productos **40a** y **40b** con una eficacia aceptable. Esta estrategia se pudo aplicar también de forma exitosa para sintetizar **40c** desde **38c**.



Esquema 6.27. Obtención de las amidas **40a-c**.

Finalmente, se abordó la síntesis del conjugado de **37** con ácido lipoico. Habiéndose observado que el protocolo de acoplamiento mediado por DCC no había funcionado con los ácidos carboxílicos cuya cadena lateral estaba saturada, nos decantamos por formar el cloruro de lipoilo para sintetizar después la amida correspondiente. Esta expectativa se vio rápidamente truncada, pues el tratamiento del ácido lipoico con cloruro de oxalilo no condujo a la formación del cloruro de lipoilo. En cambio, el acoplamiento directo de **37** con el ácido lipoico, asistido por DCC bajo las condiciones seleccionadas anteriormente, permitió acceder al compuesto **41**, si bien con un rendimiento modesto. Puede llamar la atención que se emplease el ácido lipoico como mezcla racémica ya que, teniendo en cuenta que **37** también es racémico, la reacción da lugar realmente a una mezcla de diastereoisómeros. La explicación reside en el alto precio del ácido lipoico en forma enantiopura y la mayor dificultad para obtener **37** de forma enantioselectiva, circunstancias que nos movieron a sintetizar primero **41** como una mezcla de diastereoisómeros para hacer los ensayos farmacológicos iniciales, y sólo acometer la síntesis con los productos de partida enantiopuros en caso de que los resultados biológicos fuesen realmente interesantes. Además, como era de esperar, la lejanía de los centros quirales en la estructura de **41** hace que sea imposible separar los dos diastereoisómeros mediante una columna cromatográfica, e incluso que no sean distinguibles en los espectros de RMN de protón y carbono, y cabe esperar por tanto que no haya una diferencia significativa en sus perfiles farmacológicos.



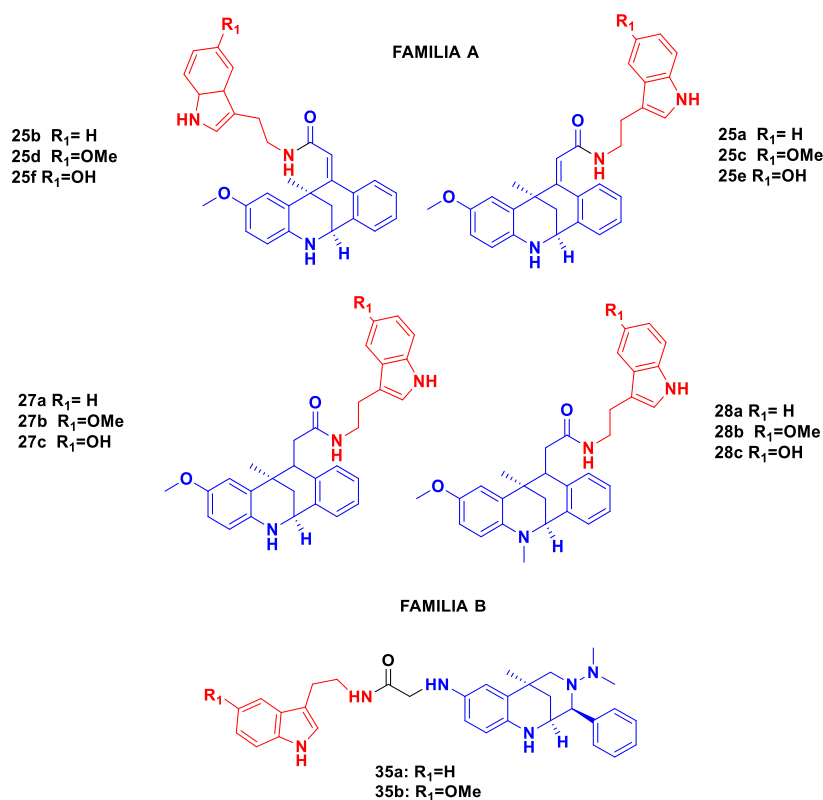
Esquema 6.28. Síntesis de la lipoamida **41**.

El hecho de que la dura realidad de la química obligase a invertir el planteamiento de esta ruta de síntesis acabó por representar una ventaja a efectos prácticos, puesto que tal como ha quedado configurada, se sintetiza un intermedio común (**37**) del que luego se pueden obtener los diversos productos finales en un último paso divergente. Entonces surgirá la pregunta, ¿por qué no se planteó así la síntesis desde el principio? Tiene respuesta: inicialmente se pensaba que el compuesto **37** no sería estable bajo las

exigentes condiciones de reacción requeridas para el acoplamiento mediado por DCC, y sólo los problemas aparecidos durante el desarrollo de la estrategia original nos empujaron a ensayar esta alternativa.

6.6 Caracterización farmacológica de las familias A, B y C de ligandos multidiana

Los compuestos pertenecientes a las tres nuevas familias de ligandos multidiana cuya síntesis se ha detallado en este capítulo fueron sometidos a una evaluación farmacológica para valorar su actividad antioxidante y neuroprotectora. Dicha evaluación se realizó durante dos estancias llevadas a cabo en el laboratorio de la profesora Barbara Monti, perteneciente al Departamento de Farmacia y Biotecnología de la Universidad de Bolonia (Italia); y en el laboratorio del Dr. Rafael León, del Instituto Fundación Teófilo Hernando, asociado a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. En el primero de ellos se llevaron a cabo los ensayos de toxicidad y neuroprotección, mientras que en el segundo se evaluó la actividad antiinflamatoria, así como otros aspectos más concretos sobre el mecanismo de acción de los nuevos ligandos multidiana.



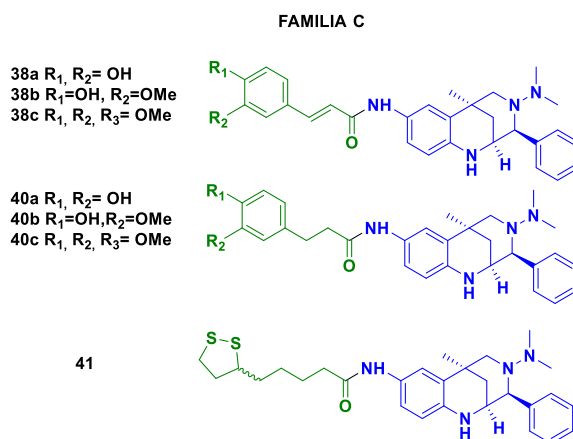


Figura 6.12. Resumen de las estructuras químicas de los ligandos multidiana pertenecientes a las familias A, B y C.

A fin de establecer la relación estructura-actividad considerando la máxima cantidad de información posible, se introdujeron en los ensayos que se consideró oportuno algunos compuestos representativos de los fragmentos que forman parte de los distintos ligandos multidiana, como es el caso de **23**, **36**, **37** o la melatonina. De este modo, se pudo evaluar cuál era la actividad farmacológica de los fragmentos por separado y como ésta se veía afectada cuando eran integrados en una única entidad química.

Como no podía ser de otra forma, el primer aspecto valorado fue la neurotoxicidad de los compuestos, en aras de eliminar del proceso de evaluación todas aquellas moléculas que presentasen un perfil de toxicidad desfavorable. Con este fin, se incubaron cultivos primarios de gránulos cerebelares de ratón con tres concentraciones diferentes de cada compuesto (5, 10 y 25 μM) durante 24 horas, evaluándose posteriormente la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT. Como se puede observar en la figura 6.13, todos los compuestos presentaron una toxicidad baja o nula a las concentraciones más bajas (5 y 10 μM), mientras que algunos derivados, como **25a**, **27a**, **35a**, **38a-b** y **40a-b** causaron una reducción significativa de la viabilidad celular a 25 μM , de hasta el 50% en algún caso. Considerándose esta última una concentración ya bastante elevada, y teniendo en cuenta que a las concentraciones más bajas todos los compuestos resultaron inocuos, se consideró que la totalidad de los compuestos había superado esta primera criba.

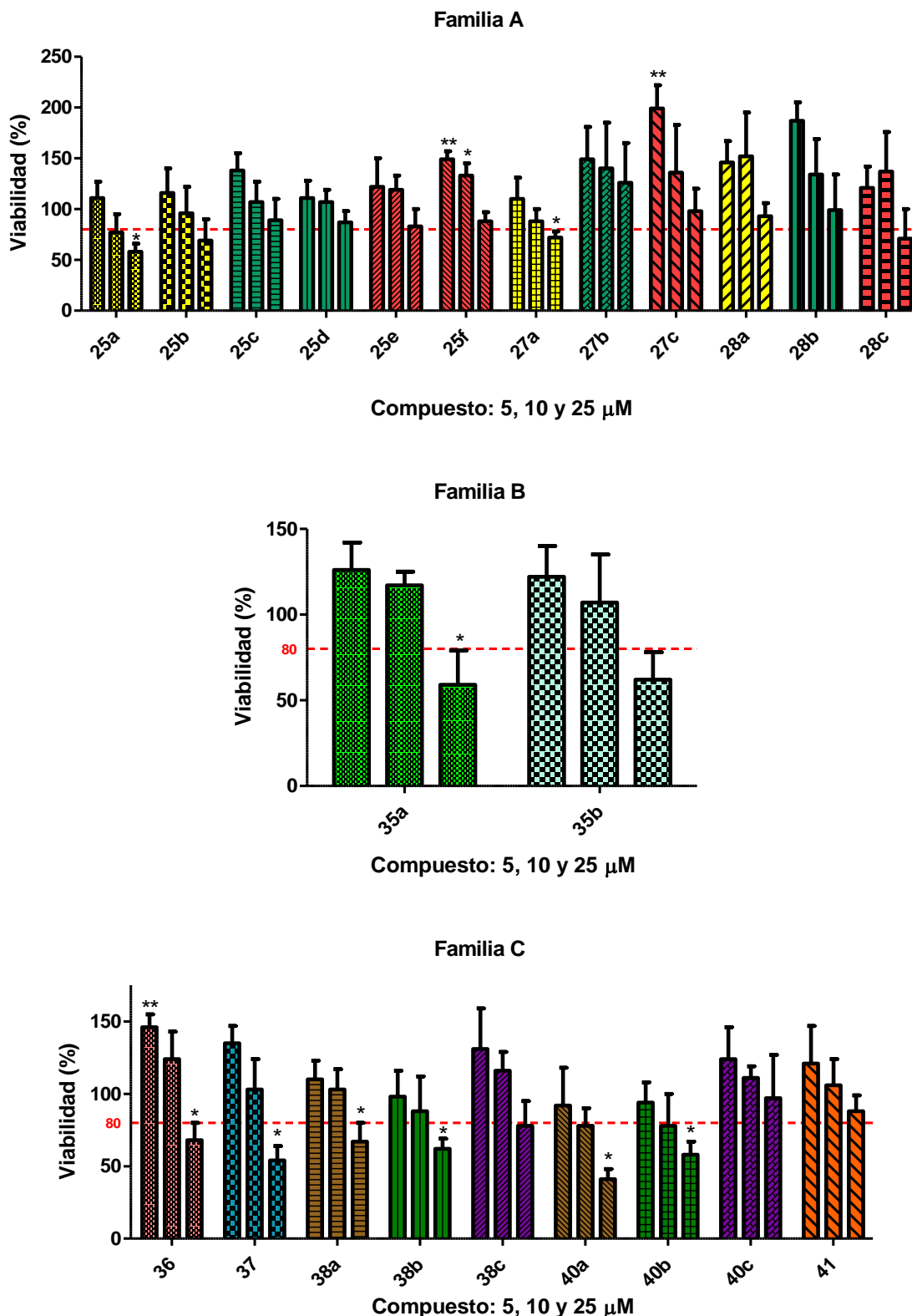


Figura 6.13. Toxicidad de los compuestos de las familias A, B y C a las concentraciones de 5, 10 y 25 μM en cultivos primarios de gránulos cerebelares. Los datos están expresados como la media $\pm \sigma$ de tres experimentos, cada uno de ellos por cuadruplicado. El tratamiento estadístico consistió en una prueba ANOVA de una vía y un post-test de Dunnett para comparaciones múltiples: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; comparado con la viabilidad de la condición basal (sin tratamiento).

Los derivados **25f**, **27c**, **28b** y **36** destacaron por un fenómeno que pudiera parecer *a priori* un tanto extraño, ya que causaron un aumento significativo de la viabilidad celular a 5 μ M. Hay que tener en cuenta que el ensayo de MTT es una medida indirecta de la viabilidad celular, pues lo que se mide en realidad es la capacidad de las células para reducir en la mitocondria el MTT a un derivado de formazano, cuya absorbancia a 570 nm permite cuantificar la mortalidad celular. Aquellos compuestos que modifican la actividad mitocondrial son capaces de “falsear” en cierto modo el resultado de este ensayo, lo que podría explicar la anomalía observada en el caso de que estos compuestos fuesen activadores de la función mitocondrial. Cuando esto ocurre, resulta conveniente efectuar un ensayo de viabilidad alternativo, como por ejemplo una tinción de núcleos celulares con el colorante Hoechst para proceder al conteo de las células. Desgraciadamente, el experimento forma parte del trabajo que queda aún pendiente de realización, por lo que no se ha podido incluir en la memoria.

Una vez se determinó que los compuestos no eran tóxicos, se pasó a los ensayos de neuroprotección utilizando un modelo de toxicidad neuronal basado en la privación de suero y potasio, que consiste básicamente en el mantenimiento de las células en un medio carente de ambos elementos. El suero es fundamental para el cultivo de cualquier tipo celular, pues contiene una gran cantidad de nutrientes, hormonas y factores de crecimiento; esenciales todos ellos para la supervivencia y proliferación celular. La presencia de una concentración elevada de potasio en el medio de los cultivos primarios de neuronas es fundamental para permitir su supervivencia más allá de 3-5 días, pues como células excitables que son, requieren una concentración de potasio despolarizante (25 mM) para mantener el correcto funcionamiento de algunas funciones fisiológicas clave, como la regulación de la entrada de calcio en la célula. Cuando se combina la privación de suero y de potasio, se induce una grave alteración del metabolismo y el funcionamiento fisiológico general de la neurona, verificándose un deterioro de la función mitocondrial, aumento del estrés oxidativo, fragmentación del ADN y, finalmente, la entrada de las neuronas en apoptosis. Todas estas características aparecen en las neuronas que atraviesan un proceso de degeneración patológica, lo que

docta al modelo de utilidad para la evaluación de agentes neuroprotectores^{355,356}. Hay que destacar que éste es un modelo de neurodegeneración más “fisiológico”, pues implica una limitación de aquellos elementos que la neurona necesita para sobrevivir, como ocurre en un contexto de envejecimiento. El protocolo utilizado para evaluar los ligandos multidiana consistió en el cultivo de los gránulos cerebelares durante 48 horas en un medio sin suero y con una concentración mínima de potasio (5 mM), en presencia de los compuestos sometidos a evaluación a las concentraciones de 5 y 10 µM. Después se midió la viabilidad celular mediante un ensayo MTT, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 6.9 y en la figura 6.14:

Compuesto	Viabilidad (%)		Neuroprotección (%)	
	5 µM	10 µM	5 µM	10 µM
5K-S*	68,95 ± 4,01		-	
MT	78,83 ± 11,80	93,58 ± 17,02	27,9	78,1
AC	95,76 ± 19,24	98,31 ± 7,05	84,6	93,9
25a	79,18 ± 19,73	89,47 ± 25,55	34,0	66,6
25b	85,76 ± 14,67	76,87 ± 8,76	54,9	26,7
25c	71,29 ± 8,72	82,03 ± 8,12	9,1	43,1
25d	79,52 ± 5,15	79,01 ± 8,08	35,6	34,0
25e	84,11 ± 14,01	77,27 ± 16,11	50,1	28,6
25f	86,19 ± 13,83	92,08 ± 17,09	56,6	75,1
27a	78,83 ± 15,57	74,32 ± 11,99	32,9	18,7
27b	69,69 ± 7,57	79,89 ± 12,99	4,7	36,8
27c	72,90 ± 22,27	70,32 ± 8,27	7,7	-
28a	75,15 ± 3,06	73,73 ± 9,56	21,3	16,8
28b	69,79 ± 6,21	71,02 ± 19,37	5,0	8,9
28c	90,25 ± 26,57	82,06 ± 9,95	66,8	38,9
35a	79,80 ± 12,17	75,23 ± 12,89	35,2	20,6
35b	86,46 ± 20,44	76,19 ± 23,54	56,6	23,7
38a	67,04 ± 14,11	60,63 ± 13,80	-	-
38b	66,11 ± 12,31	67,15 ± 21,65	-	-
38c	87,13 ± 21,34	93,90 ± 27,66	58,8	80,5
40a	62,18 ± 8,23	46,22 ± 1,06	-	-
40b	83,35 ± 18,83	82,27 ± 13,18	39,5	35,6
40c	70,28 ± 1,75	69,88 ± 11,22	-	-
41	95,76 ± 19,24	98,31 ± 7,06	84,6	93,9

Tabla 6.9. Porcentajes de viabilidad y neuroprotección de los compuestos de las familias A, B y C a las concentraciones de 5 y 10 µM en el modelo de neurotoxicidad provocada por la privación de suero y potasio a cultivos primarios de gránulos cerebelares de ratón.

*Condición tóxica del experimento: mantenimiento de las células en un medio sin suero y con una concentración de potasio de 5 mM.

³⁵⁵ Gallo, V., Kingsbury, A., Balazs, R., Jorgensen, O. S. J. *Neurosci.* **1987**, 7, 2203.

³⁵⁶ Contestabile, A. *Cerebellum.* **2002**, 1, 41.

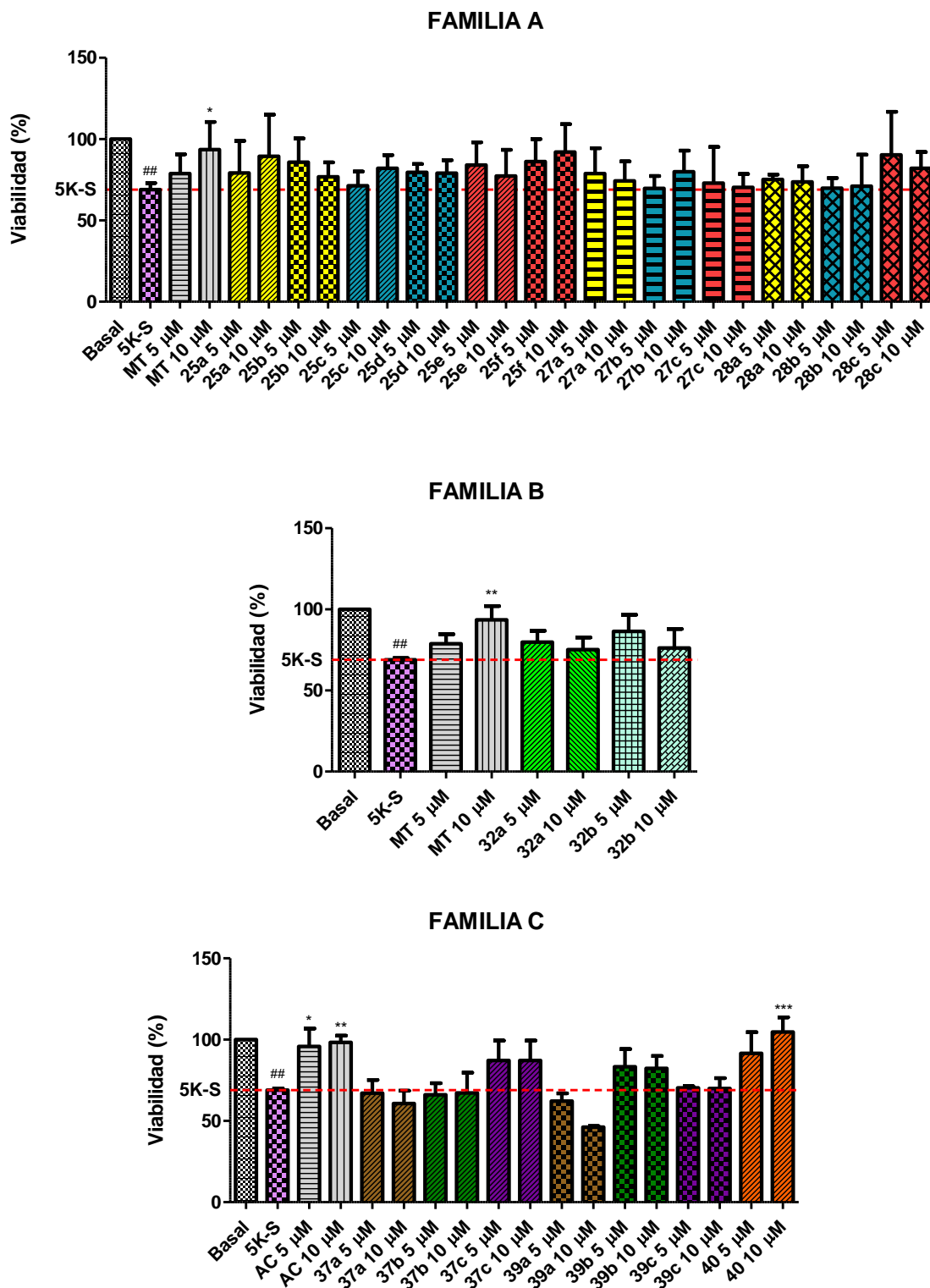


Figura 6.14. Actividad neuroprotectora de los compuestos de las familias A, B y C a las concentraciones de 5 y 10 μ M en cultivos primarios de gránulos cerebelares sometidos a una privación de suero y potasio por 48 horas. Los datos están expresados como la media $\pm \sigma$ de tres experimentos, cada uno de ellos por cuadruplicado. El tratamiento estadístico consistió en una prueba ANOVA de una vía y un post-test de Bonferroni: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; comparado con la viabilidad de la condición basal (sin tratamiento). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; comparado con la viabilidad de la condición tóxica (sin tratamiento).

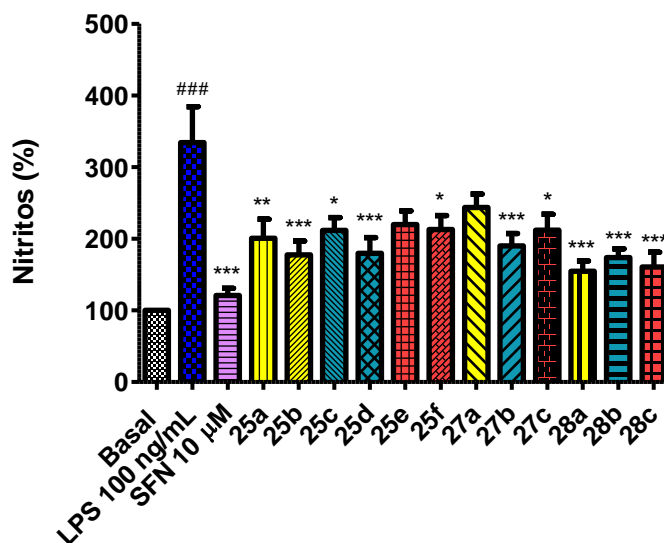
Los resultados obtenidos en este experimento son algo difíciles de interpretar, posiblemente debido a la complejidad del manejo de los cultivos primarios y a la variabilidad intrínseca al experimento. Por tanto, sería necesario ensayar otros modelos de neurotoxicidad y otros tipos de cultivos (primarios o de líneas inmortalizadas) para consolidar los datos de neuroprotección. No obstante, no hay que desdeñar la información que nos proporciona el trabajo realizado. Los derivados **25a**, **25f**, **38c** y **41** dieron los mejores resultados a la hora de rescatar a las neuronas de la mortalidad infligida por la privación de suero y potasio, con porcentajes de neuroprotección que superan claramente el 60% a 10 μM y que manifiestan una buena correlación con la concentración de compuesto empleada. Merece la pena destacar especialmente la capacidad neuroprotectora de la lipoamida **41**, que a 5 μM reduce la mortalidad neuronal en un 85% y a 10 μM restituye la viabilidad celular prácticamente a los niveles observados en ausencia del estímulo deletéreo. En cuanto al resto de compuestos, la gran mayoría ejercen un cierto efecto neuroprotector, que en el caso de algunos como **25b**, **25e**, **28c** y **35b** llega a ser mayor al 50% a 5 μM , si bien en ocasiones el incremento de la concentración se traduce en un descenso del efecto beneficioso por razones desconocidas, quizá relacionadas con un descenso del umbral de toxicidad de algunos derivados en los cultivos privados de suero y potasio o simplemente achacables a la variabilidad del experimento. No se aprecian relaciones estructura-actividad muy nítidas, aunque parece que dentro de la familia A tienen a ser más activas las amidas α,β -insaturadas, mientras que el derivado de 5-metoxitriptamina de la familia B **35b** es más neuroprotector en este modelo que su análogo de triptamina **35a**. Por su parte, la familia C aparece en líneas generales como la menos activa en este ensayo, aunque con las importantes excepciones de **38c** y **41**.

Ya se ha revisado extensamente el papel de la respuesta inflamatoria en la instauración del proceso neurodegenerativo. Por ello, consideramos importante evaluar la capacidad de los nuevos compuestos multidiana para reducir la respuesta inflamatoria de la microglía, utilizando cultivos celulares de la línea BV-2 de microglía murina inmortalizada. El protocolo empleado consistió en un pretratamiento con los compuestos multidiana a la concentración de 5 μM durante 24 horas, después de lo cual se añadió lipopolisacárido bacteriano a una concentración de 100 ng/mL para estimular

la respuesta inflamatoria. Tras otras 24 horas de coincubación del estímulo inflamatorio junto con los compuestos sujetos a ensayo, el medio de cultivo se recogió para cuantificar los nitritos liberados por la microglía mediante el método de Griess. En las figuras 6.15-6.17 y la tabla 6.10 se recogen los resultados obtenidos para los derivados de las familias A, B y C:

Compuestos (5 μ M)	Reducción producción nitritos (%)	Sign. estad.
Sulforafano (10 μ M)	92,37 \pm 14,23	***
25a	65,50 \pm 19,11	**
25b	70,91 \pm 19,67	***
25c	61,93 \pm 9,66	*
25d	75,37 \pm 10,42	***
25e	59,49 \pm 8,90	n.s.
25f	60,33 \pm 18,03	*
27a	43,56 \pm 20,26	n.s.
27b	67,18 \pm 10,59	***
27c	57,08 \pm 22,01	*
28a	80,31 \pm 17,05	***
28b	71,46 \pm 10,74	***
28c	80,65 \pm 4,28	***
35a	75,02 \pm 8,39	***
35b	62,11 \pm 15,78	**
38a	70,06 \pm 14,66	***
38b	71,71 \pm 15,18	**
38c	80,35 \pm 11,81	***
40a	75,86 \pm 13,62	***
40b	55,09 \pm 21,65	**
40c	64,45 \pm 15,33	***
41	37,46 \pm 18,63	n.s.

Familia A (5 μ M)



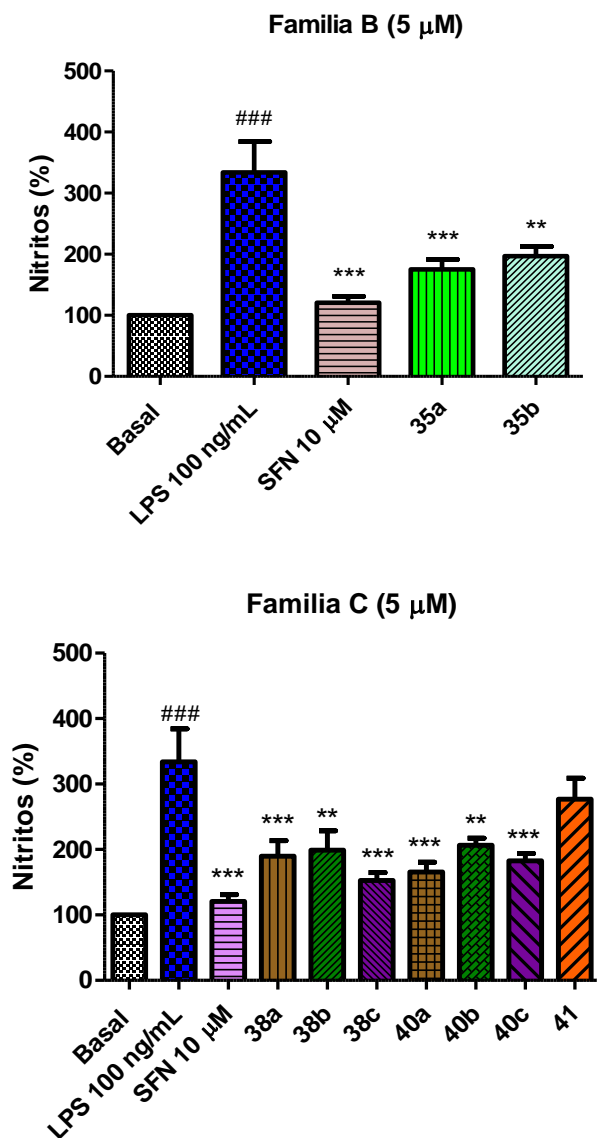


Tabla 6.10. Figura 6.15. Figura 6.16. Figura 6.17. Reducción de la producción de nitritos causada por el tratamiento con los compuestos de las familias A, B y C de cultivos celulares de microglía BV2 estimulados con LPS. El resultado se expresa como la media \pm SD de al menos cinco experimentos. El tratamiento estadístico consistió en una prueba ANOVA de una vía y un post-test de Newman-Keuls: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ comparado con la producción de nitritos de la condición basal (no tratada) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ con respecto a la producción de nitritos provocada por el tratamiento con LPS

A bote pronto, merece la pena destacar que todos los derivados ensayados son capaces, a la concentración de 5 µM, de reducir la respuesta inflamatoria de la microglía inducida por el tratamiento con lipopolisacárido. La mayoría de los compuestos muestran una actividad destacable, con porcentajes de reducción de la producción de nitritos superiores al 50%, siendo no pocos los compuestos que consiguen atenuarla en un 70-80%. La capacidad antiinflamatoria es bastante homogénea si se comparan globalmente las tres familias, aunque cabe realizar algunas puntualizaciones dentro de cada grupo.

Por ejemplo, en la familia A se observa que la reducción del doble enlace vecino al grupo amida no altera sustancialmente las prestaciones de los compuestos en este ensayo, pero si a esta modificación se le añade la metilación del nitrógeno del tetraciclo, la actividad sí experimenta un moderado incremento (compuestos **28a-c**). Dentro de la familia C, la lipoamida **41** exhibe una capacidad antiinflamatoria notoriamente menor que las cinamidas.

Después de haber caracterizado la actividad general neuroprotectora y antiinflamatoria de estas tres familias de compuestos, nos dispusimos a caracterizar los posibles mecanismos de acción por los que podrían ejercer estos efectos, un aspecto que es esencial al tratarse de ligandos multidiana.

La capacidad captadora de radicales libres de los compuestos se evaluó mediante dos métodos, ORAC y DPPH. Es importante resaltar que no son ensayos biológicos sino meramente químicos, que no implican el uso de células y por tanto no miden mecanismos antioxidantes de carácter farmacodinámico, sino que sólo miden la reactividad intrínseca a sus estructuras químicas con especies radicalarias de diversa clase.

En el ensayo ORAC, cuyos pormenores se trataron en el capítulo anterior, los compuestos fueron evaluados a seis concentraciones: 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 y 3 μM . En la tabla 6.11 se muestran los resultados para los compuestos de las familias A, B y C, así como para algunos controles. Todas las moléculas evaluadas presentaron una elevada capacidad captadora de radicales de oxígeno, en general comprendida entre los 3 y los 5 equivalentes de trolox, que superó claramente a la del antioxidante de referencia en este ensayo, la melatonina. No se aprecian unas claras relaciones estructura-actividad: si acaso merece la pena destacar que los dos compuestos de la familia B, **35a** y **35b**, fueron los derivados más potentes de toda la quimioteca, sin que la sustitución sobre el anillo de triptamina marcara una diferencia significativa. Este fenómeno también se evidencia entre los compuestos de la familia A. La adición de las triptaminas y los ácidos cinámicos al núcleo diazabíciclico (representado por los compuestos **36** y **37**) no causa un cambio significativo en la actividad, si bien la introducción del ácido lipoico sí resulta algo perjudicial.

Compuesto	Captación de radicales (eq. de trolox)
Melatonina	2,41 ± 0,17
25a	3,48 ± 0,27
25b	3,74 ± 0,39
25c	3,42 ± 0,26
25d	3,62 ± 0,44
25e	3,96 ± 0,41
25f	3,76 ± 0,36
27a	3,23 ± 0,23
27b	4,16 ± 0,28
27c	3,92 ± 0,23
28a	4,40 ± 0,44
28b	4,29 ± 0,31
28c	3,62 ± 0,21
35a	4,54 ± 0,50
35b	4,57 ± 0,44
36	4,14 ± 0,36
37	4,11 ± 0,30
38a	4,02 ± 0,34
38b	3,83 ± 0,33
38c	3,96 ± 0,26
40a	4,28 ± 0,21
40b	4,01 ± 0,19
40c	3,82 ± 0,24
41	4,15 ± 0,21

Tabla 6.11. Capacidad captadora de radicales de oxígeno por parte de los compuestos de las familias A, B y C mediante el ensayo ORAC. Los resultados se expresan como la media ± SD de eq. de Trolox de cinco experimentos independientes.

La determinación de la actividad antioxidante mediante el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) se suele considerar más orientada hacia la capacidad de captación de radicales de nitrógeno, pues el propio DPPH es un radical estable de nitrógeno. Es un método más sencillo que el ORAC: el DPPH presenta una banda de absorción a 517 nm en su espectro UV-visible, no así el aducto que forma cuando reacciona con un compuesto captador de radicales, por lo que basta con poner ambos reactivos en contacto y realizar una medida espectrofotométrica tras un periodo de incubación determinado para poder cuantificar la actividad del compuesto evaluado. Se considera que este ensayo puede medir la reactividad con especies radicalarias mediante transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) y de un solo electrón (SET, *Single Electron Transfer*), aunque en la práctica opera mucho más rápidamente por este último mecanismo, y por tanto lo determina mejor. Este método reúne algunas características que a la postre lo convierten en menos robusto y versátil que el ORAC, como la fuerte

dependencia del medio, del pH y del impedimento estérico de las moléculas evaluadas (pues el DPPH ya de por sí es voluminoso); además, su validez queda restringida a moléculas con un carácter eminentemente hidrófobo. En el caso que nos ocupa, los compuestos se evaluaron a cuatro concentraciones distintas, que fueron ajustadas para cada derivado a fin de poder obtener curvas concentración/respuesta mediante un ajuste no lineal que permitiesen calcular la IC₅₀, que es el dato que se recoge en la tabla 6.12.

Paradójicamente, a pesar de ser más sencillo, el ensayo del DPPH nos permite en este caso establecer unas relaciones estructura-actividad más claras que el ensayo ORAC. En el seno de la familia A, se advierte que los compuestos más activos son los que presentan en su estructura la serotonina, y que por tanto tienen una estructura fenólica (**25e**, **25f**, **27c** y **28c**). Los fenoles pueden reaccionar con radicales libres por HAT y por SET, lo que unido a su capacidad para estabilizarse por resonancia explica sus buenos resultados en este ensayo³⁵⁷. El resto de los derivados de la familia A mantiene una actividad bastante aceptable, a excepción de los compuestos **28a** y **28b**, de cuyas CI₅₀ mayores de 100 µM se puede deducir que la metilación del nitrógeno del tetraciclo les hace perder la actividad. Los dos compuestos de la familia B (**35a** y **35b**) presentan una capacidad captadora muy destacable, conservando la que exhibe el fragmento diazabíclico (**36** y **37**) a pesar de que ninguno de los dos presenta un hidroxilo fenólico. Respecto a la familia C, los compuestos fenólicos **38a** y **38b** son potentes captadores del radical DPPH, incluso mejorando sustancialmente la actividad del ácido cafeico. En cambio, sus derivados reducidos (**40a** y **40b**) acusan una significativa pérdida de potencia, causada seguramente por el acortamiento de la insaturación extendida que permite estabilizar el radical generado. El ligando que deriva del ácido trimetoxicinámico (**38c**) es menos potente que los compuestos fenólicos, pero su reducción (**40c**) no motiva una pérdida adicional de actividad. También el derivado del ácido lipoico (**41**) tiene una potencia remarcable.

³⁵⁷ Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., Pegg, R. B. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012**, *11*, 148.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)
Ácido cafeico	11,99 ± 1,25
25a	26,98 ± 12,38
25b	29,24 ± 7,81
25c	85,94 ± 16,36
25d	29,11 ± 8,29
25e	12,32 ± 2,58
25f	9,58 ± 3,01
27a	34,16 ± 10,49
27b	17,81 ± 5,36
27c	6,45 ± 1,37
28a	>100
28b	>100
28c	10,27 ± 1,94
35a	12,49 ± 2,37
35b	15,69 ± 5,12
36	8,81 ± 1,41
37	17,60 ± 3,98
38a	3,52 ± 1,54
38b	5,99 ± 1,09
38c	13,03 ± 2,32
40a	16,51 ± 5,23
40b	19,78 ± 6,07
40c	11,54 ± 3,13
41	10,42 ± 1,65

Tabla 6.12. Evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos de las familias A, B y C mediante el método del DPPH. El resultado se expresa como la CI₅₀ ± SD, calculada mediante la realización de al menos cinco experimentos independientes, cada uno de ellos por duplicado, en los que se realizó para cada compuesto una curva de cuatro concentraciones que permitió hallar las CI₅₀ mediante un ajuste no lineal.

Los resultados de los ensayos de ORAC y DPPH avalan la capacidad intrínseca de la mayoría de los compuestos para neutralizar radicales de oxígeno y nitrógeno, pero ¿qué hay de la actividad antioxidante farmacodinámica? Para evaluarla, en primer lugar, se midió la capacidad de los ligandos multidiana para inducir la actividad del factor de transcripción Nrf2. Este ensayo también se explicó detalladamente en el capítulo 5, por lo que simplemente mostraremos las concentraciones a las que cada compuesto fue capaz de doblar la actividad basal de Nrf2 (tabla 6.13). Para calcularla, se escogieron para cada compuesto cuatro concentraciones en cuyo intervalo se encontrase la CD, de modo que ésta pudiera ser calculada trazando una curva concentración/respuesta mediante un ajuste no lineal. Se añadieron al experimento varios fragmentos de los compuestos multidiana por separado para obtener más información sobre la relación

estructura/actividad, y se utilizó la *terc*-butilhidroquinona como control positivo a 10 μ M.

Compuesto	CD (μ M)
Ácido cafeico	6,5-11,5
23	1,51 \pm 0,24
25a	0,25 \pm 0,05
25b	0,38 \pm 0,06
25c	0,81 \pm 0,21
25d	0,57 \pm 0,16
25e	>20
25f	>20
27a	0,80 \pm 0,10
27b	0,68 \pm 0,16
27c	7,53 \pm 2,70
28a	>20
28b	>20
28c	>20
35a	2,99 \pm 0,41
35b	3,81 \pm 1,61
36	2,46 \pm 0,87
37	>20
38a	>20
38b	>20
38c	7,30 \pm 2,79
40a	5,24 \pm 2,24
40b	11,21 \pm 4,16
40c	10,31 \pm 6,30
41	9,77 \pm 2,26

Tabla 6.13. Concentración que dobla los niveles basales de actividad de Nrf2 para cada uno de los compuestos de las familias A, B y C. El resultado se expresa como la CD \pm SD, calculada mediante la realización de al menos tres experimentos independientes, cada uno de ellos por duplicado, en los que se realizó para cada compuesto una curva de cuatro concentraciones que permitió hallar las CD mediante un ajuste no lineal.

Dentro de la familia A, los compuestos **25a**, **25b**, **25c**, **25d**, **27a** y **27b** exhibieron una actividad realmente potente, estando las CD de todos ellos por debajo de 1 μ M. Las amidas α,β -insaturadas con triptamina (**25a** y **25b**) fueron más potentes que sus homólogas con 5-metoxitriptamina (**25c** y **25d**), sin que esta relación se aprecie entre las amidas saturadas **27a** y **27b**. No se aprecian diferencias significativas dentro de las parejas de isómeros geométricos, por lo que la isomería del doble enlace no parece influir en la actividad inductora de Nrf2. Otro dato importante reside en el hecho de que la pérdida de la función aceptora de Michael como consecuencia de la reducción del doble enlace en α a la amida apenas tiene consecuencias sobre la actividad inductora de Nrf2. Esto quiere decir que no se podría achacar la actividad de estos compuestos a su

electrofilia, sino a otros mecanismos alternativos que podrían ir desde la modulación de determinadas vías de señalización relacionadas con Nrf2 hasta la disrupción de la interacción entre Nrf2 y Keap-1. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que los derivados que presentan un metilo sobre el nitrógeno del tetraciclo (**28a** y **28b**) no son inductores de Nrf2, de lo que se colige que algunas características estructurales concretas son muy importantes en términos de actividad. Este fenómeno aparece frecuentemente cuando una molécula debe interaccionar con su diana de una manera muy específica. Los derivados que contienen un fragmento de serotonina son inactivos, a excepción del compuesto **27c**, que no es electrófilo pero sí tiene el nitrógeno heterocíclico libre. Merece la pena señalar que el fragmento tetracíclico **23** tiene por sí solo una elevada capacidad inductora de Nrf2, que puede incrementarse ligeramente o perderse completamente según la triptamina que se le añade para constituir los ligandos multidiana finales.

Los compuestos de la familia B también son inductores potentes de Nrf2, si bien están un grado por debajo de los mejores derivados de la familia A. Destaca que, como ocurre en la familia anterior, el derivado de triptamina es algo más potente que el de 5-metoxitriptamina. Más allá de esta consideración, el fragmento de triptamina no parece tener una influencia decisiva sobre la actividad de los compuestos finales, ya que el compuesto diazabícíclico **36** es incluso ligeramente más potente que éstos.

El análisis de la relación estructura-actividad de la familia C también depara alguna sorpresa. Los compuestos **38a** y **38b**, con una función aceptora de Michael que les convierte en electrófilos, no son inductores de Nrf2 a las concentraciones ensayadas (hasta 20 μM), pero sus derivados reducidos **40a** y **40b** sí presentan una cierta actividad. Nuevamente, hay que pensar en la existencia de mecanismos alternativos para explicar este fenómeno, quizá relacionado con la mayor facilidad para la formación de intermedios en forma de quinona que puedan activar este factor de transcripción. El derivado insaturado no fenólico **38c**, sin embargo, sí que induce Nrf2 con una potencia comparable a la de su homólogo reducido **40c**, y a la del conjugado con ácido lipoico, **41**. De todos modos, hay que reconocer que en esta familia el diseño de los ligandos multidiana no ha funcionado bien en lo que respecta a la actividad inductora de Nrf2,

como demuestran los pobres datos obtenidos en comparación con las actividades del núcleo diazabíclico **36** y del ácido cafeico por separado.

Recordemos que la hipótesis inicial sobre la que se diseñaron estos compuestos fue que podrían inducir la actividad del factor de transcripción Nrf2 a través de la modulación de determinados subtipos de receptores nicotínicos. Por tanto, el siguiente paso fue determinar si los compuestos de las familias A, B y C eran capaces de modular la respuesta nicotínica en general y, en caso afirmativo, a qué subtipos de estos receptores eran capaces de unirse, en aras de intentar establecer una conexión entre la actividad nicotínica y la inducción de Nrf2. La evaluación de la actividad nicotínica se planteó en dos fases: un cribado en cultivos celulares de la línea SH-SY5Y estándar, y una posterior caracterización de los compuestos más interesantes en cultivos celulares de la línea SH-SY5Y que sobreexpresasen un subtipo determinado de receptor, $\alpha_4\beta_2$ o α_7 , en función de los resultados obtenidos en los primeros experimentos. Al igual que en los experimentos recogidos en el capítulo anterior, se utilizó la sonda Fluo-4 para medir las concentraciones intracelulares de calcio.

