

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Química Orgánica**



**ANÁLOGOS FLUORESCENTES DE FÁRMACOS  
LIPÍDICOS CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA  
Y ANTINEOPLÁSTICA: DISEÑO, SÍNTESIS Y  
APLICACIONES.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Valentín Hornillos Gómez-Recuero**

Bajo la dirección de los doctores

A. Ulises Acuña  
Francisco Amat Guerri

**Madrid, 2010**

- ISBN: 978-84-693-1104-2



TESIS DOCTORAL

**ANÁLOGOS FLUORESCENTES DE  
FÁRMACOS LIPÍDICOS CON ACTIVIDAD  
ANTIPARASITARIA Y ANTINEOPLÁSICA.  
DISEÑO, SÍNTESIS Y APLICACIONES**

**VALENTÍN HORNILLOS GÓMEZ-RECUERO**

INSTITUTO DE QUÍMICA FÍSICA *ROCASOLANO*, CSIC  
INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL, CSIC



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**Madrid, 2009**





TESIS DOCTORAL

**ANÁLOGOS FLUORESCENTES DE  
FÁRMACOS LIPÍDICOS CON ACTIVIDAD  
ANTIPARASITARIA Y ANTINEOPLÁSICA.  
DISEÑO, SÍNTESIS Y APLICACIONES**

Memoria presentada por  
**VALENTÍN HORNILLOS GÓMEZ-RECUERO**  
para optar al grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

INSTITUTO DE QUÍMICA FÍSICA *ROCASOLANO*, CSIC  
INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL, CSIC

Directores:  
**A. ULISES ACUÑA Y FRANCISCO AMAT GUERRI**

**Madrid, 2009**



*The idea is to try to give all the information to help others to judge the value of your contribution; not just the information that leads to judgment in one particular direction or another.*

Richard P. Feynman



*A mis padres*



## **Agradecimientos**

Hace ahora casi cinco años que, durante la preparación de mi diploma de estudios avanzados (DEA) en Ciudad Real, recibí la noticia de una oferta para la realización de una tesis doctoral en Madrid, en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Recuerdo que el título de la beca me llamó mucho la atención, así que busqué los artículos publicados por el grupo ofertante y tras leer, entre otros, uno en el que aparecían, en unas micrografías de fluorescencia, los microtúbulos responsables de repartir el ADN entre las dos nuevas células generadas en el proceso mitótico, decidí solicitar la beca. Un mes después vine a Madrid para conocer personalmente a los dos investigadores que durante todo este tiempo me han dirigido el trabajo descrito en esta Memoria: los profesores A. Ulises. Acuña y Francisco Amat Guerri. A ellos quiero agradecer, en primer lugar, no solo la oportunidad que entonces me brindaron, sino su dedicación y generosidad en todos los aspectos que han rodeado este trabajo. Ambos me han hecho sentirme parte activa de este proyecto, escuchando mis opiniones y concediéndome autonomía en la toma de muchas decisiones. Sin su ayuda no hubiera sido posible finalizar con éxito el trabajo que aquí se expone.

Así mismo quiero dar las gracias al Prof. Diego Armesto Vilas, Catedrático de Química Orgánica de la Universidad Complutense de Madrid, por haber aceptado ser mi tutor y ponente de esta Tesis.

También quisiera expresar todo mi agradecimiento al Dr. Luis Rivas, del Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C., Madrid) por su interés y esfuerzo en el desarrollo de las aplicaciones biológicas de los análogos de Miltefosina. Del mismo modo, doy las gracias a los Drs. J. Luis Saugar, J. R. Luque y Eugenia Carrillo, quienes realizaron los experimentos de actividad en el laboratorio.

También quiero agradecer al Dr. Faustimo Mollinedo, del Centro de Investigación del Cáncer, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (C.S.I.C., Universidad de Salamanca), por su interés y por dar sentido a los análogos fluorescentes de Edelfosina en sus levaduras modificadas.

Besides I would like to thank Dr. Peter Nussbaumer, at Novartis Institutes for Biomedical Research, Vienna, who gave me the opportunity to join his group, and the staff working there, who received me as one more in the group.

Esta Memoria ha sido posible gracias a los Institutos de Química Orgánica General y de Química Física *Rocasolano*, donde realicé la mayor parte del trabajo aquí descrito.

Agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una beca predoctoral FPI y a los proyectos de Investigación PIF-200680F0171, FIS-PI061125 y BQU2003-04413 que han financiado mi trabajo.

No podría olvidarme en estas líneas de todos los miembros del Departamento de Química. Orgánica, en la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Castilla la Mancha, Ciudad Real, donde me inicié en la investigación y a quienes debo gran parte de mi formación. Especialmente a los Drs. Juan Tejeda Sojo y Enrique Díez Barra y a la Dra. Sonia Merino Guijarro.

Al Prof. Félix Sánchez, porque nunca dudó en dejar su trabajo para ayudarme o para contestar a mis preguntas. También, cómo no, por su amistad.

Quiero dar las gracias a mis amigos y compañeros de trabajo, especialmente al Dr. Javier Delgado, que me brindó su ayuda en los primeros meses de trabajo. A mis compañeros de laboratorio e Instituto, Alberto, Marta Liras, Mercedes, Gonzalo, Carolina, Laura, Ester, Sergio, Luis, Nuria, Raúl, Elisa, Mariana, Gema... A Guillermo y Laura Tormo por su ayuda en el registro de los espectros de fluorescencia. A Puri por tantos momentos.

A todo el personal del Centro, Joaquina, May, Araceli, Pablo, Juanma y Tico... por la realización de los espectros IR, RMN, masas y el microanálisis.

Quiero hacer una mención especial a aquellas personas con las que he compartido parte de mi vida y he vivido momentos inolvidables en multitud de lugares: Toledo, Ciudad-Real, Los Navalmorales, Guadamur y Madrid, principalmente.

En último lugar agradecer a toda mi familia y, en particular, a mi madre y a mi hermano por el cariño y apoyo que me han dado en todo momento.

A todos, GRACIAS.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1	FLUORESCENCIA Y QUÍMICA MEDICINAL	3
1.2	OBJETIVOS CONCRETOS DE ESTE TRABAJO	5
1.3	ORGANIZACIÓN DE LA MEMORIA	8
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>15</b>
2.1	ANÁLOGOS FLUORESCENTES DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS	15
2.1.1	Unión covalente de etiquetas fluorescentes	18
2.1.2	Construcción del fluoróforo sobre la estructura original	23
2.2	FOSFOLÍPIDOS	26
2.3	MILTEFOSINA Y LEISHMANIASIS	27
2.3.1	Leishmaniasis	29
2.4	EDELFOFINA Y CÁNCER	37
2.5	POLIENOS CONJUGADOS COMO GRUPOS FLUORESCENTES	42
2.5.1	Introducción	42
2.5.2	Métodos de obtención	42
2.5.2.1	Reacciones de Wittig y de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)	43
2.5.2.2	Acoplamientos catalizados por paladio	45
2.5.2.3	Empleo de fragmentos poliénicos bifuncionales	50
2.5.3	Lípidos poliénicos fluorescentes como sondas moleculares	53
2.5.3.1	Polienos lineales conjugados fluorescentes	54
2.5.3.2	Fenilpolienos fluorescentes	57
2.5.3.3	Análogos fluorescentes de colesterol	60
2.5.4	Análogos poliénicos y fenilpoliénicos de Edelfosina y Miltefosina	61
2.6	EL CROMÓFORO BODIPY: ESTRUCTURA, SÍNTESIS, PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS Y APLICACIONES	65
2.6.1	Estructura básica	65
2.6.2	Síntesis de BODIPYs simétricos	66
2.6.2.3	Síntesis de BODIPYs asimétricos	68
2.6.3	Reactividad del grupo BODIPY	70
2.6.3.1	Sustitución electrófila	70
2.6.3.2	Sustitución nucleófila sobre BODIPYs halogenados	71
2.6.3.3	Adición nucleófila en la posición 8	72
2.6.3.4	Condensaciones a través de metilos en 3 y 5	73

2.6.3.5	Oxidación del metilo en 3 .....	74
2.6.3.6	Reacciones de acoplamiento en las posiciones 3 y 5 .....	75
2.6.3.7	Síntesis de “cassettes” .....	76
2.6.3.8	Síntesis a partir de 8-metiltio-BODIPY .....	77
2.6.3.9	Sustitución de los átomos de flúor .....	77
2.6.4	Estructuras relacionadas .....	78
2.6.5	Pirroles para construir el cromóforo BODIPY .....	80
2.6.5.1	Introducción .....	80
2.6.5.2	Reacciones de sustitución en pirroles .....	80
2.6.5.3	Interconversión de grupos funcionales .....	82
2.6.5.4	Síntesis de pirroles mediante ciclaciones .....	85
2.6.6	Propiedades espectroscópicas del cromóforo BODIPY .....	90
2.6.7	Aplicaciones .....	91
2.7	SYNTHESIS OF SPHINGOLIPIDS .....	100
2.7.1	Introduction.....	100
2.7.2	Sphingolipid functions.....	101
2.7.3	Synthetic routes towards ceramide-1-phosphates.....	103
<b>3</b>	<b>COMPUESTOS SINTETIZADOS EN ESTE TRABAJO .....</b>	<b>109</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>115</b>
4.1	ANÁLOGOS FLUORESCENTES DE MILTEFOSINA CON GRUPOS POLIENO .....	115
4.1.1	Diseño .....	115
4.1.2	Síntesis.....	124
4.1.2.1	Análogos con grupos todo-( <i>E</i> )-feniltrienino .....	124
4.1.2.2	Análogos con el grupo 1,6-difenilhexatrieno (DPH).....	147
4.1.3	Propiedades espectroscópicas y estabilidad térmica y fotoquímica.....	157
4.1.4	Evaluación biológica. ....	163
4.1.4.1	Actividad leishmanicida.....	163
4.1.4.2	Experimentos de competición.....	164
4.1.4.3	Concentración intracelular de MT-5C-PTRI .....	166
4.1.4.4	Distribución intracelular en parásitos de Leishmania .....	167
4.1.4.5	Estabilidad metabólica de los análogos fluorescentes .....	168
4.2	ANÁLOGOS FLUORESCENTES DE MILTEFOSINA CON GRUPO BODIPY .....	171
4.2.1	Diseño .....	171

4.2.2	Síntesis.....	174
4.2.2.1	Síntesis de MT-11C-BDP ( <b>45</b> ) y MT-11C-2EtBDP ( <b>46</b> ) .....	176
4.2.2.2	Síntesis de MT-11C-2INBDP ( <b>50</b> ) .....	184
4.2.3	Propiedades fotofísicas de los análogos <b>45</b> , <b>46</b> y <b>50</b> .....	189
4.2.4	Propiedades parasiticidas de los análogos <b>45</b> y <b>46</b> .....	192
4.2.4.1	Actividad leishmanicida.....	192
4.2.4.2	Distribución intracelular en parásitos de Leishmania .....	193
4.3	SÍNTESIS DE UN ANÁLOGO FLUORESCENTE DEL ÁCIDO OCTADECANOICO .....	195
4.4	ANÁLOGOS FLUORESCENTES DE EDELFOFINA CON GRUPO BODIPY .....	200
4.4.1	Diseño molecular .....	200
4.4.2	Síntesis.....	203
4.4.2.1	Síntesis de <b>56</b> .....	206
4.4.2.2	Síntesis de ET-11C-6EtBDP ( <b>62</b> ) .....	209
4.4.2.3	Síntesis de ET-13C-2INBDP ( <b>65</b> ).....	214
4.4.3	Propiedades espectroscópicas de los análogos <b>62</b> y <b>65</b> .....	217
4.4.4	Bioactividad de los análogos .....	219
4.5	ANÁLOGOS DE MILTEFOFINA CON GRUPO TIOL.....	221
4.5.1	Síntesis del tiol <b>72</b> para cromatografía de afinidad.....	221
4.5.1.1	Síntesis y propiedades de <b>72</b> .....	222
4.5.1.2	Actividad leishmanicida de <b>72</b> .....	226
4.5.1.3	Inmovilización de <b>72</b> .....	227
4.5.2	Síntesis del tiol <b>84</b> , para su conjugación con péptidos lanzadera .....	229
4.5.2.1	Síntesis .....	230
4.5.2.2	Propiedades espectroscópicas de <b>84</b> .....	240
4.5.2.3	Actividad leishmanicida de <b>84</b> .....	241
4.6	SYNTHESIS OF CERAMIDE-1-PHOSPHATES .....	243
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>251</b>
<b>6</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>257</b>
6.1	MATERIALES Y MÉTODOS .....	257
6.2	ANÁLISIS DE FÓSFORO. ....	259
6.3	ANÁLISIS DE TIOLES.....	261
6.4	ANÁLOGOS FLUORESCENTES POLIÉNICOS .....	263
6.4.1	Síntesis de productos de partida.....	263
6.4.1.1	Síntesis del fosfonato <b>4</b> .....	263

6.4.1.2	Síntesis de alquinoles terminales .....	266
6.4.2	Síntesis de análogos de Miltefosina con grupo feniltrienino (PTRI).....	268
6.4.2.1	Método 1. Síntesis de MT-6C-PTRI ( <b>11</b> ) .....	268
6.4.2.2	Método 2. Síntesis de MT-5C-OMePTRI ( <b>17</b> ) .....	274
6.4.3	Síntesis del bromopolieno <b>19</b> .....	279
6.4.4	Síntesis de análogos con el grupo difenilhexatrieno (DPH) .....	282
6.5	ANÁLOGOS FLUORESCENTES CON GRUPOS BODIPY .....	293
6.5.1	Métodos generales .....	293
6.5.1.1	Alquilación de acetilacetona (acacH) .....	293
6.5.1.2	Síntesis de Johnson-Knorr de pirroles .....	293
6.5.1.3	Síntesis de $\alpha$ -H pirroles .....	294
6.5.1.4	Síntesis de BODIPYs asimétricos.....	295
6.5.1.5	Síntesis de BODIPYs 2-sustituidos (Sonogashira-Hagihara) .....	295
6.5.2	Síntesis de COOH-10C-2EtBDP ( <b>39</b> ).....	296
6.5.3	Síntesis de análogos de Miltefosina con grupo BODIPY .....	304
6.5.3.1	Síntesis de MT-11C-BDP ( <b>45</b> ) y MT-11C-6EtBDP ( <b>46</b> ) .....	304
6.5.3.2	Síntesis de MT-11C-2INBDP ( <b>46</b> ) .....	311
6.5.4	Síntesis de análogos de Edelfosina con grupo BODIPY .....	315
6.5.4.1	Síntesis del glicerol precursor <b>56</b> .....	315
6.5.4.2	Síntesis de ET-11C-6EtBDP ( <b>62</b> ) .....	321
6.5.4.3	Síntesis de ET-13C-2INBDP ( <b>65</b> ).....	327
6.6	ANÁLOGOS REACTIVOS DE MILTEFOSINA .....	331
6.6.1	Síntesis de MT-16C-SH ( <b>72</b> ) .....	331
6.6.2	Síntesis de MT-8C-SHBDP ( <b>84</b> ) .....	337
6.7	SÍNTESIS DE CERAMIDAS 1-FOSFATO (C1P) .....	348
6.7.1	Procedimiento general .....	348
6.8	ENSAYOS BIOLÓGICOS .....	354
6.8.1	Actividad leishmanicida de los análogos de MT .....	354
7	REFERENCIAS Y NOTAS .....	359

## 1. Introducción



## 1 Introducción

### 1.1 Fluorescencia y Química Medicinal

La emisión de fluorescencia en fase condensada es un proceso de origen electrónico, lo que ha retrasado históricamente su comprensión, a pesar de que las primeras observaciones del fenómeno se realizaron en Sevilla ya en el siglo XVI.<sup>1</sup> Hoy en día se sabe que las molécula excitadas electrónicamente por absorción fotónica permanecen nanosegundos en dicho estado excitado, un tiempo que es  $\sim 10^6$  veces mayor que el requerido para la excitación. En la mayoría de los casos, la molécula pierde este exceso de energía electrónica a través de procesos no radiantes. Sin embargo, para un número reducido de compuestos la probabilidad de la emisión es mayor que la de los procesos no radiantes y, por tanto, se produce emisión de fluorescencia. Como era de esperar, se ha dedicado un gran esfuerzo investigador a lo largo de casi un siglo para determinar los factores electrónicos y estructurales que optimizan las propiedades emisivas de una molécula; sin embargo, todavía hoy el diseño de nuevos grupos fluorescentes (fluoróforos) se lleva a cabo de forma semi-empírica. En contraste, el desarrollo de las técnicas instrumentales para la excitación y detección de fluorescencia ha progresado considerablemente. A finales de la década de los 70 del pasado siglo ya se había alcanzado la sensibilidad necesaria para detectar la emisión de un solo fotón, con resolución temporal de ps-ns, y a lo largo de las últimas décadas se pusieron a punto técnicas apropiadas para detectar la fluorescencia de una molécula única.<sup>2</sup> Finalmente, en los años más recientes se ha logrado combinar la detección de fotones únicos<sup>3</sup> con una elevada resolución espacial, en la zona de las decenas de nm. Este formidable progreso técnico ha traído como consecuencia la disponibilidad de microscopios de fluorescencia que combinan todas estas posibilidades de sensibilidad, resolución temporal y resolución espacial.<sup>4</sup> Además, gracias a los avances paralelos en optoelectrónica y procesado de imágenes, se ha conseguido que dichos instrumentos se puedan utilizar en los laboratorios de investigación biológica de manera rutinaria. Esto ha supuesto una revolución en la forma en la que el investigador actual puede abordar problemas

---

<sup>1</sup> Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. en *Springer Series on Fluorescence*, **2008**, 4, 3-20. Springer-Verlag, Berlin.

<sup>2</sup> Tinnenfeld, P., Sauer, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2642-2671.

<sup>3</sup> Schmidt, R., Wurm, C. A., Jakobs, S., Engelhardt, J., Egner, A., Hell, S. W. *Nature Meth.* **2008**, 6, 539-544.