Se comenzó, pues, por un cribado sobre cultivos de células SH-SY5Y estándar, realizando una breve preincubación con los compuestos a ensayar a la concentración de 10 μM y midiendo posteriormente la respuesta a tres agonistas nicotínicos diferentes, con el objetivo de extraer una información preliminar sobre el perfil de selectividad de los nuevos ligandos. Recordemos que la base del experimento reside en que, si la entrada de calcio a la célula tras la inyección del agonista nicotínico correspondiente se reduce en presencia de un compuesto, se puede colegir que éste es capaz de unirse a alguno de los subtipos del receptor sobre los que el agonista empleado tiene actividad.

El primer agonista utilizado fue la acetilcolina, que al ser el ligando endógeno es un agonista muy potente de todos los subtipos de receptores nicotínicos. Aunque su elevada potencia impida ver claramente el efecto de los potenciales moduladores, de la proporción en que éstos reducen la respuesta total se puede inferir una idea preliminar sobre su actividad. Se empleó la mecamilamina, un antagonista no selectivo de los receptores nicotínicos, como control negativo.

Compuesto	Respuesta (%)	Sig. estadística
Acetilcolina	100	-
Mecamilamina	82,84 ± 11,57	n.s.
25a	86,14 ± 12,60	n.s.
25b	88,82 ± 11,84	n.s.
25c	101,86 ± 11,45	n.s.
25d	66,04 ± 19,01	n.s.
25e	91,46 ± 10,21	n.s.
25f	91,89 ± 9,26	n.s.
27a	87,23 ± 18,45	n.s.
27b	88,85 ± 14,28	n.s.
27c	85,33 ± 15,75	n.s.
28a	93,44 ± 10,76	n.s.
28b	85,19 ± 7,27	n.s.
28c	98,55 ± 19,25	n.s.
35a	86,60 ± 5,99	n.s.
35b	91,10 ± 15,72	n.s.
38a	88,31 ± 8,25	n.s.
38b	91,39 ± 16,34	n.s.
38c	76,12 ± 18,48	n.s.
40a	89,16 ± 11,84	n.s.
40b	78,26 ± 15,76	n.s.
40c	85,58 ± 17,97	n.s.
41	81,76 ± 18,61	n.s.

Tabla 6.14. Respuesta a acetilcolina de las células SH-SY5Y por parte de los compuestos de las familias A, B y C. Los datos están expresados como la media $\pm \sigma$ de tres experimentos, cada uno de ellos por duplicado. El tratamiento estadístico consistió en una prueba ANOVA de una vía y un post-test de Newman-Keuls: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; comparado con la respuesta a acetilcolina.

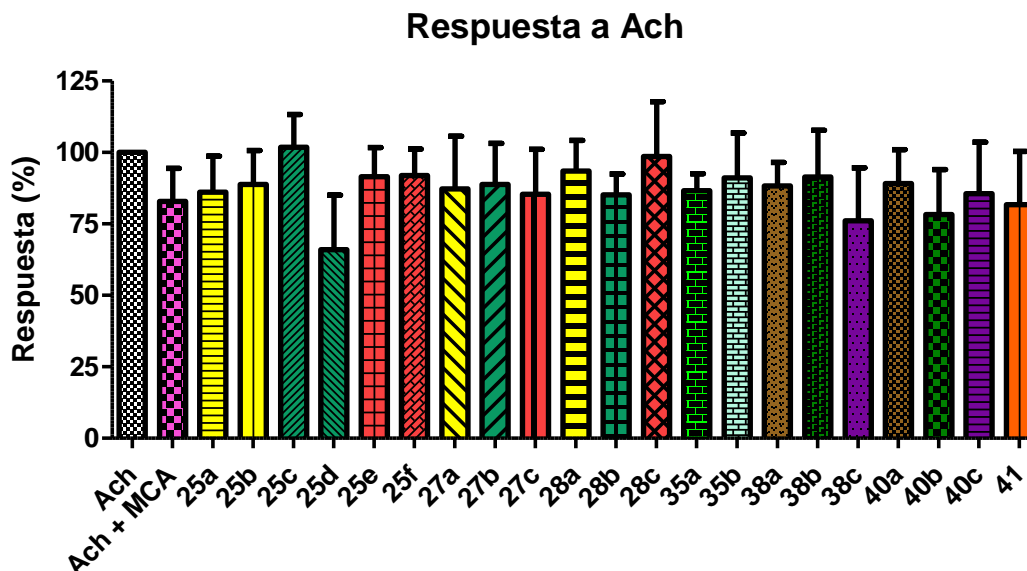


Figura 6.18. Respuesta a acetilcolina de las células SH-SY5Y tratadas con los compuestos de las familias A, B y C.

Como era de esperar, la capacidad general de los compuestos ensayados para bloquear la respuesta a acetilcolina fue modesta (tabla 6.14), aunque destacaron los compuestos

25d, **38c** y **40b** por causar un descenso en la entrada de calcio provocada por acetilcolina superior al 20%, y de hasta el 34% en el caso del compuesto **25d**. El bajo nivel de bloqueo impide también establecer una relación estructura-actividad clara.

En segundo lugar, se ensayó la inyección de citisina, quizá la parte del experimento más importante teniendo en cuenta que es precisamente de este alcaloide de donde parte el diseño del fragmento con actividad nicotínica de los nuevos compuestos multidiana. La citisina, como ya indicamos previamente, es un agonista parcial de los receptores $\alpha_4\beta_2$ con elevada afinidad, mientras que sobre los receptores $\alpha_3\beta_4$ y α_7 es un agonista total pero con una afinidad baja. Por tanto, se considera que a efectos prácticos la citisina produce su respuesta nicotínica a través de los receptores $\alpha_4\beta_2$ de forma mayoritaria. También en este ensayo se utilizó la mecamilamina como control de bloqueo de la respuesta.

Compuesto	Respuesta (%)	Sig. estadística
Citisina	100	-
Mecamilamina	22,15 ± 7,85	***
25a	34,36 ± 3,80	***
25b	34,80 ± 5,38	***
25c	41,60 ± 12,88	***
25d	34,09 ± 22,53	***
25e	39,51 ± 6,60	***
25f	37,54 ± 10,24	***
27a	25,61 ± 8,91	***
27b	34,24 ± 16,56	***
27c	37,00 ± 6,92	***
28a	43,77 ± 1,64	***
28b	38,01 ± 10,10	***
28c	32,40 ± 7,98	***
35a	44,61 ± 8,90	***
35b	45,54 ± 20,89	***
38a	33,52 ± 6,69	***
38b	29,18 ± 7,19	***
38c	26,08 ± 4,31	***
40a	26,12 ± 8,15	***
40b	29,03 ± 12,91	***
40c	22,99 ± 10,57	***
41	15,49 ± 3,42	***

Tabla 6.15. Respuesta a citisina de las células SH-SY5Y por parte de los compuestos multidiana. Los datos están expresados como la media $\pm \sigma$ de tres experimentos, cada uno de ellos por duplicado. El tratamiento estadístico consistió en una prueba ANOVA de una vía y un post-test de Newman-Keuls: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; comparado con la respuesta a citisina.

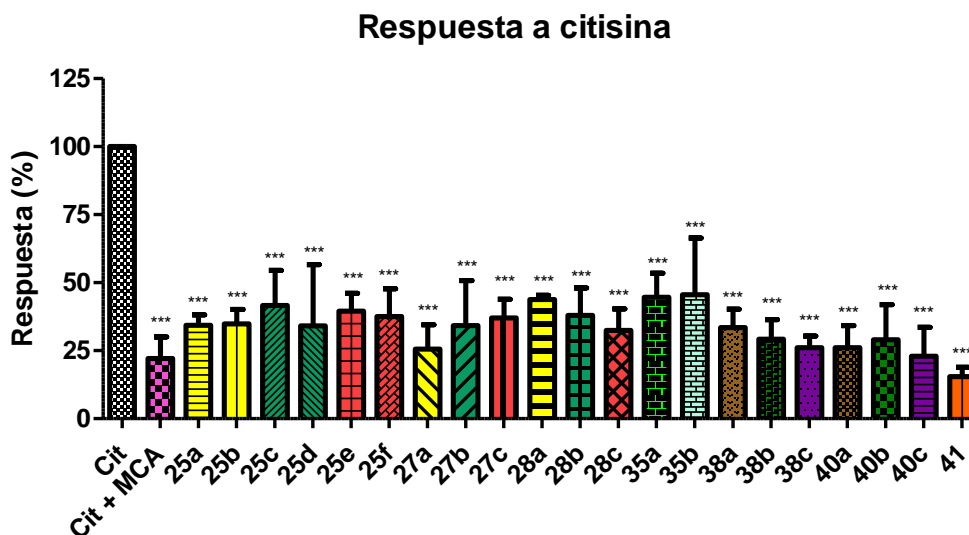


Figura 6.19. Respuesta a citisina de las células SH-SY5Y tratadas con los compuestos de las familias A, B y C.

Los resultados son muy interesantes, pues todos los derivados bloquearon la respuesta a citisina en un porcentaje superior al 50%, indicando que las tres familias de compuestos podrían ser capaces de modular los receptores nicotínicos $\alpha_4\beta_2$. Es particularmente destacable el caso de los compuestos de la familia A, pues su estructura carece del nitrógeno básico canónico en este tipo de moduladores, en contraste con las familias B y C, que son el resultado de un diseño más convencional. El bloqueo de la respuesta a citisina ejercido por el compuesto **41** supera incluso al de la mecamilamina (antagonista de referencia en este ensayo), lo que constituye un hecho muy notable. Asimismo, los compuestos **27a**, **38b**, **38c**, y **40a-c** también redujeron la respuesta a citisina por debajo del 30%. Si bien no se puede extraer un patrón claro para establecer una relación estructura-actividad, se observa claramente que las cinamidas y la lipoamida **41**, es decir, los compuestos de la familia C, presentan en general una mayor capacidad para bloquear la respuesta evocada por la citisina.

Por último, se ensayó el bloqueo a la respuesta provocada por la combinación de PNU-282987 y PNU-120596. El primero es un agonista selectivo de los receptores nicotínicos α_7 que se inyectó como el resto de los agonistas, mientras que el segundo es un modulador alostérico positivo de este mismo subtipo, y se añadió junto con los compuestos a ensayar para la incubación previa a la inyección del agonista. En este caso se empleó como control negativo la metilcaconitina (MLA), un antagonista selectivo de los receptores α_7 .

Compuesto	Respuesta (%)	Sig. estadística
PNU-282987 + PNU-120596	100	-
Metilicaconitina	7,07 ± 3,25	***
25a	99,27 ± 13,09	n.s.
25b	87,28 ± 22,43	n.s.
25c	108,36 ± 24,07	n.s.
25d	89,88 ± 15,62	n.s.
25e	106,64 ± 11,84	n.s.
25f	110,00 ± 4,66	n.s.
27a	77,81 ± 19,48	n.s.
27b	41,99 ± 17,42	***
27c	77,27 ± 3,61	n.s.
28a	63,33 ± 8,57	**
28b	64,85 ± 18,10	*
28c	19,35 ± 2,26	***
35a	102,05 ± 10,63	n.s.
35b	98,55 ± 7,71	n.s.
38a	49,99 ± 10,10	***
38b	60,87 ± 8,98	**
38c	103,61 ± 14,07	n.s.
40a	103,14 ± 11,47	n.s.
40b	97,11 ± 16,78	n.s.
40c	94,82 ± 13,99	n.s.
41	36,52 ± 10,40	***

Respuesta a PNU28 + PNU12

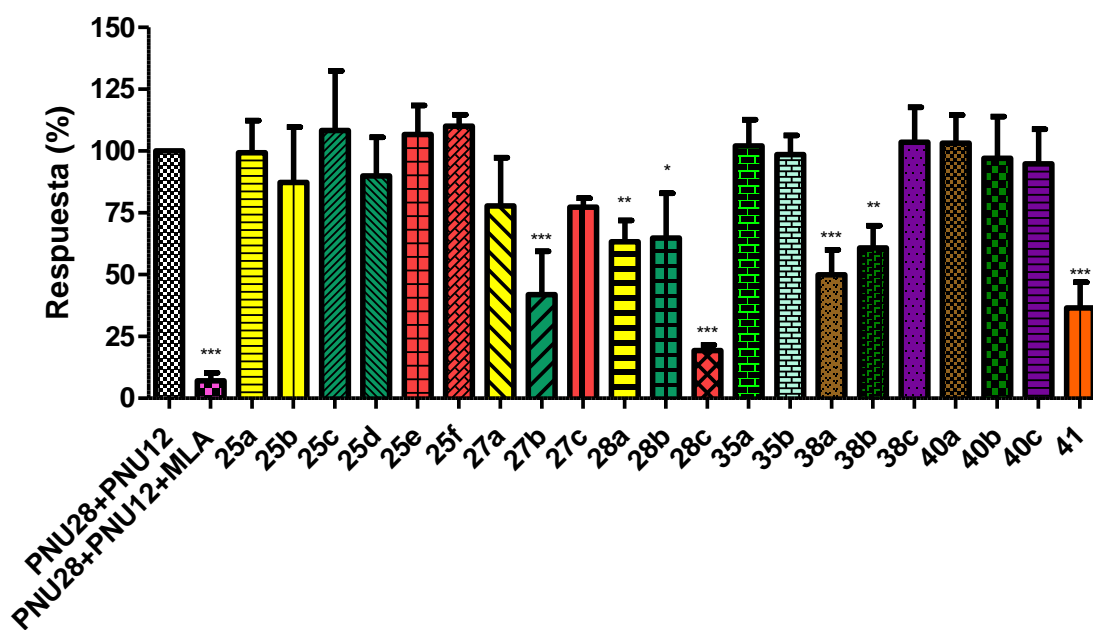


Tabla 6.16. Figura 6.20. Bloqueo de la respuesta a la combinación de PNU-282987 y PNU-120596 de las células SH-SY5Y por parte de los compuestos multidiana de las familias A, B y C. Los datos están expresados como la media $\pm \sigma$ de tres experimentos, cada uno de ellos por duplicado. El tratamiento estadístico consistió en una prueba ANOVA de una vía y un post-test de Newman-Keuls: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; comparado con la respuesta a PNU-28 + PNU-12.

Al contrario que en el caso anterior, la actividad moduladora de los compuestos en este ensayo fue generalmente bastante modesta, lo cual podría constituir una buena noticia en términos de selectividad. No obstante, algunos derivados superaron el 20 % de bloqueo: **27a**, **27b**, **27c**, **28a**, **28b**, **28c**, **38a**, **38b** y **41**. Si nos centramos en el análisis de los compuestos pertenecientes a la familia A, vemos algo realmente interesante: todos los derivados que carecen del doble enlace en α al grupo amida muestran bloqueos superiores al 20 %, sin importar la presencia o no de sustitución sobre el nitrógeno del tetraciclo. Destaca especialmente el compuesto **28c**, que consigue bloquear casi en un 90% la respuesta provocada por la combinación de PNU-282987 y PNU-120596. Ninguno de los derivados que presentan el doble enlace en α al grupo carbonilo presentan estos niveles de actividad. Quizás la posibilidad de que la molécula gire libremente en torno a ese enlace conlleve una pérdida de la selectividad que parecen exhibir otros compuestos por los receptores $\alpha_4\beta_2$ o, dicho en otras palabras, una mayor flexibilidad estructural irá en detrimento de la selectividad. Dentro de la familia C, destaca que las amidas del ácido trimetoxicinámico no manifiestan la capacidad de bloqueo que sí tenían en general frente a acetilcolina y citisina, mientras que los derivados de ácido cafeico y ferúlico con la cadena lateral insaturada (**38a** y **38b**) sí que podrían presentar cierta actividad sobre los receptores α_7 . Merece la pena resaltar que el compuesto **41** también reduce de forma considerable la respuesta a PNU-282987 + PNU-120596.

Todos los compuestos ensayados fueron capaces de reducir en gran medida la entrada de calcio mediada por la citisina, y la mayoría de ellos lo hicieron de forma selectiva. Por ello, el siguiente paso consistiría en realizar ensayos sobre cultivos de células SH-SY5Y que sobreexpresan los receptores $\alpha_4\beta_2$, escogiendo aquellos compuestos con un perfil nicotínico más interesante para estudiar su capacidad de bloqueo de la respuesta a citisina en estas células modificadas.

Finalmente, se hicieron algunos estudios predictivos sobre las características fisicoquímicas y la biodisponibilidad de estas nuevas familias de ligandos multidiana. El ensayo PAMPA (*Parallel artificial membrane permeability assay*) permite predecir la permeabilidad de un compuesto a través de diversas membranas biológicas, entre las que se encuentra la barrera hematoencefálica. Se basa en el cálculo de la cantidad de compuesto que es capaz de atravesar una membrana artificial infundida con un

determinado fosfolípido. Es un ensayo que sin duda ofrece una información interesante, pero hay que tener en cuenta que sólo modeliza el paso de membranas por difusión pasiva y que constituye una representación muy simplificada y modificada de una barrera hematoencefálica real, por lo que la correlación con la realidad es moderada y hay que tomar los resultados con cautela, sean éstos positivos o negativos. Además, no permite evaluar compuestos que carecen de un pico marcado de absorción en el espectro UV-visible, pues su medida espectrofotométrica es la base práctica del ensayo. En nuestro caso, se utilizó una disolución de lípido cerebral porcino (PBL) en dodecano para cubrir la membrana artificial, tomando la cafeína como control negativo de permeabilidad y la testosterona como control positivo.

Compuesto	Permeabilidad ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	Predicción
25a	6,34 ± 1,88	
25b	4,95 ± 1,68	
25c	18,61 ± 11,63	
25d	8,72 ± 4,27	
25e	5,26 ± 0,40	
25f	5,30 ± 1,00	
27a	4,16 ± 0,85	
27b	N.C.	
27c	5,98 ± 2,07	
28a	N.C.	
28b	N.C.	
28c	5,49 ± 2,07	
35a	0,96 ± 0,45	
35b	0,63 ± 0,34	
36	15,22 ± 4,81	
37	6,73 ± 2,20	
38a	11,90 ± 2,98	
38b	8,10 ± 0,05	
38c	1,86 ± 0,90	
40a	12,94 ± 4,31	
40b	10,90 ± 4,98	
40c	13,63 ± 6,52	
41	9,79 ± 5,18	

Tabla 6.17. Predicción de permeabilidad a través de la BHE de los compuestos pertenecientes a las familias A, B y C según el ensayo PAMPA. Los resultados se expresan como la media $\pm \sigma$ de los valores de permeabilidad proporcionados por el experimento, obtenidos mediante la realización de al menos dos experimentos independientes, cada uno de ellos por duplicado.

La tabla 6.17 nos muestra cómo todos los compuestos obtuvieron una predicción positiva de paso de la barrera hematoencefálica, a excepción de los compuestos **35a**, **35b** y **38c**. Este resultado tiene cierto sentido, pues son los compuestos (si se obvia el

40c) con un peso molecular más elevado de toda la quimioteca, claramente por encima de los 500 g/mol que aconsejan las reglas de Lipinski como límite. Aunque esto podría suponer la exclusión de los dos compuestos de la familia B, hay que tener en cuenta que su estructura incluye un fragmento análogo a la melatonina, que al ser una hormona endógena cuenta con diversos mecanismos fisiológicos de transporte activo a través de membranas³⁵⁸. Por tanto, en este caso el ensayo de PAMPA podría resultar demasiado simple como para modelizar la permeabilidad *in vivo* de estos compuestos a través de la BHE, y quizá sería un poco aventurado descartarlos sólo por el resultado de este experimento. Los compuestos **27b**, **28a** y **28b** no pudieron ser evaluados debido a su carencia de un pico de absorción en el espectro UV-visible.

Para complementar los datos obtenidos experimentalmente, se realizó un estudio computacional de las propiedades fisicoquímicas de la quimioteca utilizando el software Swiss-ADME, provisto gratuitamente por el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB). De entre la gran cantidad de predicciones que emite la aplicación, destacan:

- Todos los compuestos tendrían una baja solubilidad en agua.
- La absorción gastrointestinal sería alta en todos los casos, en contraste con el carácter variable de la permeabilidad a través de la BHE. Lógicamente, aquí conviene atender un poco más a los resultados experimentales del ensayo PAMPA.
- Todos los compuestos (salvo **38a**) serían inhibidores de los citocromos CYP3A4 y CYP2D6, participantes habituales en el metabolismo de xenobióticos.
- Todos los derivados cumplen los criterios de Lipinski excepto el compuesto **41**, cuyo logP o/a está por encima de lo indicado y su peso molecular excede los 500 g/mol.
- El modelo predice una biodisponibilidad media para todos los compuestos a excepción del **41**, para el que sería baja.
- La mayoría de los compuestos generan alertas PAIN (*Pan-assay interference*), relacionadas con la presencia de un fragmento de anilina, catecol o un puente

³⁵⁸ Mayo, J. C., Sainz, R. M., González-Menéndez, P., Hevia, D., Cernuda-Cernuda, R. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 3927.

disulfuro. Sin embargo, nuestros propios resultados descritos anteriormente permiten descartar que estos compuestos presenten una afinidad indiscriminada por todo tipo de proteínas que pueda dar lugar a falsos resultados positivos en su evaluación farmacológica.

Comp.	Sol. acuosa	Abs. GI	P. BHE	Inh. CYP3A4/CYP2D6	Reglas Lipinski	BDP	Alerta PAIN
25a	Baja	Alta	Sí	Sí/Sí	Sí	Media	Sí
25b	Baja	Alta	Sí	Sí/Sí	Sí	Media	Sí
25c	Baja	Alta	No	Sí/Sí	Sí	Media	Sí
25d	Baja	Alta	No	Sí/Sí	Sí	Media	Sí
25e	Baja	Alta	No	Sí/Sí	Sí	Media	Sí
25f	Baja	Alta	No	Sí/Sí	Sí	Media	Sí
27a	Baja	Alta	Si	Sí/Sí	Sí	Media	Sí
27b	Baja	Alta	No	Sí/Sí	Sí	Media	Sí
27c	Baja	Alta	No	Sí/Sí	Sí	Media	Sí
28a	Baja	Alta	Sí	Sí/Sí	Sí	Media	Sí
28b	Baja	Alta	No	Sí/Sí	Sí	Media	Sí
28c	Baja	Alta	No	Sí/Sí	Sí	Media	Sí
35a	Baja	Alta	Sí	Sí/Sí	Sí	Media	No
35b	Baja	Alta	No	Sí/Sí	Sí	Media	No
38a	Baja	Alta	No	No/Sí	Sí	Media	Sí
38b	Baja	Alta	Sí	Sí/Sí	Sí	Media	No
38c	Baja	Alta	Sí	Sí/Sí	Sí	Media	No
40a	Baja	Alta	No	Sí/Sí	Si	Media	Sí
40b	Baja	Alta	Sí	Sí/Sí	Sí	Media	No
40c	Baja	Alta	Sí	Sí/Sí	Sí	Media	No
41	Baja	Alta	No	Sí/Sí	No	Baja	No

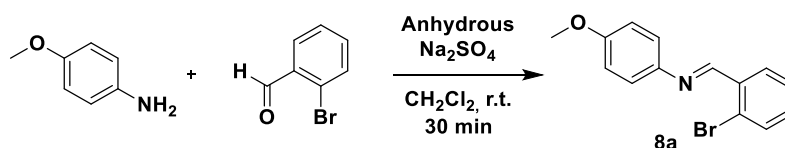
Tabla 6.18. Estimación de algunos parámetros farmacocinéticos relevantes para los compuestos de las familias A, B y C proporcionada por el software Swiss-ADME.

6.7 Experimental section

General experimental details

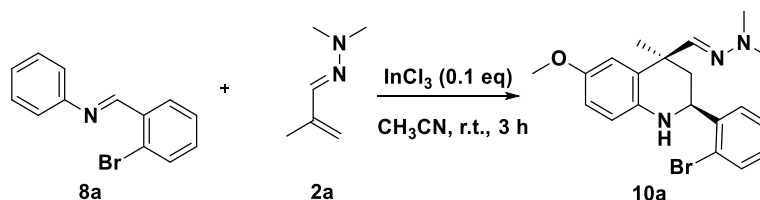
All reagents (Aldrich, Fischer, Alpha Aesar) and solvents (Scharlau, Fischer) were of commercial quality and were used as received. Reactions were monitored by thin layer chromatography on aluminium plates coated with silica gel and fluorescent indicator (Macherey-Nagel Xtra SIL G/UV254). Mechanochemical reactions were carried out in a vibratory ball mill Anton Paar BM500 (Madrid, Spain) and a planetary ball mill Retsch PM 100 (Asturias, España), using grinding jars and balls of zirconium oxide and stainless steel with different volumes and diameters. Microwave-assisted reactions were performed on a CEM Discover focused microwave reactor. Separations by flash chromatography were performed using a Combiflash Teledyne automated flash chromatograph or on conventional silica gel columns (Scharlau 40–60 μm , 230–400 mesh ASTM). Melting points were determined using a Stuart Scientific apparatus, SMP3 Model, and are uncorrected. Infrared spectra were recorded with an Agilent Cary630 FTIR spectrophotometer with a diamond accessory for solid and liquid samples. NMR spectroscopic data were recorded using a Bruker Avance 250 spectrometer operating at 250 MHz for ^1H NMR and 63 MHz for ^{13}C NMR (CAI de Resonancia Magnética Nuclear, Universidad Complutense); Topspin (Bruker, Rivas-Vaciamadrid, Madrid, Spain) or Mestrenova (Mestrelab, Santiago de Compostela, Spain) software packages were used throughout for data processing; chemical shifts are given in ppm and coupling constants in Hertz. Elemental analyses were determined by the CAI de Microanálisis Elemental, Universidad Complutense, using a Leco 932 combustion microanalyzer. Exact mass data were recorded with a high-resolution mass spectrometer FTMS Bruker APEX Q IV coupled to 2DLC-NS-ESI-MALDI (Mass range: 200-10.000 uma) and a time-of-flight mass spectrometer MALDI-TOF/TOF Bruker ULTRAFLEX coupled to MALDI (Mass range: 300-150000 uma), operated by the CAI de Espectrometría de Masas, Universidad Complutense.

Synthesis of (*E*)-*N*-(2-bromobenzylidene)-4-methoxyaniline (**8a**)



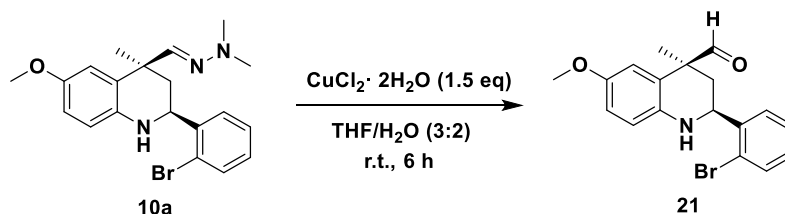
A solution of *p*-anisidine (4 mmol, 0.493 g) and 2-bromobenzaldehyde (4 mmol, 0.740 g) in CH₂Cl₂ (10 mL) was stirred vigorously in the presence of anhydrous Na₂SO₄ (5 g) for 30 minutes. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent evaporated under vacuum to afford the desired product as a brown paste in quantitative yield, being used without further purification in the following reaction.

Synthesis of (±)-(2*S*,4*S*)-2-(2-bromophenyl)-4-((2,2-dimethylhydrazono)methyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (**10a**)



To a stirred solution of the imine **8a** (4 mmol, 1.041 g) and InCl₃ (0.4 mmol, 0.088 g) in acetonitrile (20 mL) it was added **2a** (4.4 mmol, 0.494 g) dropwise. Stirring was continued for 3 h until completion of the reaction as indicated by TLC, and the mixture was diluted with water (10 mL), extracted with CH₂Cl₂ (4 x 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated under vacuum. The resulting crude was purified by silica gel column chromatography using a petroleum ether: ethyl acetate (9:1) mixture to obtain 0.612 g of **10a** as a pale yellow solid (38 %).

Synthesis of (±)-(2*S*,4*S*)-2-(2-bromophenyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-4-carbaldehyde (**21**)



To a solution of CuCl₂·2 H₂O (7.2 mmol, 1.228 g) in water (20 mL) was added a solution of **10a** (6 mmol, 2.414 g) in THF (30 mL) at room temperature. After being stirred for 6

h at the same temperature, no starting material was detected by TLC, so the reaction mixture was quenched with aqueous 3 M NH₄OH (30 mL), diluted with CH₂Cl₂ (30 mL), and washed with brine (20 mL). The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 30 mL), and the combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄. Removal of the solvent and column chromatography on silica gel eluting with petroleum ether: ethyl acetate (9:1) gave 1.491 g of the aldehyde **21** as a yellow solid (69%).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 9.40 (s, 1H), 7.72 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, 1H), 7.45 – 7.36 (m, 1H), 7.25 – 7.16 (m, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 4.85 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.08 – 1.88 (m, 2H), 1.63 (s, 3H) ppm.

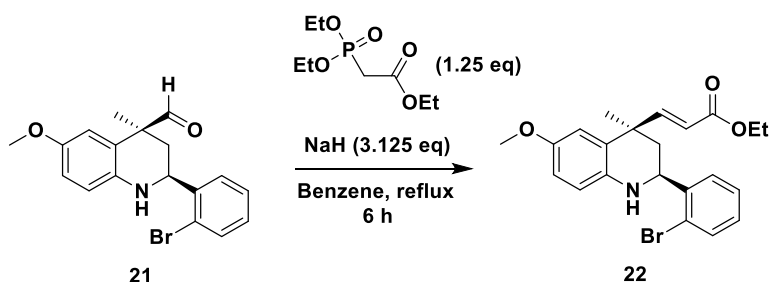
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 201.7, 153.0, 141.9, 139.7, 133.4, 129.6, 128.5, 128.2, 123.4, 121.9, 117.4, 115.6, 114.1, 56.2, 51.7, 50.7, 37.2, 24.6 ppm.

IR (NaCl) v: 3358.6, 2928.1, 2832.5, 1710.2 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₁₆H₁₇NO₃ (M = 271.31): C, 60.01; H, 5.04; N, 3.89. Found: C, 60.13; H, 5.30; N, 4.15.

mp: 138-140 °C.

Synthesis of ethyl (±)-(E)-3-((2*S*,4*R*)-2-(2-bromophenyl)-6-methoxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-yl)acrylate (22**)**



Sodium hydride (60% dispersion in mineral oil) (12.4 mmol, 0.298 g) was washed with petroleum ether (3 x 5 mL) and suspended in dry benzene (20 mL) under argon atmosphere. To this stirred mixture at room temperature was added via syringe a solution of triethyl phosphonoacetate (4.8 mmol, 1.076 g) in dry benzene (10 mL). After 5 minutes, a solution of **21** (4 mmol, 1.441 g) in dry benzene (10 mL) was also added via canula, and the resulting mixture was refluxed for 6 h. After cooling, the reaction was quenched by the slow addition of water, and diluted with dichloromethane (20 mL). The

organic layer was washed with brine (2 x 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and evaporated. The oily residue was purified by silica gel column chromatography with a 9:1 petroleum ether: ethyl acetate mixture, yielding 1.308 g (76 %) of **22** as a pale brown solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.71 (dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.38 (td, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 1H), 7.18 (td, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 8.7, 2.8 Hz, 1H), 6.65 – 6.58 (m, 2H), 6.03 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 4.93 (dd, *J* = 11.0, 2.6 Hz, 1H), 4.22 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.92 (bs, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.00 (dd, *J* = 13.1, 2.7 Hz, 1H), 1.94 – 1.79 (m, 1H), 1.65 (s, 3H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H) ppm.

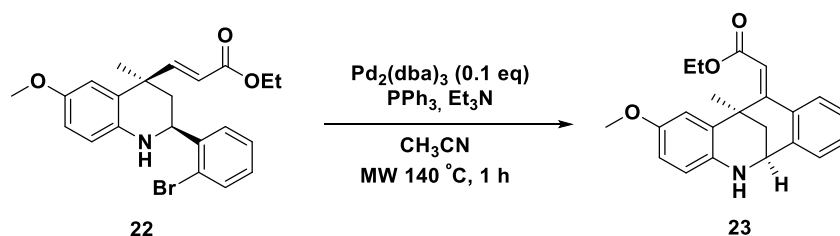
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 167.2, 156.6, 152.7, 142.5, 138.5, 133.3, 129.3, 128.4, 128.3, 127.5, 123.3, 119.8, 116.6, 114.8, 114.1, 60.7, 56.2, 52.3, 43.0, 40.9, 28.3, 14.6 ppm.

IR (NaCl) v: 3350.8, 2930.7, 1707.5, 1646.1 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₂H₂₄BrNO₃ (M = 430.33): C, 61.40; H, 5.62; N, 3.25. Found: C, 61.36; H, 5.61; N, 3.44.

mp: 106-108 °C.

Synthesis of ethyl (±)-(E)-2-((6S,12R)-2-methoxy-12-methyl-5,12-dihydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*]azocin-11(6H)-ylidene)acetate (23**)**



In a 8 mL microwave vial, a solution of **22** (1 mmol, 0.430 g), Pd₂(dba)₃ (0.1 mmol, 0.092 g), PPh₃ (0.2 mmol, 0.053 g) and Et₃N (2 mmol, 0.202 g) in acetonitrile (3 mL) was irradiated in a confocal MW at 140 °C for 1 h. The reaction mixture was then allowed to reach room temperature and filtered through a pad of zelite to remove metallic palladium. The filtrate was diluted with ethyl acetate (20 mL) and washed with water (2 x 15 mL). The aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 15 mL), the combined organic phases were dried over anhydrous sodium sulphate and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting crude was purified by silica gel flash

chromatography using 85:15 petroleum ether: ethyl acetate as the eluting phase, yielding 0.266 g of the cross-coupling product **23** (76%) as a yellow paste.

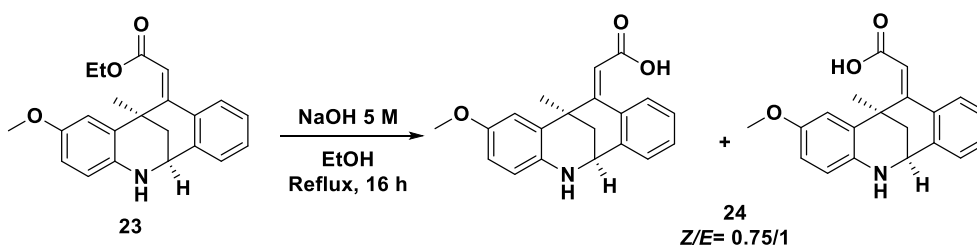
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.35 – 7.23 (m, 3H), 7.22 – 7.12 (m, 1H), 6.59 (dd, *J* = 8.7, 2.8 Hz, 1H), 6.39 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 4.45 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H), 4.42 – 4.28 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 2.31 (dd, *J* = 12.8, 3.6 Hz, 1H), 2.15 (dd, *J* = 12.8, 2.6 Hz, 1H), 1.81 (s, 3H), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 169.4, 153.2, 151.6, 139.9, 136.0, 134.4, 130.0, 128.5, 128.1, 127.9, 125.7, 117.3, 115.0, 113.4, 113.2, 61.4, 56.0, 50.5, 39.9, 38.7, 26.6, 14.7 ppm.

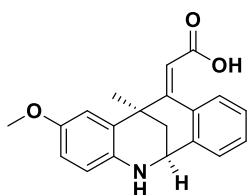
IR (NaCl) v: 3357.0, 2928.2, 1706.3, 1617.2 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₂H₂₃NO₃ (M = 349.42): C, 75.62; H, 6.63; N, 4.01. Found: C, 75.35; H, 6.42; N, 3.91.

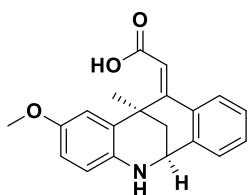
Synthesis of (±)-(E)-2-((6*S*,12*R*)-2-methoxy-12-methyl-5,12-dihydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*]azocin-11(6*H*)-ylidene)acetic acid and (±)-(Z)-2-((6*S*,12*R*)-2-methoxy-12-methyl-5,12-dihydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*]azocin-11(6*H*)-ylidene)acetic acid (24**)**



To a solution of ester **23** (2 mmol, 0.699 g) in EtOH (10 mL), 3 mL of a 5 M aqueous solution of NaOH were added, and the mixture was refluxed overnight. Then, ethanol was evaporated under reduced pressure and replaced by ethyl acetate (20 mL). The resulting suspension was neutralised slowly with HCl 2 M, and the mixture was poured into a separatory funnel. The two forming phases were separated, and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 20 mL). The organic phases were combined, dried over anhydrous sodium sulphate, and the solvent was removed under reduced pressure. 0.495 g of **24** (77 %) were obtained as a mixture of isomers *Z/E*, with the aspect of a brown oil that could be used in the next reactions without further purification.

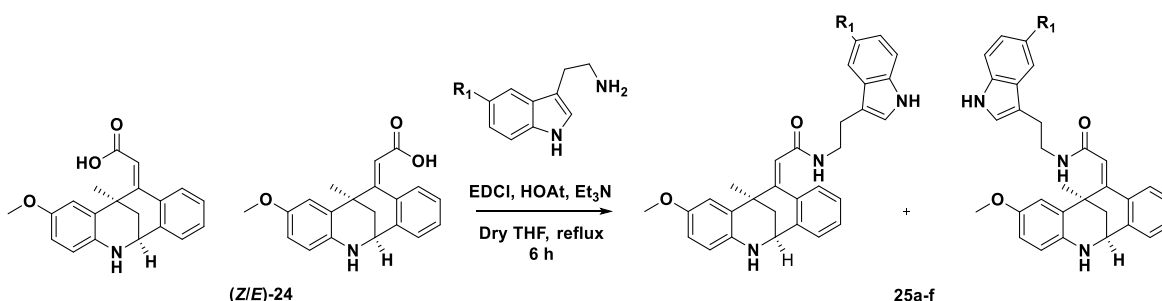


$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 7.43 – 7.33 (m, 2H), 7.31 – 7.19 (m, 1H), 7.09 – 6.97 (m, 1H), 6.73 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.55 – 6.35 (m, 2H), 6.04 (s, 1H), 4.44 (bs, 1H), 3.68 (s, 1H), 3.65 (s, 3H), 2.30 (dd, $J = 12.7, 3.7$ Hz, 1H), 2.21 (dd, $J = 12.8, 2.6$ Hz, 1H), 1.59 (s, 3H) ppm.



$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 7.49 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.38 – 7.10 (m, 5H), 6.52 (dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz, 1H), 6.42 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.41 (s, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.25 (dd, $J = 12.9, 3.7$ Hz, 1H), 2.08 (dd, $J = 12.8, 2.4$ Hz, 1H), 1.81 (s, 3H) ppm.

Synthesis of methanodibenzo[*b,f*]azocin-11(12*H*)-ylidene-tryptamine hybrids 25a-f.



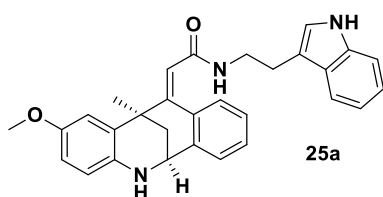
A solution of the mixture of isomers **24** (0.3 mmol, 0.096 g), the corresponding tryptamine (0.3 mmol), EDC·HCl (0.3 mmol, 0.058 g), HOAt (0.3 mmol, 0.49 mL of a solution 0.6 M in DMF) and Et_3N (0.6 mmol, 0.061 g) in dry THF (10 mL) was refluxed for 6 h. The reaction mixture was then cooled to room temperature, quenched with water (20 mL), and extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous sodium sulphate and evaporated under reduced pressure. Each crude was purified by silica gel column chromatography with different mixtures of solvents, that are detailed in the description of each compound.

(±)-(Z)-N-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-2-((6S,1RS)-2-methoxy-12-methyl-5,12-dihydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*]azocin-11(6H)-ylidene)acetamide (25a) and

(±)-(E)-N-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-2-((6S,12R)-2-methoxy-12-methyl-5,12-dihydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*]azocin-11(6H)-ylidene)acetamide (25b)

Prepared from **24** (0.3 mmol, 0.096 g), tryptamine (0.3 mmol, 0.048 g), HOAt (0.3 mmol, 0.49 mL of a solution 0.6 M in DMF) and Et₃N (0.6 mmol, 0.061 g).

Purification: neat diethyl ether.



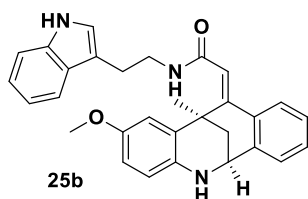
Yield: 0.029 g (21 %). Brown oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.04 (bs, 1H), 7.50 – 7.33 (m, 3H), 7.27 – 7.24 (m, 2H), 7.23 – 7.16 (m, 1H), 7.14 – 6.99 (m, 2H), 6.77 – 6.72 (m, 2H), 6.54 (dd, *J* = 8.7, 2.8 Hz, 1H), 6.36 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.54 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.45 (t, *J* = 2.9 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.68 – 3.48 (m, 2H), 3.04 – 2.76 (m, 2H), 2.29 (dd, *J* = 12.7, 2.5 Hz, 1H), 2.16 (dd, *J* = 12.8, 3.8 Hz, 1H), 1.58 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 170.0, 153.3, 152.1, 139.9, 136.7, 136.2, 132.6, 130.2, 129.4, 128.6, 128.1, 127.6, 127.2, 122.6, 122.3, 119.9, 118.9, 117.5, 116.7, 114.4, 113.2, 112.9, 111.6, 56.1, 50.9, 40.2, 40.0, 38.8, 26.2, 25.0 ppm.

IR (NaCl) ν: 3280.6, 2924.3, 1639.9 cm⁻¹.

HRMS (MALDI-TOF): calcd. for C₃₀H₂₉N₃O₂ [M] 463.2260, found 463.2280.



Yield: 0.040 g (29 %). Brown oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.20 (bs, 1H), 7.68 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.44 – 7.37 (m, 2H), 7.28 – 7.10 (m, 7H), 6.57 (dd, *J* = 8.7, 2.8 Hz, 1H), 6.37 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 5.77 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.41 (t, *J* = 3.0 Hz, 1H), 3.86 – 3.77 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.12 (t, *J*

= 6.6 Hz, 2H), 2.21 (dd, $J = 12.8, 3.6$ Hz, 1H), 2.09 (dd, $J = 12.8, 2.7$ Hz, 2H), 1.79 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 169.6, 153.1, 149.2, 139.8, 137.0, 136.0, 134.8, 129.6, 128.7, 128.4, 128.1, 127.7, 125.4, 122.7, 122.7, 120.0, 119.2, 117.3, 117.2, 114.5, 113.5, 113.3, 111.8, 56.1, 50.6, 40.0, 39.8, 38.8, 26.3, 25.6 ppm.

IR (NaCl) ν : 3285.2, 2925.0, 1616.8 cm^{-1} .

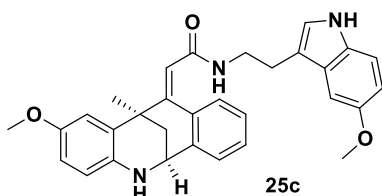
HRMS (MALDI-TOF): calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$ [M] 463.2260, found 463.2257.

(±)-(Z)-2-((6S,12R)-2-Methoxy-12-methyl-5,12-dihydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*]azocin-11(6H)-ylidene)-N-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)acetamide (25c) and

(±)-(E)-2-((6S,12R)-2-Methoxy-12-methyl-5,12-dihydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*]azocin-11(6H)-ylidene)-N-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)acetamide (25d).

Prepared from **24** (0.3 mmol, 0.096 g), 5-methoxytryptamine (0.3 mmol, 0.057 g), HOAt (0.3 mmol, 0.49 mL of a solution 0.6 M in DMF) and Et_3N (0.6 mmol, 0.061 g).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 1:1.



Yield: 0.033 g (22 %). White solid.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 7.96 (bs, 1H), 7.45 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.27 – 7.21 (m, 3H), 7.05 – 6.96 (m, 2H), 6.87 (dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.54 (dd, $J = 8.6, 2.8$ Hz, 1H), 6.36 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.57 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.43 (bs, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.65 – 3.52 (m, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.00 – 2.73 (m, 2H), 2.28 (dd, $J = 12.8, 2.2$ Hz, 1H), 2.16 (dd, $J = 12.8, 3.8$ Hz, 1H), 1.59 (s, 3H) ppm.

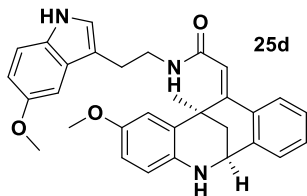
^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 170.1 154.4, 153.2, 152.3, 139.9, 136.2, 132.5, 131.8, 130.1, 129.4, 128.6, 128.1, 128.0, 127.2, 123.0, 117.5, 116.6, 114.3, 112.9, 112.8, 112.7, 112.4, 100.8, 56.3, 56.1, 50.8, 40.0, 39.9, 38.8, 26.3, 25.1 ppm.

IR (NaCl) ν : 3285.6, 2922.8, 1636.2 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for C₃₁H₃₁N₃O₃ (M = 493.60): C, 75.43; H, 6.33; N, 8.51.

Found: C, 75.30; H, 6.23; N, 8.64.

mp: 115-117 °C.



Yield: 0.044 g (30 %). Brown solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.19 (bs, 1H), 7.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.33 – 7.27 (m, 3H), 7.24 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.20 – 7.10 (m, 3H), 6.92 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 6.59 (dd, *J* = 8.6, 2.6 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.31 (s, 1H), 5.85 (bs, 1H), 4.48 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.87 – 3.69 (m, 5H), 3.10 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.24 (dd, *J* = 12.9, 3.4 Hz, 1H), 2.15 (dd, *J* = 12.9, 2.2 Hz, 1H), 1.82 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 169.6, 154.5, 153.6, 149.1, 139.3, 135.0, 134.9, 132.1, 129.6, 129.3, 128.6, 128.2, 128.1, 125.4, 123.4, 117.7, 117.4, 114.5, 113.6, 112.9, 112.8, 112.5, 101.0, 56.4, 56.1, 50.7, 40.0, 39.7, 38.8, 26.3, 25.6 ppm.

IR (NaCl) v: 3276.4, 2922.0, 1618.7 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₃₁H₃₁N₃O₃ (M = 493.60): C, 75.43; H, 6.33; N, 8.51.

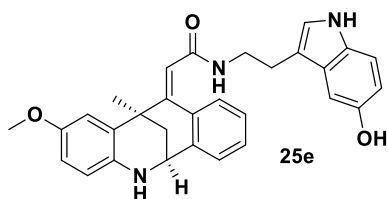
Found: C, 75.38; H, 6.61; N, 8.75.

mp: 130-132 °C.

(±)-(Z)-N-(2-(5-Hydroxy-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-((6S,12R)-2-methoxy-12-methyl-5,6-dihydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*]azocin-11(12H)-ylidene)acetamide (25e) and (±)-(E)-N-(2-(5-Hydroxy-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-((6S,12R)-2-methoxy-12-methyl-5,6-dihydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*]azocin-11(12H)-ylidene)acetamide (25f)

Prepared from **24** (0.3 mmol, 0.096 g), serotonin hydrochloride (0.3 mmol, 0.064 g), HOAt (0.3 mmol, 0.49 mL of a solution 0.6 M in DMF) and Et₃N (0.6 mmol, 0.061 g).

Purification: dichloromethane: methanol 98:2.



Yield: 0.035 g (24 %). Beige solid.

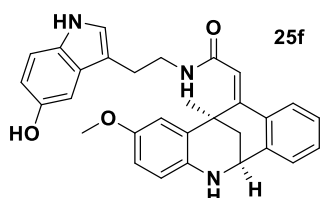
¹H NMR (250 MHz, MeOD) δ : 7.32 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.20 (td, J = 7.3, 1.1 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.97 – 6.92 (m, 1H), 6.91 – 6.86 (m, 2H), 6.74 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.66 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 6.49 (dd, J = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.03 (s, 1H), 4.39 (t, J = 2.9 Hz, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.44 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.93 – 2.69 (m, 2H), 2.30 (dd, J = 12.7, 3.8 Hz, 1H), 2.17 (dd, J = 12.5, 2.2 Hz, 1H), 1.56 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, MeOD) δ : 172.7, 154.3, 153.8, 151.1, 140.8, 137.7, 133.8, 133.0, 130.5, 129.8, 129.6, 129.4, 129.3, 127.5, 124.2, 118.5, 115.9, 114.7, 113.4, 112.7, 112.3, 112.3, 103.4, 56.0, 51.5, 41.4, 40.4, 39.6, 26.4, 25.7 ppm.

IR (NaCl) ν : 3263.2, 2920.4, 1598.7 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$ (M = 479.57): C, 75.13; H, 6.10; N, 8.76. Found: C, 74.82; H, 6.42; N, 8.40.

mp: 142-143 °C.



Yield: 0.046 g (32 %). Brown paste.

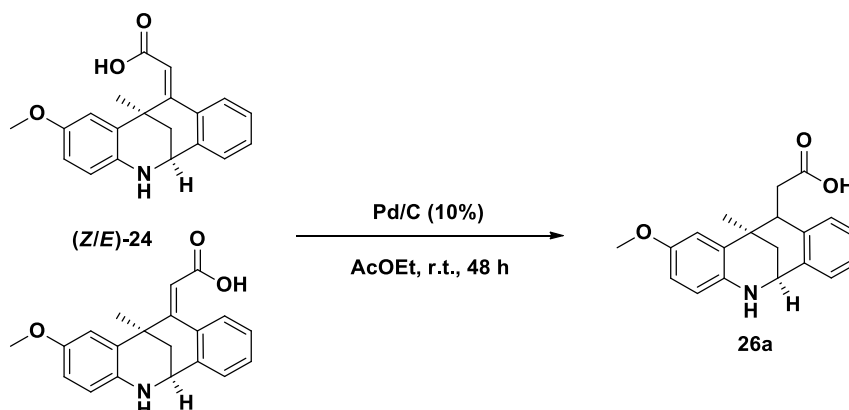
¹H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 7.44 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.34 – 7.28 (m, 1H), 7.27 – 7.17 (m, 2H), 7.15 – 7.07 (m, 3H), 6.99 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.68 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 6.49 (dd, J = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 6.41 – 6.34 (m, 2H), 4.34 (t, J = 2.9 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.66 – 3.56 (m, J = 7.0, 4.0 Hz, 2H), 2.99 (t, J = 8.2 Hz, 2H), 2.22 (dd, J = 12.8, 3.7 Hz, 1H), 2.03 (dd, J = 12.8, 2.4 Hz, 1H), 1.70 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 172.3, 154.3, 151.2, 150.0, 140.3, 137.1, 136.1, 133.1, 130.1, 129.8, 129.8, 129.5, 128.6, 125.8, 124.3, 118.4, 117.2, 115.3, 114.0, 112.7, 112.5, 112.4, 103.5, 56.0, 51.1, 41.6, 40.8, 39.8, 26.7, 26.1 ppm.

IR (NaCl) ν : 3297.2, 2930.9, 1620.4 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$ (M = 479.57): C, 75.13; H, 6.10; N, 8.76. Found: C, 75.44; H, 5.95; N, 8.85.

Synthesis of (\pm)-2-((6*S*,12*R*)-2-methoxy-12-methyl-5,6,11,12-tetrahydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*]azocin-11-yl)acetic acid (**26a**)



0.193 g (0.6 mmol) of acids **24** were dissolved in 5 mL of ethyl acetate in a 50 mL single-neck round-bottom flask. Pd/C (0.019 g, 10% w/w) was added under Ar atmosphere, and then, argon and air traces were removed under vacuum for 5 minutes. Later, the flask was filled with H_2 , and the reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h. When the reaction was finished, the mixture was filtered through a zelite pad to remove palladium, and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting crude could be used in the following reaction without further purification, but the product could be also purified for its characterization by a silica gel column chromatography using petroleum ether: ethyl acetate 85:15 as the mobile phase, obtaining 0.171 g of **26a** (88%) as a beige solid.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 7.27 – 7.08 (m, 4H), 6.84 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.63 (dd, $J = 8.7, 2.8$ Hz, 1H), 6.45 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.43 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.58 (dd, $J = 7.9, 2.5$ Hz, 1H), 3.19 (dd, $J = 17.4, 2.9$ Hz, 1H), 2.47 (dd, $J = 17.4, 7.9$ Hz, 1H), 2.25 (qd, $J = 12.8, 3.1$ Hz, 2H), 1.57 (s, 3H) ppm.

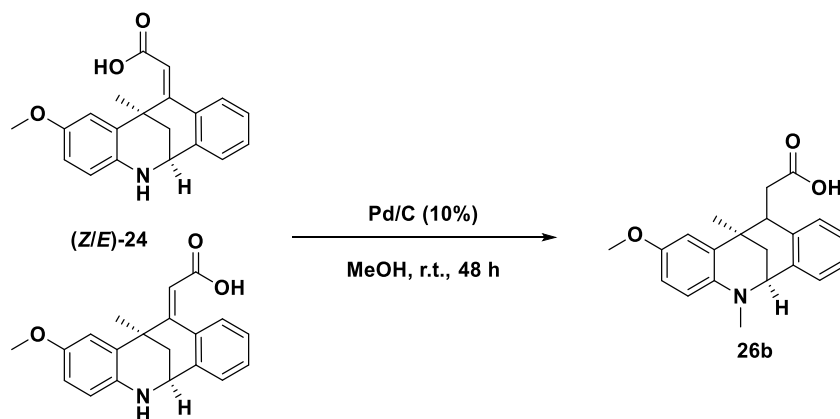
$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ : 180.5, 152.4, 139.4, 138.9, 136.5, 128.5, 128.2, 127.4, 127.3, 127.2, 117.3, 115.0, 113.5, 56.3, 50.5, 49.4, 38.1, 36.8, 35.6, 27.5 ppm.

IR (NaCl) ν : 3281.7, 2921.6, 1699.0 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₀H₂₁NO₃ (M = 323.39): C, 74.28; H, 6.55; N, 4.33.
Found: C, 74.37; H, 6.79; N, 3.97.

mp: 183-185 °C.

Synthesis of (±)-2-((6*S*,12*R*)-2-methoxy-5,12-dimethyl-5,6,11,12-tetrahydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*]azocin-11-yl)acetic acid (26b**)**



0.193 g (0.6 mmol) of acids **24** were dissolved in 5 mL of dry methanol in a 50 mL single-neck round-bottom flask. Pd/C (0.019 g, 10% w/w) was added under Ar atmosphere, and then, argon and air traces were removed under vacuum for 5 minutes. Later, the flask was filled with H₂, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h. When the reaction was finished, the mixture was filtered through a zelite pad to remove palladium, and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting crude could be used in the following reaction without further purification, but the product could also be purified through a silica gel column chromatography using petroleum ether: ethyl acetate 85:15 as the mobile phase, that yielded 0.165 g of **26b** (85%) as a brown solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.27 – 7.09 (m, 4H), 6.87 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.69 (dd, *J* = 8.9, 2.8 Hz, 1H), 6.42 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.26 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.56 (dd, *J* = 7.7, 2.7 Hz, 1H), 3.15 (dd, *J* = 17.4, 3.0 Hz, 1H), 2.95 (s, 3H), 2.50 – 2.30 (m, 2H), 2.20 (dd, *J* = 12.6, 3.4 Hz, 1H), 1.57 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 179.7, 150.9, 147.6, 139.2, 135.3, 128.8, 128.2, 127.5, 127.2, 126.2, 115.8, 112.6, 112.4, 58.4, 56.3, 51.4, 49.6, 38.9, 36.8, 36.1, 27.9 ppm.

IR (NaCl) ν: 2923.4, 1702.6 cm⁻¹.

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 3:2.

Yield: 0.099 g (71 %). Yellowish solid.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.13 (bs, 1H), 7.66 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.27 – 7.11 (m, 4H), 7.07 – 6.97 (m, 3H), 6.75 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.59 (dd, $J = 8.7, 2.8$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 5.59 (s, 1H), 4.36 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H), 3.82 – 3.58 (m, 6H), 3.07 – 2.99 (m, 2H), 2.92 (dd, $J = 16.0, 2.4$ Hz, 1H), 2.26 – 2.10 (m, 2H), 1.94 (dd, $J = 16.0, 8.4$ Hz, 1H), 1.51 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ : 173.5, 151.9, 139.7, 139.7, 136.9, 136.8, 128.2, 127.9, 127.8, 127.7, 127.7, 126.8, 122.6, 122.5, 119.9, 119.2, 116.7, 115.3, 113.3, 112.9, 111.7, 56.3, 50.5, 48.6, 40.2, 39.4, 37.8, 35.3, 27.5, 25.8 ppm.

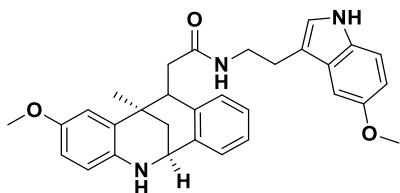
IR (NaCl) ν : 3284.8, 2920.4, 1641.8 cm^{-1}

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$ ($M = 465.59$): C, 77.39; H, 6.71; N, 9.03.

Found: C, 77.48; H, 6.36; N, 8.88.

mp: 121-123 $^\circ\text{C}$.

(±)-2-((6*S*,12*R*)-2-methoxy-12-methyl-5,6,11,12-tetrahydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*]azocin-11-yl)-*N*-(2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)acetamide (27b)



Prepared from **26a** (0.3 mmol, 0.097 g), 5-methoxytryptamine (0.3 mmol, 0.057 g), HOAt (0.3 mmol, 0.49 mL of a solution 0.6 M in DMF) and Et_3N (0.6 mmol, 0.061 g).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 1:1.

Yield: 0.061 g (41 %). Pink foam.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.07 (bs, 1H), 7.26 – 7.11 (m, 3H), 7.08 – 6.98 (m, 4H), 6.89 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 6.58 (dd, $J = 8.6, 2.6$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.62 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.36 (bs, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.80 – 3.61 (m, 6H), 3.03 – 2.87 (m, 3H), 2.17 (t, $J = 10.0$ Hz, 2H), 1.95 (dd, $J = 16.0, 8.5$ Hz, 1H), 1.51 (s, 3H) ppm.

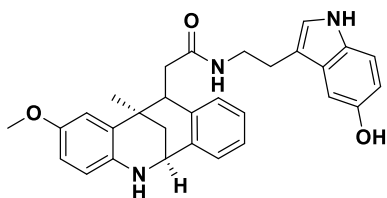
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 173.5, 154.5, 152.0, 139.7, 138.4, 132.9, 132.0, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9, 127.7, 126.9, 123.3, 116.7, 115.4, 112.9, 112.8, 112.8, 112.5, 100.9, 56.3, 56.3, 50.5, 48.6, 40.0, 39.4, 37.8, 35.3, 27.5, 25.8 ppm.

IR (NaCl) v: 3298.0, 2924.4, 1642.7 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₃₁H₃₃N₃O₃ (M = 495.61): C, 75.13; H, 6.71; N, 8.48. Found: C, 74.77; H, 6.45; N, 8.68.

mp: 110-111 °C.

(±)-N-(2-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-((6S,12R)-2-methoxy-12-methyl-5,6,11,12-tetrahydro-6,12-methanodibenzo[b,f]azocin-11-yl)acetamide (27c)



Prepared from **26a** (0.3 mmol, 0.097 g), serotonin hydrochloride (0.3 mmol, 0.064 g), HOAt (0.3 mmol, 0.49 mL of a solution 0.6 M in DMF) and Et₃N (0.6 mmol, 0.061 g).

Purification: dichloromethane: methanol 97:3.

Yield: 0.051 g (35 %). Purple solid.

¹H NMR (250 MHz, MeOD) δ: 7.24 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.13 – 7.06 (m, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.99 – 6.90 (m, 3H), 6.79 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 6.41 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.28 (t, *J* = 3.0 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.61 – 3.47 (m, *J* = 9.0, 4.4 Hz, 3H), 3.05 – 2.89 (m, 3H), 2.13 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 2.06 (dd, *J* = 16.0, 9.0 Hz, 1H), 1.48 (s, 3H) ppm.

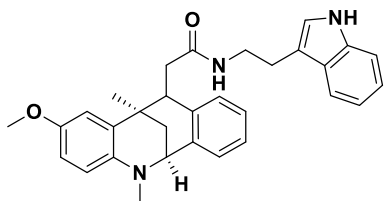
¹³C NMR (63 MHz, MeOD) δ: 176.3, 153.3, 151.2, 140.5, 140.2, 137.8, 133.1, 129.6, 129.5, 128.6, 128.4, 127.9, 127.4, 124.3, 118.0, 115.2, 114.4, 112.6, 112.5, 112.3, 103.5, 56.2, 51.2, 49.6, 41.5, 39.3, 39.3, 36.2, 27.5, 26.1 ppm.

IR (NaCl) v: 3296.8, 2922.2, 1636.5 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₃₀H₃₁N₃O₃ (M = 481.59): C, 74.82; H, 6.49; N, 8.73. Found: C, 75.10; H, 6.60; N, 8.50.

mp: 151-153 °C.

(±)-N-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-2-((6S,12R)-2-methoxy-5,12-dimethyl-5,6,11,12-tetrahydro-6,12-methanodibenzo[b,f]azocin-11-yl)acetamide (28a)



Prepared from **26b** (0.3 mmol, 0.101 g), tryptamine (0.3 mmol, 0.048 g), HOAt (0.3 mmol, 0.49 mL of a solution 0.6 M in DMF) and Et₃N (0.6 mmol, 0.061 g).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 3:1.

Yield: 0.066 g (46 %). Pale brown solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.21 (bs, 1H), 7.64 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.41 – 7.32 (m, 1H), 7.27 – 7.09 (m, 4H), 7.06 – 6.94 (m, 3H), 6.81 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J* = 8.8, 2.9 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.56 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.22 (bs, 1H), 3.81 – 3.57 (m, 6H), 3.05 – 2.91 (m, 5H), 2.85 (dd, *J* = 16.0, 2.6 Hz, 1H), 2.28 (dd, *J* = 12.6, 3.0 Hz, 1H), 2.13 (dd, *J* = 12.6, 3.2 Hz, 1H), 1.88 (dd, *J* = 16.0, 8.4 Hz, 1H), 1.53 (s, 3H) ppm.

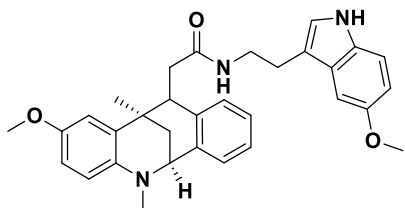
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 173.6, 150.6, 140.0, 139.1, 136.8, 135.6, 128.6, 127.9, 127.9, 127.9, 127.7, 125.8, 122.5, 122.5, 119.8, 119.1, 116.0, 113.2, 112.1, 111.9, 111.7, 58.3, 56.2, 48.6, 40.2, 39.6, 38.7, 38.5, 35.8, 27.9, 25.7 ppm.

IR (NaCl) *v*: 3281.7, 2922.3, 1646.2 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₃₁H₃₃N₃O₂ (M = 479.61): C, 77.63; H, 6.94; N, 8.76. Found: C, 77.41; H, 6.85; N, 8.40.

mp: 113-114 °C.

(±)-N-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-((6S,12R)-2-methoxy-5,12-dimethyl-5,6,11,12-tetrahydro-6,12-methanodibenzo[b,f]azocin-11-yl)acetamide (28b)



Prepared from **26b** (0.3 mmol, 0.101 g), 5-methoxytryptamine (0.3 mmol, 0.057 g), HOAt (0.3 mmol, 0.49 mL of a solution 0.6 M in DMF) and Et₃N (0.6 mmol, 0.061 g).

Purification: petroleum ether: ethyl acetate 1:1.

Yield: 0.061 g (40 %). Beige solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.00 (bs, 1H), 7.26 – 7.08 (m, 3H), 7.08 – 7.01 (m, 4H), 6.89 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.66 (dd, *J* = 8.8, 2.9 Hz, 1H), 6.39 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.57 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.22 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.82 – 3.57 (m, 6H), 2.99 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.94 (s, 3H), 2.87 (dd, *J* = 16.0, 2.6 Hz, 1H), 2.28 (dd, *J* = 12.6, 3.0 Hz, 1H), 2.14 (dd, *J* = 12.6, 3.3 Hz, 1H), 1.91 (dd, *J* = 16.0, 8.4 Hz, 1H), 1.53 (s, 3H) ppm.

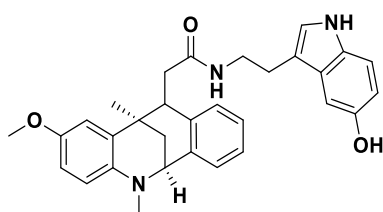
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 173.6, 154.5, 150.6, 140.0, 139.1, 135.7, 132.0, 128.7, 128.0, 127.9, 127.9, 127.9, 125.9, 123.2, 116.0, 113.0, 112.9, 112.4, 112.1, 111.9, 100.9, 58.4, 56.3, 56.3, 48.7, 40.0, 39.7, 38.7, 38.5, 35.8, 27.9, 25.8 ppm.

IR (NaCl) ν: 3283.7, 2920.5, 1644.1 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₃₂H₃₅N₃O₃ (M = 509.64): C, 75.41; H, 6.92; N, 8.25. Found: C, 75.74; H, 7.16; N, 8.54.

mp: 117-118 °C.

(±)-*N*-(2-(5-hydroxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)-2-((6*S*,12*R*)-2-methoxy-5,12-dimethyl-5,6,11,12-tetrahydro-6,12-methanodibenzo[*b,f*]azocin-11-yl)acetamide (**28c**)



Prepared from **26b** (0.3 mmol, 0.101 g), serotonin hydrochloride (0.3 mmol, 0.064 g), HOAt (0.3 mmol, 0.49 mL of a solution 0.6 M in DMF) and Et₃N (0.6 mmol, 0.061 g).

Purification: dichloromethane: methanol 97:3.

Yield: 0.048 g (32 %). Brown oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.98 (s, 1H), 7.22 – 6.94 (m, 6H), 6.90 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.7, 2.2 Hz, 1H), 6.68 (dd, *J* = 8.9, 2.9 Hz, 1H), 6.40

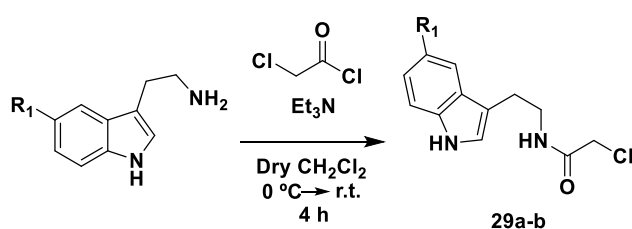
(d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 5.50 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.20 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.69 – 3.49 (m, 3H), 2.93 (s, 3H), 2.88 – 2.74 (m, 3H), 2.25 (dd, $J = 12.6, 3.0$ Hz, 1H), 2.10 (dd, $J = 12.6, 3.3$ Hz, 1H), 1.81 (dd, $J = 16.0, 8.3$ Hz, 1H), 1.50 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 173.8, 150.4, 150.3, 139.9, 139.3, 135.6, 131.9, 128.7, 128.5, 128.1, 128.0, 127.9, 125.9, 123.5, 116.3, 112.8, 112.6, 112.3, 112.1, 111.9, 103.9, 58.3, 56.5, 48.6, 40.5, 39.6, 38.8, 38.4, 35.8, 27.9, 25.7 ppm.

IR (NaCl) ν : 3297.6, 2923.5, 1642.7 cm^{-1} .

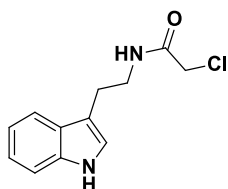
HRMS (MALDI-TOF): calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 496.2522, found 496.2572.

Synthesis of 2-chloroacetamides 29a-b.



To a stirred solution of the suitable tryptamine derivative (3 mmol) and Et_3N (3.3 mmol, 0.333 g) in dry CH_2Cl_2 (5 mL) at 0°C , a solution of chloroacetyl chloride (3.3 mmol, 0.339 g) in dry CH_2Cl_2 (5 mL) was added dropwise, *via* an addition funnel. The reaction mixture was allowed to reach room temperature and stirred for 4 h. Then, the reaction was quenched by the addition of water (15 mL), the phases were separated, and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 15 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous sodium sulphate, and the solvent was removed under vacuum. The resulting residues were the pure products obtained with quantitative yield, and they could be characterized and used in the next reaction without further purification.

N-(2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl)-2-chloroacetamide (29a)



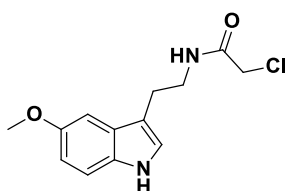
Prepared from tryptamine (3 mmol, 0.481 g), chloroacetyl chloride (3.3 mmol, 0.339 g), and Et_3N (3.3 mmol, 0.333 g). Off-white solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.76 (bs, 1H), 7.64 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.28–7.21 (m, 1H), 7.20–7.12 (m, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.87 (bs, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.70–3.57 (m, 2H), 3.03 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 166.5, 136.7, 127.4, 122.7, 122.4, 119.7, 118.8, 112.3, 111.8, 43.0, 40.4, 25.3 ppm.

IR (NaCl) v: 3385.7, 3299.0, 2949.5, 1635.3 cm⁻¹.

2-Chloro-*N*-(2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)acetamide (29b).



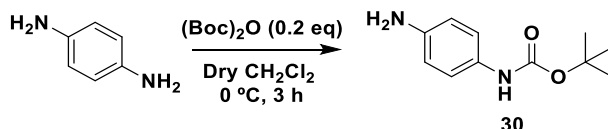
Prepared from tryptamine (3 mmol, 0.571 g), chloroacetyl chloride (3.3 mmol, 0.339 g), and Et₃N (3.3 mmol, 0.333 g). Brown solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.43 (s, 1H), 7.30–7.26 (m, 1H), 7.08 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.91 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.83 (bs, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.71–3.59 (m, 2H), 3.00 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 166.6, 154.3, 131.9, 127.8, 123.4, 112.7, 112.5, 112.2, 100.7, 56.3, 43.0, 40.4, 25.3 ppm.

IR (NaCl) v: 3324.1, 2943.1, 1647.7 cm⁻¹.

Synthesis of tert-butyl-(4-aminophenyl)carbamate (30)



To a solution of *p*-phenylenediamine (50 mmol, 5.407 g) in dry CH₂Cl₂ (40 mL) at 0 °C, Boc anhydride (10 mmol, 2.183 g) dissolved in 10 mL of dry CH₂Cl₂ was added dropwise *via* an addition funnel. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 3 h, then, the solvent was removed under vacuum and the crude was purified by silica gel column chromatography, using petroleum ether: ethyl acetate (from 2:1 to 1:2) as the mobile phase. 1.562 g (75%) of **30** were obtained as a white solid.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 7.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.70 – 6.59 (m, 2H), 6.39 (bs, 1H), 3.57 (bs, 2H), 1.52 (s, 9H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 153.8, 142.8, 130.1, 121.3, 116.0, 80.4, 28.8 ppm.

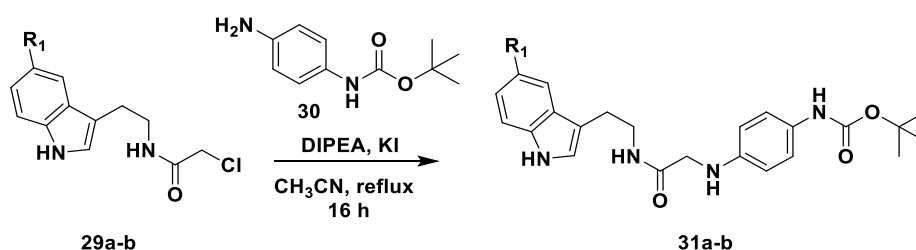
IR (NaCl) ν : 3354.6, 2984.6, 1691.5 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ ($M = 208.26$): C, 63.44; H, 7.74; N, 13.45.

Found: C, 63.27; H, 7.65; N, 13.75.

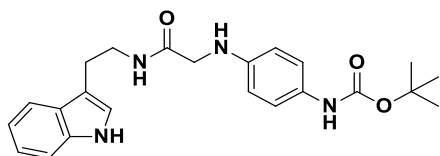
mp: > 250 °C.

Synthesis of carbamates 31a-b.



A solution of the corresponding chloride **29** (3 mmol), **30** (3 mmol, 0.625 g), DIPEA (3.3 mmol, 0.426 g) and KI (4.5 mmol, 0.747 g) in acetonitrile (15 mL) was refluxed overnight. The reaction mixture was cooled to room temperature and quenched by the addition of water (15 mL). The organic phase was washed with brine (15 mL), and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 x 15 mL). The organic phases were combined and dried over anhydrous sodium sulphate, and the solvent was removed under reduced pressure. A silica gel column chromatography using neat AcOEt as the mobile phase was performed to isolate the pure products.

Tert-Butyl (4-((2-((2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl)amino)phenyl)carbamate (**31a**)



Prepared from **29a** (3 mmol, 0.710 g), **30** (3 mmol, 0.625 g), DIPEA (3.3 mmol, 0.426 g) and KI (4.5 mmol, 0.747 g).

Yield: 0.931 g (76%). White foam.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 9.03 (bs, 1H), 7.53 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.22 – 7.14 (m, 1H), 7.14 – 7.04 (m, 3H), 6.70 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.45 – 6.34 (m, 3H), 4.16 (bs, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.62 – 3.51 (m, 2H), 2.91 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.59 (s, 9H) ppm.

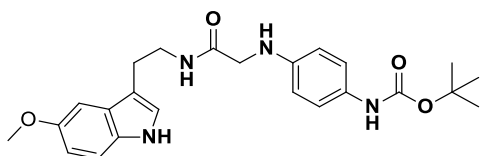
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 170.8, 155.1, 144.0, 136.8, 129.1, 127.2, 124.1, 123.4, 121.9, 119.2, 118.7, 113.42 (s), 111.8, 111.5, 80.8, 48.5, 39.3, 28.8, 25.2 ppm.

IR (NaCl) v: 3296.7, 2974.3, 1648.8 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₃H₂₈N₄O₃ (M = 408.49): C, 67.63; H, 6.91; N, 13.72. Found: C, 67.76; H, 6.53; N, 14.04.

mp: 101-103 °C.

Tert-butyl(4-((2-((2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl)amino)phenyl)-carbamate (31b)



Prepared from **29b** (3 mmol, 0.800 g), **30** (3 mmol, 0.625 g), DIPEA (3.3 mmol, 0.426 g) and KI (4.5 mmol, 0.747 g).

Yield: 1.026 g (78%). Brown foam.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.88 (bs, 1H), 7.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.70 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.45 – 6.36 (m, 3H), 4.18 (bs, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.69 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.63 – 3.50 (m, 2H), 2.88 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.58 (s, 9H) ppm.

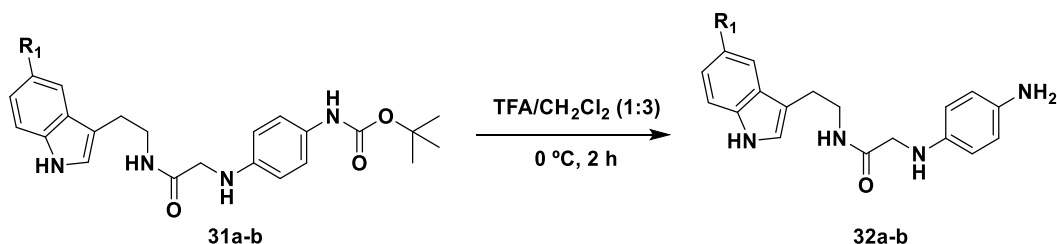
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 170.8, 155.1, 154.0, 144.0, 132.0, 129.1, 127.5, 124.3, 124.1, 113.4, 112.5, 112.2, 111.2, 100.5, 80.9, 56.3, 48.5, 39.1, 28.8, 25.2 ppm.

IR (NaCl) v: 3298.6, 2928.3, 1650.2 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₄H₃₀N₄O₄ (M = 438.52): C, 65.73; H, 6.90; N, 12.78. Found: C, 66.07; H, 6.65; N, 12.48.

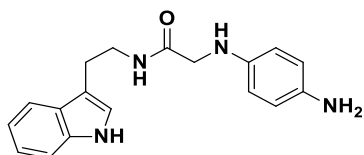
mp: 93-95 °C.

Synthesis of anilines 32a-b.



To a stirred solution of **31a** or **31b** (2 mmol) in CH₂Cl₂ (60 mL) at 0 °C, 20 mL of trifluoroacetic acid were added dropwise. The mixture was stirred at 0°C for 2 h, after which it was neutralised carefully with NaOH 5 M. Then, the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL), the combined organic phases were dried over anhydrous sodium sulphate, and then the solvent was evaporated under reduced pressure. The oily residue was purified by silica gel column chromatography with dichloromethane: methanol 95:5 as the mobile phase, yielding the desired anilines **32a-b**.

N-(2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl)-2-((4-aminophenyl)amino)acetamide (**32a**)



Prepared from **31a** (2 mmol, 0.817 g).

Yield: 0.580 g (94%). Brown paste.

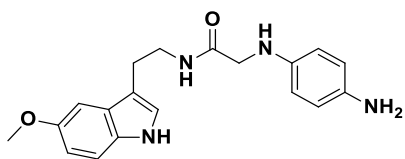
¹H NMR (250 MHz, MeOD) δ: 7.56 – 7.44 (m, 1H), 7.33 – 7.27 (m, 1H), 7.11 – 7.03 (m, 1H), 7.02 – 6.93 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.65 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.41 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.59 (s, 2H), 3.50 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, MeOD) δ: 174.3, 142.5, 139.4, 138.2, 128.6, 123.7, 122.3, 119.6, 119.2, 118.7, 115.3, 112.7, 112.2, 50.0, 40.8, 26.2 ppm.

IR (NaCl) *v*: 3315.6, 2920.0, 1637.2 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₁₈H₂₀N₄O (M = 308.38): C, 70.11; H, 6.54; N, 18.17. Found: C, 69.90; H, 6.45; N, 17.87.

2-((4-Aminophenyl)amino)-N-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)acetamide (32b)



Prepared from **31b** (2 mmol, 0.877 g).

Yield: 0.548 g (81%). Brown oil.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, MeOD) δ : 7.19 (dd, $J = 8.8, 0.4$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.74 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 6.64 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.41 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.60 (s, 2H), 3.49 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.86 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H) ppm.

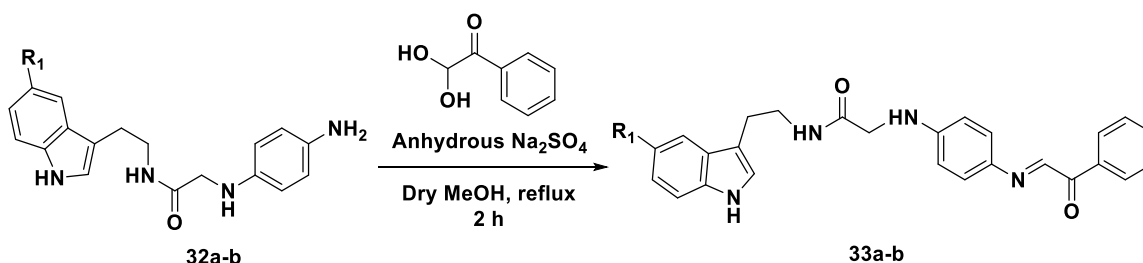
$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, MeOD) δ : 174.4, 154.9, 142.6, 139.4, 133.4, 128.9, 124.4, 118.7, 115.3, 112.9, 112.6, 112.5, 101.1, 56.3, 50.0, 49.7, 49.3, 49.0, 48.7, 48.3, 48.0, 40.7, 26.2 ppm.

IR (NaCl) ν : 3332.8, 2919.2, 1650.7 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$ ($M = 338.40$): C, 67.44; H, 6.55; N, 16.56.

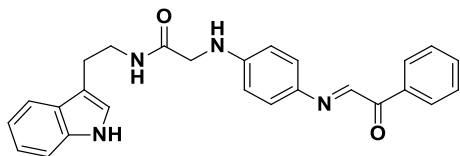
Found: C, 67.10; H, 6.48; N, 16.46.

Synthesis of α -ketoimines 33a-b.



Compounds **32a-b** (1 mmol) and phenyl glyoxal monohydrate (1 mmol, 0.152 g) were dissolved in 5 mL of dry methanol. Anhydrous sodium sulphate (5 g) was added, and the mixture was refluxed for 2 h. Then, the reaction mixture was filtered through a pad of cotton to remove the sodium sulphate, and the solvent was removed under reduced pressure to afford the desired imines in quantitative yields. The products could be used in the following reaction without further purification.

(E)-N-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-2-((4-((2-oxo-2-phenylethylidene)amino)phenyl)amino)acetamide (33a)



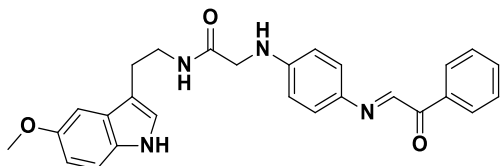
Prepared from **32a** (1 mmol, 0.308 g) and phenyl glyoxal monohydrate (1 mmol, 0.152 g). Brown oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.40 (s, 1H), 8.37 – 8.28 (m, 2H), 7.95 (bs, 1H), 7.69 – 7.61 (m, 1H), 7.60 – 7.49 (m, 3H), 7.41 – 7.32 (m, 3H), 7.27 – 7.19 (m, 1H), 7.17 – 7.09 (m, 1H), 6.81 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.62 – 6.55 (m, 2H), 3.82 (s, 2H), 3.72 – 3.63 (m, 2H), 2.98 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 191.1, 170.3, 151.5, 148.9, 139.3, 136.7, 136.1, 133.7, 130.7, 128.7, 127.5, 124.5, 122.7, 122.2, 119.5, 118.8, 113.5, 112.4, 111.8, 48.1, 39.8, 25.4 ppm.

IR (NaCl) v: 3314.5, 2921.8, 1649.9 cm⁻¹.

(E)-N-(2-(5-Methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-((4-((2-oxo-2-phenylethylidene)amino)phenyl) amino)acetamide (33b)



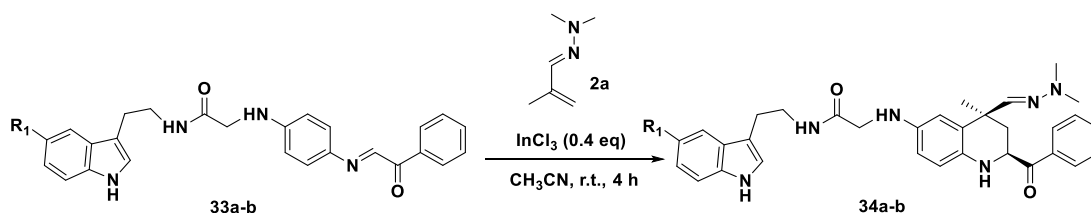
Prepared from **32b** (1 mmol, 0.338 g) and phenyl glyoxal monohydrate (1 mmol, 0.152 g). Red oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.40 (s, 1H), 8.35 – 8.26 (m, 2H), 7.68 – 7.60 (m, 1H), 7.57 – 7.49 (m, 2H), 7.39 – 7.30 (m, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.61 – 6.53 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.80 (s, 2H), 3.69 – 3.58 (m, *J* = 12.7, 6.5 Hz, 2H), 2.93 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 191.4, 170.0, 154.4, 152.5, 148.7, 139.9, 136.2, 133.7, 131.9, 131.0, 128.8, 128.0, 124.5, 123.4, 113.8, 112.7, 112.6, 112.5, 101.0, 56.4, 48.6, 39.6, 25.6 ppm.

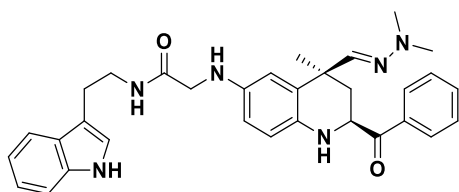
IR (NaCl) v: 3312.9, 2928.6, 1650.3 cm^{-1} .

Synthesis of 2-acyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines 34a-b.



To a stirred solution of the imines **33a-b** (1 mmol) and InCl_3 (0.4 mmol, 0.088 g) in acetonitrile (20 mL), it was added the hydrazone **2a** (1.1 mmol, 0.123 g) dropwise. Stirring was continued for 4 h until completion of the reaction as indicated by TLC, and the mixture was diluted with water (10 mL), extracted with ethyl acetate (4 x 10 mL), dried and evaporated. The resulting crude was purified by silica gel column chromatography using different solvent mixtures that are detailed in the description of each compound.

(±)-N-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-2-(((2S,4S)-2-benzoyl-4-((E)-(2,2-dimethylhydrazono)methyl)-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)amino)acetamide (34a)



Prepared from **33a** (1 mmol, 0.424 g), **2a** (1.1 mmol, 0.123 g), and InCl_3 (0.4 mmol, 0.088 g).

Purification: dichloromethane: methanol 97:3.

Diastereoselection: 84:16 (*cis*: *trans*).

Yield: 0.284 g (53 %). Yellow foam.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.34 (bs, 1H), 8.03 – 7.94 (m, 2H), 7.68 – 7.61 (m, 1H), 7.61 – 7.55 (m, 2H), 7.54 – 7.50 (m, 1H), 7.39 – 7.34 (m, 1H), 7.25 – 7.17 (m, 1H), 7.16 – 7.08 (m, 1H), 6.99 – 6.92 (m, 1H), 6.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.42 – 6.34 (m, 2H), 5.11 (dd, $J = 11.8, 3.1$ Hz, 1H), 3.76 – 3.63 (m, 3H), 3.58 – 3.44 (m,

^1H), 3.00 – 2.89 (m, 2H), 2.73 (s, 6H), 2.12 (dd, $J = 13.1, 3.1$ Hz, 1H), 1.89 (t, $J = 12.4$ Hz, 1H), 1.64 (s, 3H) ppm.

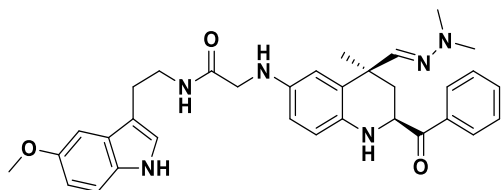
^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 200.2, 171.2, 143.7, 139.7, 136.8, 136.1, 135.1, 134.0, 129.4, 129.0, 128.8, 127.6, 123.0, 122.4, 119.7, 119.0, 117.8, 113.9, 113.8, 112.8, 111.7, 54.8, 49.9, 43.7, 41.2, 39.3, 39.2, 27.2, 25.7 ppm.

IR (NaCl) ν : 3334.3, 2921.2, 1653.4 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_2$ (M = 536.67): C, 71.62; H, 6.76; N, 15.66. Found: C, 71.83; H, 6.57; N, 16.05.

mp: 108-110 $^\circ\text{C}$.

(±)-2-(((2*S*,4*S*)-2-Benzoyl-4-((*E*)-(2,2-dimethylhydrazono)methyl)-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)amino)-*N*-(2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)acetamide (**34b**)



Prepared from **33b** (1 mmol, 0.455 g), **2a** (1.1 mmol, 0.123 g), and InCl_3 (0.4 mmol, 0.088 g).

Purification: dichloromethane: methanol 97:3.

Diastereoselection: 80:20 (*cis*: *trans*).

Yield: 0.238 g (42 %). Yellow solid.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.38 (bs, 1H), 8.02 – 7.93 (m, 2H), 7.69 – 7.59 (m, 1H), 7.58 – 7.48 (m, 2H), 7.25 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.04 – 6.94 (m, 2H), 6.86 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.65 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.43 – 6.31 (m, 2H), 5.10 (dd, $J = 11.8, 2.9$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.76 – 3.61 (m, 3H), 3.59 – 3.43 (m, 1H), 3.00 – 2.80 (m, 2H), 2.72 (s, 6H), 2.11 (dd, $J = 13.0, 3.0$ Hz, 1H), 1.88 (t, $J = 12.4$ Hz, 1H), 1.64 (s, 3H) ppm.