<sup>4</sup> a) Yuste, R. *Nature Meth.* **2005**, 2, 902-904. b) Lichman, J. W., Conchello, J.-A. *Nature Meth.* **2005**, 2, 910-919.

biológicos de gran complejidad, ya que estas nuevas técnicas permiten localizar espacialmente y cuantificar propiedades dinámicas, estructurales e interacciones de biomoléculas en su entorno natural (células o tejidos). Como es natural, todo esto es posible si se dispone de la molécula fluorescente apropiada y, por tanto, cualquier avance en el diseño de nuevos fluoróforos útiles para estas aplicaciones tiene un gran impacto en esta área.<sup>5</sup>

Un problema de gran interés en Biología y Biomedicina consiste en determinar los mecanismos mediante los cuales un fármaco ejerce su función terapéutica en un organismo superior. Dichos mecanismos suelen ser de notable complejidad y se extienden a través de varios niveles de organización. Así, en primer lugar, desde que se introduce el fármaco en algún fluido biológico (plasma sanguíneo, fluidos del sistema digestivo, etc.) hasta que alcanza su diana terapéutica a nivel molecular, está sujeto a una larga serie de procesos físicos y químicos que son determinantes para dicha actividad. En segundo lugar, la identificación de la diana o dianas terapéuticas y las condiciones que modulan la interacción del fármaco con estas dianas, así como el descubrimiento de interacciones secundarias no deseadas con otros componentes celulares, plantean a su vez dificultades considerables. Obviamente, el conocimiento de todos estos procesos es crucial para el diseño de fármacos más eficientes y con menores efectos secundarios; sin embargo, rara vez está disponible dicho conocimiento, debido a las limitaciones de los métodos experimentales aplicables. La utilización de los nuevos métodos basados en la emisión de fluorescencia puede facilitar de forma radical este tipo de investigación, tanto a nivel macroscópico como a nivel celular. En la práctica, la aplicación de estos métodos sólo es posible si el fármaco es, además, un buen emisor de fluorescencia, es decir, con intensidad razonable y en una zona accesible del espectro. Aunque se conocen algunos ejemplos de fármacos con fluorescencia intrínseca apropiada,<sup>6</sup> esto es una situación excepcional. En consecuencia, la aplicación de las técnicas de fluorescencia depende de la disponibilidad de análogos fluorescentes del fármaco,<sup>7</sup> es decir, de compuestos que presenten las mismas propiedades farmacológicas que la molécula original y que, además, emitan fluorescencia con cierta intensidad y en zonas adecuadas del espectro. Una posible forma de incorporar químicamente propiedades emisivas a un fármaco consiste en hacer reaccionar un compuesto fluorescente (etiqueta) convenientemente funcionalizado, con un sustituyente reactivo del fármaco, p. ej. un grupo  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$ , etc. Sin embargo, cuando el fármaco es un lípido o una molécula similar,

---

<sup>5</sup> Giepmans, B. N. G., Andams, S. R., Ellisman, M. H., Tsien, R. Y. *Science* **2006**, *312*, 217-224.

<sup>6</sup> Coley, H. M., Amos, W. B., Tewntyman, P.R., Workman, P. *Br. J. Cancer* **1993**, *67*, 1316-1323.

<sup>7</sup> McGrath, J. C., Arribas, S., Daly, C. *TiPS* **1996**, *17*, 393-399.

este camino no es posible, ya que, como se discute con detalle más adelante, el resultado de esta forma de etiquetado es una estructura molecular en la que no se conservan las propiedades anfífilas del fármaco. Esta perturbación conduce invariablemente a la pérdida de actividad biológica del producto resultante.

El objetivo general del trabajo descrito en esta Memoria es, precisamente, resolver este problema, diseñando estrategias de síntesis que permitan incorporar grupos fluorescentes a sustancias lipídicas de interés en Química Médica, preservando al máximo las propiedades químico-físicas de la estructura original. De esta forma aumentan considerablemente las probabilidades de que el producto resultante sea un verdadero análogo bioactivo de la molécula original, y por tanto, que con él se puedan utilizar las técnicas de fluorescencia hoy disponibles para el estudio de su actividad farmacológica o metabólica.

## 1.2 Objetivos concretos de este trabajo

Para llevar a cabo la incorporación de grupos fluorescentes a compuestos lipídicos con actividad bio-farmacológica se eligieron tres tipos de estructuras relacionadas químicamente: alquifosfocolinas, éter-lípidos y ácidos grasos de cadena lineal (Esquema 1.1).

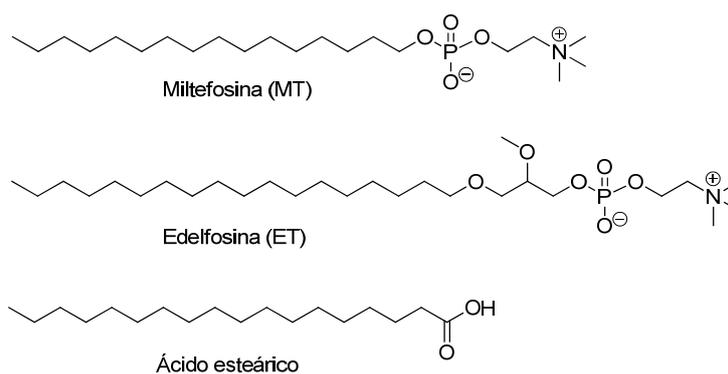


Figura 1.1. Estructuras de Miltefosina, Edelfosina y ácido esteárico

La elección de estas familias concretas de lípidos estaba condicionada por la existencia en nuestro entorno de equipos de investigadores trabajando activamente en problemas mecanísticos relacionados con su bioactividad y que, además, disponían de los métodos de fluorescencia apropiados para la explotación de los posibles compuestos fluorescentes obtenidos a lo largo de este trabajo.

La primera familia de lípidos está representada por hexadecilfosfolina (Miltefosina, Figura 1.1), un fármaco de utilización muy reciente en el tratamiento de infecciones por *Leishmania* y cuyo mecanismo de acción antiparasitaria se desconoce. El compuesto representativo de la segunda es 1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfolina (Edelfosina, Figura 1.1), que tiene la interesante propiedad de inducir la muerte programada (apoptosis) de células cancerosas de forma selectiva, sin afectar las células benignas. El tercer grupo está representado por el ácido esteárico (Figura 1.1), que interviene en varios procesos metabólicos de *Leishmania* a través de mecanismos poco conocidos. Las estructuras objetivo de los análogos fluorescentes de Miltefosina, Edelfosina y ácido esteárico se muestran en forma resumida en el Esquema 1.2. Como resultado de la explotación experimental de los primeros análogos emisivos de Miltefosina, se vio que era de gran interés mecánico disponer también de análogos no-emisivos del fármaco, con un grupo tiol en posición distal, y de análogos bifuncionales con propiedades fluorescentes y reactivas, por lo que dichas estructuras (Esquema 1.2) se incluyeron también entre los Objetivos de este trabajo. Finalmente, también se incluyeron nuevos tipos de ceramidas (Esquema 1.2) con sustituyentes fluorescentes o de otro tipo, dada su importancia en procesos metabólicos y de señalización celular.

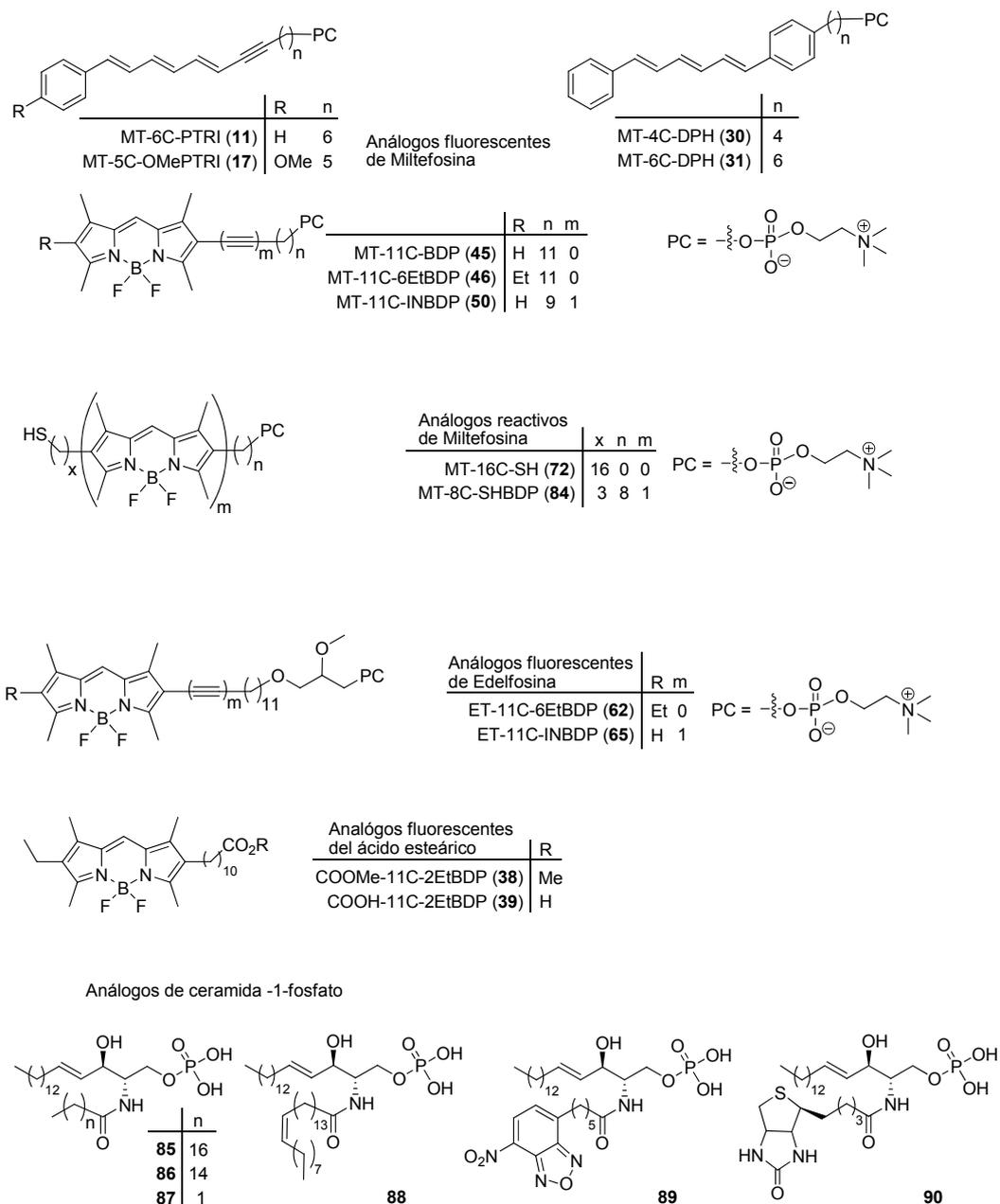


Figura 1.2 Estructuras moleculares, fluorescentes o no emisivas, que forman los objetivos concretos de este trabajo, referibles a Miltefosina, Edelfosina, ácido esteárico y ceramida-1-fosfato.