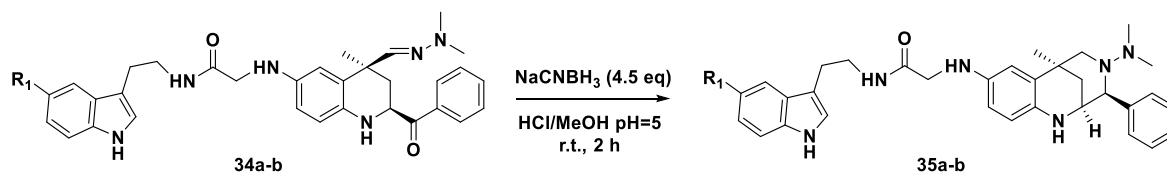
^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 200.2, 171.2, 154.3, 143.7, 139.7, 136.0, 135.1, 134.0, 131.9, 129.3, 128.9, 128.7, 127.9, 123.7, 117.8, 113.8, 113.7, 112.6, 112.4, 112.4, 100.7, 56.3, 54.7, 49.9, 43.7, 41.1, 39.2, 27.2, 25.7 ppm.

IR (NaCl) ν : 3330.9, 2923.0, 1653.6 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $C_{33}H_{38}N_6O_3$ (M = 566.69): C, 69.94; H, 6.76; N, 14.83.
 Found: C, 69.70; H, 6.57; N, 14.92.

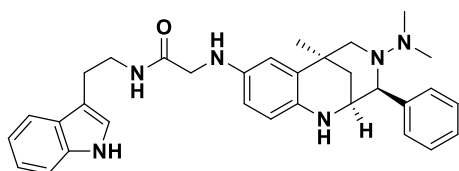
mp: 104-105 °C.

Synthesis of 2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocine-tryptamine hybrid compounds 35a-b.



To a stirred solution of 2-acyltetrahydroquinolines **34a** or **34b** (0.3 mmol) in methanol (3 mL) at room temperature, it was added dropwise a mixture of HCl conc/MeOH (pH~3) to set the pH of the mixture at 5 approximately. Then, $NaCNBH_3$ was added in a portion (0.3 mmol), stirring was continued for 10 minutes, and pH was readjusted again to 5. This process was repeated until 4.5 eq of $NaCNBH_3$ were employed and pH set to 5. Stirring was continued for 75 min, and then, the solvent was evaporated. The residue was dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL), washed with water (1 x 5 mL) and brine (1 x 5 mL). The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 5 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated under vacuum. The resulting residue was purified by a column chromatography in silica gel, using the suitable mixture of solvents.

(±)-N-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-2-(((2S,3S,6S)-4-(dimethylamino)-6-methyl-3-phenyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocin-8-yl)amino)acetamide (35a)



Prepared from **34a** (0.3 mmol, 0.161 g) and $NaCNBH_3$ (1.35 mmol, 0.085 g).

Purification: dichloromethane: methanol 98:2.

Yield: 0.091 g (58 %). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.30 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.42 – 7.33 (m, 3H), 7.31 (s, 1H), 7.29 – 7.23 (m, 2H), 7.20 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.17 – 7.09 (m, 2H), 6.77 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.48 (bs, 1H), 6.41 – 6.21 (m, 1H), 3.82 (bs, 1H), 3.75 – 3.54 (m, 4H), 3.26 (bs, 1H), 2.97 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.85 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 2.46 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 2.11 (s, 7H), 1.86 – 1.67 (m, 1H), 1.40 (s, 3H).

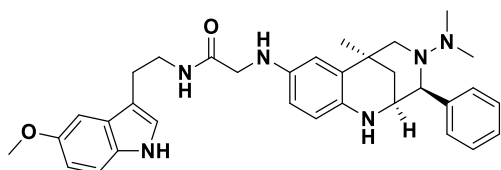
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 171.7, 142.9, 139.4, 138.7, 136.7, 130.7, 128.4, 128.2, 127.6, 127.2, 122.8, 122.3, 119.6, 119.0, 113.9, 113.4, 112.9, 111.6, 111.0, 71.5, 56.7, 53.2, 50.4, 39.6, 39.0, 38.0, 33.9, 25.8, 25.1 ppm.

IR (NaCl) v: 3330.5, 2928.1, 1652.0 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₃₂H₃₈N₆O (M = 522.68): C, 73.53; H, 7.33; N, 16.08. Found: C, 73.92; H, 7.49; N, 16.15.

mp: 122-123 °C.

(±)-2-(((2*S*,3*S*,6*S*)-4-(Dimethylamino)-6-methyl-3-phenyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[*e*][1,4]diazocin-8-yl)amino)-*N*-(2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)acetamide (35b)



Prepared from **34b** (0.3 mmol, 0.170 g) and NaCNBH₃ (1.35 mmol, 0.085 g).

Purification: dichloromethane: methanol 97:3.

Yield: 0.083 g (50 %). Brown solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.18 (s, 1H), 7.41 – 7.33 (m, 2H), 7.31 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.28 – 7.21 (m, 3H), 7.14 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.87 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.58 – 6.16 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.84 – 3.52 (m, 5H), 3.36 – 3.15 (m, 1H), 2.93 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.86 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 2.46 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 2.11 (s, 7H), 1.89 – 1.64 (m, 1H), 1.38 (s, 3H).

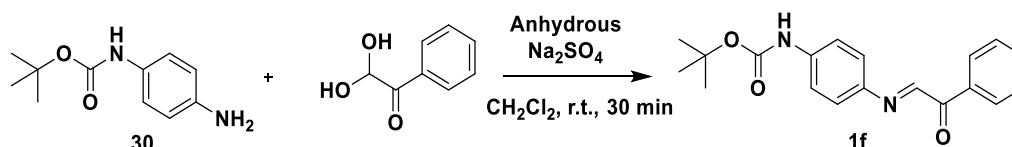
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: not available due to deficient relaxation of diverse aromatic and aliphatic carbons. Further experiments will be displayed to fully characterise the compound.

IR (NaCl) ν : 3330.5, 2930.5, 1651.8 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_2$ (M = 552.71): C, 71.71; H, 7.29; N, 15.21. Found: C, 72.08; H, 7.10; N, 15.49.

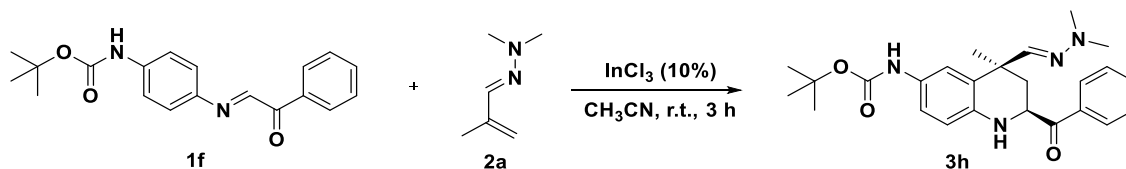
mp: 127-129 $^{\circ}\text{C}$.

Synthesis of (*E*)-tert-butyl 4-((2-oxo-2-phenylethylidene)amino)phenylcarbamate (1f)



A solution of **30** (4 mmol, 0.833 g) and phenyl glyoxal monohydrate (4 mmol, 0.609 g) in CH_2Cl_2 (5 mL) was stirred vigorously in the presence of anhydrous Na_2SO_4 (5 g) for 30 minutes. Then, the reaction mixture was filtered and the solvent evaporated under vacuum to afford the desired product as a brown oil in quantitative yield. It was used without further purification in the following reaction.

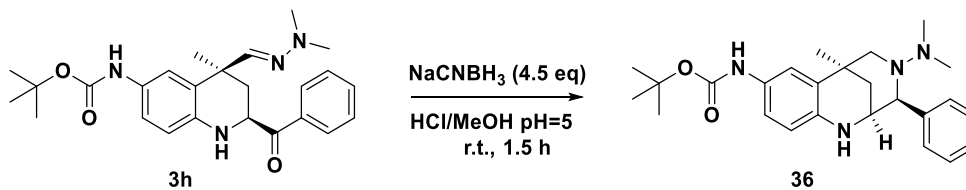
Synthesis of tert-butyl (\pm)-((2*S*,4*S*)-2-benzoyl-4-((*E*)-(2,2-dimethylhydrazono)methyl)-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)carbamate (3h).



To a stirred solution of the imine **1f** (4 mmol) and InCl_3 (0.4 mmol, 0.088 g) in acetonitrile (20 mL) it was added **2a** (1.1 eq, 4.4 mmol, 0.493 g) dropwise. Stirring was continued for 3 h until completion of the reaction as indicated by TLC, and the mixture was diluted with water (10 mL), extracted with ethyl acetate (4 x 10 mL), dried and evaporated. The resulting crude was purified by silica gel flash chromatography using petroleum ether: ethyl acetate 7:3 as the eluting solvent mixture, obtaining 1.083 g (62%) of the desired tetrahydroquinoline as a yellow solid.

Diastereoselection: 88:12 (*cis*: *trans*).

Synthesis of (±)-tert-butyl-((2S,3S,6S)-4-(dimethylamino)-6-methyl-3-phenyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocin-8-yl)carbamate (36).



To a stirred solution of **3h** (2.4 mmol, 1.048 g) in methanol (5 mL) at room temperature, it was added dropwise a mixture of HCl conc/MeOH (pH~3) to adjust the pH of the mixture at 5. Then, NaCNBH₃ was added in a portion (2.4 mmol), stirring was continued for 10 minutes, and pH was readjusted again to 5. This process was repeated until 4.5 eq of NaCNBH₃ were employed and pH set to 5. Stirring was continued for 45 min, and then, the solvent was evaporated and the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL), washed with water (1 x 5 mL) and brine (1 x 5 mL). The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 5 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated under vacuum. The resulting residue was purified by a flash chromatography in silica gel, using petroleum ether: ethyl acetate 9:1 as the mobile phase. 0.608 g (60%) of the desired compound **36** were obtained, as a white foam.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.42 – 7.22 (m, 5H), 7.14 (s, 1H), 7.06 – 6.95 (m, 1H), 6.42 – 6.32 (m, 2H), 3.82 (s, 1H), 3.26 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 2.87 (dd, *J* = 9.7, 1.8 Hz, 1H), 2.46 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 2.12 (s, 7H), 1.78 (dd, *J* = 12.3, 2.9 Hz, 1H), 1.56 (s, 9H), 1.44 (s, 3H) ppm.

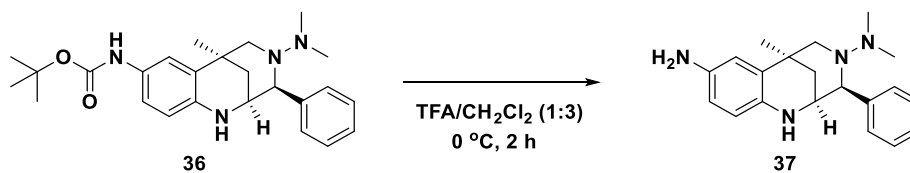
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: not available due to deficient relaxation of diverse aromatic and aliphatic carbons. Further experiments will be displayed to fully characterise the compound.

IR (NaCl) v: 3393.6, 2929.6, 1698.4 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₅H₃₄N₄O₂ (M = 422.56): C, 71.06; H, 8.11; N, 13.26. Found: C, 71.22; H, 7.78; N, 13.44.

mp: 101-103 °C.

Synthesis of (±)-(2*S*,3*S*,6*S*)-*N*⁴,*N*⁴,6-trimethyl-3-phenyl-2,3,5,6-tetrahydro-2,6-methanobenzo[*e*][1,4]diazocine-4,8(1*H*)-diamine (**37**)



To a stirred solution of compound **36** (1.4 mmol, 0.592 g) in CH₂Cl₂ (30 mL) at 0 °C, 10 mL of trifluoroacetic acid were added dropwise. The mixture was stirred at 0°C for 3 h, and then the reaction was neutralised carefully with NaOH 5 M. The aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL), the combined organic phases were dried over anhydrous sodium sulphate, and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was purified by silica gel flash chromatography with petroleum ether: ethyl acetate 3:1 as the eluting mixture, obtaining 0.321 g (71%) of **37** as a dark brown solid.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.41 – 7.33 (m, 2H), 7.32 – 7.23 (m, 3H), 6.64 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.51 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.82 (s, 1H), 3.46 (bs, 2H), 3.23 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 2.85 (dd, *J* = 9.6, 2.1 Hz, 1H), 2.44 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 2.20 – 2.06 (m, 7H), 1.77 (dd, *J* = 12.3, 2.9 Hz, 1H), 1.41 (s, 3H) ppm.

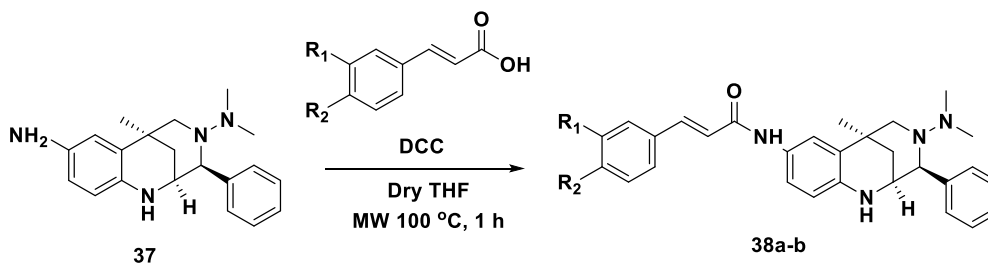
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 143.1, 139.3, 136.6, 130.6, 128.4, 128.2, 127.1, 115.6, 113.7, 113.4, 71.6, 56.5, 53.3, 39.0, 38.1, 33.7, 25.1 ppm.

IR (NaCl) ν: 3331.2, 2928.2 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₀H₂₆N₄ (M = 322.45): C, 74.50; H, 8.13; N, 17.38. Found: C, 74.26; H, 8.48; N, 17.02.

mp: 89-91 °C.

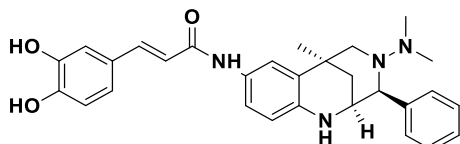
Synthesis of *N*-(2,6-methanobenzo[*e*][1,4]diazocin-8-yl)-3-phenylacrylamides **38a-b**.



In an 8 mL microwave vial, a solution of **37** (0.28 mmol), the corresponding acid (0.28 mmol) and DCC (0.28 mmol) in dry THF (3 mL) was irradiated in a confocal MW at 100 °C

for 1 h. The reaction mixture was allowed to reach room temperature and then, it was filtered through a pad of cotton to remove the solid formed. The filtrate was evaporated under reduced pressure, and the resulting crude was purified by silica gel flash chromatography using the suitable mixture of solvents.

(±)-(E)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-N-((2S,3S,6S)-4-(dimethylamino)-6-methyl-3-phenyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocin-8-yl)acrylamide (38a)



Prepared from **37** (0.28 mmol, 0.090 g), caffeic acid (0.28 mmol, 0.050 g) and DCC (0.28 mmol, 0.058 g).

Purification: dichloromethane: methanol 97:3.

Yield: 0.092 g (68 %). Yellow solid.

¹H NMR (250 MHz, MeOD) δ: 7.52 – 7.41 (m, 2H), 7.36 – 7.20 (m, 6H), 7.06 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.95 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.54 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.84 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 3.25 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 2.90 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 2.52 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 2.08 (s, 6H), 2.04 – 1.95 (m, 1H), 1.84 (dd, *J* = 12.3, 2.8 Hz, 1H), 1.43 (s, 3H) ppm.

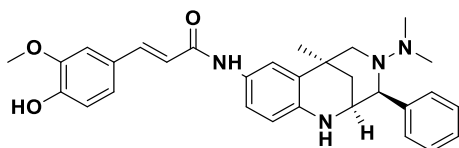
¹³C NMR (63 MHz, MeOD) δ: 166.8, 148.8, 146.8, 144.3, 143.7, 142.2, 129.9, 129.2, 129.0, 129.0, 128.5, 127.7, 122.1, 120.9, 119.1, 118.6, 116.5, 115.1, 113.1, 72.3, 57.6, 54.2, 39.0, 38.4, 34.6, 25.1 ppm.

IR (NaCl) v: 3184.7, 2929.4, 1594.1 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₉H₃₂N₄O₃ (M = 484.59): C, 71.88; H, 6.66; N, 11.56. Found: C, 71.56; H, 6.46; N, 11.68.

mp: 182-183 °C.

(±)-(E)-N-((2S,3S,6S)-4-(Dimethylamino)-6-methyl-3-phenyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocin-8-yl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide (38b)



Prepared from **37** (0.28 mmol, 0.090 g), ferulic acid (0.28 mmol, 0.054 g) and DCC (0.28 mmol, 0.058 g).

Purification: dichloromethane: methanol 98:2.

Yield: 0.081 g (58 %). Yellow oil.

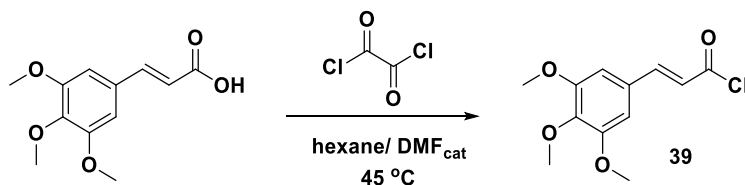
¹H NMR (250 MHz, MeOD) δ: 7.53 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.35 – 7.21 (m, 6H), 7.17 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.82 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 3.24 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 2.89 (dd, *J* = 9.6, 1.6 Hz, 1H), 2.50 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 2.08 – 1.94 (m, 7H), 1.83 (dd, *J* = 12.3, 2.9 Hz, 1H), 1.42 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, MeOD) δ: 166.6, 150.0, 149.3, 144.4, 143.9, 142.1, 130.0, 129.2, 129.0, 128.9, 128.4, 127.6, 123.2, 120.9, 119.4, 118.5, 116.5, 113.1, 111.6, 72.3, 57.6, 56.4, 54.2, 38.8, 38.4, 34.6, 25.1 ppm.

IR (NaCl) ν: 3275.0, 2931.4, 1593.2 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₃₀H₃₄N₄O₃ (M = 498.62): C, 72.26; H, 6.87; N, 11.24. Found: C, 72.21; H, 6.69; N, 11.10.

Synthesis of (E)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl chloride (39)

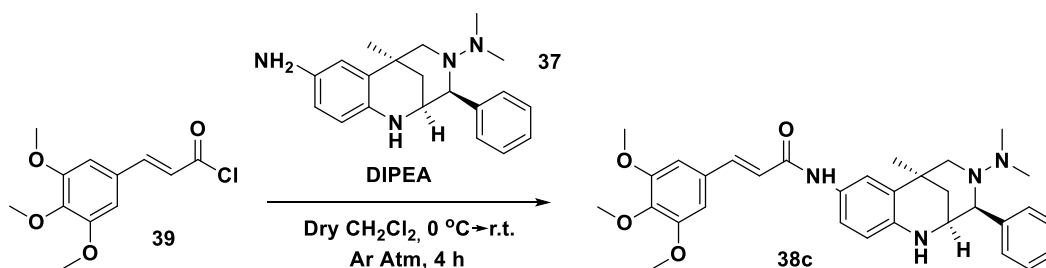


To a stirred suspension of trimethoxycinnamic acid (0.28 mmol, 0.067 g) in hexane/DMF (5 mL/3 drops), oxalyl chloride (0.56 mmol, 0.071 g) was added dropwise, and the mixture was heated to 45 °C for 3 h. Then, the reaction mixture was cooled to room temperature and the supernatant suspension was removed carefully from the flask, as it corresponded to the acyl chloride, while the excess of oxalyl chloride remained stuck

at the walls of the reaction flask. The supernatant was dried under reduced pressure, affording the pure acyl chloride **39** as a yellow solid in quantitative yield. It was employed in the following reaction without further purification.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.60 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.08 (s, 2H), 6.67 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 3.81 (s, 6H), 3.68 (s, 3H).

Synthesis of (\pm)-(*E*)-*N*-((2*S*,3*S*,6*S*)-4-(Dimethylamino)-6-methyl-3-phenyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[*e*][1,4]diazocin-8-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acrylamide (38c**)**



To a stirred solution of amine **37** (0.28 mmol, 0.090 g) and DIPEA (0.42 mmol, 0.054 g) in dry CH_2Cl_2 (5 mL) at $0\text{ }^\circ\text{C}$, a solution of **39** (0.28 mmol, 0.072 g) in dry CH_2Cl_2 (5 mL) was added dropwise. Once the addition was finished, the mixture was allowed to reach room temperature and stirred for 6 h. Then, the reaction was quenched by the addition of water (10 mL), the organic phase was washed with brine (10 mL), and the combined aqueous phases were extracted with CH_2Cl_2 (2 x 15 mL). The organic layers were combined, dried over anhydrous sodium sulphate and evaporated under reduced pressure. The crude was purified through a silica gel flash chromatography using dichloromethane: metanol 98:2 to elute the pure product, obtaining 0.073 g (48%) of **38c** as a yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, MeOD) δ : 7.61 – 7.49 (m, 4H), 7.37 – 7.21 (m, 13H), 6.92 (s, 4H), 6.73 (d, $J = 15.6$ Hz, 2H), 6.43 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.90 (s, 12H), 3.85 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 3.82 (s, 6H), 3.27 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 2.92 (dd, $J = 9.6, 1.6$ Hz, 2H), 2.53 (d, $J = 9.7$ Hz, 2H), 2.10 (s, 12H), 2.06 – 1.96 (m, 3H), 1.85 (dd, $J = 12.3, 2.9$ Hz, 2H), 1.45 (s, 6H) ppm.

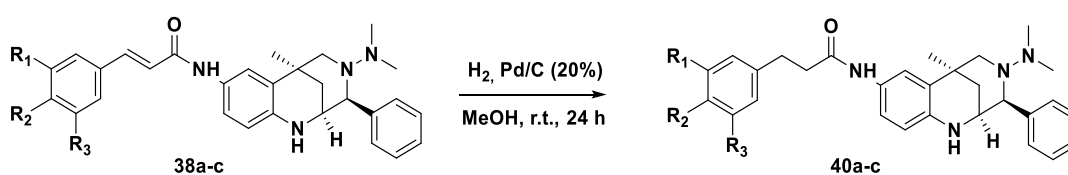
^{13}C NMR (63 MHz, MeOD) δ : 166.0, 154.8, 144.4, 143.7, 141.6, 140.6, 132.3, 129.9, 129.2, 128.9, 128.8, 127.7, 122.1, 120.8, 118.5, 113.0, 106.2, 72.3, 61.2, 57.6, 56.6, 54.2, 38.9, 38.4, 34.6, 25.1 ppm.

IR (NaCl) ν : 3315.7, 2931.2, 1596.8 cm^{-1} .

Elemental analysis (%): Calc. for $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_4$ (M = 542.67): C, 70.82; H, 7.06; N, 10.32. Found: C, 70.79; H, 7.00; N, 9.94.

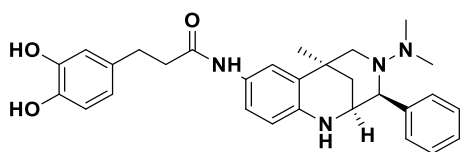
mp: 147-148 $^{\circ}\text{C}$.

Synthesis of *N*-(2,6-methanobenzo[*e*][1,4]diazocin-8-yl)-3-phenylpropanamides 40a-c.



Compounds **38a-c** (0.08 mmol) were dissolved in 5 mL of dry methanol in a 50 mL single-neck round-bottom flask. Pd/C (20% w/w) was added under Ar atmosphere, and then, argon and air traces were removed under vacuum for 5 minutes. Then, the flask was filled with H_2 , and the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. Once the reaction was finished, the mixture was filtered through a zelite pad to remove palladium, and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting crude was purified by silica gel flash chromatography using the suitable mixture of solvents.

(±)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*N*-((2*S*,3*S*,6*S*)-4-(dimethylamino)-6-methyl-3-phenyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[*e*][1,4]diazocin-8-yl)propanamide (40a)



Prepared from **38a** (0.08 mmol, 0.039 g) and Pd/C (0.008 g).

Purification: dichloromethane: methanol 97:3.

Yield: 0.019 g (50%). Yellow oil.

^1H NMR (250 MHz, MeOD) δ : 7.35 – 7.19 (m, 6H), 7.06 (dd, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H), 6.71 – 6.66 (m, 2H), 6.57 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 6.36 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.82 (d, J = 1.9 Hz, 1H),

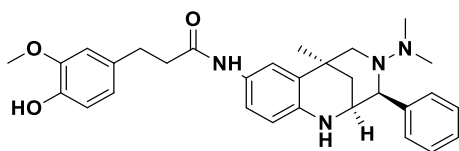
3.23 (dd, $J = 5.2, 3.0$ Hz, 1H), 2.90 – 2.80 (m, 3H), 2.61 – 2.46 (m, 3H), 2.09 – 1.93 (m, 7H), 1.81 (dd, $J = 12.2, 3.0$ Hz, 1H), 1.39 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, MeOD) δ : 173.4, 146.2, 144.4, 143.9, 133.9, 130.0, 129.2, 128.9, 128.4, 127.6, 121.5, 120.6, 119.2, 116.6, 116.3, 113.0, 72.3, 57.5, 54.2, 40.2, 38.9, 38.4, 34.5, 32.6, 25.0 ppm.

IR (NaCl) ν : 3283.0, 2927.6, 1597.8 cm^{-1} .

HRMS (MALDI-TOF): calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 487.2664, found 487.2710.

(±)-*N*-((2*S*,3*S*,6*S*)-4-(Dimethylamino)-6-methyl-3-phenyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[*e*][1,4]diazocin-8-yl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propanamide (40b)



Prepared from **38b** (0.08 mmol, 0.040 g) and Pd/C (0.008 g).

Purification: dichloromethane: methanol 98:2.

Yield: 0.021 g (52%). Beige oil.

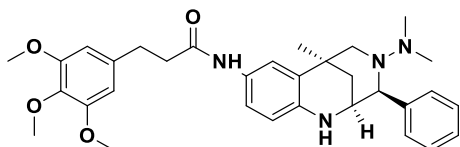
^1H NMR (250 MHz, MeOD) δ : 7.37 – 7.20 (m, 7H), 7.06 (dd, $J = 8.5, 2.3$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 6.73 – 6.68 (m, 2H), 6.37 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.86 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.25 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 2.96 – 2.85 (m, 4H), 2.65 – 2.49 (m, 3H), 2.14 (s, 6H), 2.00 – 1.93 (m, 1H), 1.83 (dd, $J = 12.3, 2.9$ Hz, 1H), 1.40 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (63 MHz, MeOD) δ : 173.4, 148.9, 145.9, 144.2, 133.8, 133.3, 129.6, 129.3, 129.1, 128.4, 128.0, 121.8, 121.5, 119.2, 116.1, 113.1, 113.0, 72.2, 57.8, 56.3, 54.1, 40.2, 39.0, 38.3, 34.6, 32.8, 25.0 ppm.

IR (NaCl) ν : 3297.2, 2931.2, 1598.6 cm^{-1} .

HRMS (MALDI-TOF): calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}]$ 500.2787, found 500.2789.

(±)-N-((2S,3S,6S)-4-(Dimethylamino)-6-methyl-3-phenyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocin-8-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propanamide (40c)



Prepared from **38c** (0.08 mmol, 0.043 g) and Pd/C (0.009 g).

Purification: dichloromethane: methanol 98:2.

Yield: 0.020 g (45%). Brown solid.

¹H NMR (250 MHz, MeOD) δ: 7.33 – 7.19 (m, 6H), 7.07 (dd, *J* = 8.5, 1.8 Hz, 1H), 6.56 (s, 2H), 6.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.72 (s, 3H), 3.21 (s, 1H), 2.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.84 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 2.59 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.48 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 2.04 (s, 6H), 1.99 – 1.90 (m, 1H), 1.80 (dd, *J* = 12.2, 2.4 Hz, 1H), 1.37 (s, 3H) ppm.

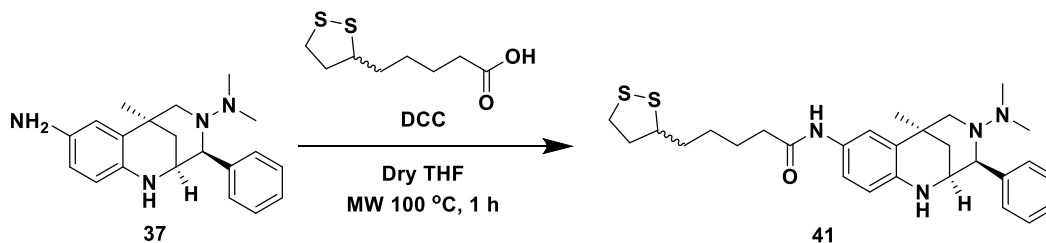
¹³C NMR (63 MHz, MeOD) δ: 173.0, 154.4, 144.4, 143.9, 138.5, 137.4, 130.0, 129.2, 128.9, 128.5, 127.6, 121.3, 119.0, 113.0, 106.7, 72.3, 61.1, 57.5, 56.5, 54.2, 39.9, 38.9, 38.4, 34.5, 33.4, 25.04 ppm.

IR (NaCl) v: 3314.2, 2927.8, 1588.1 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₃₂H₄₀N₄O₄ (M = 544.68): C, 70.56; H, 7.40; N, 10.29. Found: C, 70.72; H, 7.41; N, 10.07.

mp: 99-101 °C.

Synthesis of (±)-N-((2S,3S,6S)-4-(dimethylamino)-6-methyl-3-phenyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocin-8-yl)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide (41).



In an 8 mL microwave vial, a solution of **37** (0.1 mmol, 0.032 g), (±)-lipoic acid (0.1 mmol, 0.021 g) and DCC (0.1 mmol, 0.021 g) in dry THF (3 mL) was irradiated in a confocal MW at 100 °C for 1 h. The reaction mixture was then allowed to reach room temperature

and filtered through a pad of cotton to remove the solid formed. The filtrate was evaporated under reduced pressure, and the resulting crude was purified by silica gel flash chromatography using dichloromethane: methanol 99:1 as the eluting mixture. 0.020 g (40 %) of **41** were obtained as a brown solid.

¹H NMR (250 MHz, MeOD) δ: 7.34 – 7.18 (m, 6H), 7.11 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 6.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.82 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 3.66 – 3.53 (m, 1H), 3.26 – 3.20 (m, 1H), 3.19 – 3.02 (m, 2H), 2.91 – 2.82 (m, 1H), 2.54 – 2.41 (m, 2H), 2.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.09 – 1.94 (m, 7H), 1.94 – 1.65 (m, 6H), 1.60 – 1.46 (m, 2H), 1.40 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (63 MHz, MeOD) δ: 173.8, 144.3, 143.9, 130.0, 129.2, 128.9, 128.6, 127.6, 121.3, 119.0, 113.0, 72.3, 57.6, 57.5, 54.2, 41.3, 39.4, 38.9, 38.4, 37.6, 35.8, 34.5, 30.0, 26.8, 25.1 ppm.

IR (NaCl) v: 3285.8, 2923.9, 1640.7 cm⁻¹.

Elemental analysis (%): Calc. for C₂₈H₃₈N₄OS₂ (M = 510.76): C, 65.84; H, 7.50; N, 10.97. Found: C, 66.24; H, 7.29; N, 11.24.

mp: 94-97 °C.

Pharmacological evaluation.

Neurotoxicity

Primary cultures of cerebellar granule cells (CGNs) were prepared from 7 day-old pups of the same rat strain. All animal experiments were authorized by the University of Bologna bioethical committee (Protocol n° 17-72-1212) and performed according to Italian and European Community laws on the use of animals for experimental purposes. For cerebellar granule cultures, cells were dissociated from cerebella and plated on 96 well plates, previously coated with 10 µg/mL poly-L-lysine, at a density of 3×10⁵ cells/0.2 mL medium/well in BME supplemented with 100 mL/L heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Life technologies), 2 mM glutamine, 100 µM gentamicin sulphate and 25 mM KCl (all from Sigma-Aldrich). 16 h later, 10 µM cytosine arabino-furanoside (Sigma-Aldrich) was added to avoid glial proliferation. After 7 days *in vitro*, differentiated neurons were shifted to serum free BME medium containing 25 mM KCl without serum and different treatments were performed. The viability of CGNs exposed to increasing concentrations of the studied compounds (0, 5, 10 and 25 µM) for 24 h was evaluated

through the MTT assay. Briefly, thiazolyl blue was added to the culture medium at a final concentration of 0.1 mg/mL. Following a 20 min incubation at 37 °C in the dark, the MTT precipitate was dissolved in 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 buffer containing 5% Triton X-100 (all from Sigma-Aldrich) and absorbance was read at 570 nm in a multiplate spectrophotometric reader (Bio-Rad).

Neuroprotection assay against deprivation of serum and potassium

Primary cultures of cerebellar granule cells (CGNs) were prepared from 7 day-old pups of the same rat strain, employing the same methodology described for the neurotoxicity assays. After 7 days in vitro, differentiated neurons were shifted to serum free BME medium containing 5 mM KCl without serum and different treatments were performed. The viability of CGNs exposed to increasing concentrations of the studied compounds (0, 5 and 10 µM) for 48 h was evaluated through the MTT assay.

BV2 culture

BV-2 cells [RRID:CVCL_0182] from passages between 4 and 15 after defreezing, were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % of FBS, NaHCO₃ 24 mM, 50 units/mL and 50 µg/mL of P/S. Cells were harvested in 75 cm² flask (CORNING 430641U) and incubated at 37 °C with wet atmosphere and 5 % of CO₂ doing passages 1:4 twice a week. Once 80-85 % of confluence was reached, cells were transferred to a new culture flask and seeded in the appropriate plate for its experimental use, employing trypsin/EDTA and centrifuging at 400 revolutions per min (rpm) for 10 min.

Nitrites production determination by Griess assay

BV-2 cells were seeded in a 96-well plate (VWR 734-2327) at 40,000 cells/well density and incubated at 37 °C and 5 % of CO₂ for 24 h. Then, cells were pretreated in duplicate with tested compounds at a concentration of 5 µM and sulforaphane (positive control) at 10 µM for 24 h. Then, cells were coincubated in the presence of tested compounds at the same concentrations with LPS at 100 ng/mL for additional 24 h. Later, nitrite production was measured by modified Griess assay. Briefly, 100 µL of the supernatant was mixed with 50 µL of NEDA and 50 µL of dapson for 5 min at room temperature. Absorbance was measured at 550 nm in a Fluostar Optima plate-reader. All data were normalized to basal conditions, considering this value as 100% of nitrite production.

Nrf2 induction assay

AREc32 cell line was developed by Wang *et al.* from the human mammary MCF7 breast cancer cells. AREc32 cells are constitutively transfected with a plasmid which contains the pGL-8xARE luciferase gen reporter inserted after the EpRE sequences. Thus, the induction of Nrf-2 results in luciferase expression. AREc32 were kindly provided by Prof. Roland Wolf (University of Dundee, U.K.). AREc32 cells were cultured in DMEM with GlutaMAX and high glucose, supplemented with 1 % P/S (10,000 units), 1.6 % G418 (0.8 mg/mL), and 10 % FBS, incubated at 37 °C in a 5 % CO₂-supplemented air atmosphere. Cells were harvested in a 75 cm² flask with 11 mL of specified medium and they were transferred in a new flask each 4-6 days when the confluence was around 80 %.

For the determination of Nrf-2 induction activity, cells were seeded in 96-well white plate (COSTAR 3917) with a 60,000 cells/well density, using 100 µL of medium per well. Twenty-four hours after seeding, cells were treated with compounds at desired concentrations for 24 h, incubated at 37 °C and 5 % CO₂. Each well plate had a basal, a control with TBHQ (10 µM, positive control) variables and problem variables in a final volume of 100 µL. After 24 h incubation, the luciferase activity was measured through a bioluminescence assay, using "Luciferase assay system" (Promega E1500) proceeding as follows: treatments were removed and 20 µL of "lysis buffer" reagent were added to each well. After 10 mins, the 96-well plate was introduced in a luminescence multi-well reader, Orion II microplate luminometer (Berthold, Germany). Measurements were done by duplicate and the values were normalized to basal luminescence considered as 1.

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay

ORAC-FL test was employed to evaluate the oxygen free radical scavenger capacity of the compounds. The different solutions of trolox (1, 2, 4, 6, 8 µM) as reference compound, melatonin, as positive control, and new compounds (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 and 3 µM) were freshly prepared using PBS (10 mM, pH 7.4) at 37 °C. Black with clear flat bottom 96-well microplate (COSTAR 3904) was used to measure fluorescence in the plate reader FluoStar Optima (BMG Labtech, Offenburg, Germany) with 485 nm excitation and 520 nm emission filters. In each well 150 µL of fluorescein (70 nM) was

added as well as 25 µL of PBS buffer for blank, 25 µL of trolox solution for standard and 25 µL of melatonin or compound, for sample. Firstly, a fluorescence measurement was recorded to determine the basal signal. Then, 25 µL of AAPH (12 mM) was quickly added, since the reaction starts immediately after addition. All samples were carried out in duplicate at, at least, three different experiments. The fluorescence was measured during 90 min at 37 °C to obtain the area under the fluorescence decay curve. After blank correction, plotting the AUC versus concentration, linear regressions were obtained for each compound. The final results were expressed in trolox equivalents (TEq), where the slope of the sample linear regression was divided by the slope of trolox.

DPPH reduction assay

Experimental conditions were modified from a previously described procedure³⁵⁹. Briefly, the compounds under assay (150 µl) at the desired final concentrations in a mixture methanol/water (80/20) were added to a solution of DPPH in methanol/water (80/20) (150 µl, 100 µM), in a clear bottom 96-well plate, and the final solution was incubated 1 h in the dark. Then, DPPH absorbance of blank (MeOH/water), control (DPPH 100 µM), melatonin (negative control), ascorbic acid (positive control) and compounds plus DPPH were measured at 540 nm in a Fluostar Optima plate-reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) in duplicate. The percentage of absorbance (Abs) reduction of control after subtracting blank absorbance was calculated for each concentration by the formula: % DPPH reduction = $[100 - (Abs_{\text{sample}} - Abs_{\text{blank}}) \times 100] / Abs_{\text{control}}$.

SH-SY5Y culture

SH-SY5Y cells [ECACC 94030304] from passages between 4 and 16 after defreezing, were maintained in DMEM containing 15 % non-essential aminoacids and supplemented with 10 % of FBS, sodium pyruvate 1 M, NaHCO₃ 24 mM, 50 units/mL and 50 µg/mL of P/S, respectively. Cells were harvested in 75 cm² flask (CORNING 430641U) and incubated at 37 °C with wet atmosphere and 5 % of CO₂ doing passages 1:4 twice a week. Once 80-85 % of confluence was reached, cells were transferred to a new culture flask and,

³⁵⁹ Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., Mérillon, J. M. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1768.

seeded in the appropriate plate for its experimental use, employing trypsin/EDTA and centrifuging at 400 revolutions per min (rpm) for 10 min.

Calcium fluorimetry. Measurement of cellular response stimulating nicotinic receptors with Ach, cytisine and PNU282987 on SH-SY5Y cells

According to experimental requirements, SH-SY5Y were seeded in 96-well black plates at 100,000 cells/well density until reaching confluence. In brief, neuroblastoma cells were incubated with the Ca²⁺ sensitive fluorescent dye fluo-4 AM at 5 μM for 1 h at 37 °C in Krebs-Hepes (KH) solution, and 0.05 % pluronic acid. After that, cells were washed twice with KH solution and 175 μL of KH (as basal response) or treatments at 10 μM without (for Ach and cytisine injection) or with PNU120596 at 10 μM (for PNU282989 injection) were added and incubated for 10 mins. Prior to the stimulation of nicotinic receptors with ACh 100 μM, cytisine 20 μM or PNU282987 10 μM using an automatic injector, basal fluorescence (F₀) was recorded and then, fluorescence was measured for 13.5 s in a multi-well reader (FluoStar Optima, BMG, Germany), being the excitation and emission wavelengths 485 and 520 nm, respectively. To obtain normalized signals, the determination of maximum and minimum fluorescence values of each well were obtained adding 50 μL of Triton 5X (F_{max}) following 50 μL of MnCl₂ 1 M (F_{min}). The results were presented as normalized response to acetylcholine, cytisine or PNU282987+ PNU120596 calculated as $(F_{\text{measured}} - F_0)/(F_{\text{max}} - F_{\text{min}})$.

PAMPA assay

The filter membrane of the donor 96-well plate (Multiscreen IP sterile clear plate PDVF membrane, pore size 0.45 μM) was impregnated with 4 μL of porcine brain lipid (PBL) (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, United States) in dodecane (20 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). After 5 min, 180 μL of each compound solution in 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) buffer (pH 7.4) at a 100 μM concentration was added by duplicate into the donor plate to determine their ability to pass the brain barrier (V_D). Caffeine (negative control) and testosterone (positive control) were also included in the assay. The acceptor 96-well plate (Multiscreen, Millipore Corp. Burlington, MA, United States) was filled with 180 μL of PBS (V_A). Then, the donor filter plate was carefully put on the acceptor plate to form a “sandwich”, which was left undisturbed for 4 h at 25 °C.

After incubation, the donor plate was carefully removed. The maximum absorption wavelength in the UV spectrum of each compound was measured in a Fluostar Optima plate-reader, after which absorbances at the selected wavelength were recorded in the donor and the acceptor plates. Concentration of the compounds in the donor and acceptor well and equilibrium concentration were calculated from the standard curve and expressed as the permeability (Pe), according to the equation:

$$P_{app} = C \times \left[-\ln \left(1 - \frac{[drug_{acceptor}]}{[drug_{eq}]} \right) \right]$$

Where C:

$$C = \frac{V_D \times V_A}{(V_D + V_A) \times area \times time}$$

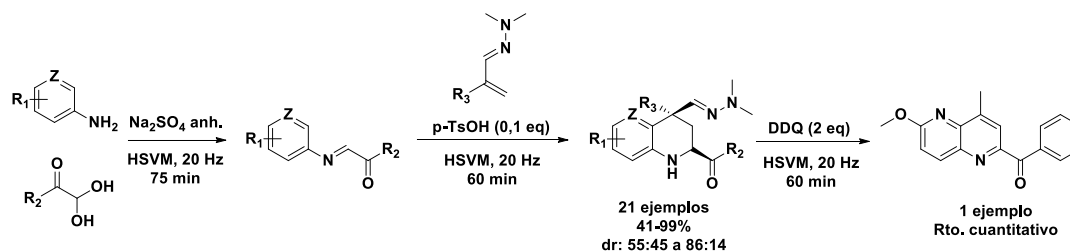
Statistical Analysis

All numerical values are given as mean \pm S.D of at least three different experiments. The IC₅₀ or CD parameters were calculated from individual concentration–response curves by performing non-linear regression analysis using GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). The results were analyzed by comparing experimental and control data using one-way ANOVA, followed by Newman–Keuls or Bonferroni post hoc test when three groups are implicated. Differences between groups were considered to be statistically significant if $p \leq 0.05$.

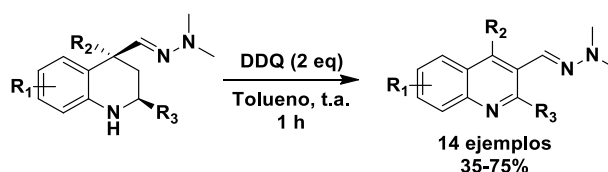
Capítulo 7.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

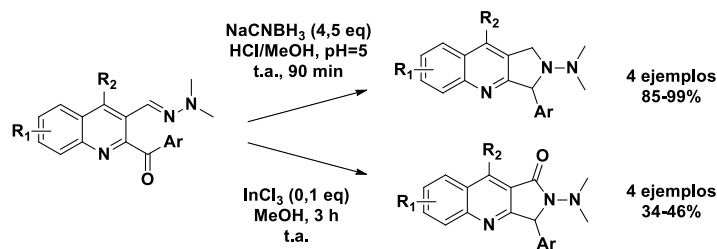
- Tras un extenso trabajo de optimización, se consiguió adaptar la síntesis de 2-acil-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas mediante la reacción de Povarov aza-vinílica a las condiciones de mecanoquímica. El nuevo procedimiento es sensiblemente más rápido que la reacción en disolución y mantiene una eficacia similar en términos de rendimiento y diastereoselectividad, aunque resulta un método un poco menos versátil que el convencional. Los derivados de 2-aciltetrahidroquinolina pudieron ser oxidados en el molino vibratorio a las quinolinas correspondientes mediante el empleo de DDQ, en un proceso que supone la pérdida del grupo dimetilhidrazonometilo. En cambio, otras transformaciones posteriores de los productos de Povarov en condiciones de mecanoquímica no dieron el resultado esperado.



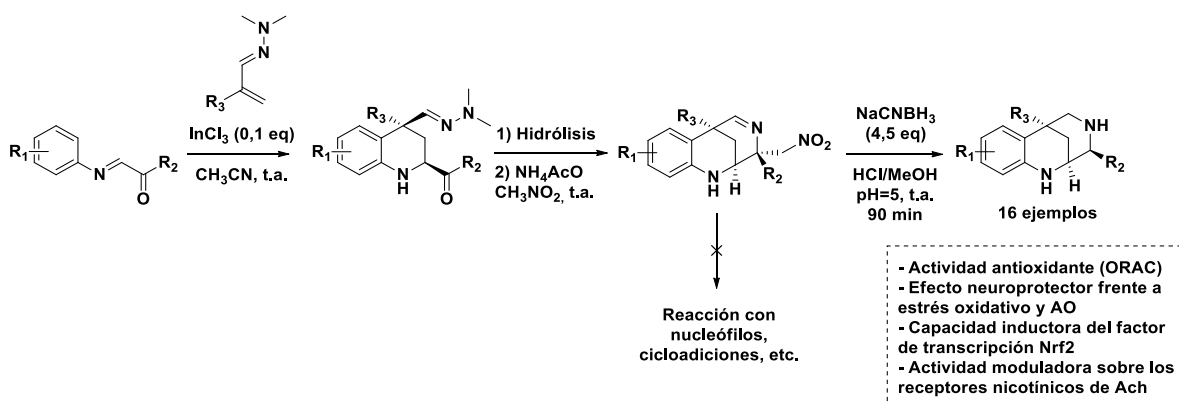
- Se verificó la aplicabilidad del protocolo de deshidrogenación/transposición/deshidrogenación a diversos derivados de 2-aryl/2-aciltetrahidroquinolina, que por regla general deben presentar sustituyentes de alto carácter electrodonador sobre el anillo de tetrahidroquinolina, así como deben carecer de grupos funcionales sensibles a la oxidación. Se desarrollaron mediante estudios computacionales varias propuestas mecanísticas para las distintas variantes de la reacción, que se pudieron validar en su mayoría de forma experimental.



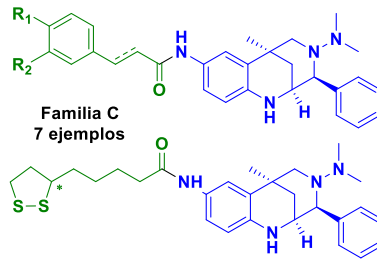
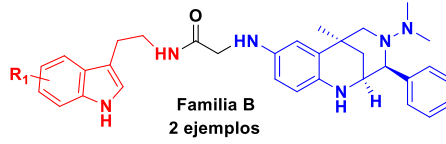
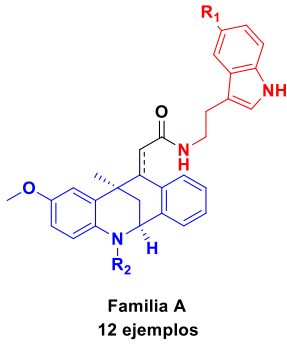
- Los derivados de 2-acil-3-dimetilhidrazonometilquinolina obtenidos se pudieron transformar en estructuras del tipo pirrolo[3,4-*b*]quinolina, mediante una ciclación reductora intramolecular, o del tipo pirrolo[3,4-*b*]quinolin-1-ona, a través de un protocolo *one-pot* catalizado por InCl₃.



4. Se completó una nueva quimioteca de compuestos derivados de 2,6-metanobenzo[e][1,4]diazocina a través de una ruta sintética basada en la reacción de Povarov aza-viníloga. Algunos de los nuevos derivados desplegaron una reseñable actividad antioxidante y neuroprotectora sobre diversos modelos *in vitro* de neurotoxicidad que podría estar mediada, al menos en parte, por su actividad moduladora de los receptores nicotínicos de acetilcolina e inductora del factor de transcripción Nrf2. Por el contrario, no se consiguió encontrar una utilidad sintética alternativa para el intermedio imínico de la ruta de obtención de los productos diazabíclicos anteriormente mencionados.

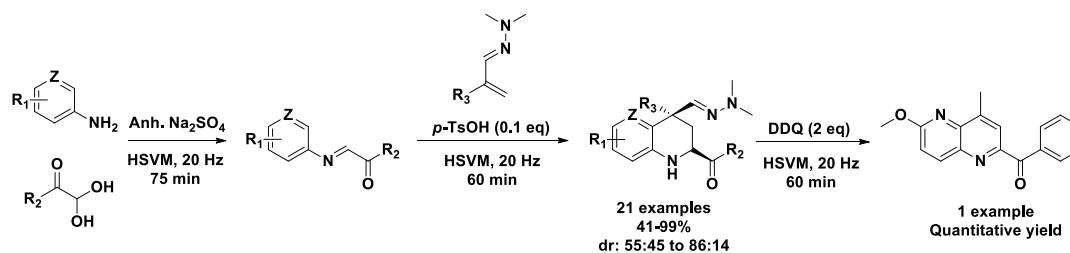


5. Se consiguió poner a punto la síntesis de tres nuevas familias de ligandos multidiana, integradas por un fragmento análogo de citosina y diversos productos naturales. La nueva quimioteca, integrada por un total de 21 derivados, fue sometida a un completo cribado farmacológico, cuyos resultados preliminares parecen confirmar que la mayoría de los compuestos obtenidos presentan las propiedades antioxidantes y neuroprotectoras que se pretendían con el nuevo diseño. Como en el caso anterior, todo apunta a que su potencial antineurodegenerativo se relaciona con su capacidad para modular los receptores nicotínicos de acetilcolina e inducir la traslocación al núcleo del factor de transcripción Nrf2.

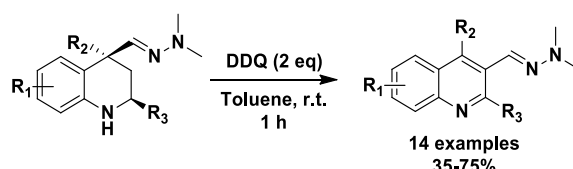


- Actividad antioxidante en ensayos ORAC y DPPH
- Efecto neuroprotector frente a privación de suero y potasio
- Actividad antiinflamatoria
- Capacidad inductora del factor de transcripción Nrf2
- Actividad moduladora sobre los receptores nicotínicos de Ach
- Atravesan BHE (PAMPA)

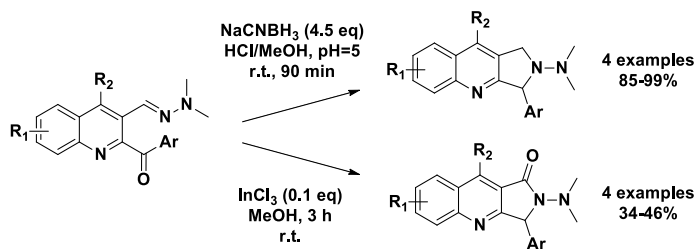
- The synthesis of 2-acyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines through the aza-vinylogous Povarov reaction was successfully adapted to mechanochemical conditions. The new optimised procedure is remarkably faster than the conventional one, while maintaining a similar efficiency in terms of diastereoselectivity and yield, although the mechanochemical conditions allowed a somewhat narrower substrate scope. A proof-of-concept experiment showed that 2-acyltetrahydroquinoline products can be oxidised under mechanochemical conditions in the presence of DDQ to furnish the corresponding 2-acylquinolines, with concomitant loss of the dimethylhydrazonomethyl group, a transformation that was not possible under conventional conditions. On the other hand, some other attempted transformations of the Povarov products under mechanochemical conditions were unsuccessful.



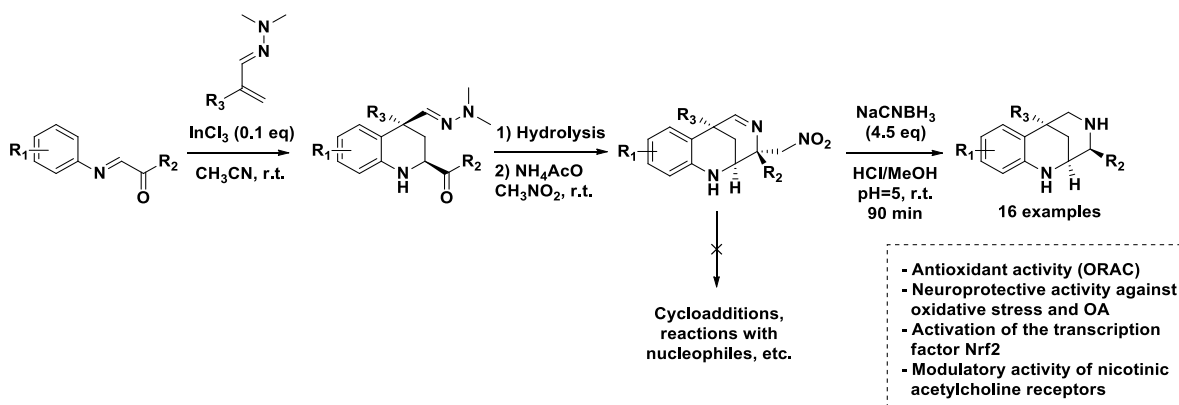
- A new DDQ-catalysed dehydrogenation/rearrangement/dehydrogenation process was successfully applied to several 2-aryl/2-acyltetrahydroquinoline derivatives, with the general requirement of bearing electrodonating substituents on the tetrahydroquinoline aromatic moiety, as well as the absence of functional groups sensitive to oxidative conditions. DFT studies furnished some mechanistic proposals for the different variants of the reaction, most of which were validated experimentally.



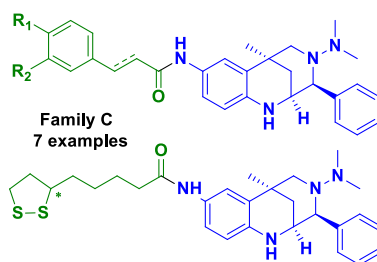
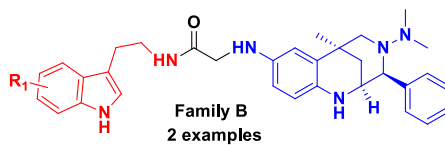
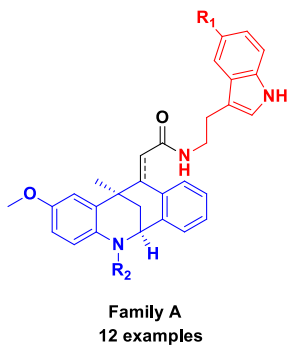
- 2-Acyl-3-dimethylhydrazonomethylquinolines obtained by the method described above could be transformed into pyrrolo[3,4-*b*]quinoline derivatives through an intramolecular reductive cyclization, and into pyrrolo[3,4-*b*]quinolin-1-ones *via* a one-pot domino transformation promoted by InCl_3 .



4. A new library of 2,6-methanobenzo[e][1,4]diazocine derivatives was obtained through a 5-step synthetic route based on the aza-vinylogous Povarov reaction. Some of these compounds showed remarkable antioxidant and neuroprotective activities on different *in vitro* models of neurotoxicity. These effects could be a consequence of their ability to activate the transcription factor Nrf2, and modulate the nicotinic acetylcholine receptors. However, we could not find a synthetic application for the imine intermediaries of the route.

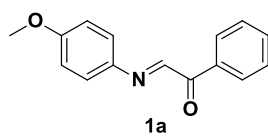


5. Three new families of multitarget directed ligands were designed and synthesised, including in their structures a cytosine-like framework and several antioxidant natural products. A preliminary pharmacological screening was performed on this new library, composed of 21 derivatives, whose results confirmed that most compounds showed the expected antioxidant and neuroprotective activities. These beneficial effects seem to be related to the activation of Nrf2 and the modulation of some subtypes of nicotinic acetylcholine receptors.

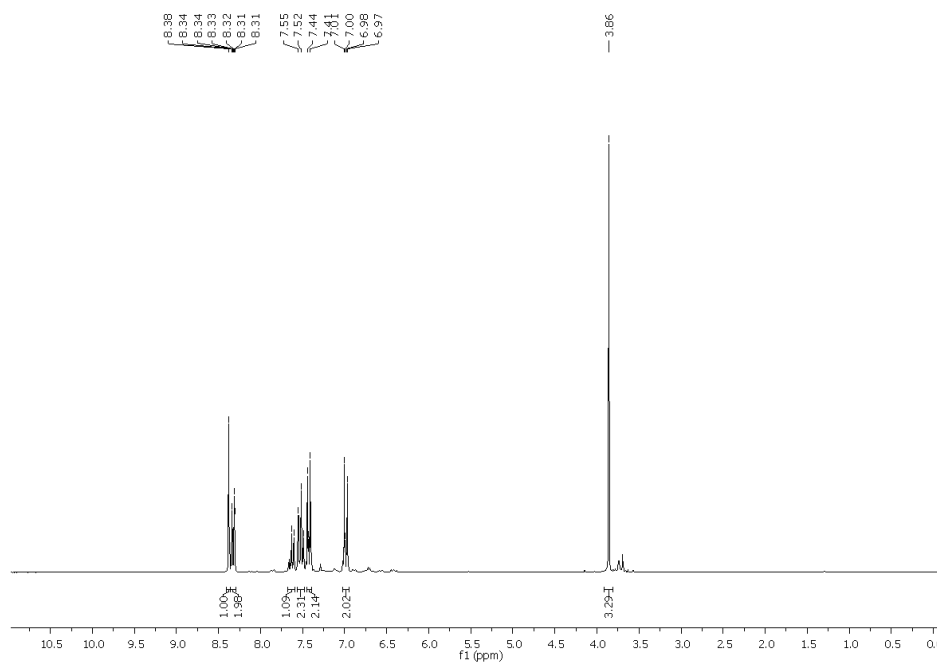


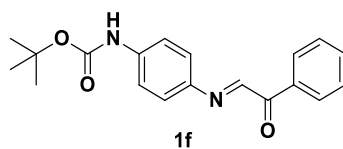
- Antioxidant activity on ORAC and DPPH assays
- Neuroprotective activity against serum and potassium deprivation
- Antiinflammatory activity
- Activation of transcription factor Nrf2
- Modulation of nicotinic Ach receptors
- BBB permeability (PAMPA)

ANEXO: ESPECTROS REPRESENTATIVOS

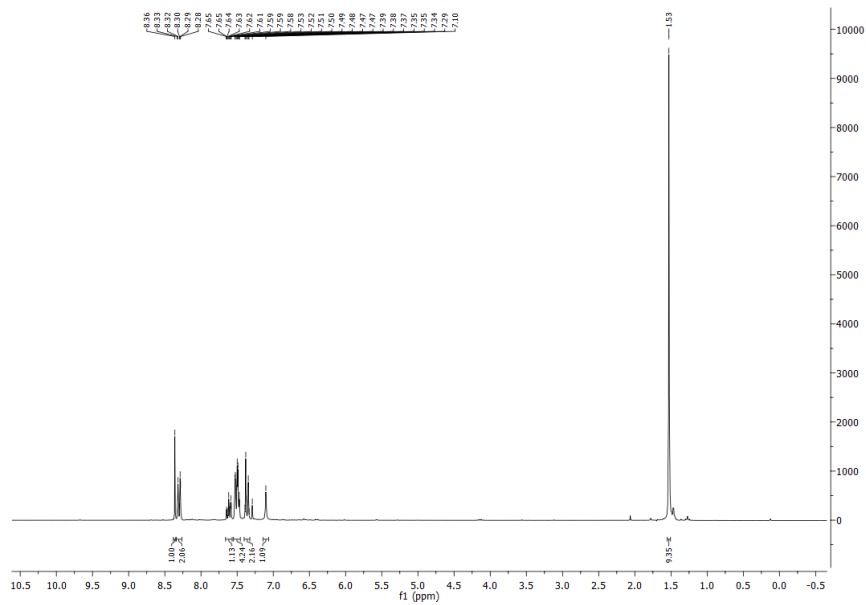


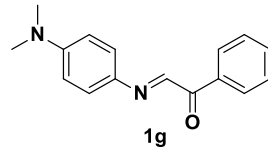
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)



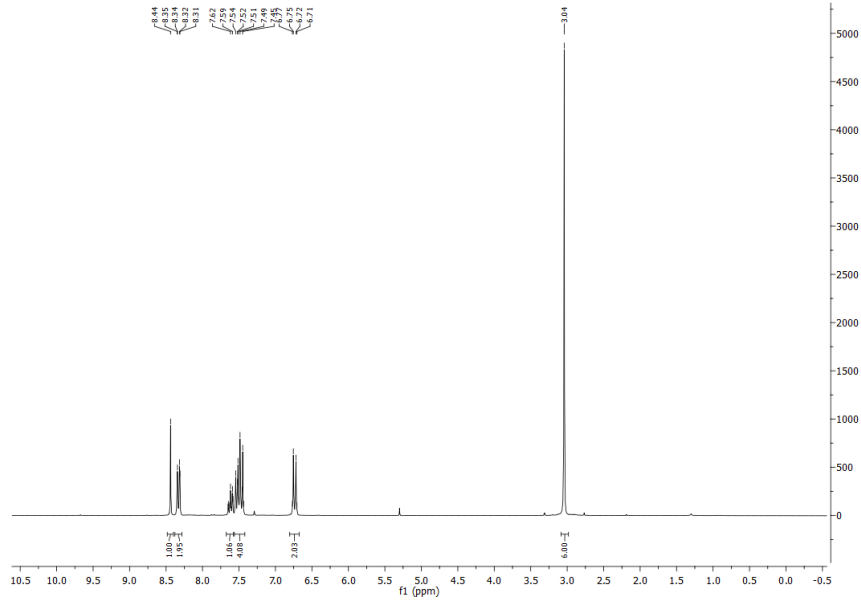


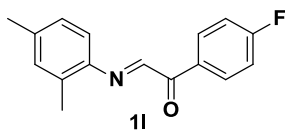
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)



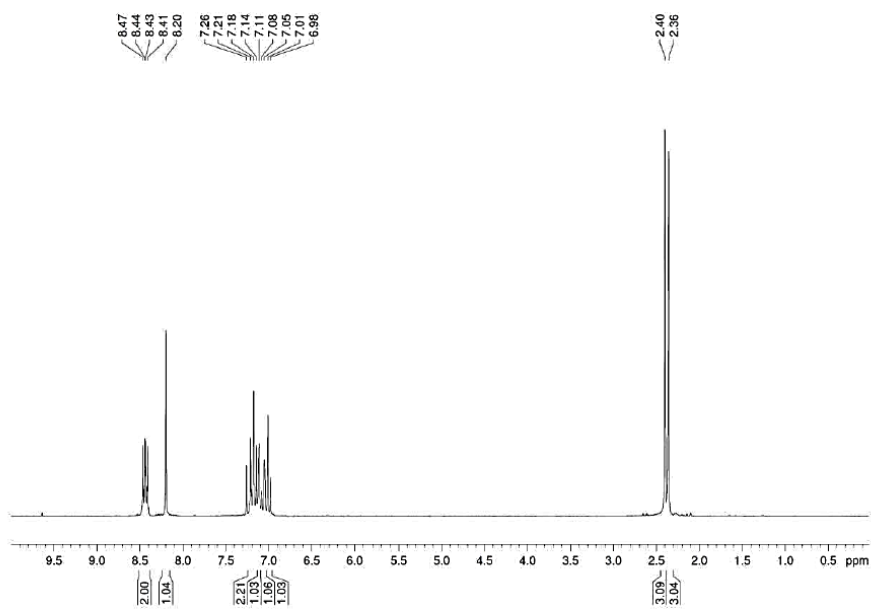


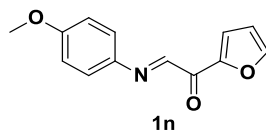
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)



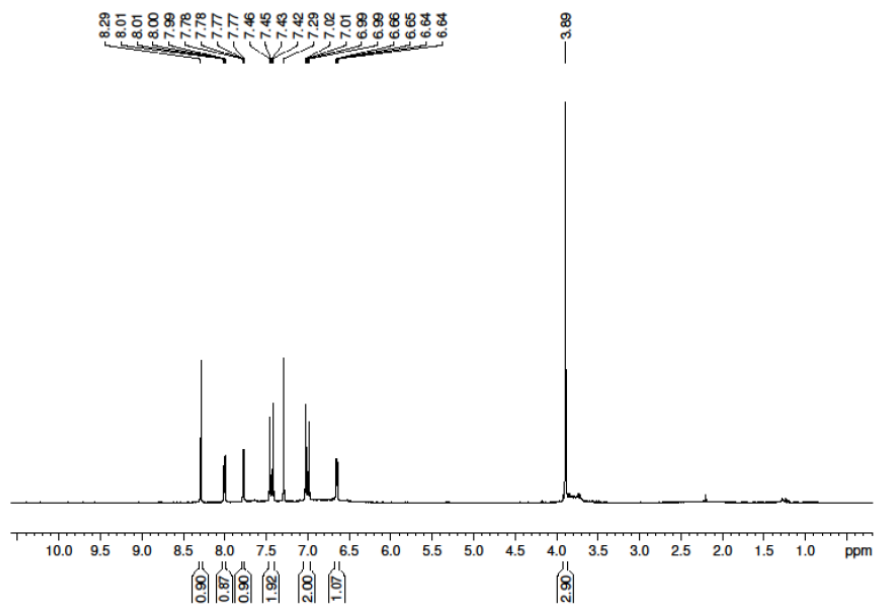


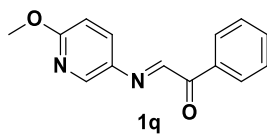
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)



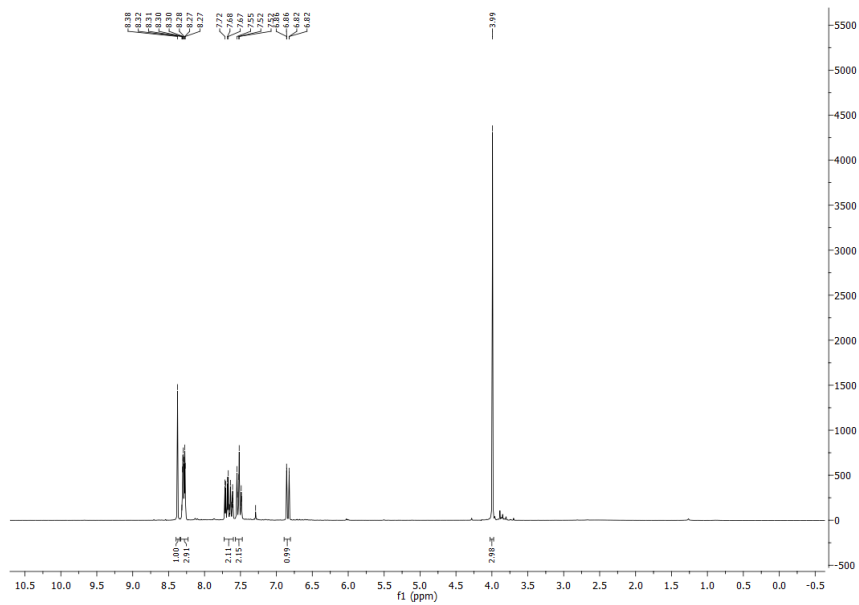


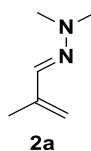
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)