### 1.3 Organización de la Memoria

A continuación de esta Introducción figura el *Capítulo 2. Antecedentes*, en el que se discuten, en primer lugar, las ventajas y limitaciones de los métodos que se utilizan más frecuentemente para incorporar un grupo fluorescente a una molécula bioactiva. A continuación se describe la situación actual en relación con las aplicaciones clínicas de Miltefosina y el mecanismo de acción de Edelfosina. Asimismo, se discuten aquí los métodos de síntesis más importantes relacionados con la preparación de los diferentes grupos (fluorescentes o no) utilizados en este trabajo. El *Capítulo 3* describe la estructura de todos los compuestos finales obtenidos en este trabajo. El *Capítulo 4. Resultados y Discusión* explica las estrategias elegidas en este trabajo para llevar a cabo el marcado fluorescente, y describe la síntesis y la caracterización de los análogos obtenidos. Así mismo, se discuten sus propiedades emisivas y biológicas. Al *Capítulo 5. Conclusiones* le sigue el *Capítulo 6. Parte Experimental*, que recoge la totalidad de los materiales y métodos utilizados en esta Memoria. Las referencias bibliográficas y los comentarios que se citan a pie de página a lo largo de la Memoria se recogen, también, en un apartado final de *Referencias y Notas*. Para los nombres de los compuestos se ha seguido generalmente la nomenclatura I.U.P.A.C.

La síntesis y la caracterización de los compuestos que aquí se describen se ha llevado a cabo en el Departamento de Síntesis del Instituto de Química Orgánica General (CSIC, Madrid), y los estudios espectroscópicos en el Departamento de Biofísica del Instituto de Química Física Rocasolano (CSIC, Madrid). Los ensayos de la actividad antiparasitaria de los análogos fluorescentes, del análogo reactivo y del bifuncional de Miltefosina se realizaron en los laboratorios del Dr. L. Rivas, en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid). Los ensayos de actividad antitumoral de los análogos de Edelfosina y los ejemplos de su utilización a nivel celular se han realizado en el laboratorio del Dr. F. Mollinedo en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca).

**Glosario de abreviaturas:** (orden alfabético)

- ALP:** alquilisofosfolípido  
**BSA:** *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida  
**c:** cuartete (RMN)  
**C1P:** ceramida-1-fosfato  
**CAN:** nitrato cérico amónico (*ceric ammonium nitrate*)  
**CCP:** clorocromato de piridinio.  
**COPA:** Conjugated OctadecaPentaenoic Acids  
**COSY:** *Correlated Spectroscopy*  
**c-PnA:** ácido *cis*-parinárico  
**<sup>13</sup>C-RMN:** resonancia magnética nuclear de carbono 13  
**DCC:** dicitlohexilcarbodiimida  
**dd:** doble doblete  
**DDQ:** 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona  
**DEA:** *N,N*-dietilamina  
**DIBAL-H:** diisobutilalano (hidruro de diisobutilaluminio)  
**DIPEA:** diisopropiletilamina  
**DMAP:** dimetilaminopiridina  
**DMPC:** 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina  
**DMPU:** 1,3-dimetilhexahidro-2-pirimidona.  
**DMSO:** dimetilsulfóxido.  
**DPH:** grupo difenilhexatrieno  
**dt:** doble triplete  
**ED<sub>50</sub>:** dosis efectiva al 50%. Concentración de análogo que produce una inhibición del 50 % en el crecimiento del parásito (4 h)  
**ESI:** ionización por electroespray (*electrospray ionization*)  
**FMOC:** fluorenilmetiloxicarbonil  
**Hanks:** disolución salina (136.8 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 4.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.1 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH = 7.2).  
**HMBC:** *Heteronuclear Multiple-Bond Connectivities*  
**HMPA:** hexametilfosforamida  
**HOMO:** orbital ocupado de mayor energía  
**HPLC:** cromatografía de líquidos de alta eficacia (*high performance liquid chromatography*)  
**<sup>1</sup>H-RMN:** resonancia magnética nuclear de protón

**HR-MS:** espectrometría de masas de alta resolución  
**HSQC:** *Heteronuclear Single Quantum Correlation*  
**HWE:** Horner-Wadsworth-Emmons  
**Hz:** hercios  
**IE:** técnica de impacto electrónico  
**IR:** infrarrojo  
**J:** constante de acoplamiento  
**KAPA:** amiduro potásico de 1,3-diaminopropano  
**LD<sub>50</sub>:** dosis letal al 50%. Concentración de análogo que produce una inhibición del 50 % en el crecimiento del parásito (48 h/72 h).  
**LUMO:** orbital molecular vacío de menor energía  
**LUV:** liposomas o vesículas grandes unilamelares (*Large Unilamellar Vesicles*)  
**M:** molaridad  
**m:** multiplete (RMN)  
**m/z:** relación masa carga  
**MHz:** megahercios  
**MW:** radiación microondas  
**NBA:** alcohol nitrobenílico  
**NBD:** 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol  
**NCS:** *N*-clorosuccinimida  
**NOE:** efecto nuclear Overhauser  
**pf:** punto de fusión  
**PC:** grupo fosfatidilcolina  
**PEG:** polietilenglicol  
**ppm:** partes por millón  
**PTE:** grupo feniltetraeno  
***p*-TosOH:** ácido *p*-toluensulfónico  
**PTRI:** grupo feniltrienino  
**q:** quintuplete  
**R<sub>f</sub>:** factor de retención (TLC)  
**s:** singlete (RMN)  
**S.-H.:** Sonogashira-Hagihara  
**S1P:** esfingosina-1-fosfato  
**SDS:** dodecilsulfato de sodio  
**SPHKs:** esfingosina kinasas  
**t:** triplete (RMN)

**t.a.:** temperatura ambiente

**TBAF:** fluoruro de tetrabutilamonio

**TBDMSCl:** cloruro de *tert*-butildimetilsililo

**TFP:** tris(2-furil)fosfina

**THF:** tetrahidrofurano

**TLC:** cromatografía en capa fina (*thin layer chromatography*)

**TMS:** tetrametilsilano

***t*-PnA:** ácido *trans*-parinámico

**u. a.:** unidades arbitrarias

**UV-Vis:** ultravioleta-visible

**$\epsilon$ :** coeficiente de absorción molar

**$\delta$ :** desplazamiento químico de las señales en RMN, en ppm

**$\lambda$ :** longitud de onda

**$\nu$ :** número de onda

**$\Phi_F$ :** rendimiento cuántico de fluorescencia



## 2. Antecedentes



## 2 Antecedentes

### 2.1 Análogos fluorescentes de moléculas bioactivas

La utilización de análogos y derivados fluorescentes de sustancias bioactivas facilita considerablemente el estudio de sistemas y procesos biológicos complejos. Gracias al reciente desarrollo de las técnicas analíticas y de los métodos espectroscópicos basados en la fluorescencia, es posible detectar un pequeño número de moléculas sin apenas alterar el medio biológico de observación.<sup>1,2</sup> Mediante el uso de análogos emisivos se pueden obtener parámetros termodinámicos y cinéticos de las interacciones ligando-receptor, incluso al nivel de una única molécula. Además, si se consigue aislar el receptor, la aplicación de los métodos espectroscópicos en disolución puede proporcionar información estructural con resolución de sub-nm.<sup>3,4</sup>

El uso de ligandos fluorescentes en la investigación de los mecanismos de acción biológica se fundamenta en un conjunto de características específicas del método, entre las que destacan:

- Elevada sensibilidad y selectividad.
- Compatibilidad con los sistemas biológicos y las condiciones fisiológicas, en términos de disoluciones acuosas, presencia de sales, temperatura, concentración, etc.
- Posibilidad de obtener imágenes con una considerable resolución espacial.
- Resolución temporal desde los picosegundos hasta las fracciones de segundo.
- Posibilidad de detectar propiedades del entorno molecular mediante cambios en parámetros espectroscópicos.
- Posibilidad de determinar la concentración de ligando en el interior celular o en orgánulos específicos, utilizando su coeficiente de absorción.

Además, los ligandos fluorescentes permiten obtener información del complejo ligando (fluorescente)-receptor en el equilibrio. Esto se debe a la gran sensibilidad del método experimental, que permite cuantificar las diferentes especies que intervienen en

---

<sup>1</sup> McGrath, J. C., Arribas, S., Daly, C. J. *TiPS*. **1996**, *17*, 393-399.