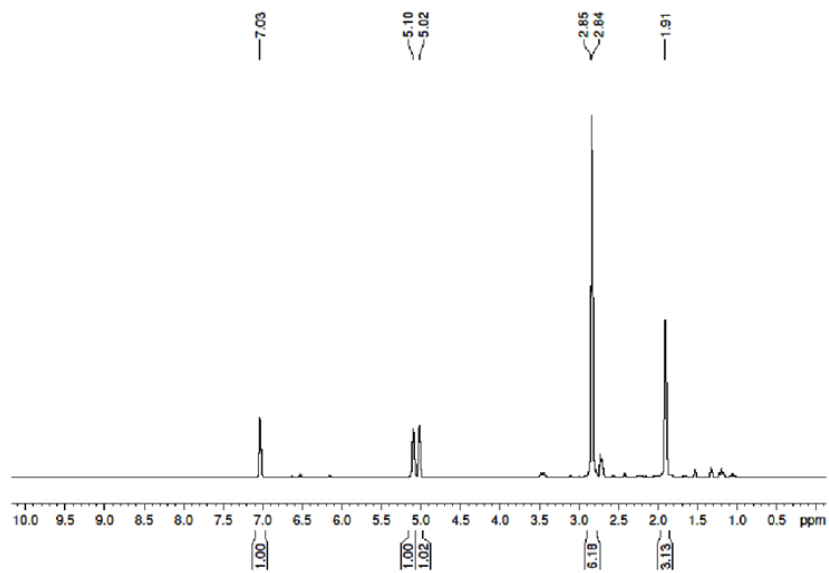


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

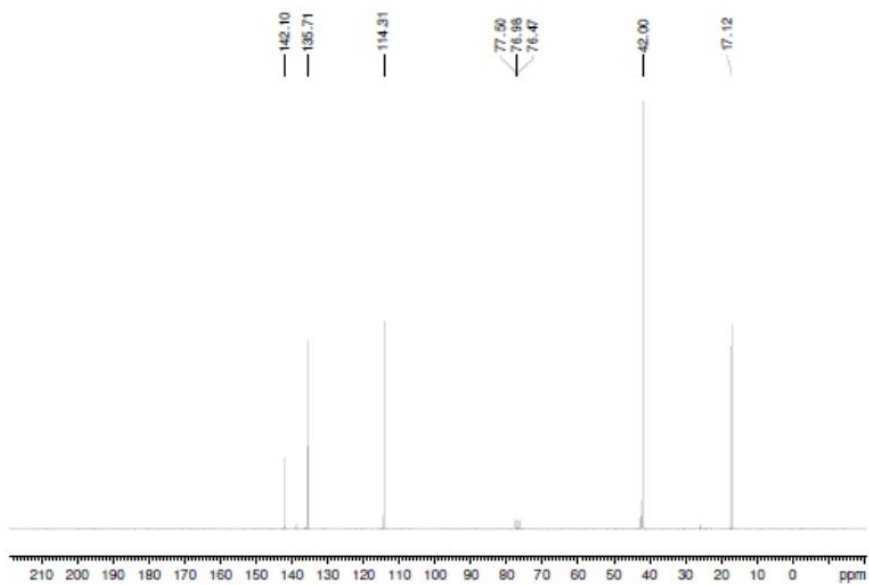


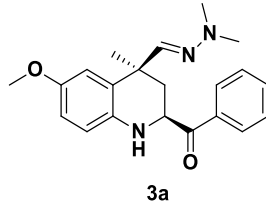


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

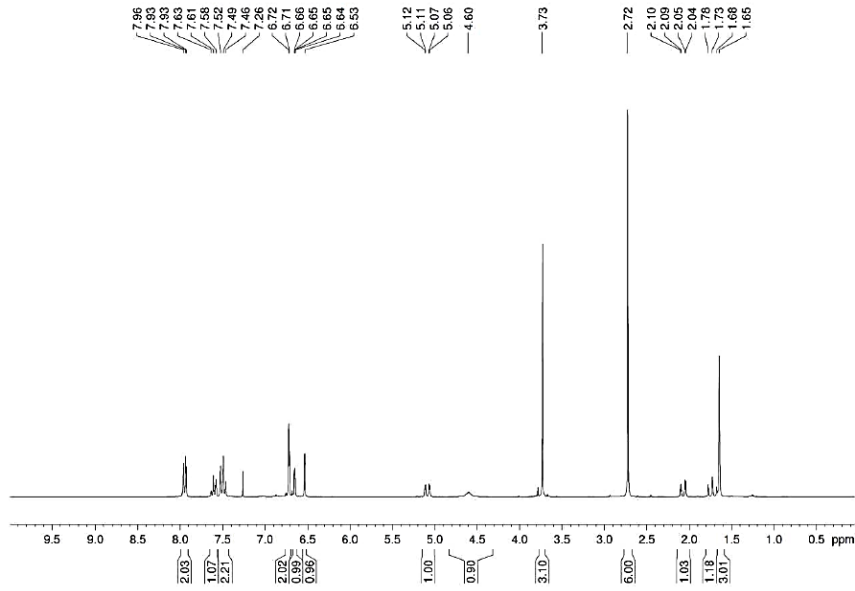


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

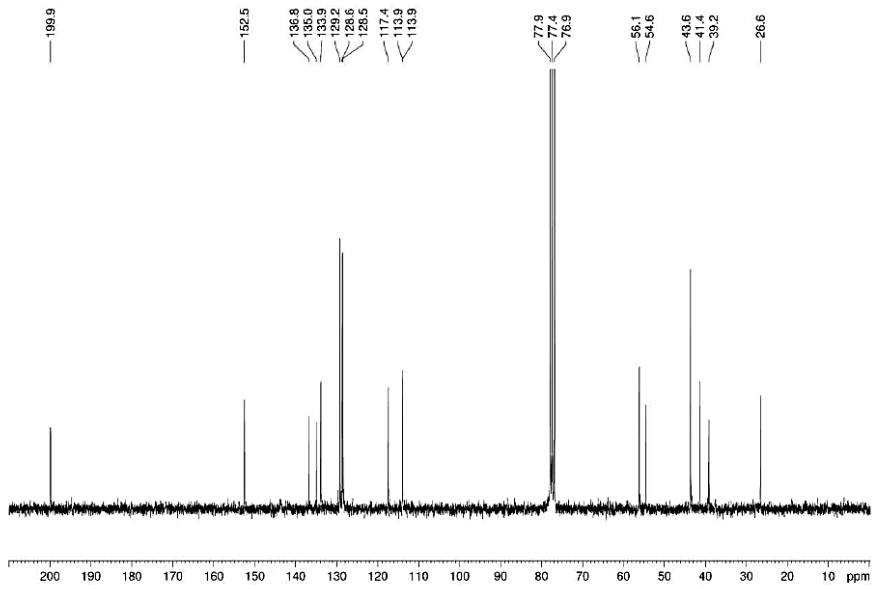


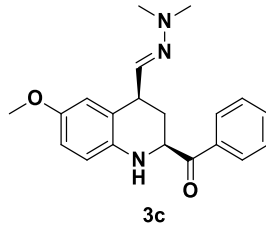


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

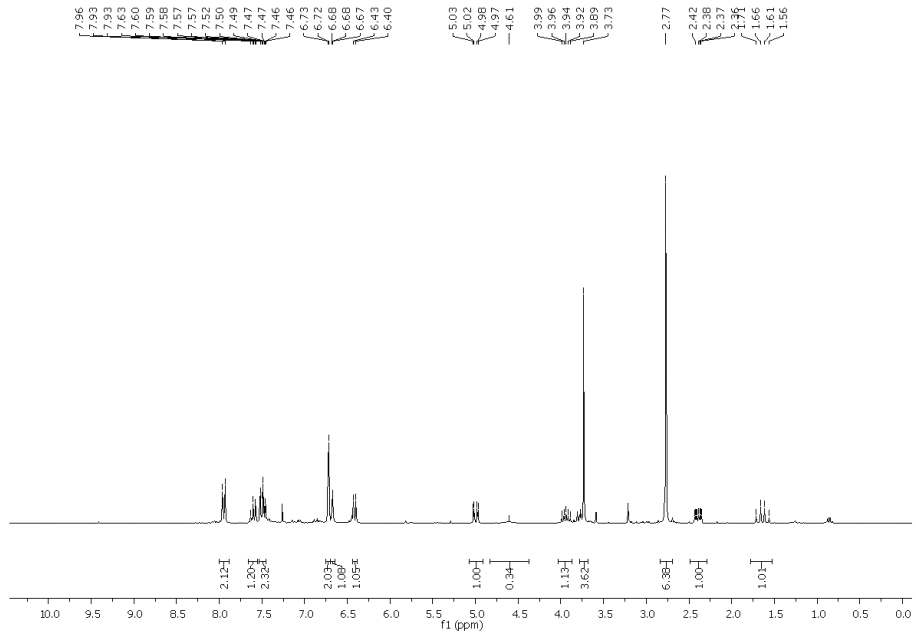


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

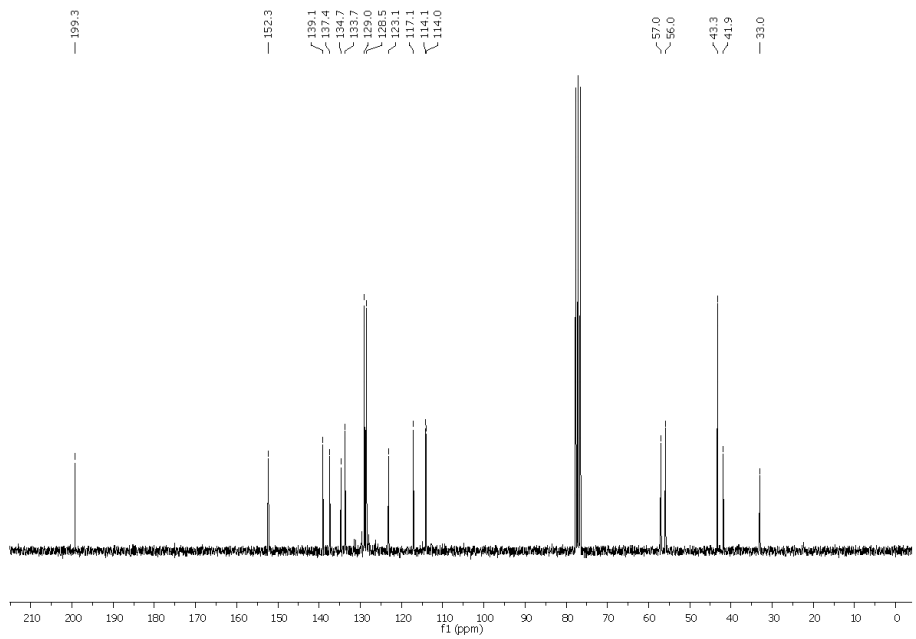


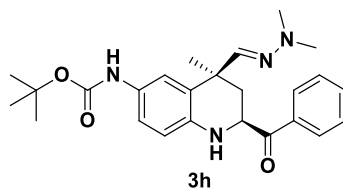


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

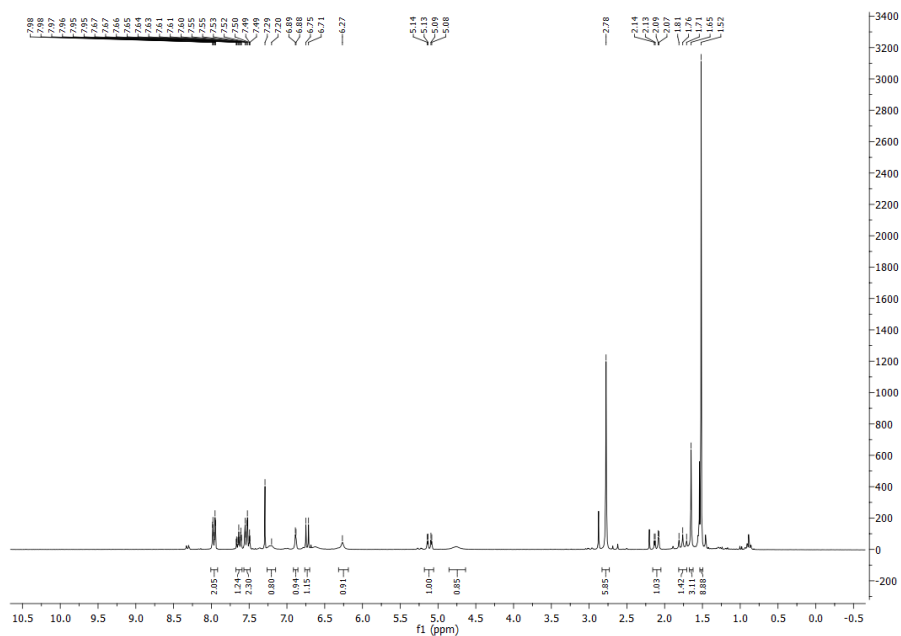


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

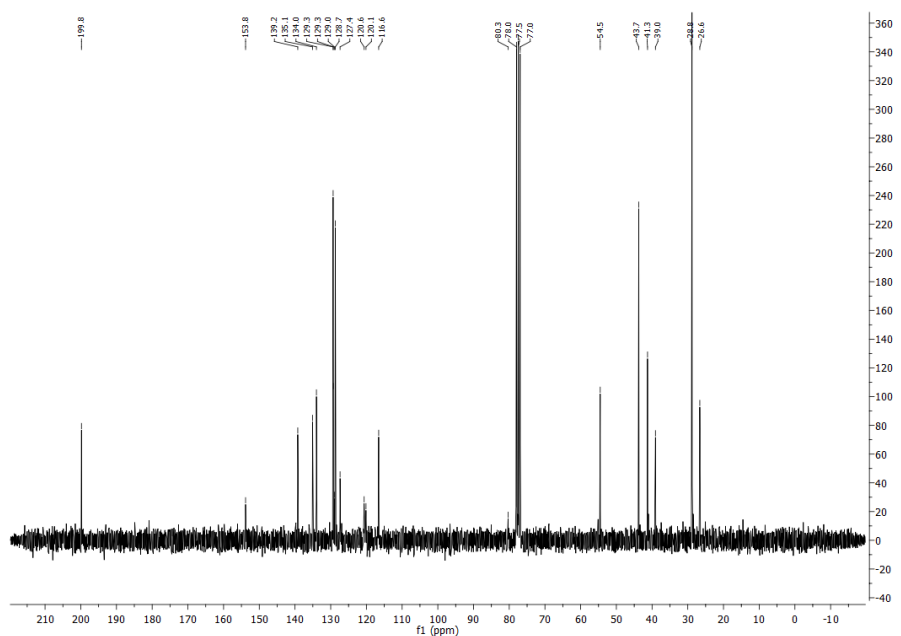


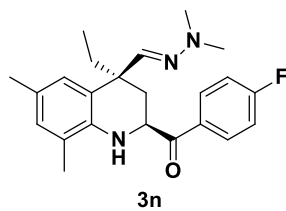


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

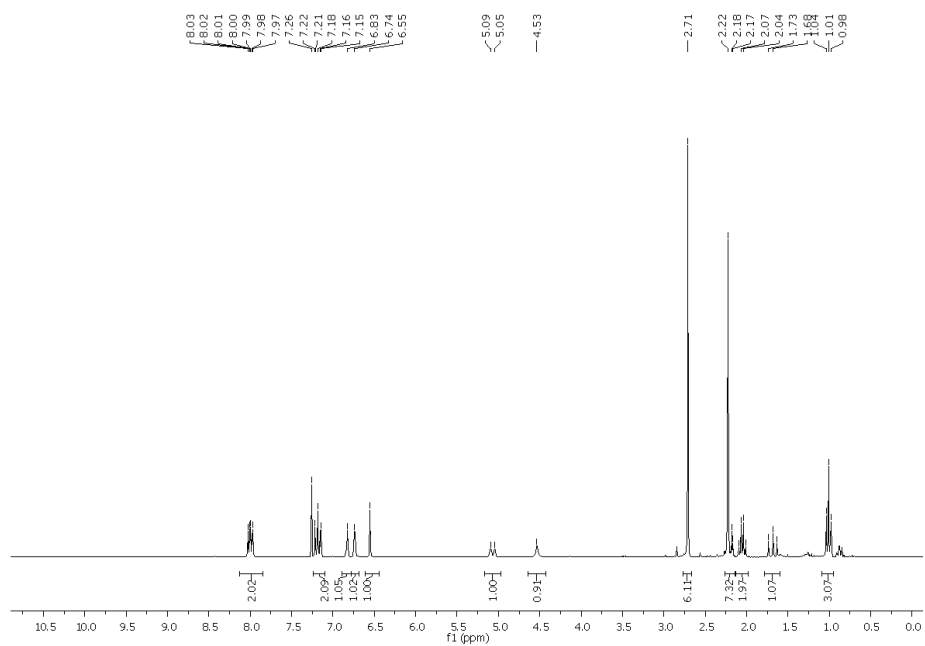


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

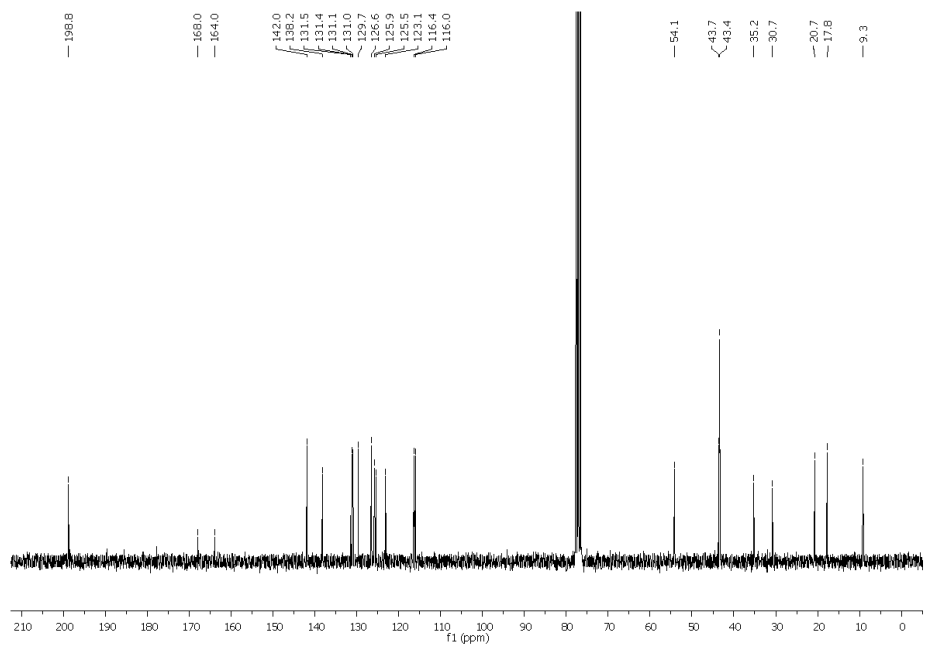


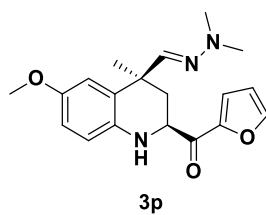


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

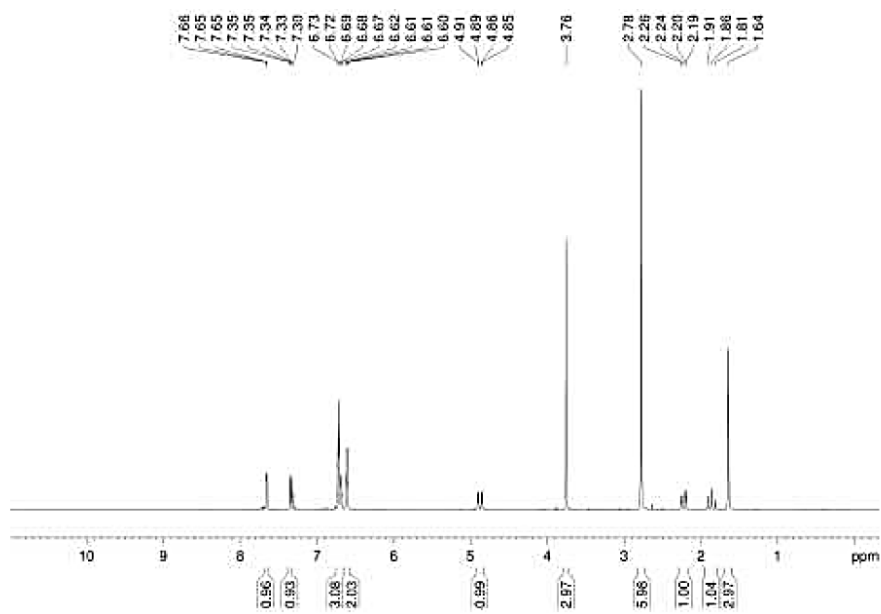


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

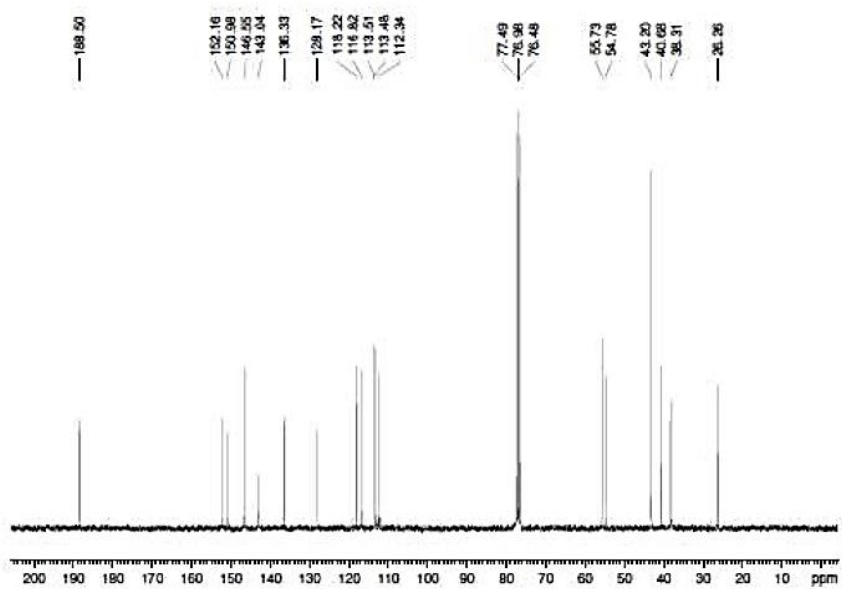


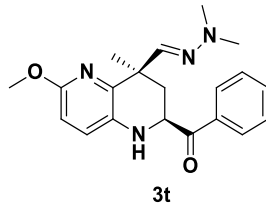


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

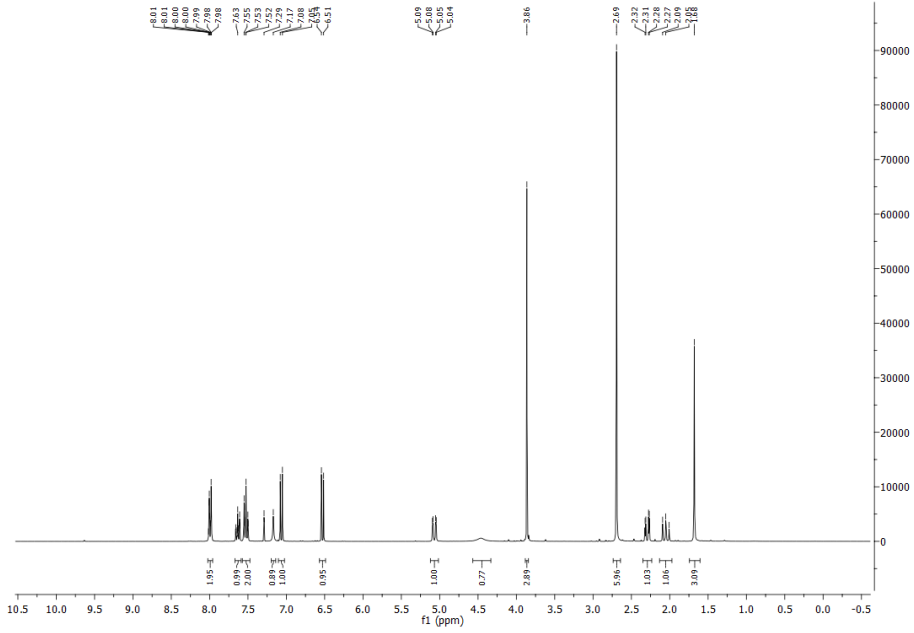


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

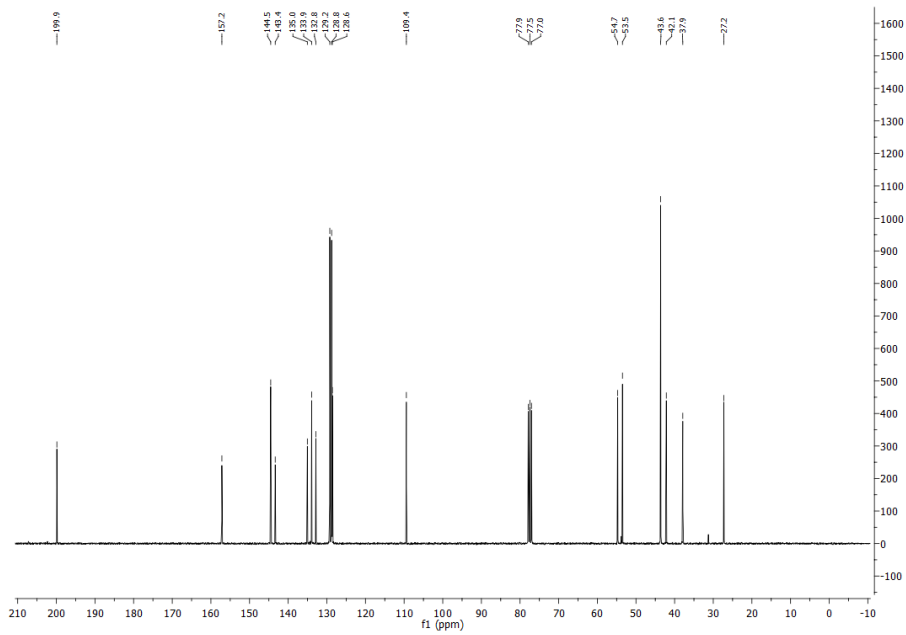


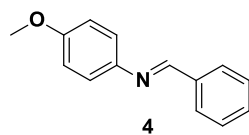


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

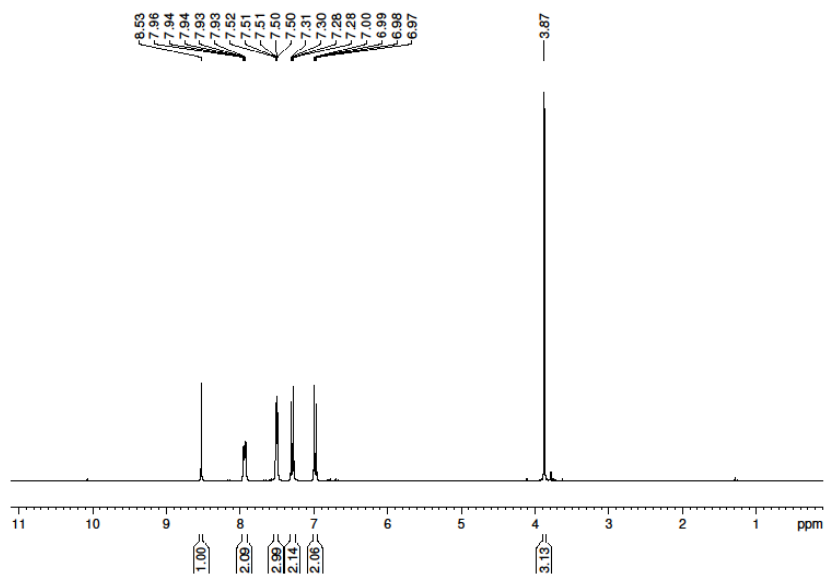


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

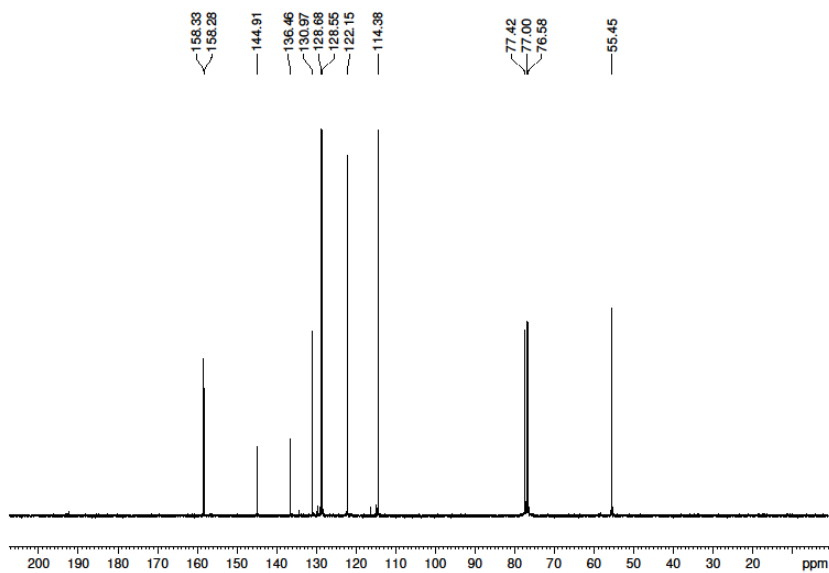


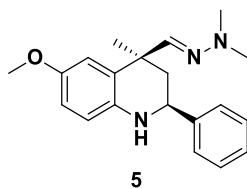


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

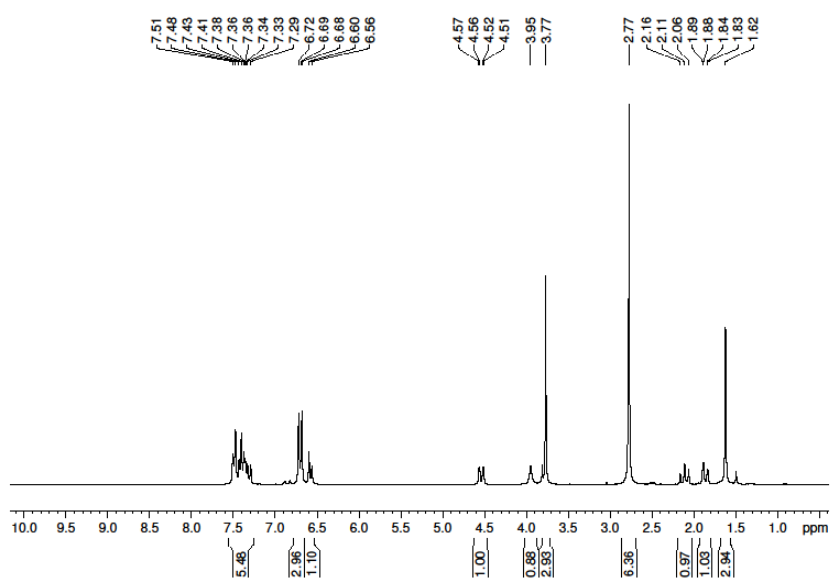


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

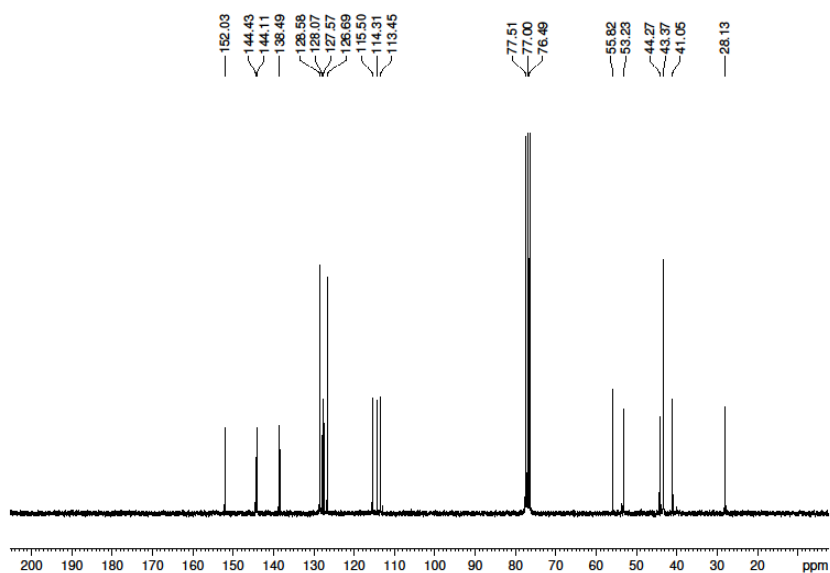


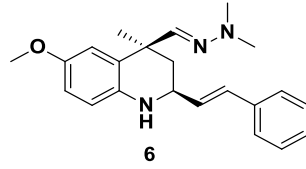


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

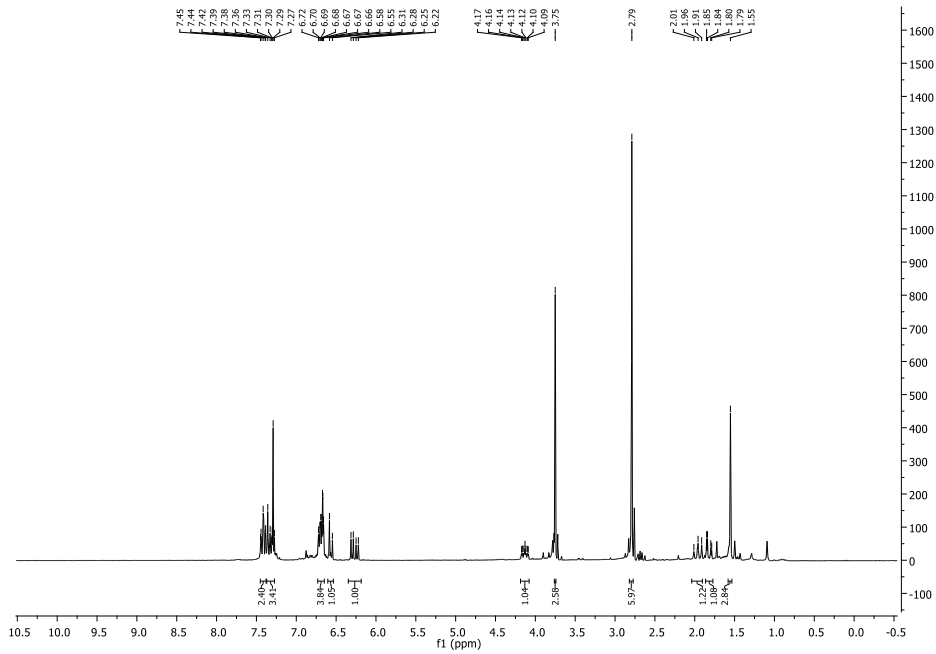


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

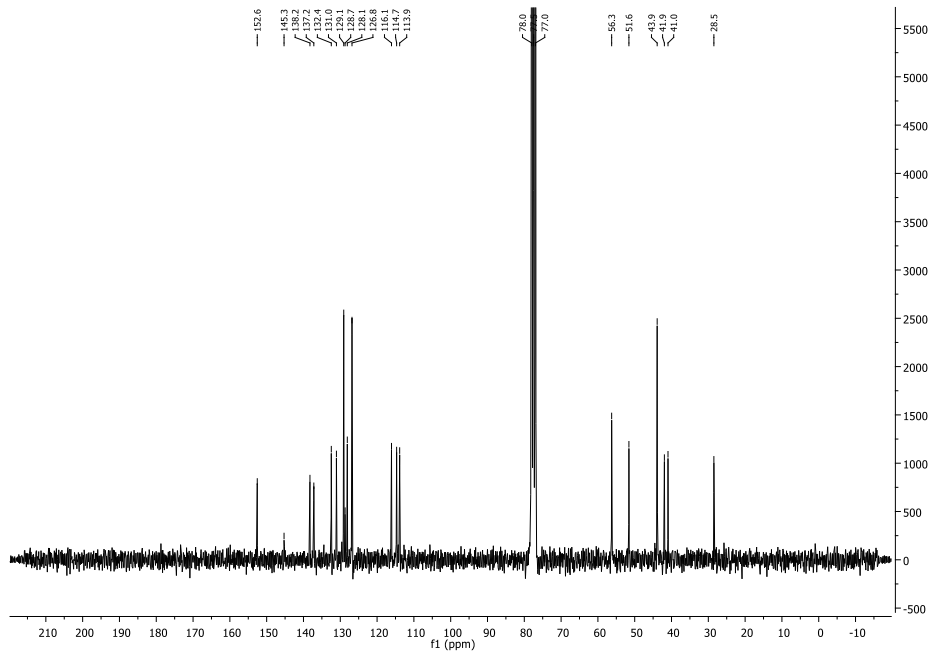


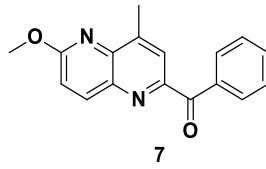


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

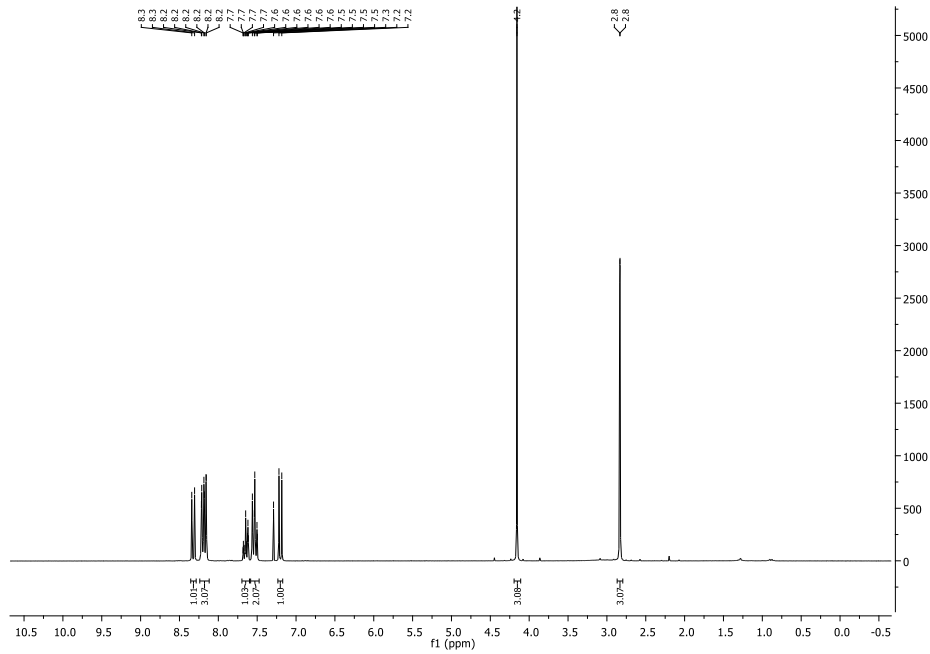


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

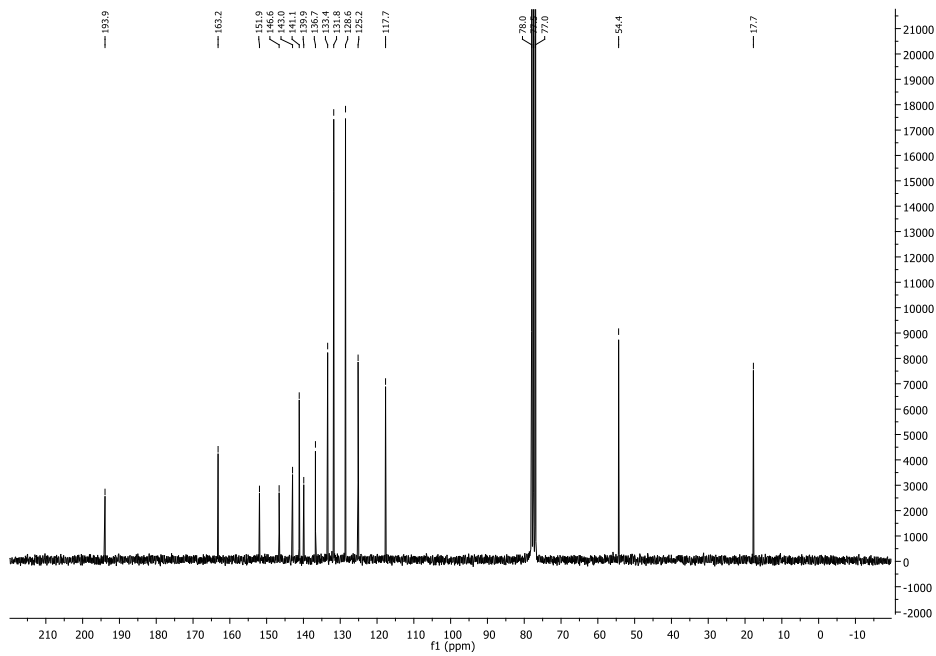


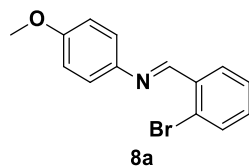


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

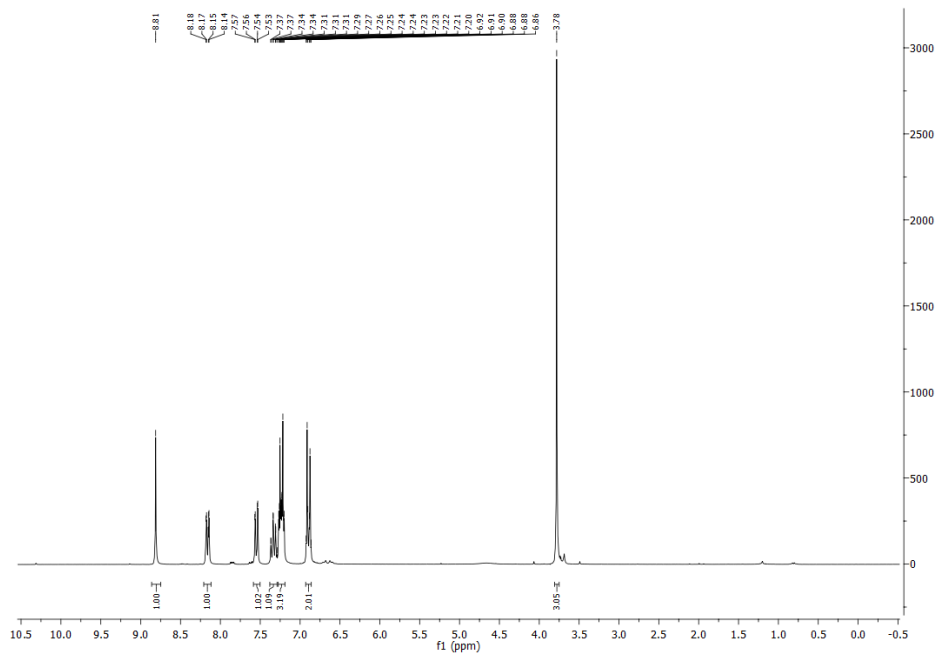


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

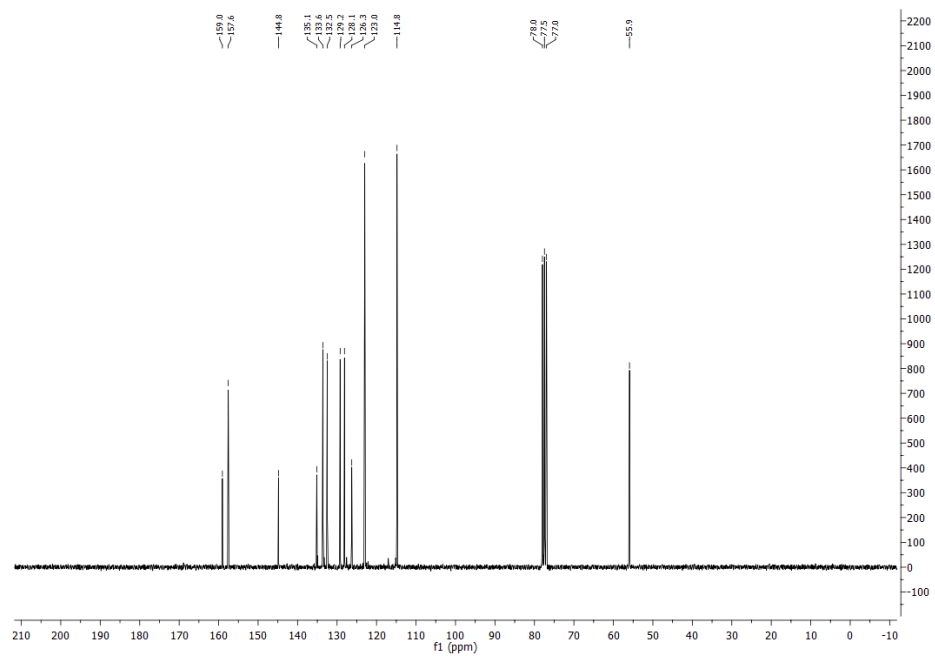


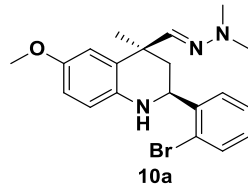


^1H NMR (250 MHz, CDCl_3)

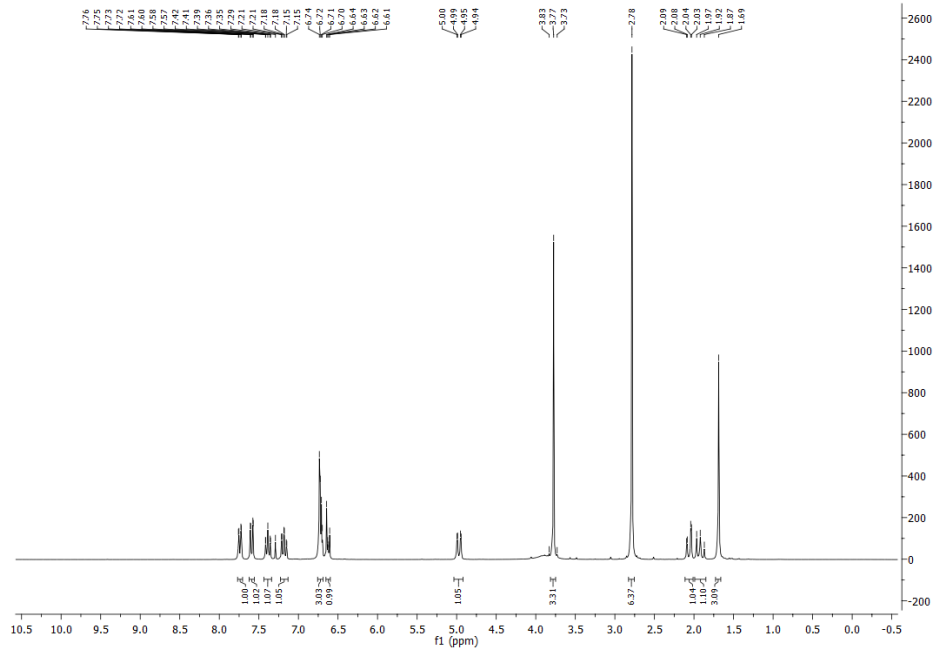


^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3)

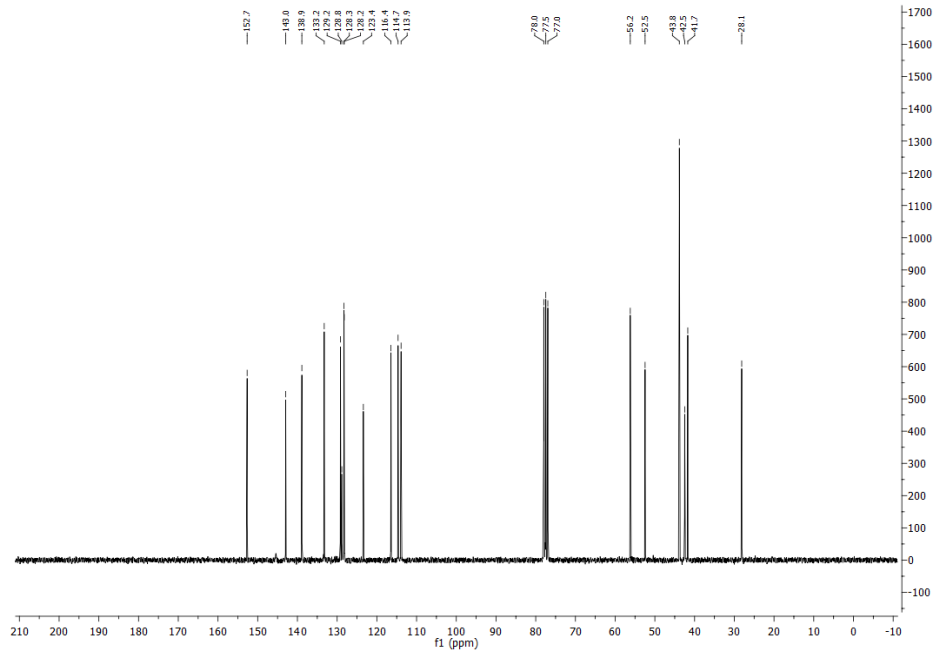


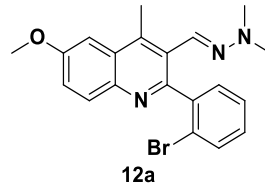


^1H NMR (250 MHz, CDCl_3)

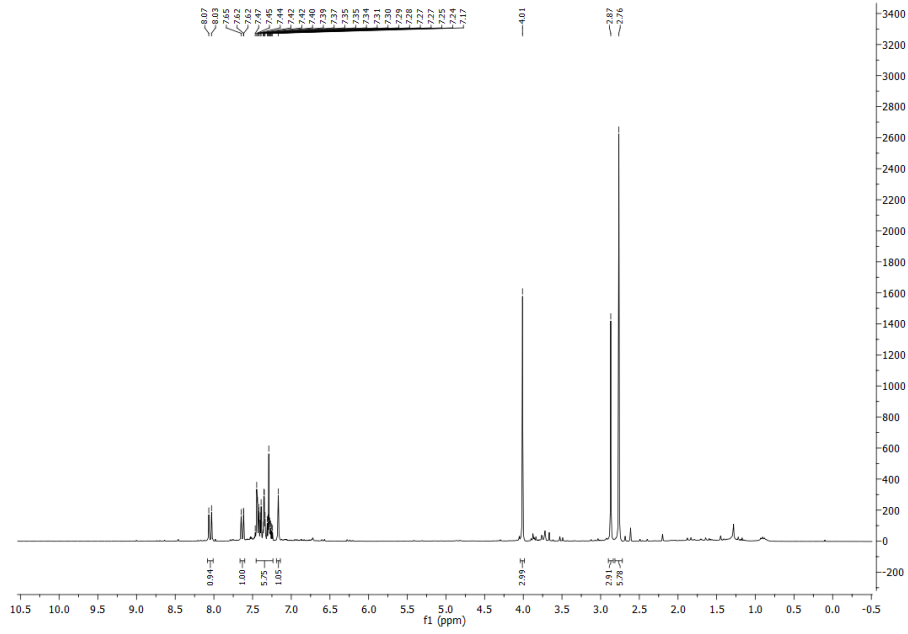


^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3)

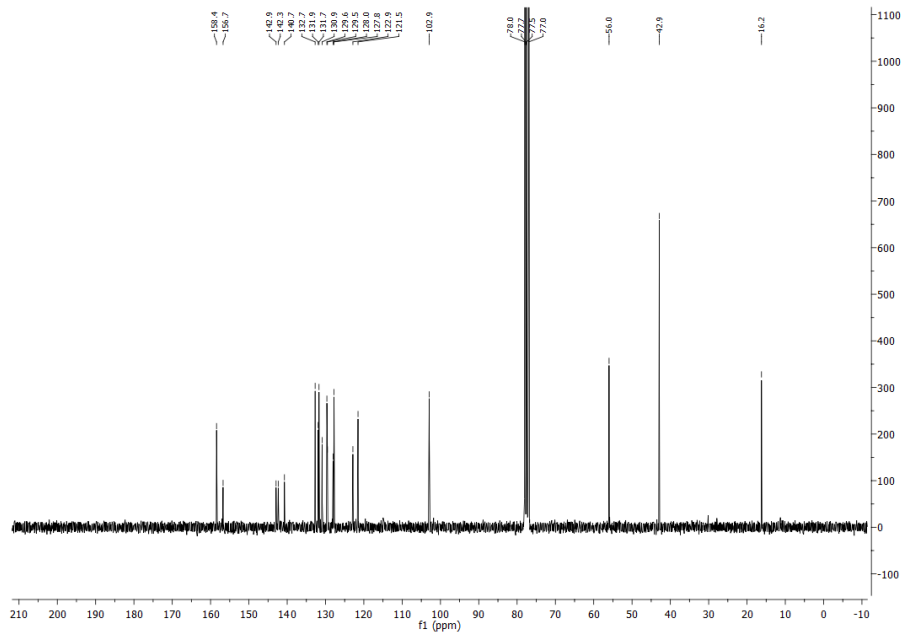


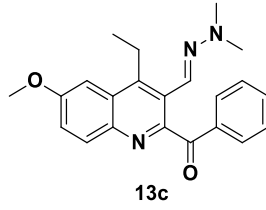


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

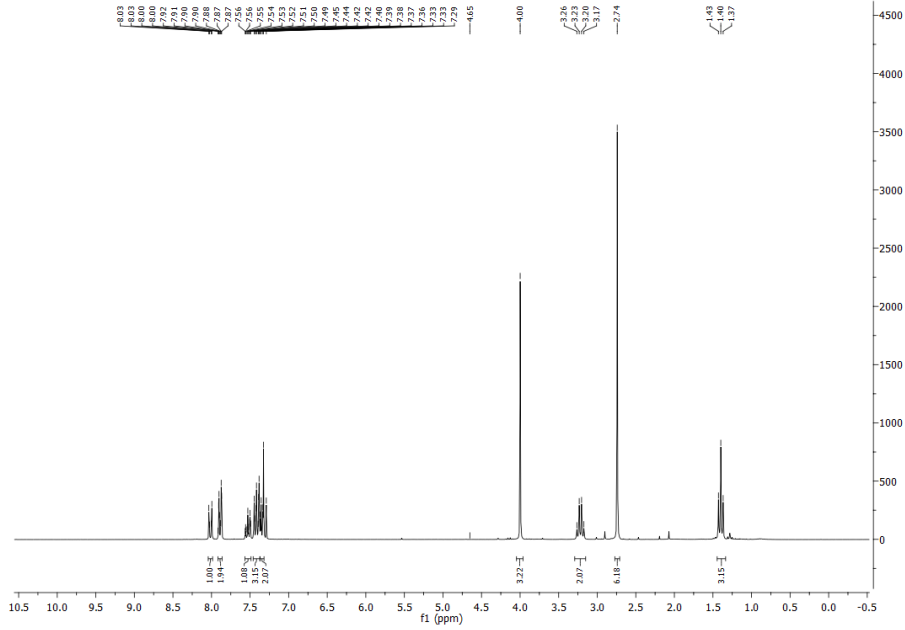


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

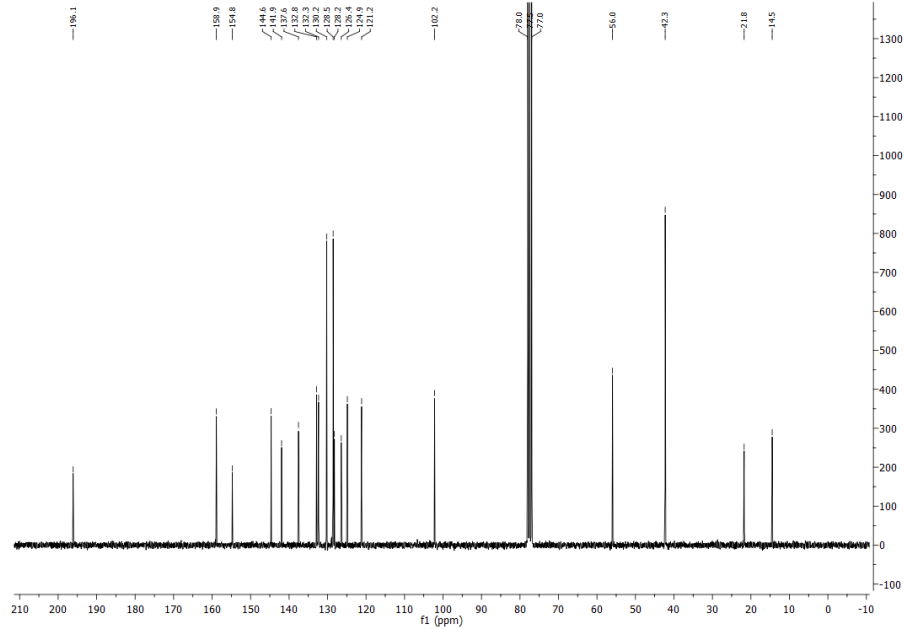


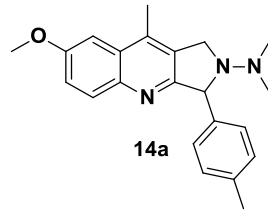


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

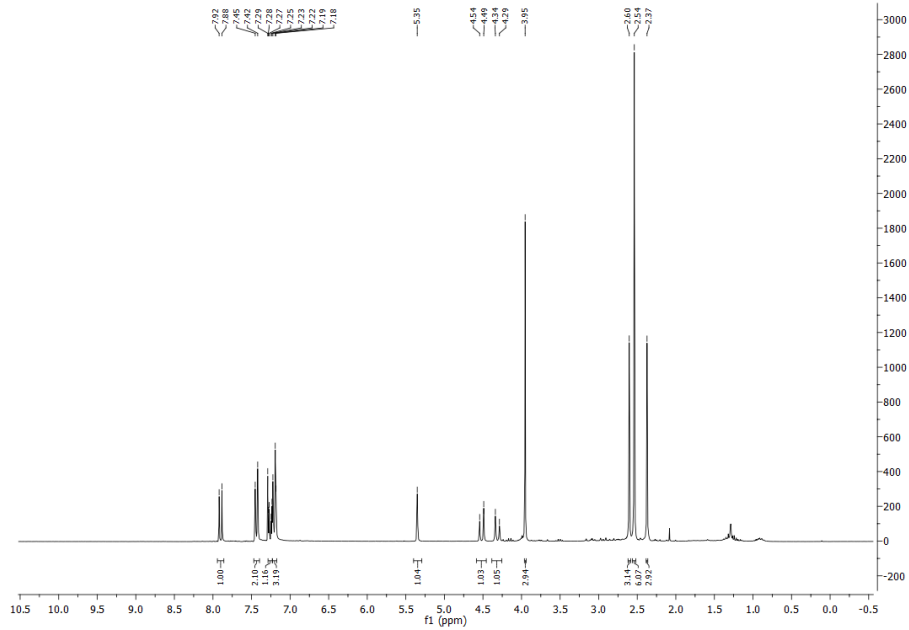


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

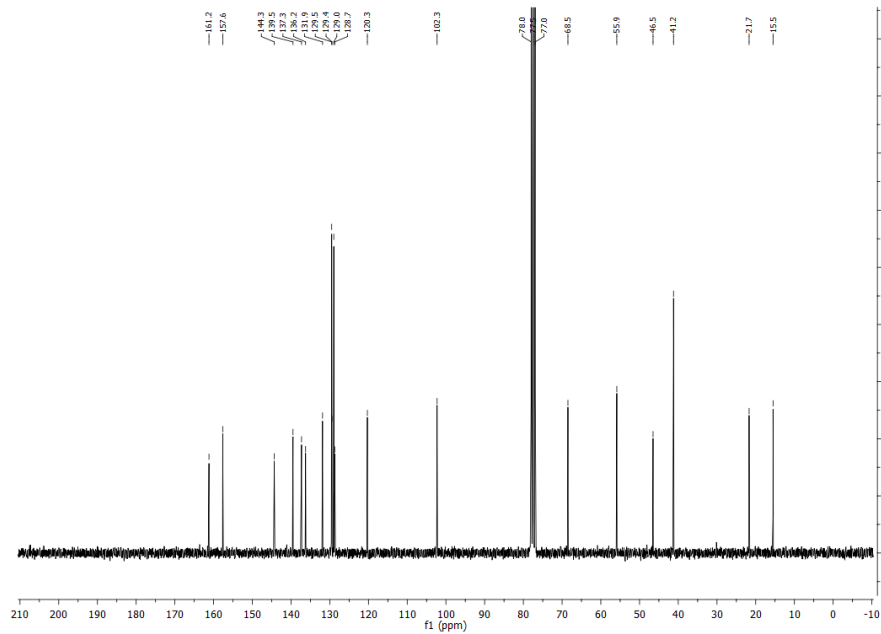


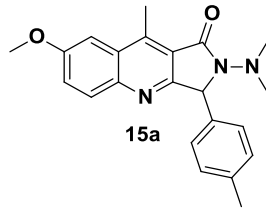


^1H NMR (250 MHz, CDCl_3)

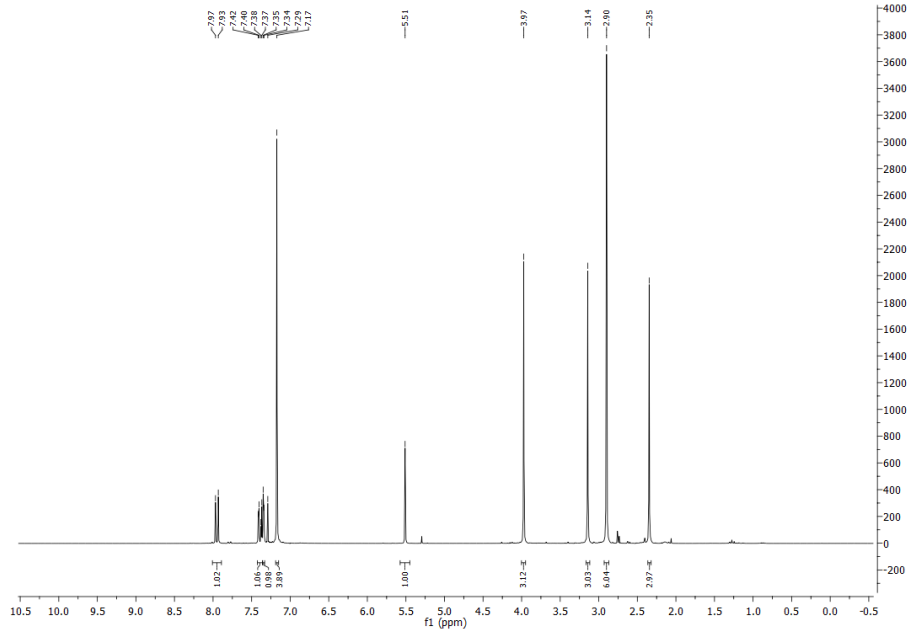


^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3)