<sup>2</sup> McGrath, J. C., Daly, C. J. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *139*, 187-189.

<sup>3</sup> Abal, M., Souto, A. A., Amat-Guerri, F., Acuña, A. U., Andreu, J. M., Barasoain, I. *Cell Motil. Cytoskel.* **2001**, *49*, 1-5.

<sup>4</sup> Lillo, M. P., Cañadas, O., Dale, R. E., Acuña, A. U. *Biochemistry* **2002**, *41*, 12436-12449.

dicho equilibrio. De este modo es posible medir la afinidad de los receptores por el ligando fluorescente y, además, calcular la afinidad de otros ligandos mediante experimentos de competición.

La aplicación de estos compuestos fluorescentes requiere necesariamente el correspondiente desarrollo de la metodología de síntesis orgánica y de las técnicas e instrumentación basadas en la emisión de fluorescencia.<sup>2,5</sup> Entre estas técnicas destacan actualmente los microscopios confocales láser, capaces de visualizar y cuantificar, con resolución espacial y temporal, los procesos físicos y químicos asociados a los diferentes procesos celulares, o el uso de los métodos bioanalíticos basados en la emisión de fluorescencia, como el inmunoanálisis, los lectores de placas, las citometrías de flujo, las técnicas de cribado de alto rendimiento (HTS, *High Throughput Screening*), electroforesis, técnicas de secuenciación del ADN, etc.<sup>6,7,8</sup>

Si se compara el uso de marcadores fluorescentes con el empleo de radioisótopos, técnica que hasta muy recientemente se consideraba como la más sensible, la espectroscopía de emisión presenta varias ventajas adicionales, tales como:

- Es más simple, segura y barata.
- Permite una gran resolución espacial.
- Los experimentos se pueden llevar a cabo más fácilmente en condiciones de equilibrio.
- Los ligandos fluorescentes permiten visualizar en tiempo real cómo son desplazados de sus sitios de unión por ligandos no fluorescentes, lo cual ayuda a identificar los lugares de unión de éstos últimos.
- La señal obtenida es generalmente estable con el tiempo.
- Los ligandos fluorescentes pueden utilizarse para el estudio de procesos en disolución, en orgánulos celulares, en células y en tejidos sin grandes dificultades.
- Los resultados son inmediatos.

---

<sup>5</sup> Coley, H. M., Amos, W. B., Twentyman, P. R., Workman, P. *Br. J. Cancer* **1993**, 1316-1323.

<sup>6</sup> Lakowicz, J. R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Biochemical Applications*, Plenum Press, Nueva York, **1991**. Vol. 3.

<sup>7</sup> Dewey, T. J. *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, Nueva York, **1991**.

<sup>8</sup> Valeur, B., Brochon, J.-C. *New Trends in Fluorescence Spectroscopy. Applications to Chemical and Life Sciences*, Springer, Berlin, **2001**.

A pesar de todas estas ventajas, aún no se observa un uso generalizado de fármacos funcionalizados con etiquetas fluorescentes. Frecuentemente, estos análogos y derivados se utilizan como simples marcadores, sin explotar sus características como agonistas o antagonistas. Esto se debe a la concurrencia de varios factores, de los que cabe destacar: 1) la dificultad para sintetizar un análogo fluorescente en el que la selectividad y afinidad por la diana terapéutica, así como sus propiedades farmacocinéticas, sean paralelas a las del compuesto original; 2) la complejidad de algunas técnicas instrumentales, como la microscopía bifotónica; y 3) la interferencia originada por la unión inespecífica del ligando fluorescente, que obliga a la realización de estudios comparativos detallados con el compuesto original.

Una de las aplicaciones más útiles de los derivados y análogos fluorescentes de fármacos consiste en su uso como herramientas de diagnóstico y detección de patologías. Por ejemplo, la tripanosomiasis africana es una enfermedad que afecta a más de 300000 personas cada año. En los últimos años se ha detectado un aumento en su prevalencia debido, entre otras razones, a la aparición de resistencias a los principales fármacos utilizados en su tratamiento. A fin de diagnosticar, de forma rápida y sencilla, los organismos resistentes a su tratamiento con fármacos arsenicales, se ha utilizado un análogo fluorescente de pentamidina, DB-99.<sup>9</sup> La entrada de pentamidina y de DB-99 en el interior del parásito se realiza a través del mismo transportador de fármacos arsenicales. En consecuencia, la ausencia o disfunción de dicho transportador supone la inhibición de la internalización de pentamidina y de DB-99 y, por tanto, la inhibición del marcado fluorescente del mismo, así como la aparición de un fenotipo de resistencia a fármacos arsenicales.

Algunos fármacos contienen cromóforos que dan lugar a la emisión de fluorescencia (intrínseca), como es el caso de los antitumorales topotecan<sup>10</sup> y camptotecina,<sup>11</sup> y esta propiedad se ha aprovechado para el estudio de sus propiedades biológicas. Cuando el fármaco no es fluorescente, que es la situación más habitual, la obtención de análogos emisivos puede llevarse a cabo a través de, al menos, dos métodos, que se comentan a continuación.

---

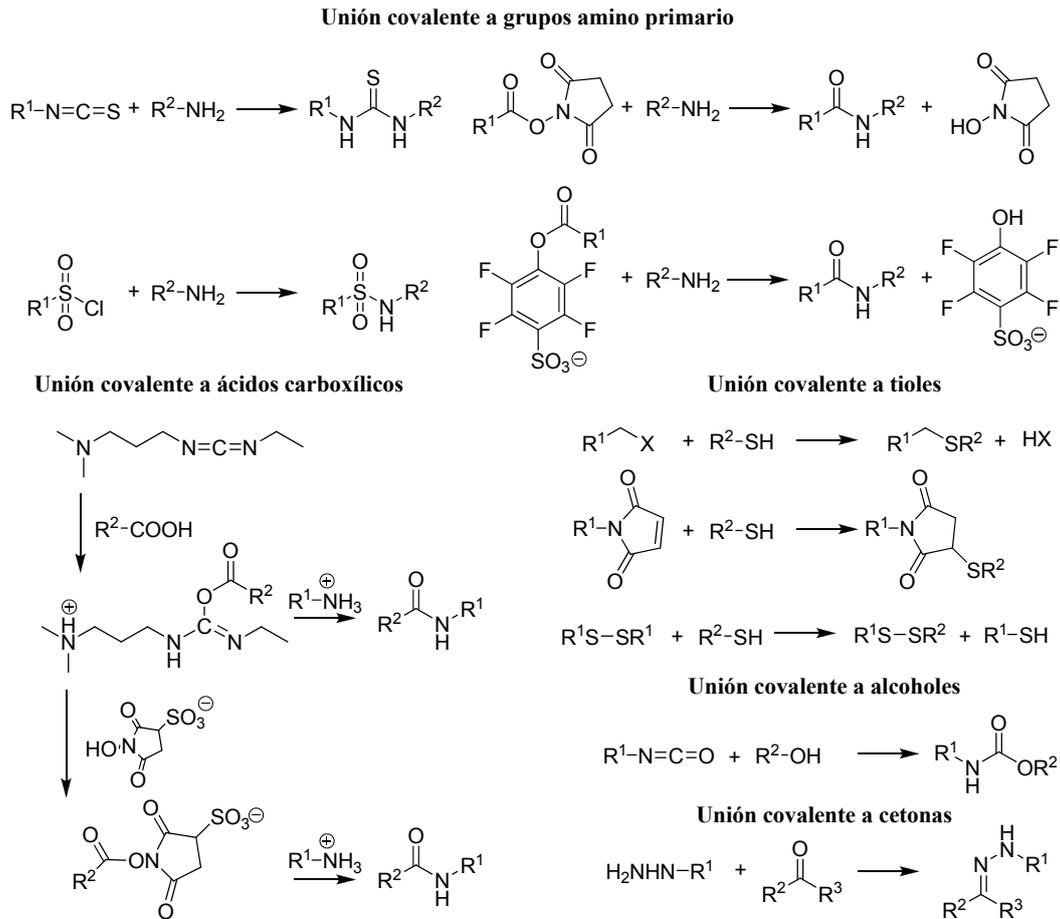
<sup>9</sup> Stewart, M. L., Krishna, S., Burchmore, R. J., Brun, R., de Koning, H. P., Boykin, D. W., Tidwell, R. R., Hall, J. E., Barrett, M. P. *Lancet* **2005**, *366*, 486-487.

<sup>10</sup> Kruszewski, S., Burke, T. G. *SPIE-Proc. Internat. Soc. Opt. Eng.* **2003**, *5064*, 75-83.

<sup>11</sup> Gryczynski, I., Gryczynski, Z., Lakowicz, J. R., Yang, D., Burke, T. G. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *69*, 421-428.

### 2.1.1 Unión covalente de etiquetas fluorescentes

Un fármaco puede hacerse fluorescente mediante la unión covalente de compuestos fluorescentes funcionalizados (etiquetas), utilizando reacciones conocidas y bien experimentadas, que transcurran en condiciones poco agresivas y con muy buenos rendimientos. En este caso, el anclaje de las etiquetas fluorescentes se lleva a cabo a través de grupos funcionales ya presentes en el fármaco (p. ej. amino primario, tiol, alcohol, cetona, carboxilo) o que se introducen en su estructura previamente. En el Esquema 2.1 se muestran las reacciones más comunes para este tipo de etiquetado.



Esquema 2.1. Reacciones de los grupos funcionales amino, ácido carboxílico, tiol, alcohol, y cetona utilizadas para la introducción de grupos fluorescentes. R<sup>1</sup>: grupo fluoróforo; R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>: resto del compuesto bioactivo.

Actualmente se dispone comercialmente de etiquetas fluorescentes específicas<sup>12</sup> para una gran diversidad de grupos funcionales, aunque obviamente la eficiencia de la reacción de etiquetado fluorescente no garantiza el mantenimiento de la bioactividad del compuesto original, que depende de factores químicos y físicos muchas veces poco, o nada, conocidos. En realidad, frecuentemente se encuentra que el etiquetado fluorescente da lugar a un derivado sin la bioactividad del fármaco original, sobre todo si éste es de reducidas dimensiones, lo que impide su utilización posterior. Entre las etiquetas fluorescentes más utilizadas se encuentran los que poseen el núcleo de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno (colorantes dipirrometeno.BF<sub>2</sub>, de nombre genérico BODIPYs), fluoresceínas, rodaminas, cumarinas, dansilo (5-*N,N*-dimetilamino-1-naftalensulfonilo), cianinas, NBD (7-nitrobenzo-[2,3-*d*]-2-oxa-1,3-diazol), etc.

Uno de los primeros ejemplos de esta estrategia es la obtención de un derivado fluorescente del antibiótico polimixina (Figura 2.1).<sup>13</sup> Este compuesto (DANSP), se obtuvo por reacción entre cloruro de dansilo (cloruro de 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfonilo) y el grupo amino en  $\gamma$  del resto de ácido  $\alpha,\gamma$ -diaminobutírico (DAB) del fármaco original; se observó que mantiene una actividad antibiótica similar a polimixina en organismos sensibles, como *Pseudomona aeruginosa*. Además, mediante técnicas de fraccionamiento celular y lisis enzimática se comprobó que DANSP se asocia a la pared celular y a una membrana bajo la misma.



Figura 2.1. Derivado fluorescente del antibiótico polimixina con grupo dansilo

En forma similar, se han descrito varios ejemplos de la conversión de compuestos de interés terapéutico o bioquímico, no fluorescentes, en derivados emisivos usando esta estrategia: neuropéptidos,<sup>14,15,16</sup> angiotensinas,<sup>17</sup> vasopresinas,<sup>18</sup> ligandos

<sup>12</sup> Haugland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes Inc., Oregon, **2002**.

<sup>13</sup> Newton, B. A. *J. Gen. Microbiol.* **1955**, *12*, 226-236.

<sup>14</sup> Buku, A., Price, J. A., Mendlowitz, M., Masur, S. *Peptides* **2001**, *22*, 1993-1998.

<sup>15</sup> Jenkinson, K. M., Morgan, J. M., Furness, J. B., Southwell, B. R. *Histochem. Cell Biol.* **1999**, *112*, 233-246.

<sup>16</sup> Fabry, M., Cabrele, C., Hocker, H., Beck-Sickinger, A. G. *Peptides* **2000**, *21*, 1885-1893.

para  $\alpha$ -adrenoreceptores,<sup>19,20</sup> etc. También se han obtenido derivados fluorescentes similares de algunos compuestos con actividad antitumoral, como cisplatino<sup>21</sup> y metotrexato (Figura 2.2).<sup>22</sup> En ambos casos se utilizaron derivados de dansilo como etiquetas fluorescentes y, en el caso de metotrexato, se encontró una importante reducción de la actividad antitumoral en el análogo fluorescente.

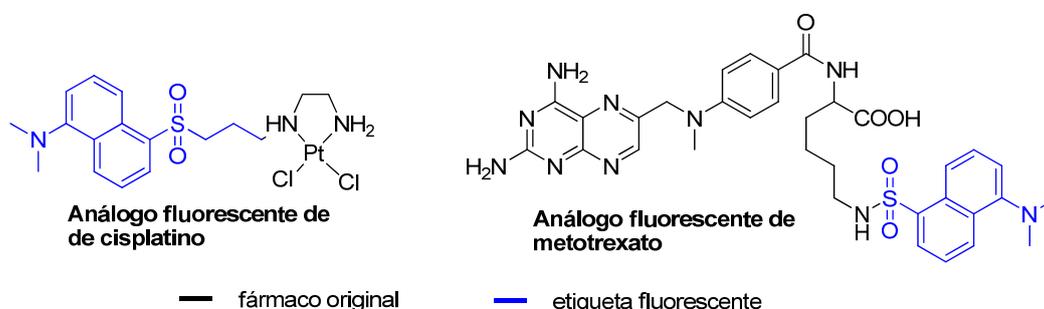


Figura 2.2. Derivados fluorescentes de cisplatino y metotrexato

Otro ejemplo es la obtención de un derivado fluorescente del fármaco antineoplásico estramustina (EM, estradiol-3-bis(2-cloroetil)carbamato), utilizado para el tratamiento del cáncer de próstata. Para dar luz sobre el mecanismo de acción, Stearns y col.<sup>23</sup> etiquetaron estramustina con el grupo fluorescente dansilo (Esquema 2.2) y estudiaron su incorporación celular. Se comprobó que el derivado fluorescente (DnsEM) presenta una actividad citotóxica similar a la de EM sobre células humanas cancerosas DU145. Los estudios de microscopía de fluorescencia mostraron que este derivado se localiza en pequeñas vesículas en el citoplasma celular y alrededor del núcleo.

<sup>17</sup> Von Bohlen, Halbach, O., Albrecht, H. D. *Neuroendocrinology* **2000**, *72*, 218-223.

<sup>18</sup> Tran, D., Durroux, T., Stelly, N., Seyer, R., Tordjmann, T., Combettes, L., Claret, M. J. *Histochem. Cytochem.* **1999**, *47*, 401-410.

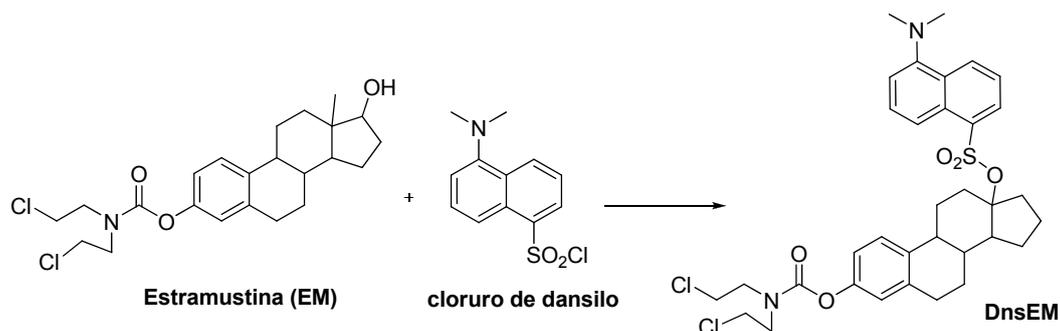
<sup>19</sup> McGrath, J. C., Mackenzie, J. F., Daly, C. J. *J. Auton. Pharmacol.* **1999**, *19*, 303-310.

<sup>20</sup> Mackenzie, J. F., Daly, C. J., Pediani, J. D., McGrath, J. C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *294*, 434-443.

<sup>21</sup> Hartwig, J. F., Pil, P. M., Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8292-8293.

<sup>22</sup> Susten, S. S., Kempton, R. J., Black, A. M., Freisheim, J. H. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 1957-1962.

<sup>23</sup> Stearns, M. E., Jenkins, D. P., Tew, K. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1985**, *82*, 8483-8487.



Esquema 2.2. Síntesis de DnsEM

Uno de los pocos ejemplos de la utilización de derivados fluorescentes obtenidos por esta vía en los que fue posible llevar la investigación hasta el nivel molecular es el del compuesto antitumoral taxol. Paclitaxel (taxol), un diterpenoide natural que se extrajo inicialmente de la corteza del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*) es, con su análogo semi-sintético taxotere (Figura 2.3), uno de los fármacos más utilizados actualmente para el tratamiento de una amplia gama de tumores.<sup>24,25</sup> Una parte importante de la actividad antitumoral de taxol se atribuye a la estabilización del sistema de microtúbulos de la célula, evitando así su proliferación.<sup>26,27</sup>

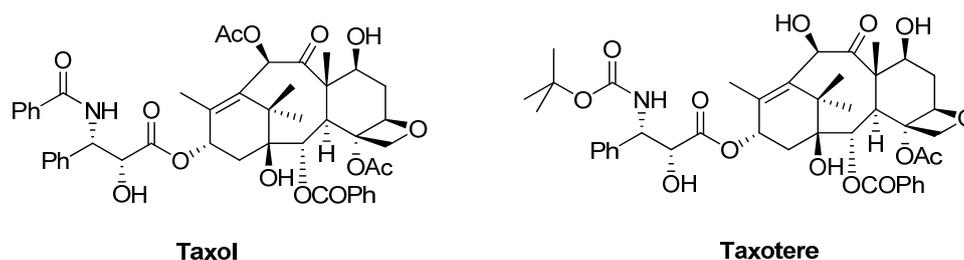


Figura 2.3. Taxol (paclitaxel) y taxotere (docetaxel).