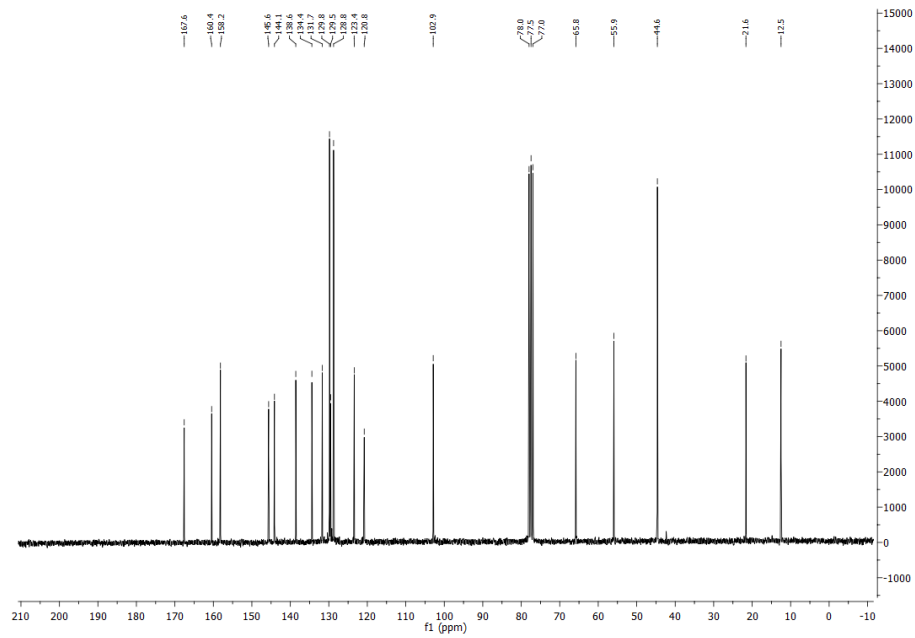


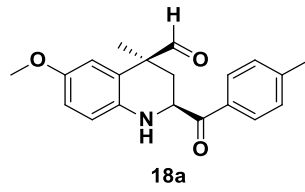


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

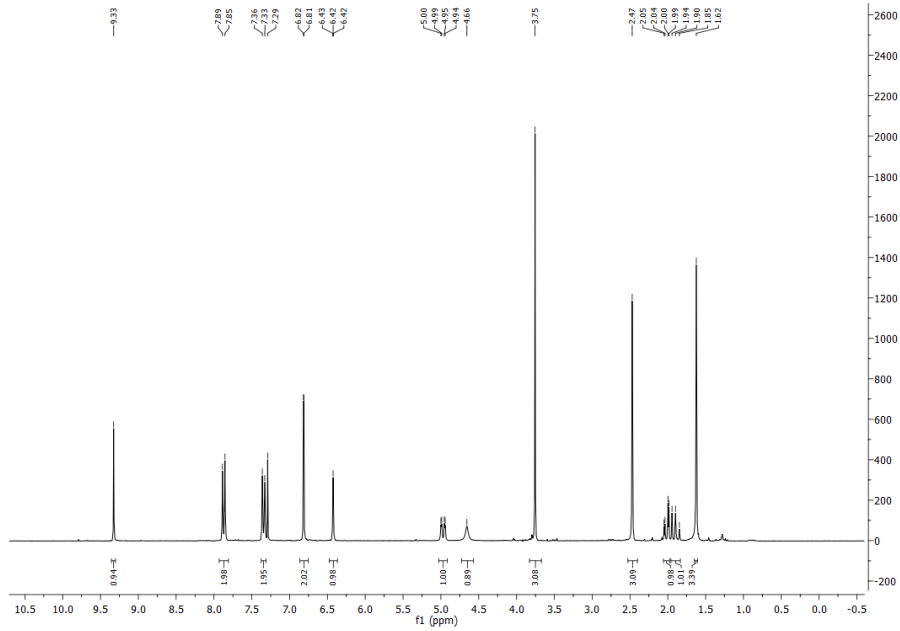


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

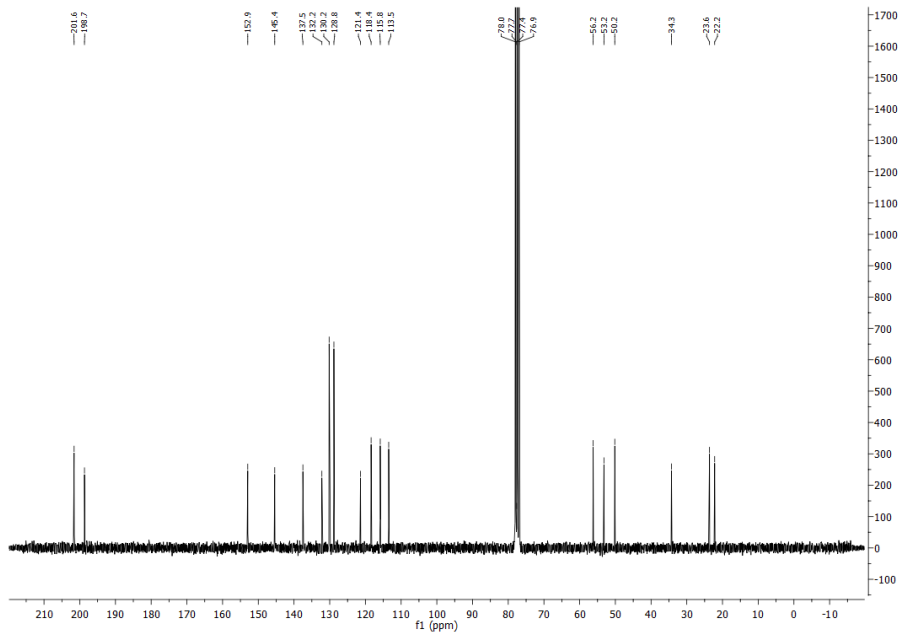


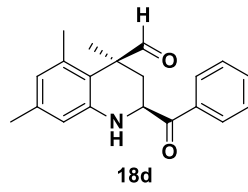


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

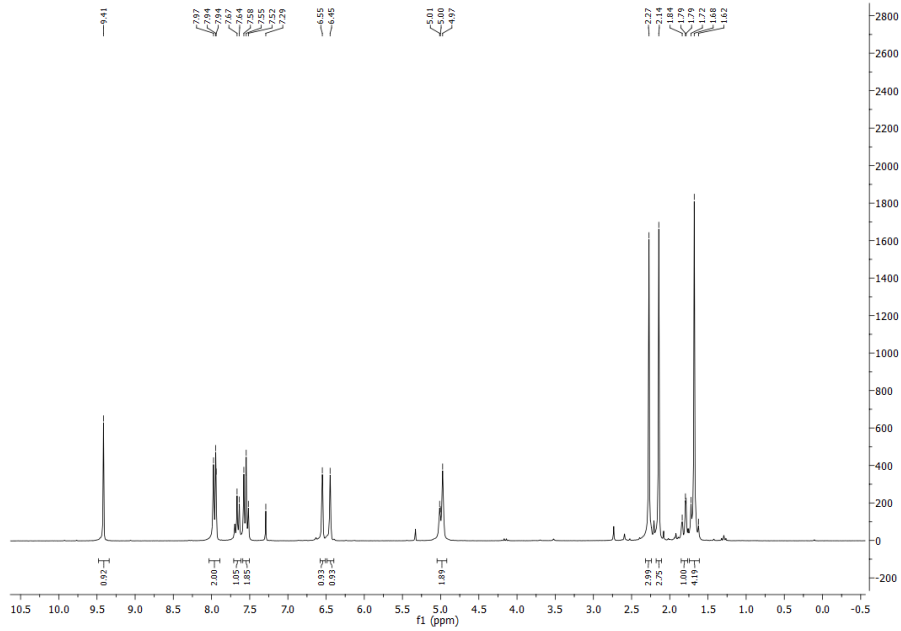


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

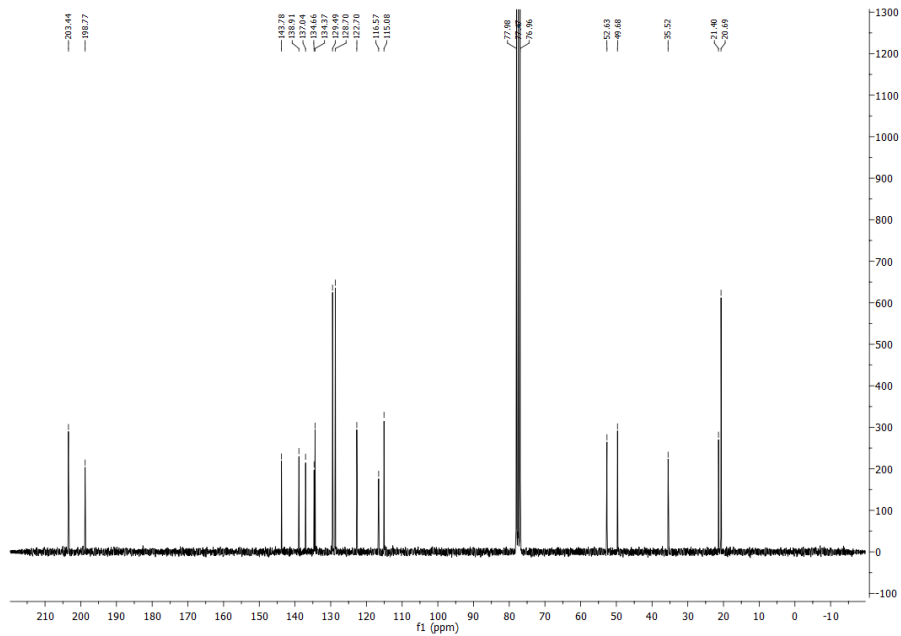


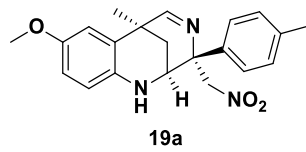


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

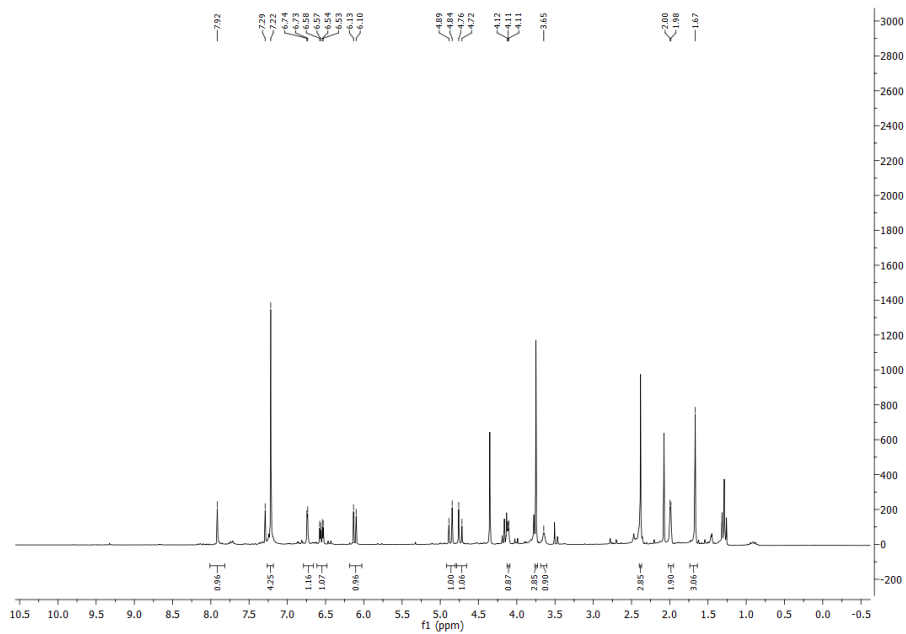


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

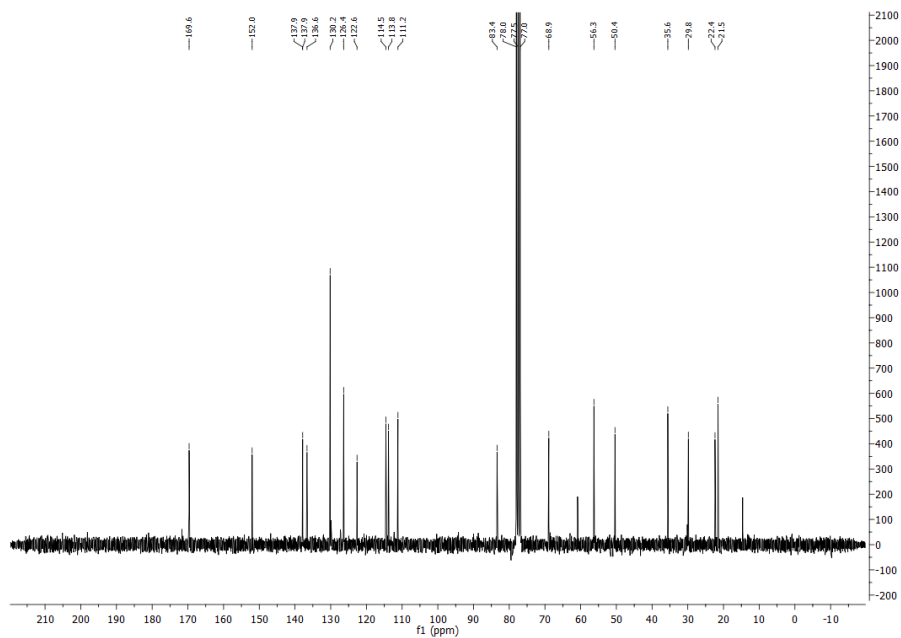


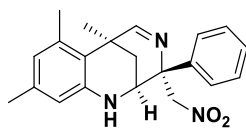


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)



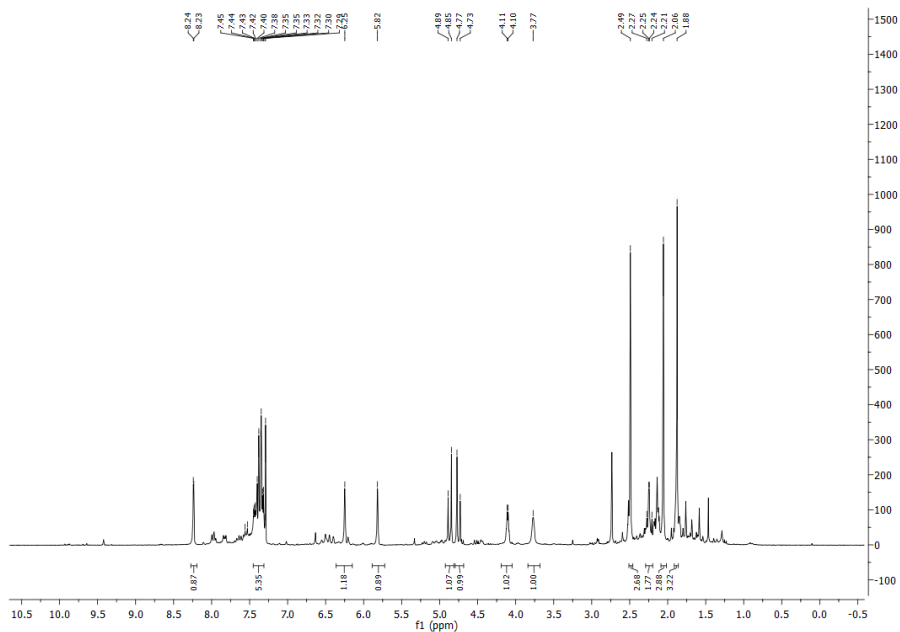
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)



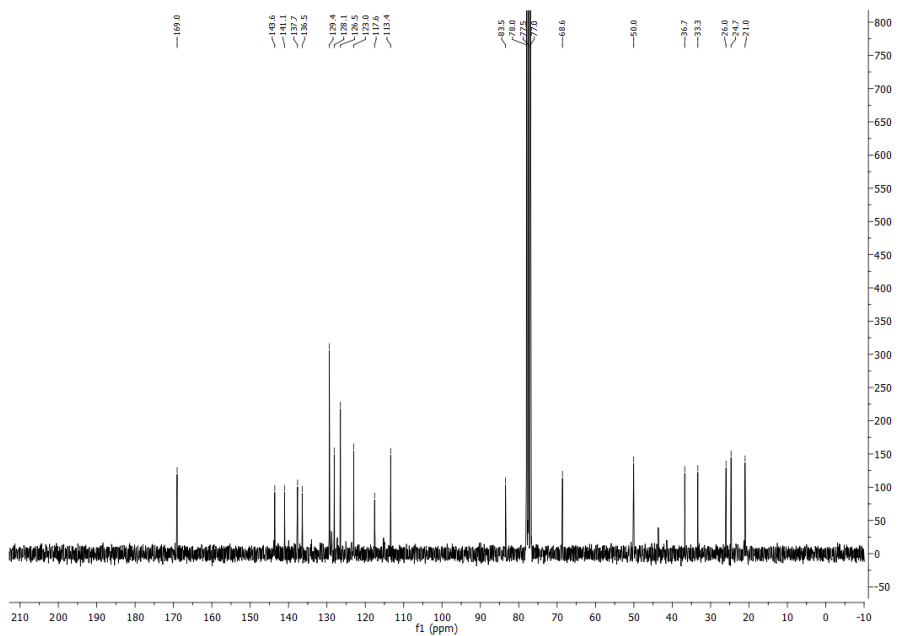


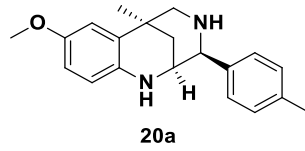
19d

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

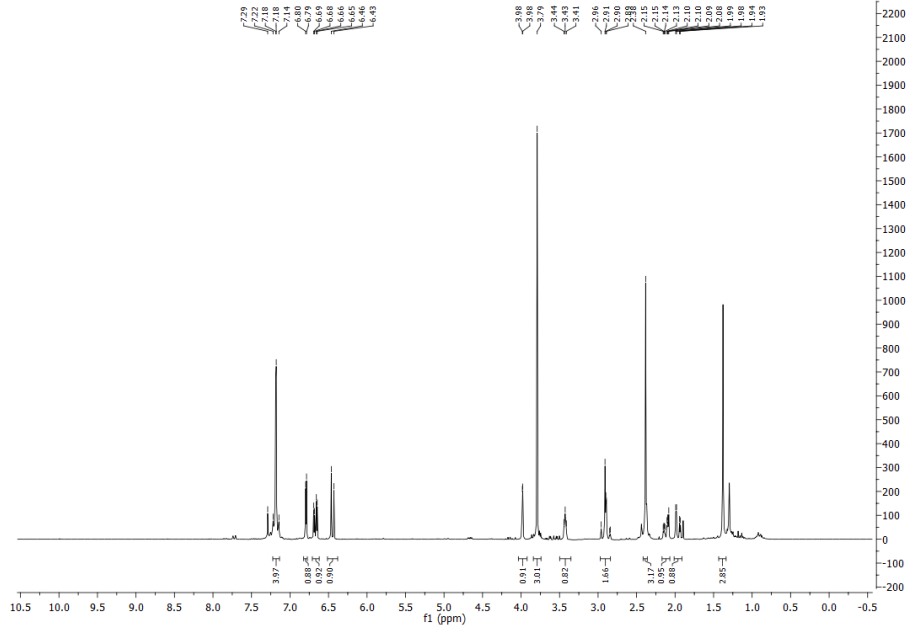


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

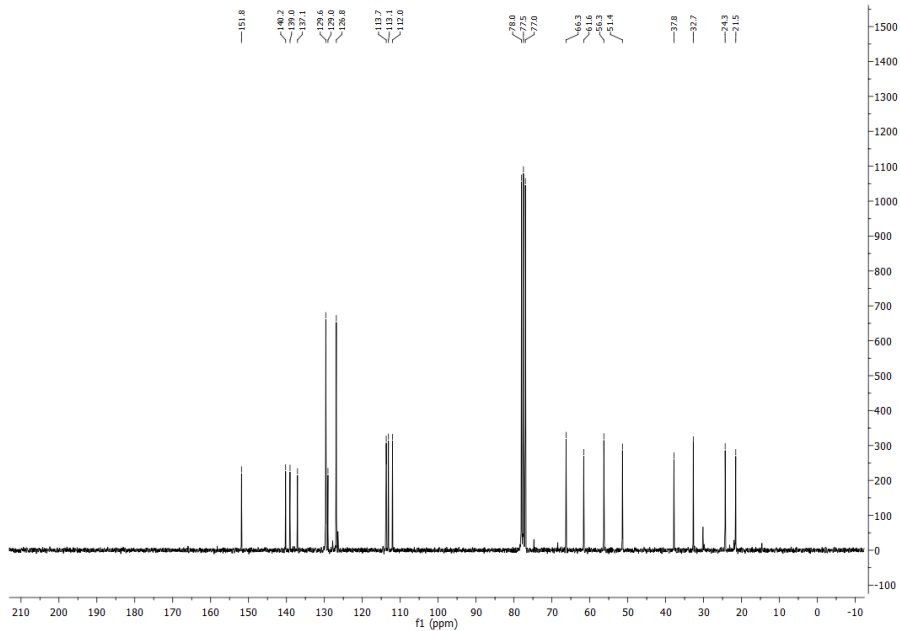


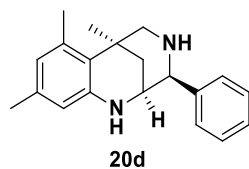


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

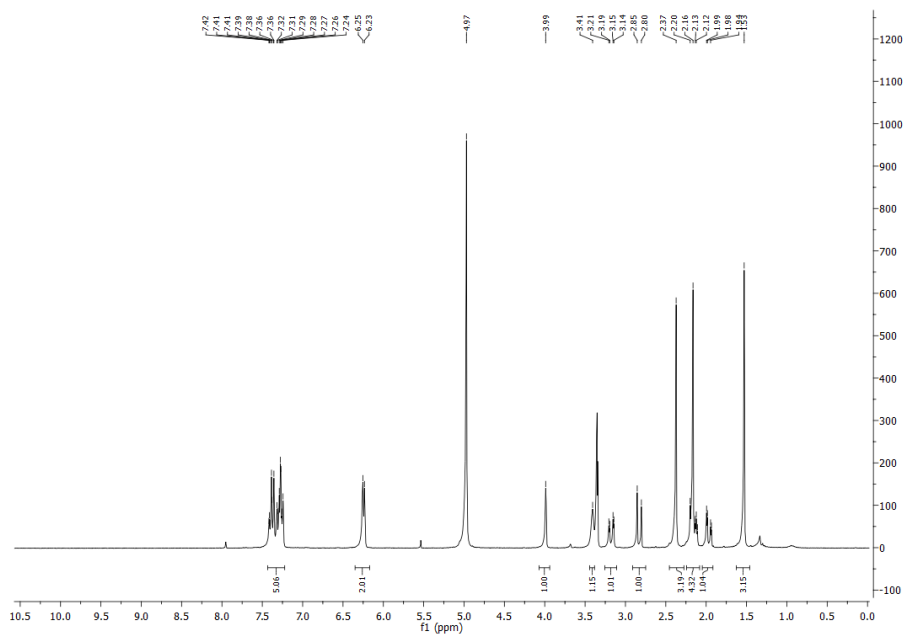


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

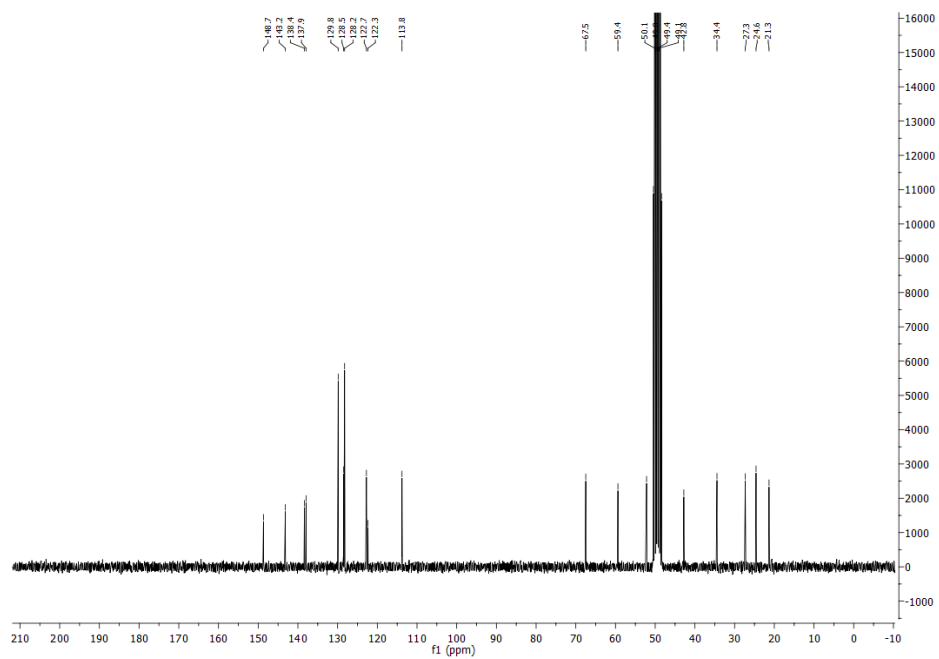


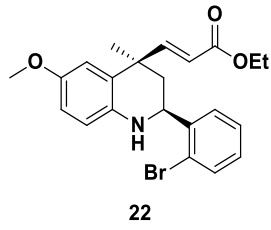


¹H NMR (250 MHz, MeOD)

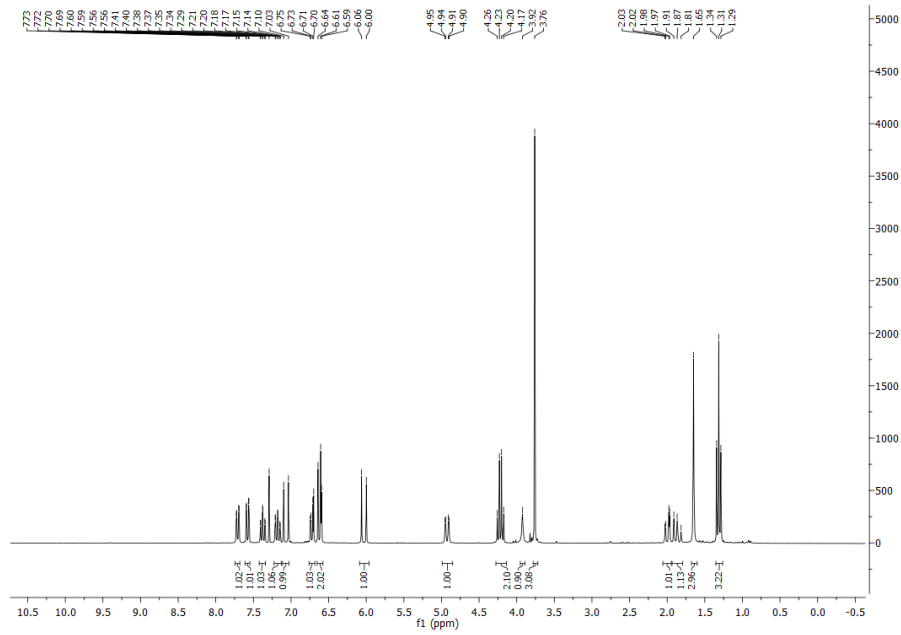


¹³C NMR (63 MHz, MeOD)

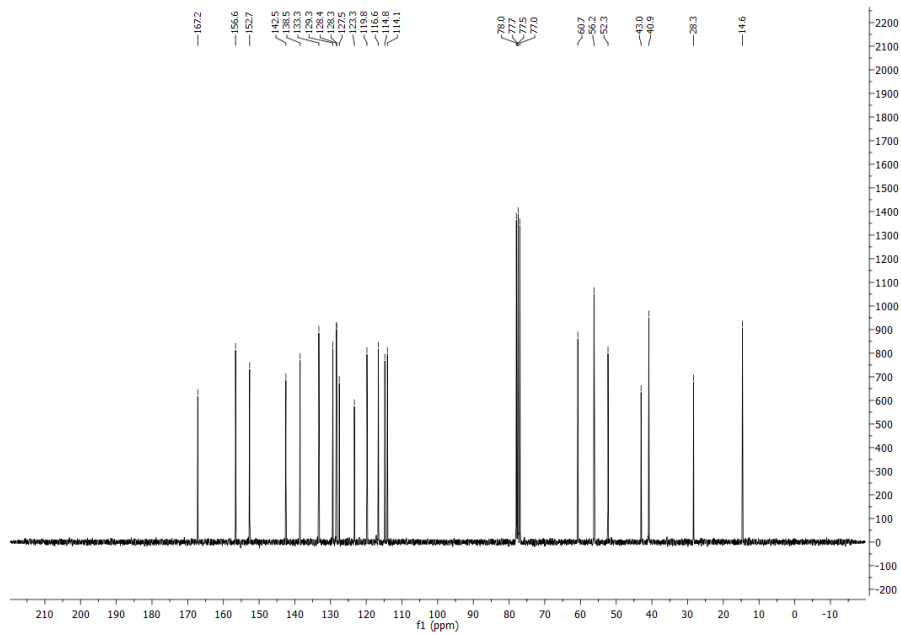


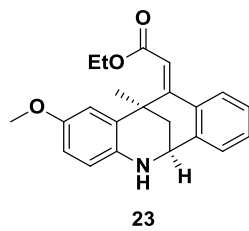


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

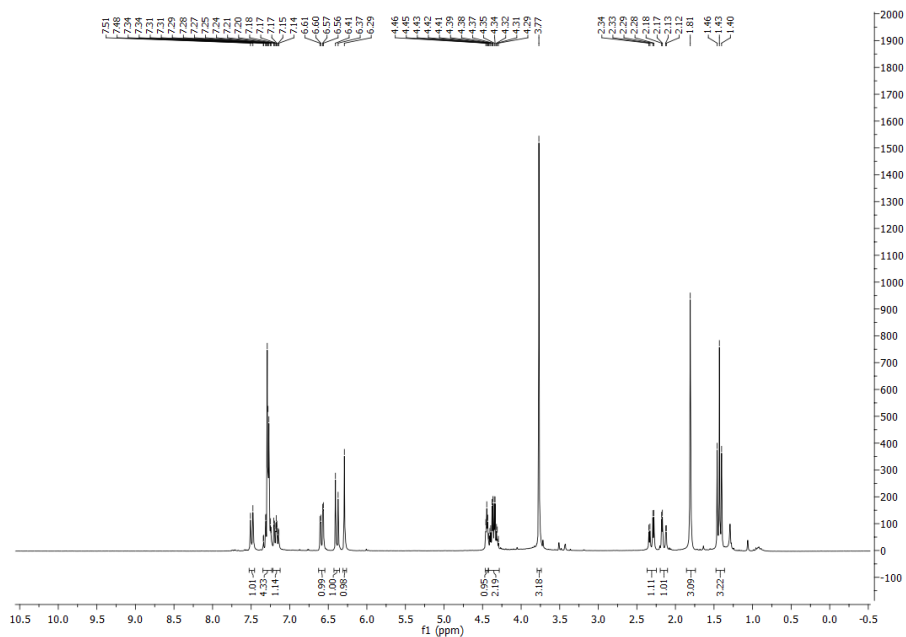


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

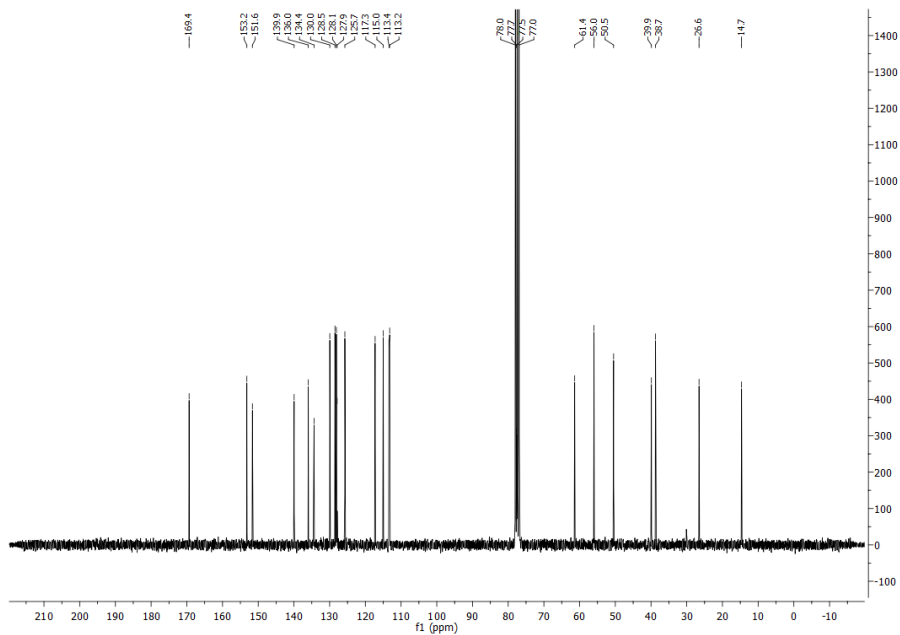


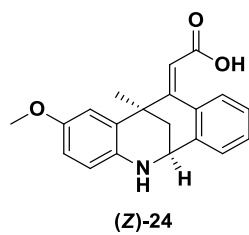


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

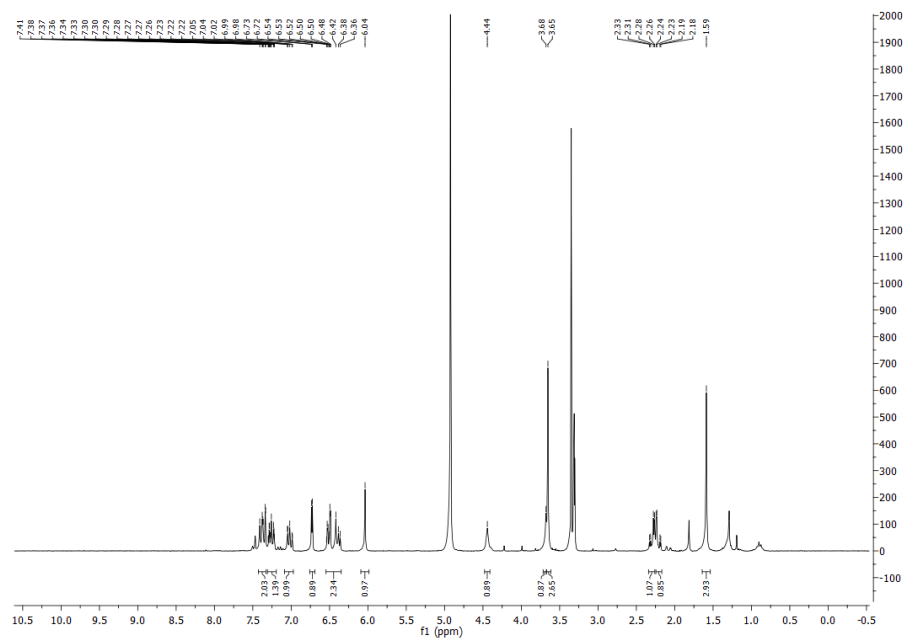


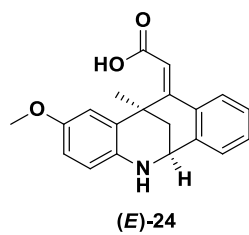
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)



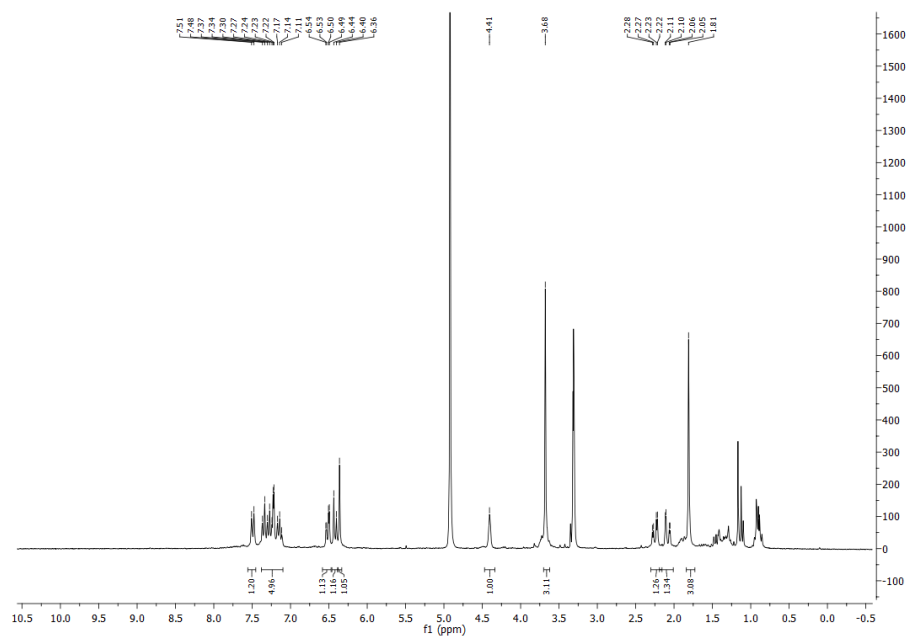


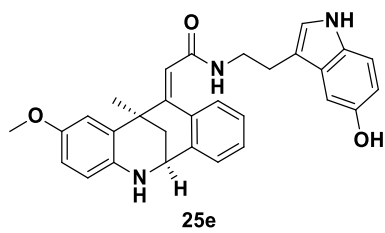
¹H NMR (250 MHz, MeOD)



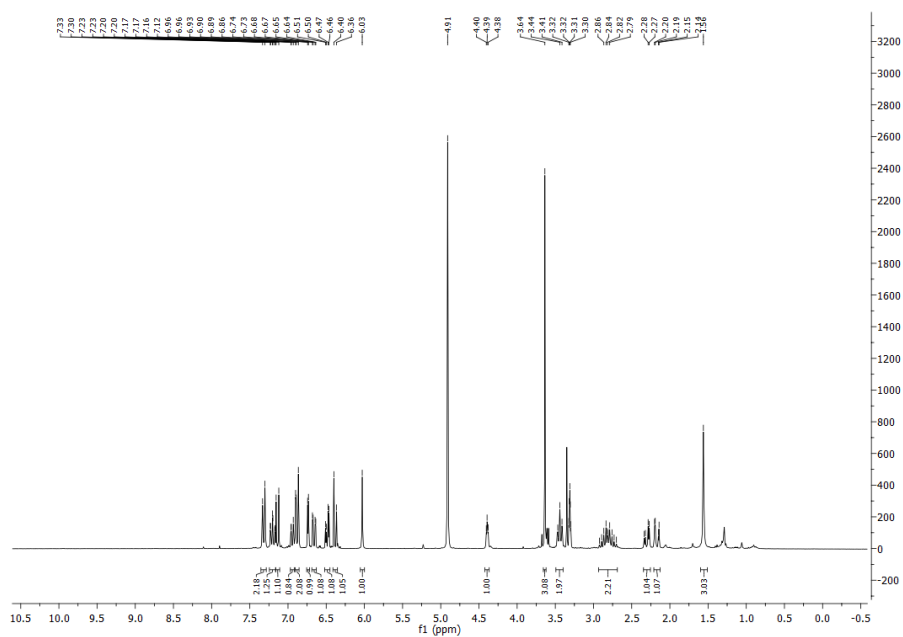


¹H NMR (250 MHz, MeOD)