En los laboratorios en los que se ha desarrollado el presente trabajo se obtuvieron<sup>28</sup> los primeros derivados fluorescentes y *bioactivos* de taxol conteniendo

<sup>24</sup> Suffness, M. *Taxol, Science and Applications*, CRC Press, Boca Raton, Florida, **1995**.

<sup>25</sup> Geog, G. I., Chen, T. T., Ojima, I., Vyas, D. M. *Taxane Anticancer Agents*, ACS Symposium Series, San Diego, California, **1994**.

<sup>26</sup> Manfredi, J. J., Horwitz, S. B. *Pharmacol. Ther.* **1984**, *25*, 83-125.

<sup>27</sup> Diaz, F., Andreu, J. M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2747-2755.

<sup>28</sup> Souto, A. A., Acuña, A. U., Andreu, J. M., Barasoain, I., Abal, M., Amat-Guerri, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 2710-2712.

como grupo emisor fluoresceína o difluorofluoresceína. En estos compuestos (Figura 2.4) se consiguió mantener la potente actividad antitumoral del fármaco original,<sup>3</sup> gracias a la introducción de un grupo que actúa también como cadena espaciadora biocompatible (L-alanina) y a la selección de grupos fluoróforos cuyas propiedades químico-físicas permiten el transporte difusivo a través de la membrana celular. Para la síntesis de estos compuestos se introdujo en la molécula original un grupo amino primario incorporando un resto de L-alanina al grupo OH en la posición 7. El nuevo taxoide con grupo amino se hizo reaccionar con succinimidil ésteres conteniendo los cromóforos fluorescentes citados y con otros con diferentes propiedades espectroscópicas.

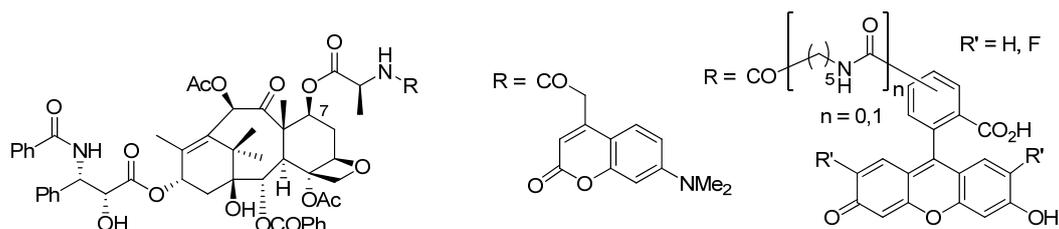


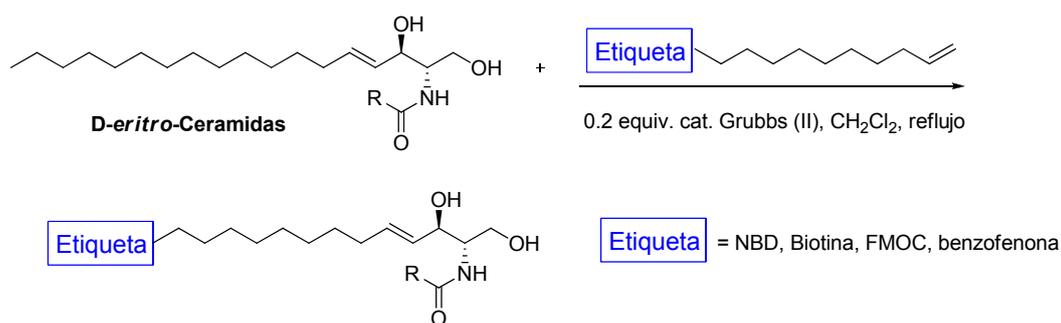
Figura 2.4. Taxoides fluorescentes obtenidos por derivatización de taxol a través de un grupo L-alanina en posición 7.

La aplicación de estos derivados ha permitido conocer numerosos detalles del mecanismo de acción del fármaco original, tanto a nivel macroscópico como molecular,<sup>29,4</sup> ya que se pudo identificar y aislar de la célula una de las dianas primarias (el sistema de microtúbulos).

Recientemente se ha descrito una metodología general, basada en la metátesis cruzada de olefinas, que permite introducir de manera eficiente y en una sola etapa diferentes etiquetas en la estructura original de compuestos bioactivos de naturaleza lipídica.<sup>30</sup> En concreto, se sintetizó una serie de ceramidas fluorescentes por reacción con olefinas terminales que contienen un grupo fluoróforo en su estructura (Esquema 2.3).

<sup>29</sup> Lillo, M. P., Canadas, O., Dale, R. E., Acuña, A. U. *Biochemistry* **2002**, *41*, 12436-12449.

<sup>30</sup> Nussbaumer, P., Ettmayer, P., Peters, C., Rosenbeiger, D., Hogenauer, K. *Chem. Commun.* **2005**, 5086-5087.

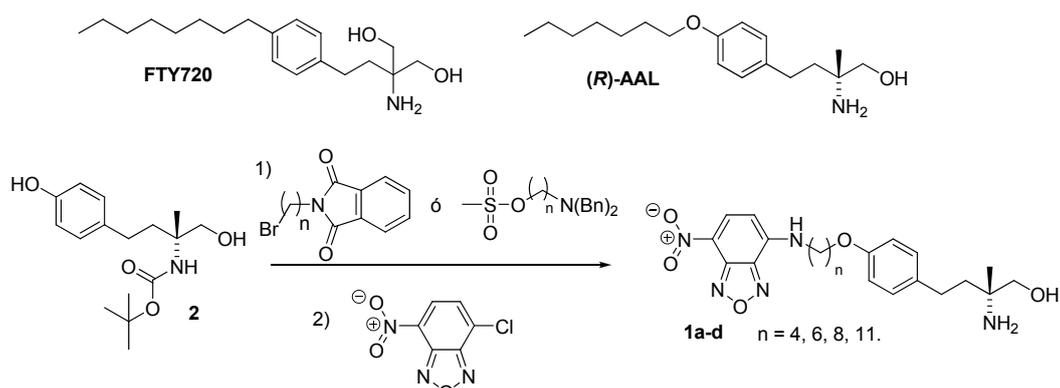


Esquema 2.3. Síntesis de esfingolípidos por metátesis cruzada.

### 2.1.2 Construcción del fluoróforo sobre la estructura original

Otra vía de obtención de análogos fluorescentes bioactivos consiste en construir el grupo fluoróforo como parte de la estructura del fármaco original, estrategia utilizada en el presente trabajo. Ejemplos de este tipo de estrategia son la obtención de análogos fluorescentes del fármaco FTY720. Este compuesto es un inmunomodulador con posibles aplicaciones en el control del rechazo de trasplantes y en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, como la diabetes y la esclerosis múltiple. Etmayer y col.<sup>31</sup> sintetizaron y caracterizaron una serie de análogos fluorescentes con grupo nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD), con diferentes longitudes de la cadena espaciadora entre el fluoróforo y el anillo aromático, basados en el análogo funcional (*R*)-AAL. La síntesis de los análogos se llevó a cabo por alquilación del compuesto **2** con  $\omega$ -bromoalquilftalimidas o dibencilaminoalquilmesilatos de diferentes longitudes de cadena. El fluoróforo se introdujo por reacción con NBD-Cl, tras liberar el grupo amino (Esquema 2.4).

<sup>31</sup> Etmayer, P., Baumruker, T., Guerini, D., Mechtcheriakova, D., Nussbaumer, P., Streiff, M. B., Billich, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 84-87.



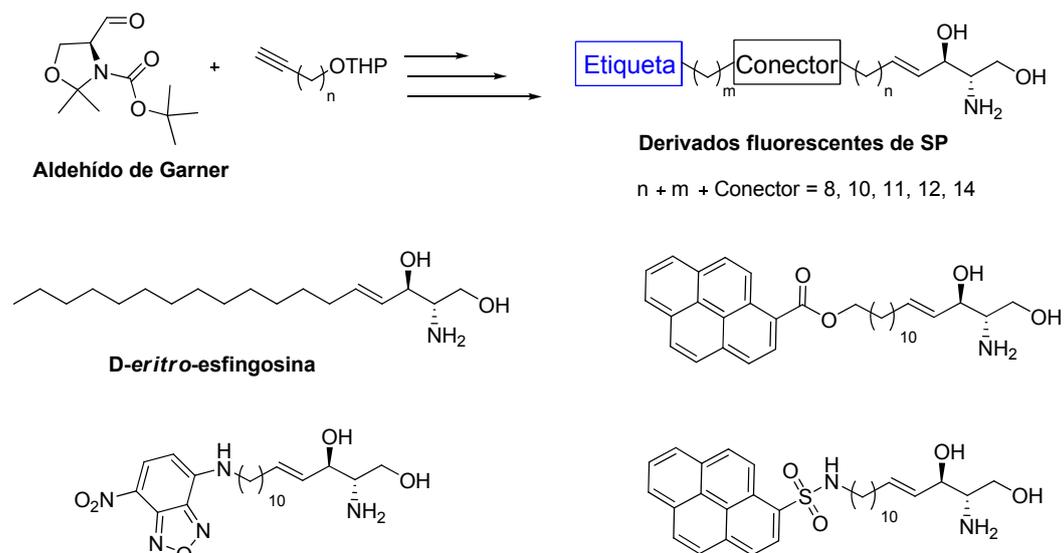
Esquema 2.4. FTY720, (R)-AAL y obtención de sus análogos fluorescentes **1a-d**

Tras el estudio biológico, se comprobó que **1d** se asimila rápidamente por células endotélicas humanas, con acumulación privilegiada en el retículo endoplasmático.