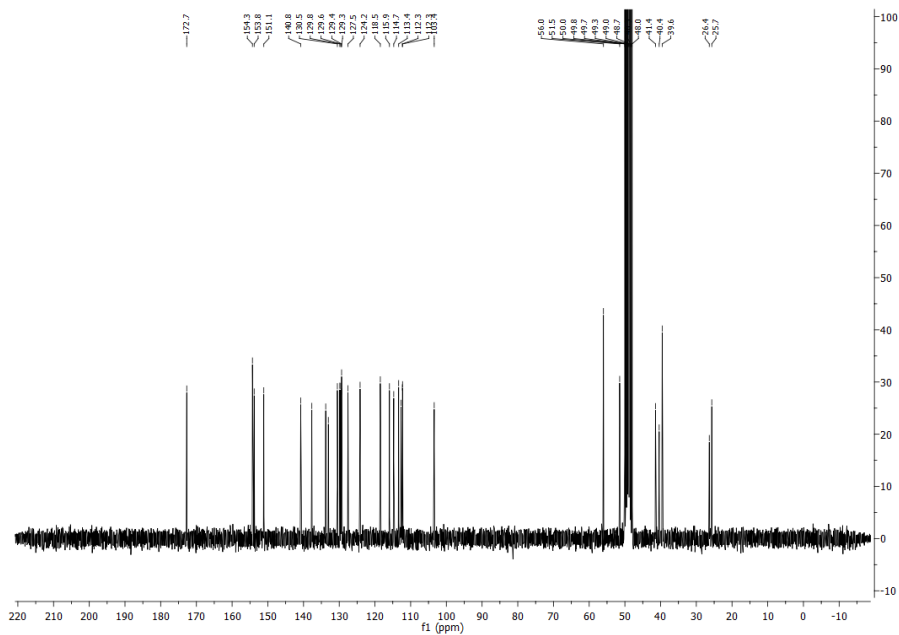


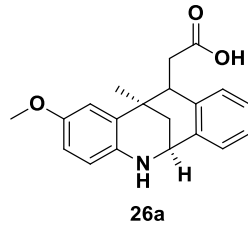


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

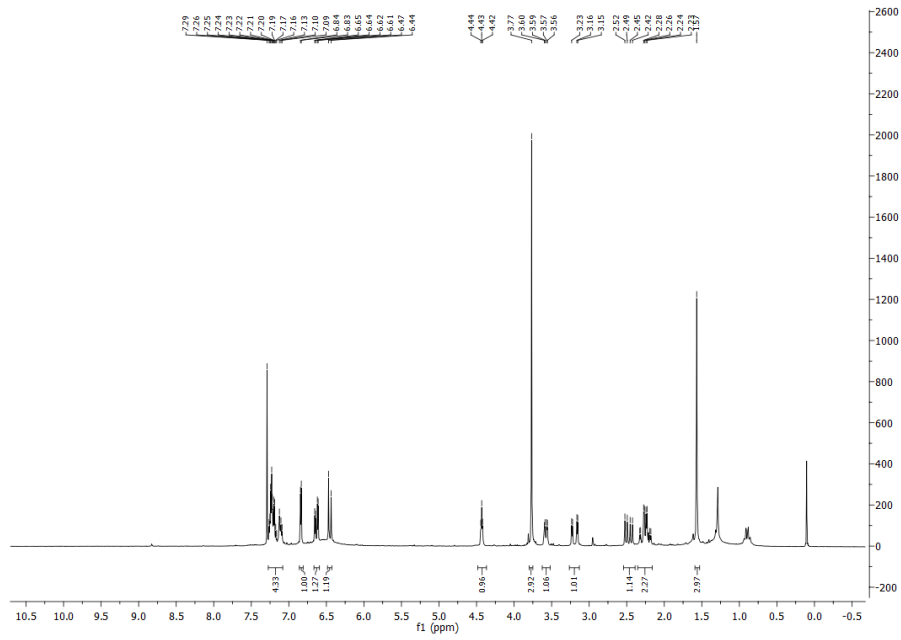


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

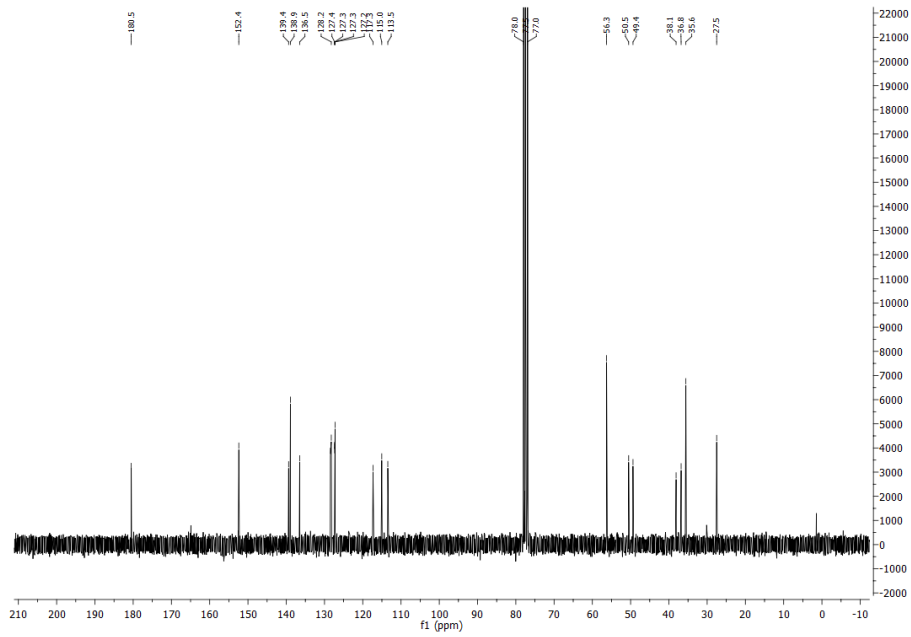


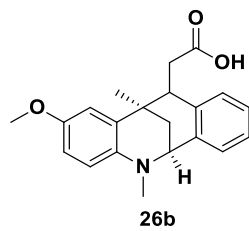


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

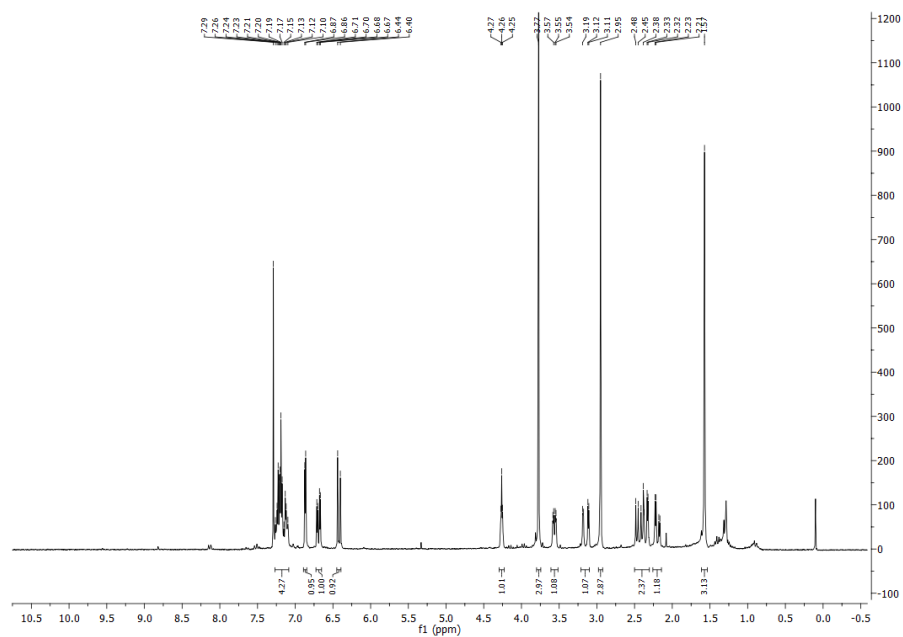


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

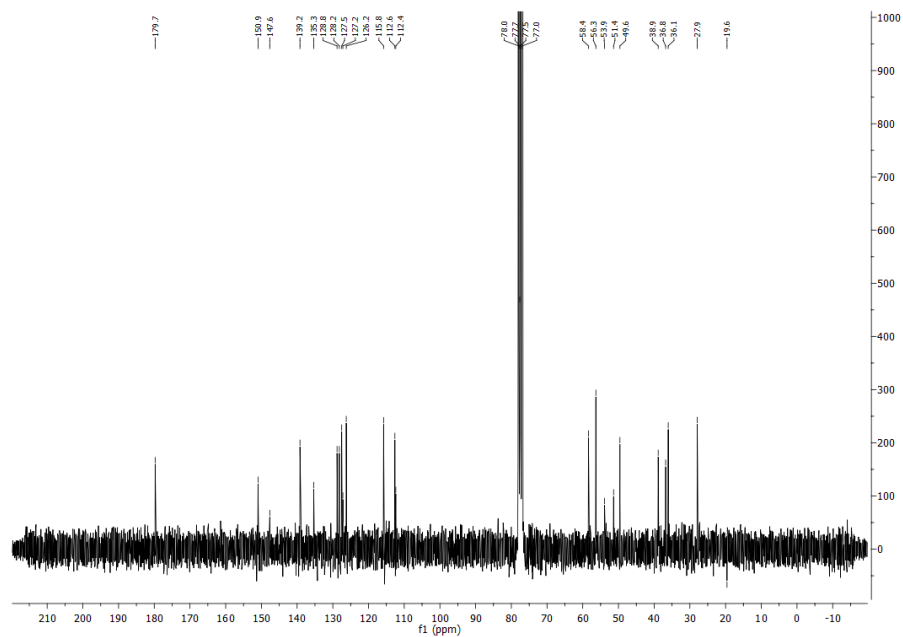


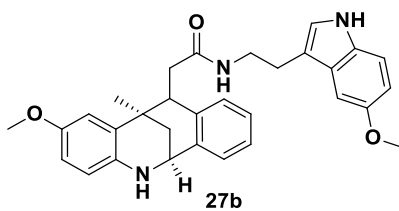


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

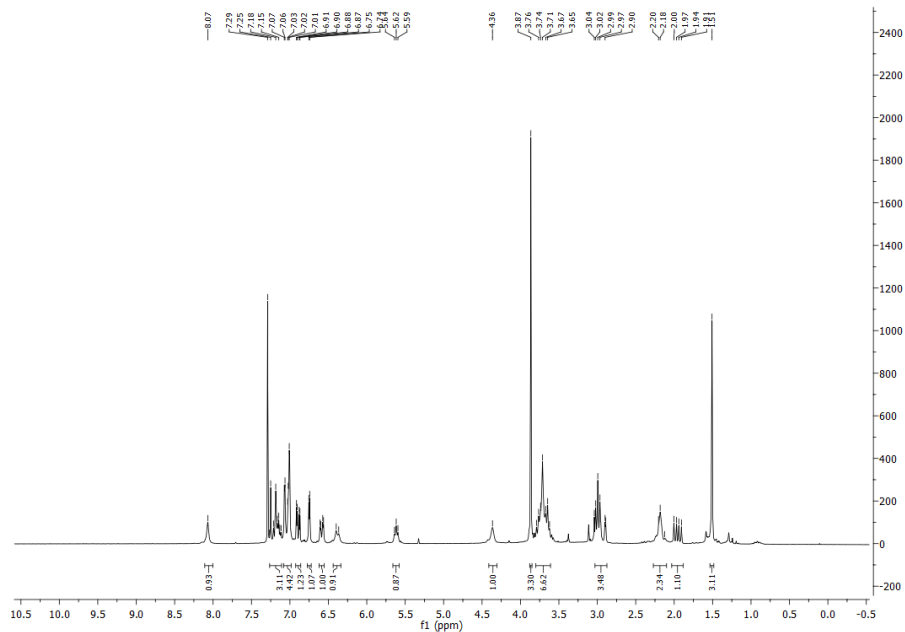


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

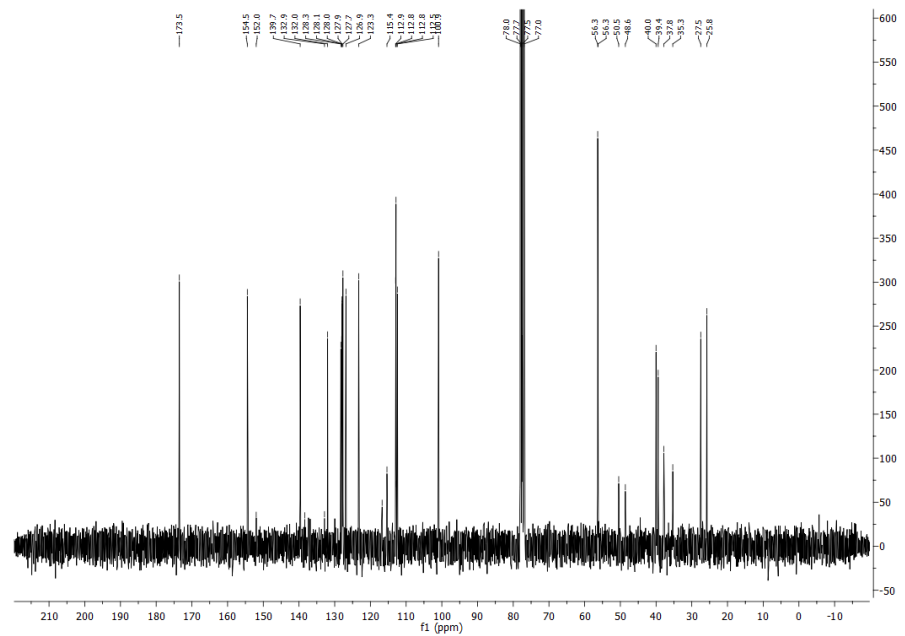


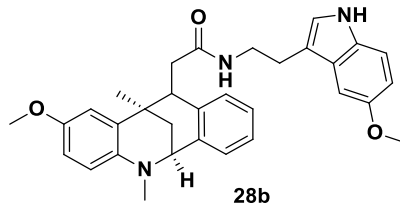


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

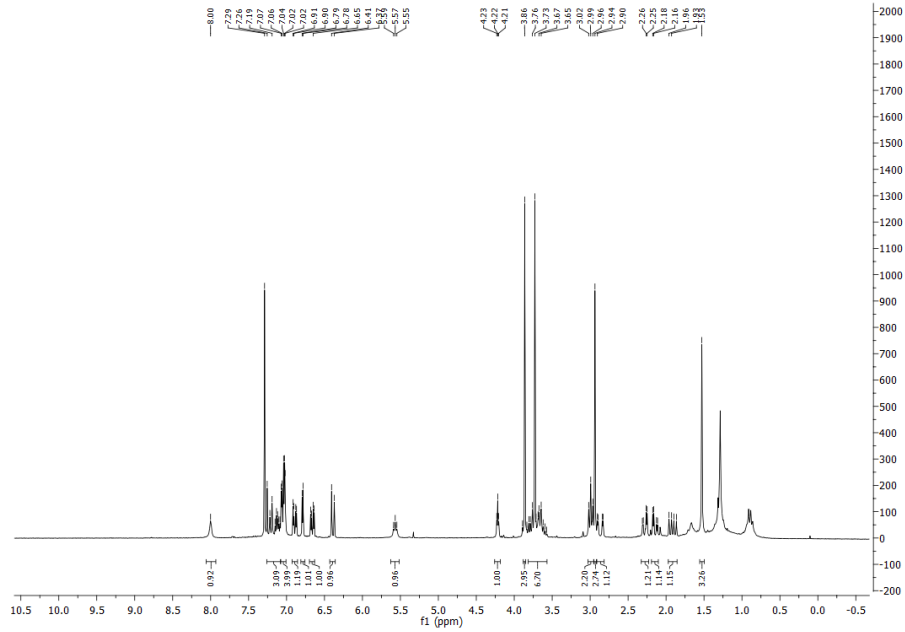


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

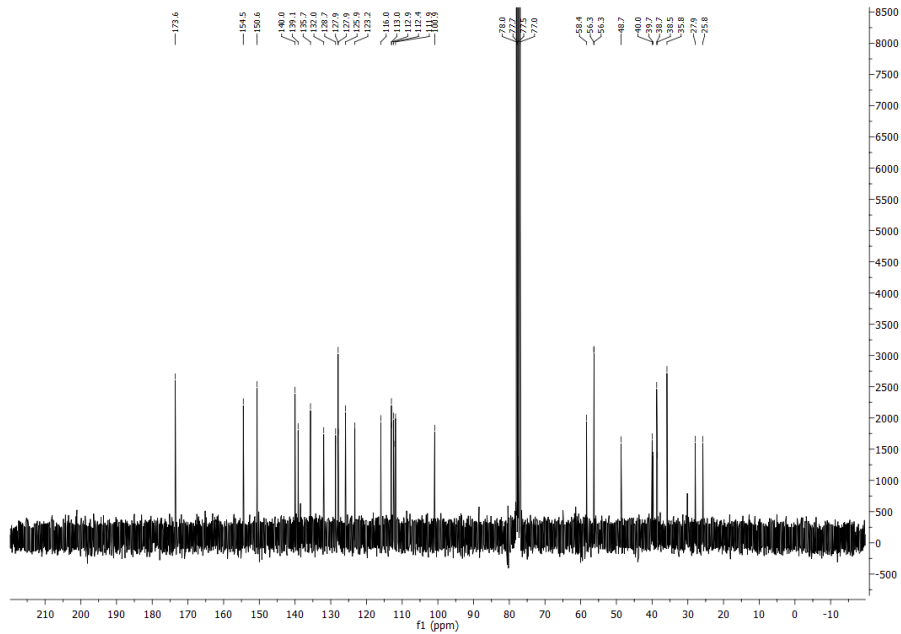


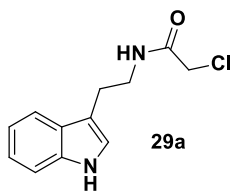


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

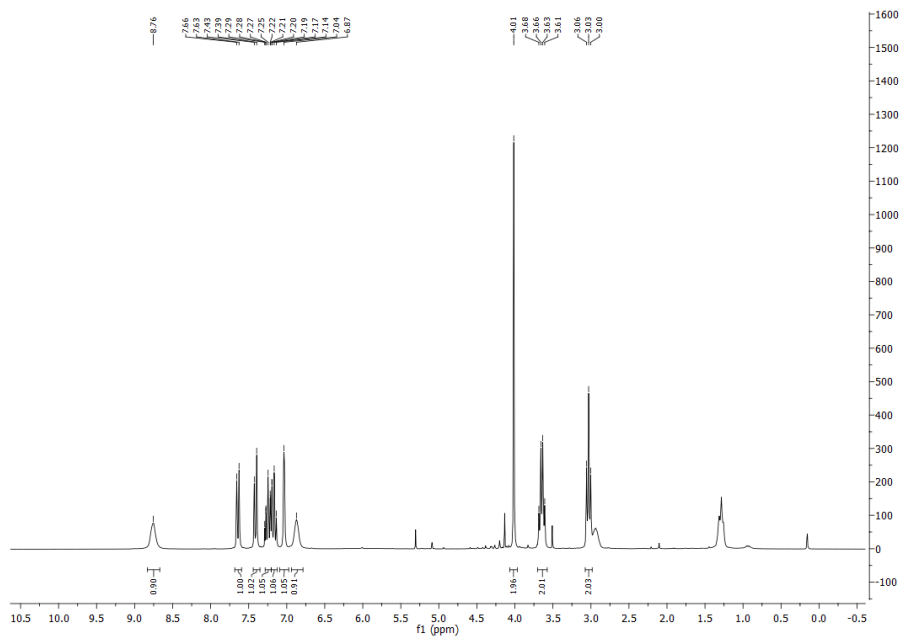


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

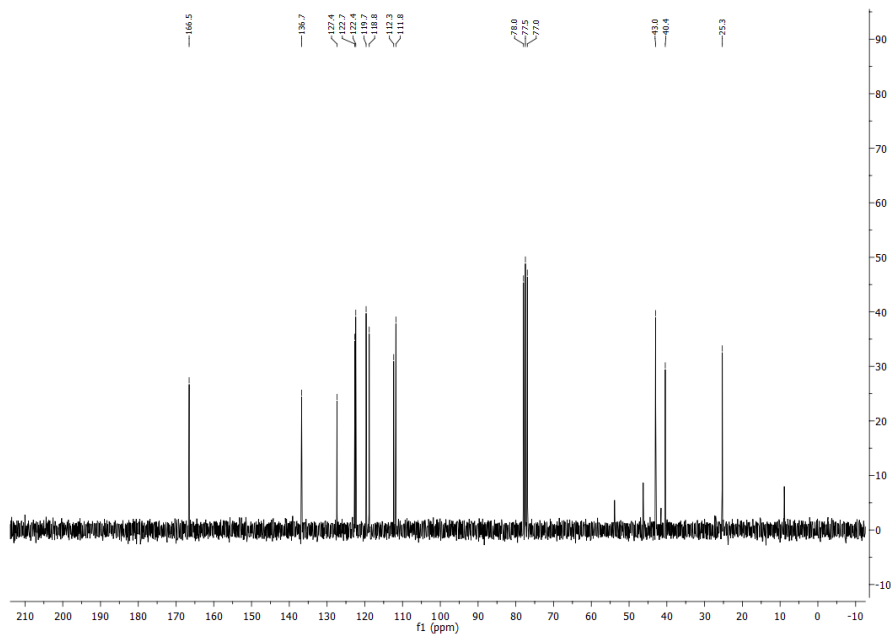


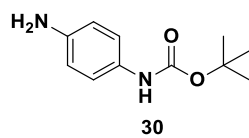


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

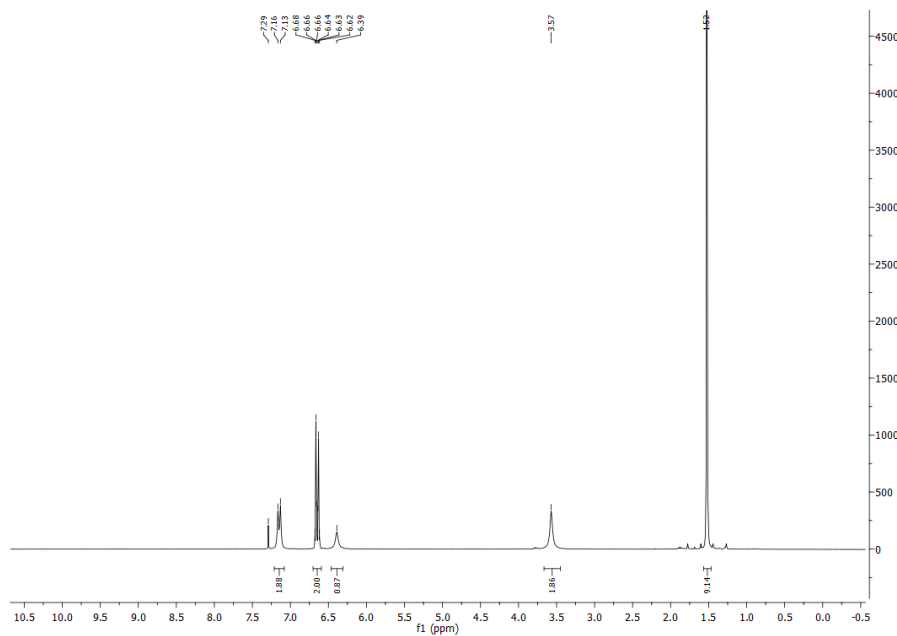


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

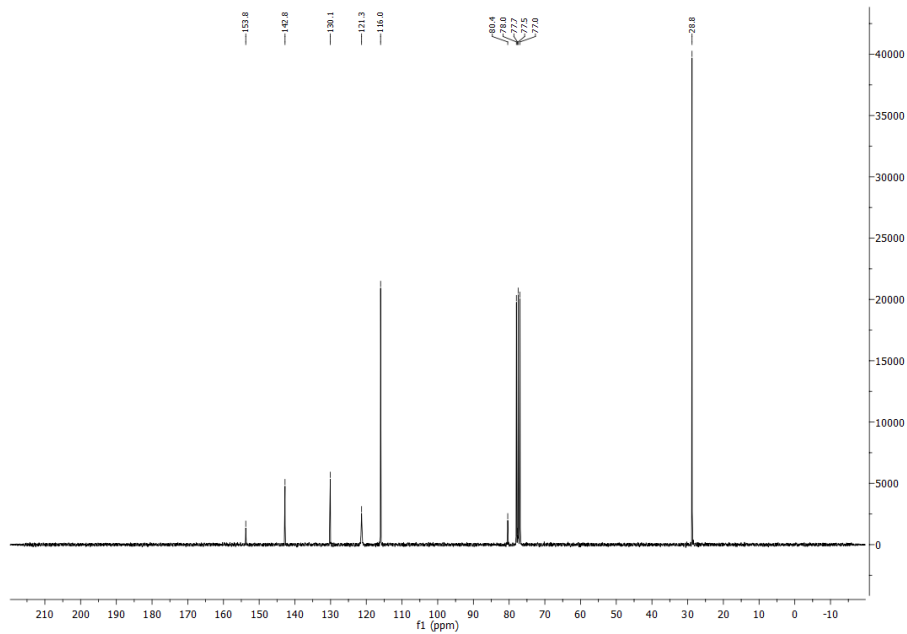


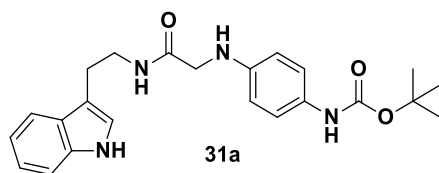


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

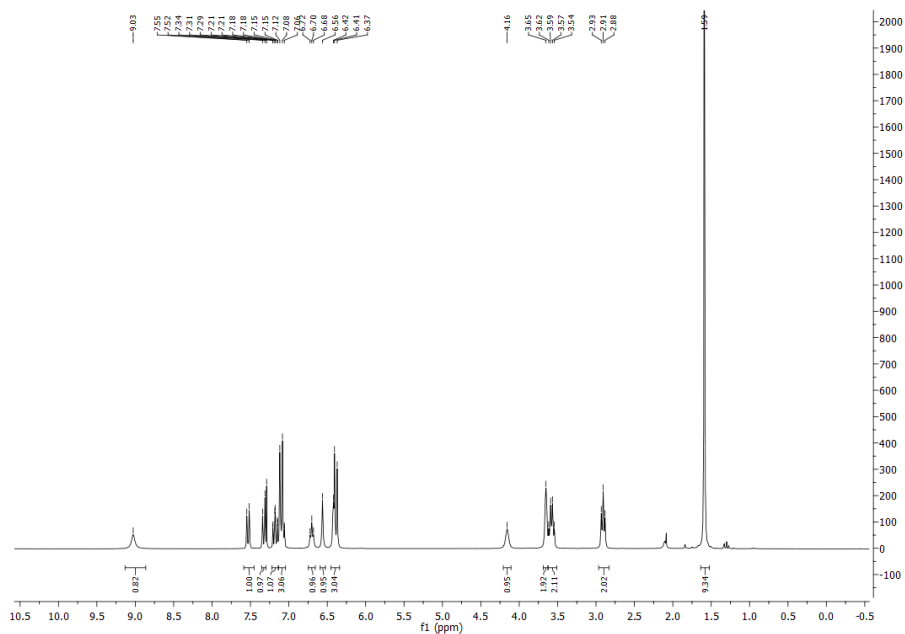


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

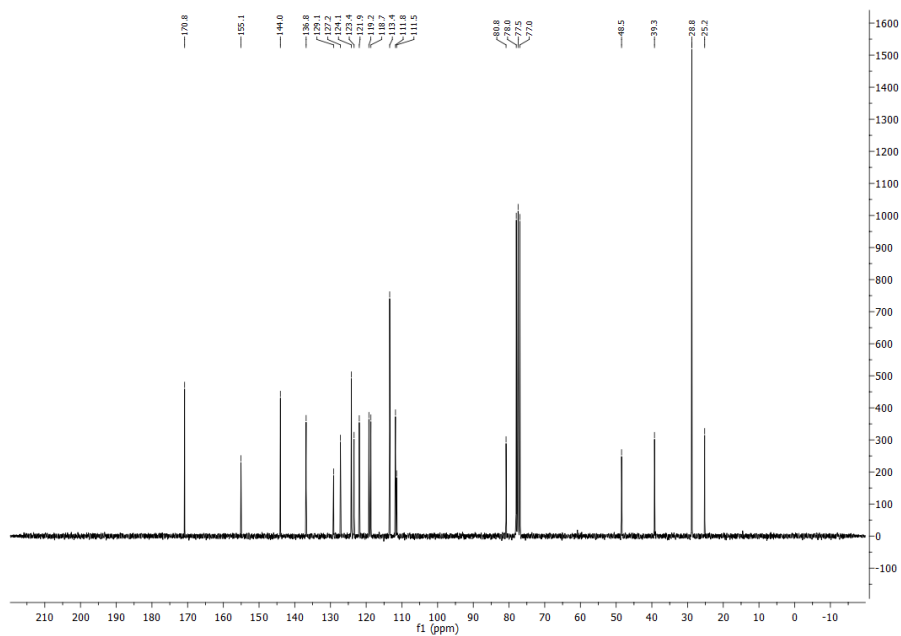


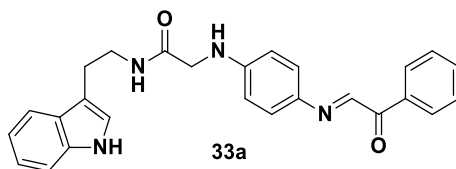


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

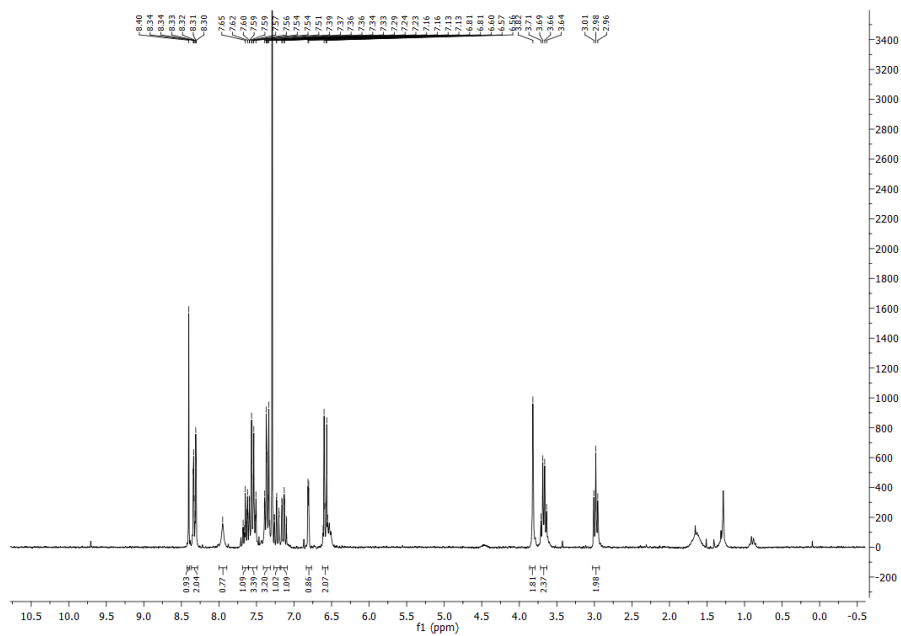


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

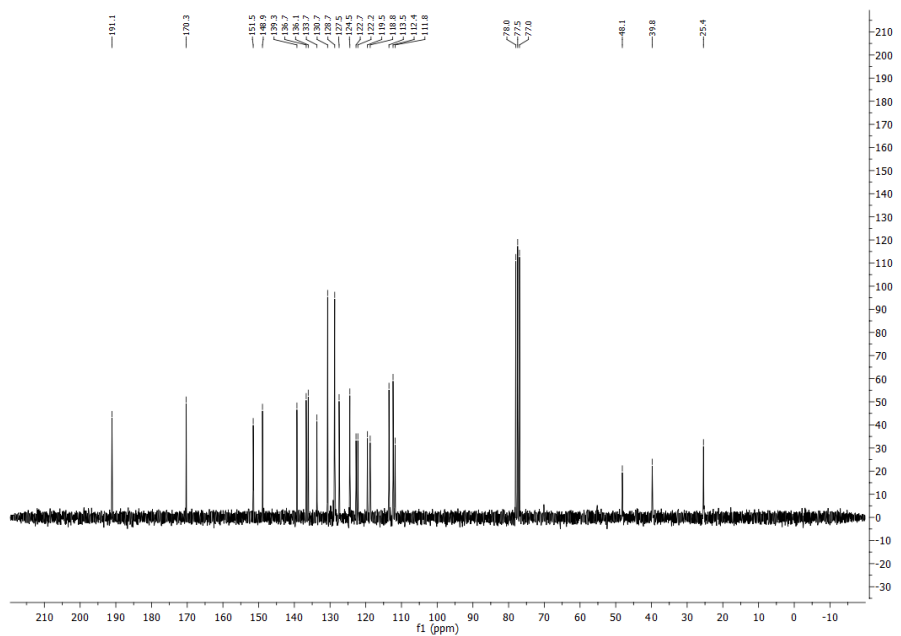


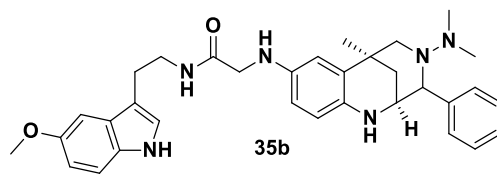


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

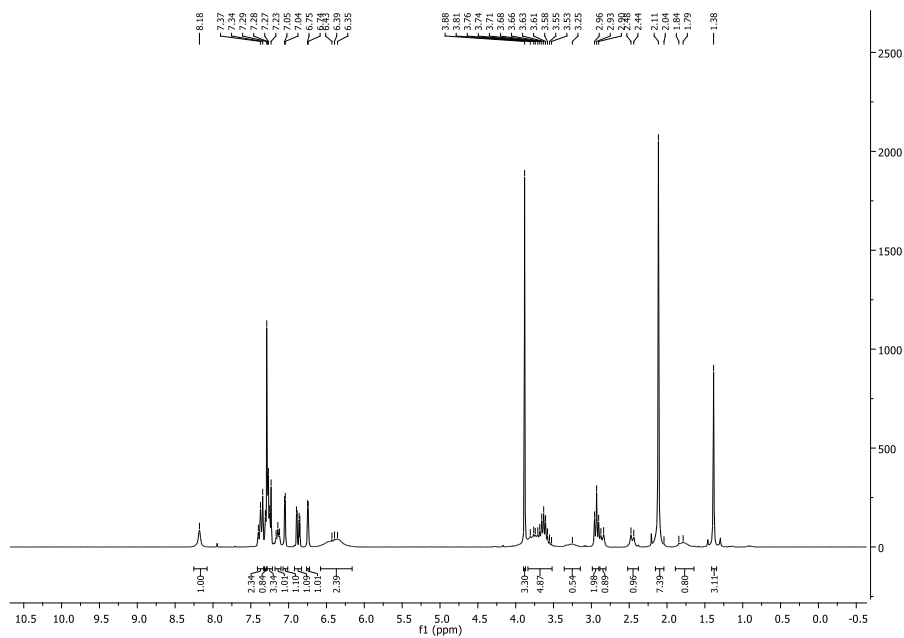


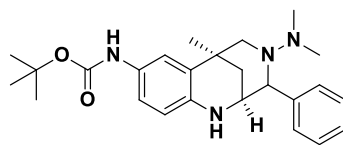
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)





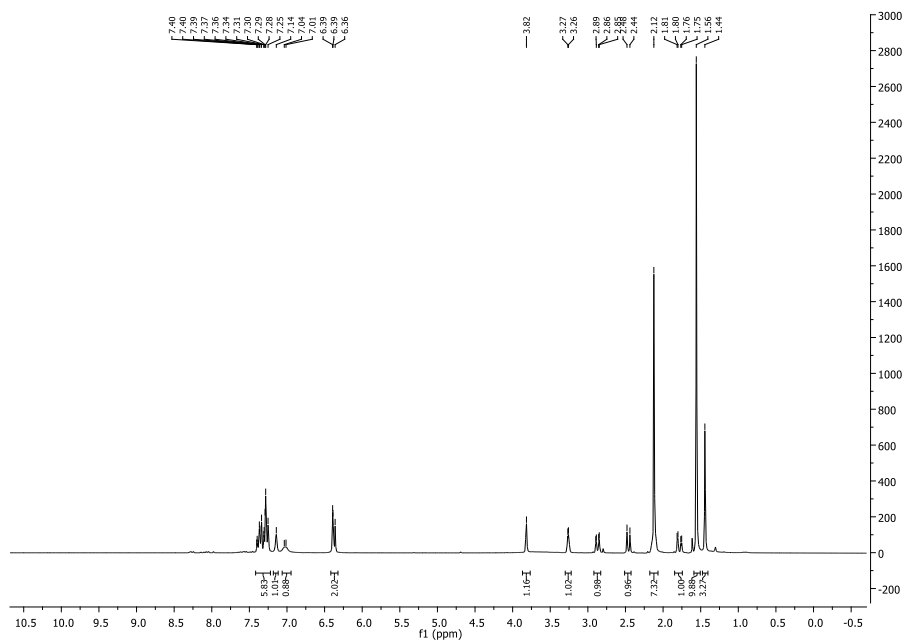
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

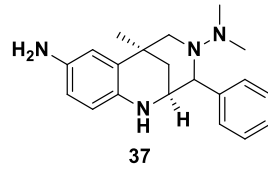




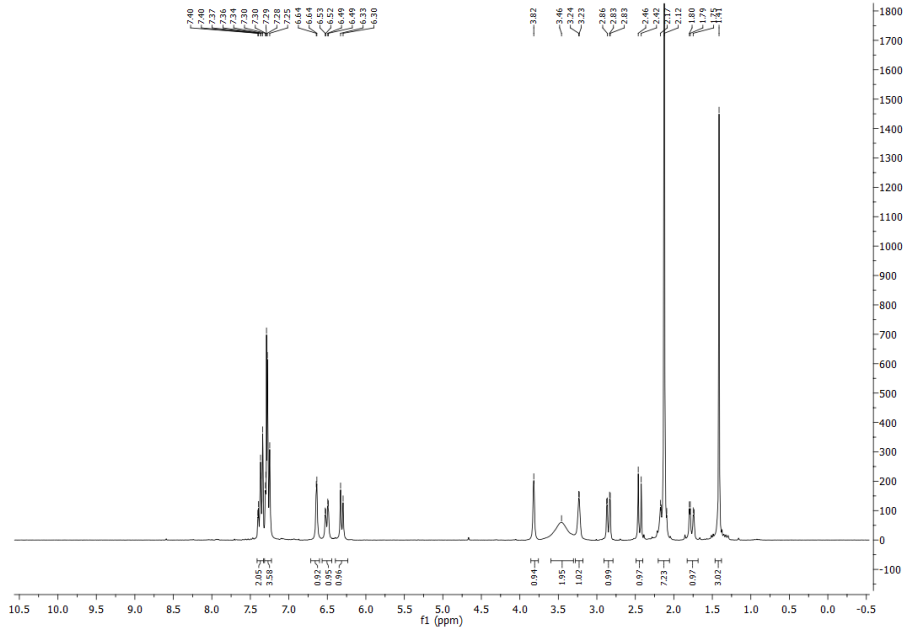
36

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3)

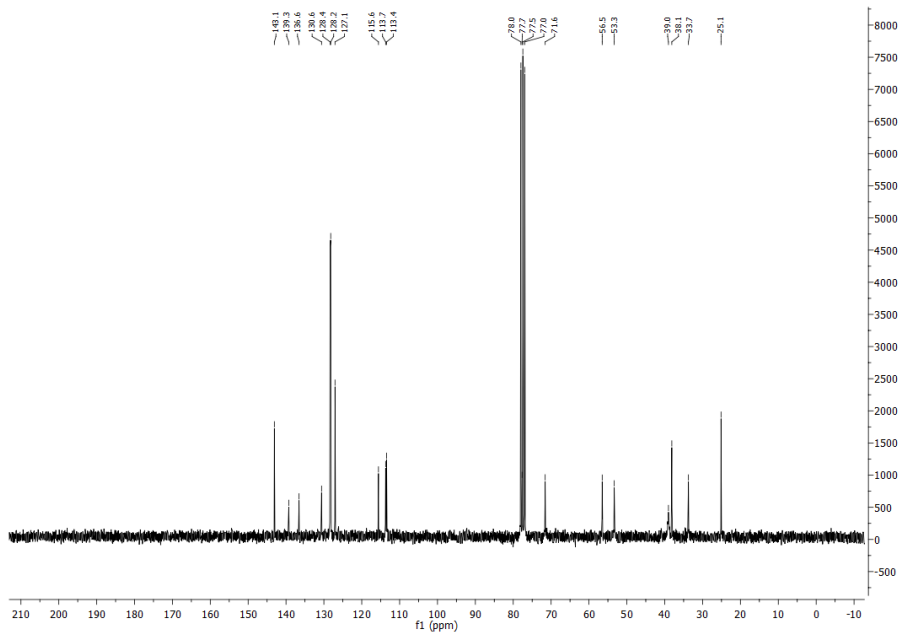


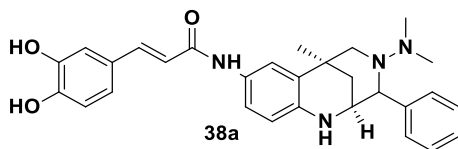


¹H NMR (250 MHz, CDCl₃)

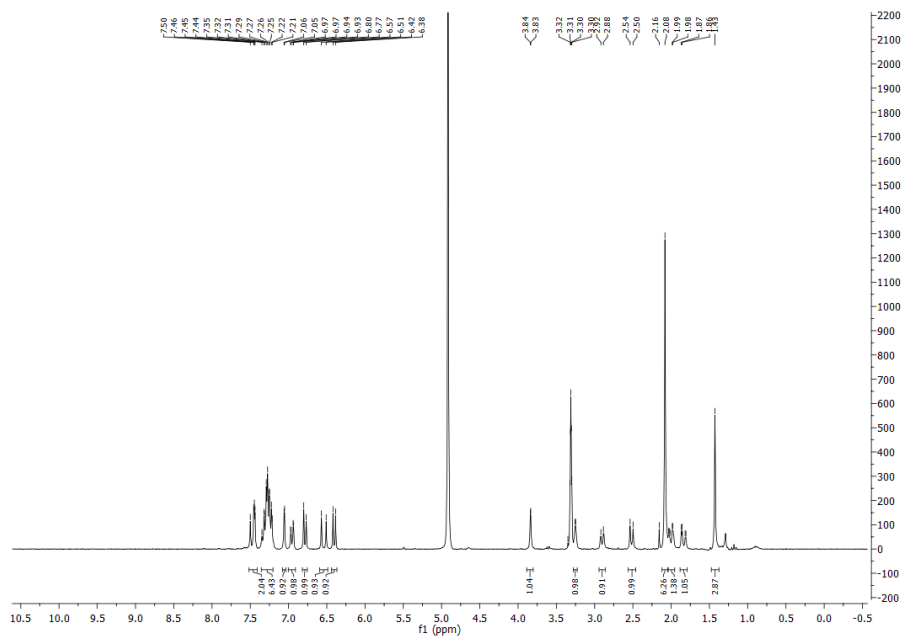


¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃)

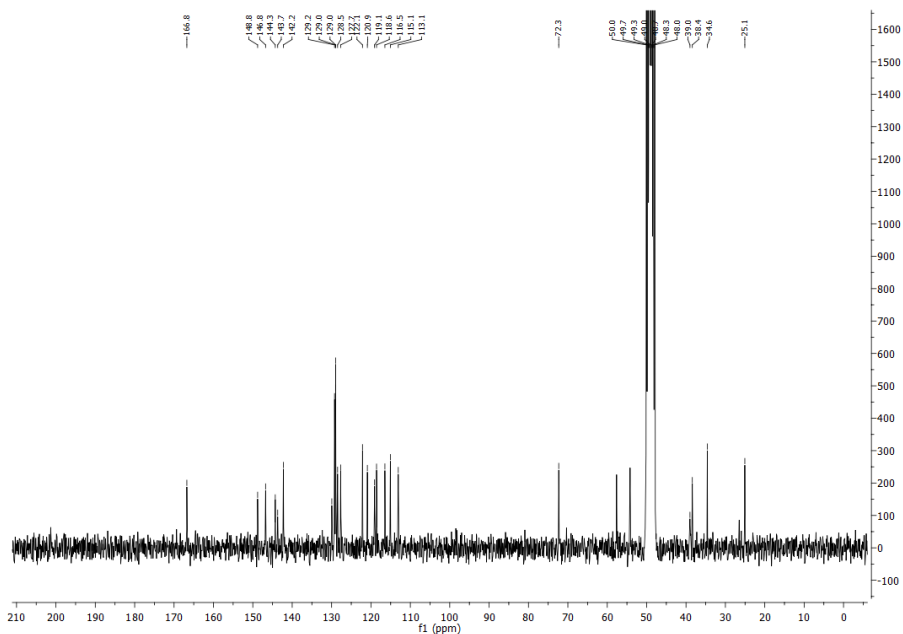


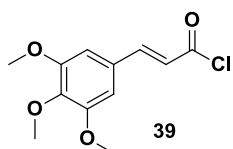


¹H NMR (250 MHz, MeOD)

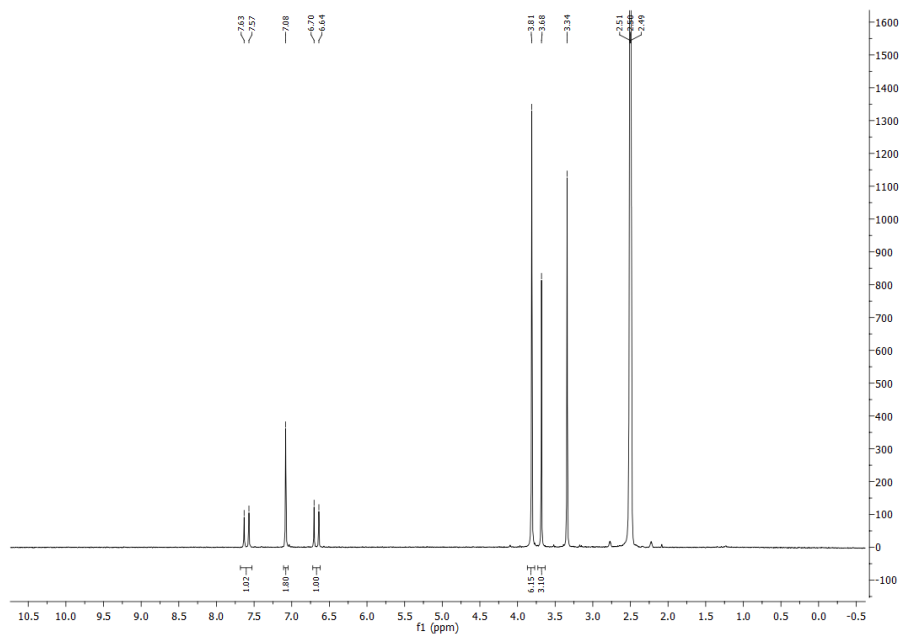


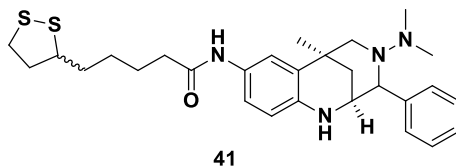
¹³C NMR (63 MHz, MeOD)



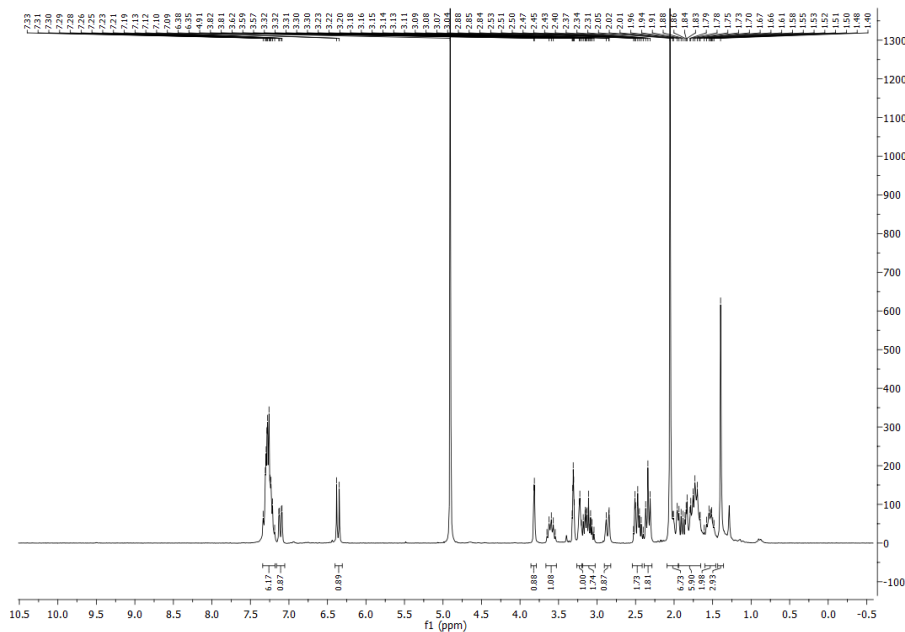


¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆)





¹H NMR (250 MHz, MeOD)



¹³C NMR (63 MHz, MeOD)