Los análogos fluorescentes también se utilizan ampliamente en estudios de transporte, difusión pasiva y activa, o detección y localización de moléculas bioactivas. Por ejemplo, el descubrimiento de que la función biológica de los esfingolípidos no es meramente estructural, sino que además presentan una gran variedad de funciones a nivel intra y extracelular, ha generado un gran interés en este área durante los últimos años.<sup>32</sup> Esfingosina-1-fosfato (S1P), generada a partir de esfingosina (SP) por las enzimas SPHKs, es una de las piezas claves de este metabolismo. Por tanto, es de gran interés la obtención de análogos fluorescentes de este compuesto para el estudio e identificación de sus rutas metabólicas. En este sentido, se ha descrito la obtención de una serie de análogos fluorescentes de SP etiquetados con pireno ó NBD, con diferentes longitudes de cadena. La síntesis se llevó a cabo en 9 ó 12 pasos a partir del aldehído de Garner (Esquema 2.5).<sup>33</sup>

<sup>32</sup> Morales, A., Fernandez-Checa. J. C. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, 7, 371-382.

<sup>33</sup> Etmayer, P., Billich, A., Baumruker, T., Mechtcheriakova, D., Schmid, H., Nussbaumer, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 1555-1558.



Esquema 2.5. Síntesis de tres derivados fluorescentes de esfingosina.

Los dos métodos generales de etiquetado de biomoléculas con grupos fluorescentes presentados más arriba (introducción de etiquetas a través de grupos funcionales presentes o añadidos y construcción del análogo) no son totalmente equivalentes. En consecuencia, la utilización de una u otra estrategia depende del tipo de estructura molecular que se quiere marcar y del objetivo de la investigación, como se discute más adelante.

## 2.2 Fosfolípidos

Los lípidos más abundantes de las membranas celulares se pueden ordenar en tres grandes grupos: glicerolípidos, fosfolípidos y glicolípidos, los dos últimos con grupos polares terminales fosfato o azúcar, respectivamente (Figura 2.5). Los glicerofosfolípidos son fosfolípidos que contienen el esqueleto de glicerina en su estructura, mientras que los esfingofosfolípidos contienen un esfingoide, siendo el más común esfingosina ((2*S*,3*R*,4*E*)-2-amino-4-octadecen-1,3-diol). Casi todos los glicerofosfolípidos naturales adoptan la configuración (*R*) en el carbono central del resto de glicerina, aunque existen glicerofosfolípidos naturales de configuración (*S*) en algunos organismos, como las arqueobacterias. Para nombrarlos se usa en general el llamado “número estereoespecífico” (*stereospecific number, sn*).<sup>34</sup>

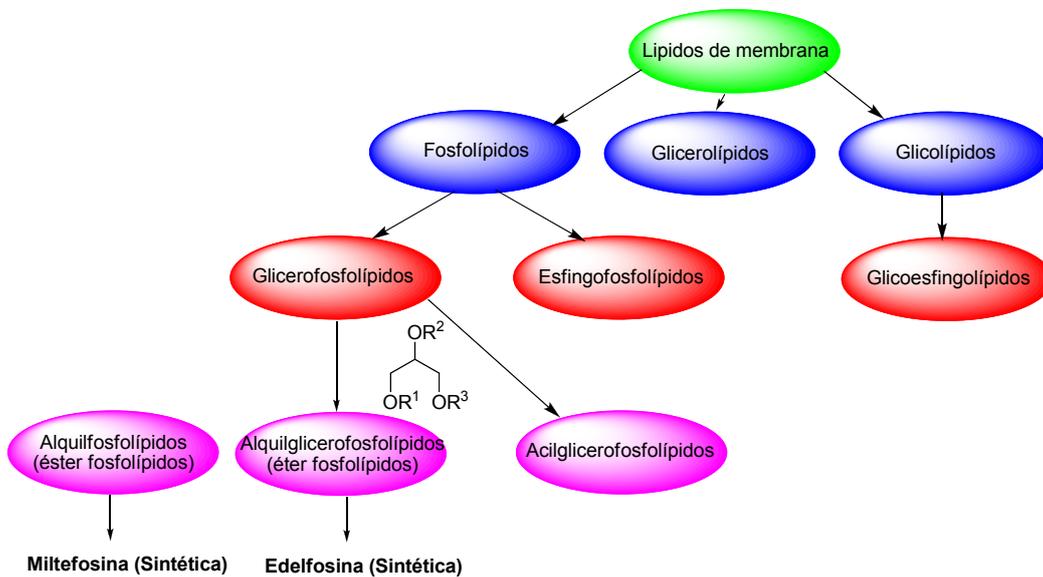


Figura 2.5. Clasificación general de los lípidos de membrana más abundantes

En los glicerofosfolípidos el esqueleto de glicerina puede estar sustituido en los grupos OH en posiciones *sn*-1 y *sn*-2 (para isómeros de configuración (*R*)) o en los grupos OH en posiciones *sn*-2 y *sn*-3 (para isómeros de configuración (*S*)), por restos de ácidos grasos (R-CO-, acilglicerofosfolípidos) o restos alquilo (R-,

<sup>34</sup> Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lehninger, Principles of Biochemistry*, Worth Publisher, New York, 2000.

alquilglicerofosfolípidos). El grupo OH en posición *sn*-3 (isómero (*R*)) o en posición *sn*-1 (isómero (*S*)) está esterificado por un grupo de fosfato de un aminoalcohol (colina, etanolamina), inositol, etc.

Los éter fosfolípidos se caracterizan por tener uno o dos restos alquilo unidos mediante enlace éter a los grupos OH en posiciones *sn*-1 y *sn*-2 (con configuración (*R*) en el carbono central), o *sn*-2 y *sn*-3 (configuración (*S*)) del esqueleto de glicerina, y un grupo fosfato en la otra posición, que también puede estar esterificado por un aminoalcohol (colina, etanolamina) u otro grupo similar. Uno de los dos grupos OH puede estar libre o sustituido. Por su alta estabilidad química, debida al enlace éter, este tipo de lípidos se encuentra en alta proporción en las membranas de las arqueobacterias extremófilas<sup>35</sup> (generalmente con configuración absoluta (*S*)). A este grupo de lípidos pertenece también Edelfosina, con grupos alquil éter en posiciones *sn*-1 y *sn*-2 de la glicerina y fosfato de colina en *sn*-3.

Un grupo de lípidos sintéticos son los alquilfosfolípidos, que proceden de la formación de un enlace éster entre un fosfato de etanolamina, *N*-sustituida o no, y un resto alquilo. Estos compuestos son objeto de gran interés debido a que varios análogos y derivados muestran actividad antitumoral y/o antiparasitaria. A este grupo pertenece la molécula de Miltefosina, de cuyos análogos fluorescentes trata esta Memoria.

### 2.3 Miltefosina y leishmaniasis

Miltefosina (hexadecilfosfocolina, MT) es una alquilfosfocolina sintética desarrollada a finales de los años 70 por sus propiedades antitumorales.<sup>36</sup> La primera síntesis de Miltefosina, descrita en el año 1958, se llevó a cabo en dos pasos: el tratamiento de hexadecanol con diclorofosfito de 2-bromoetilo dio lugar a un bromoetilfosfato que se hizo reaccionar con trimetilamina en presencia de sales de plata (Esquema 2.6).<sup>37</sup> Su estructura sencilla sirvió de base para la síntesis de numerosos alquil-lisofosfolípidos (ALP), dotados con las mismas propiedades,<sup>38,39</sup> aunque sólo cuatro de ellos, hexadecilfosfocolina (Miltefosina), 1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina (Edelfosina, ET-18-OCH<sub>3</sub>), 1-hexadeciltio-2-metoximetil-*rac*-glicerofosfocolina (ilmofosina, BM 41.440) y SRI 62-834 llegaron a fases clínicas de

---

<sup>35</sup> Gulik, A., Luzzati, V., De Rosa, M., Gambacorta, A. *J. Mol. Biol.* **1985**, 182, 131-149.

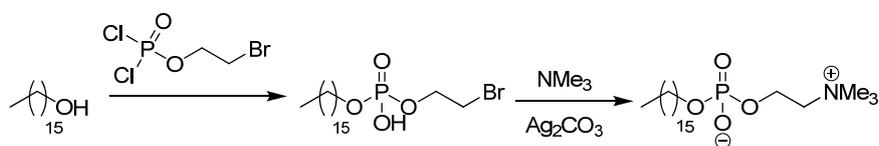
<sup>36</sup> Runge, M. H., Andreesen, R., Pfleiderer, A., Munder, P. G. *J. Natl. Cancer Inst.* **1980**, 64, 1301-1306.

<sup>37</sup> Hirt, R., Berchtold, R. *Pharmac. Acta Helv.* **1958**, 33, 349-354.

<sup>38</sup> Berdel, W. E. *Br. J. Cancer* **1991**, 64, 208-211.

<sup>39</sup> Brachwitz, H., Vollgraf, C. *Pharm & Therapeut.* **1995**, 66, 39-82.

estudio (Figura 2.6).<sup>40</sup> De todos ellos, actualmente sólo una formulación tópica de Miltefosina al 6% (Miltex®) ha sido aprobada para uso clínico.<sup>41</sup>



Esquema 2.6. Primera síntesis de Miltefosina

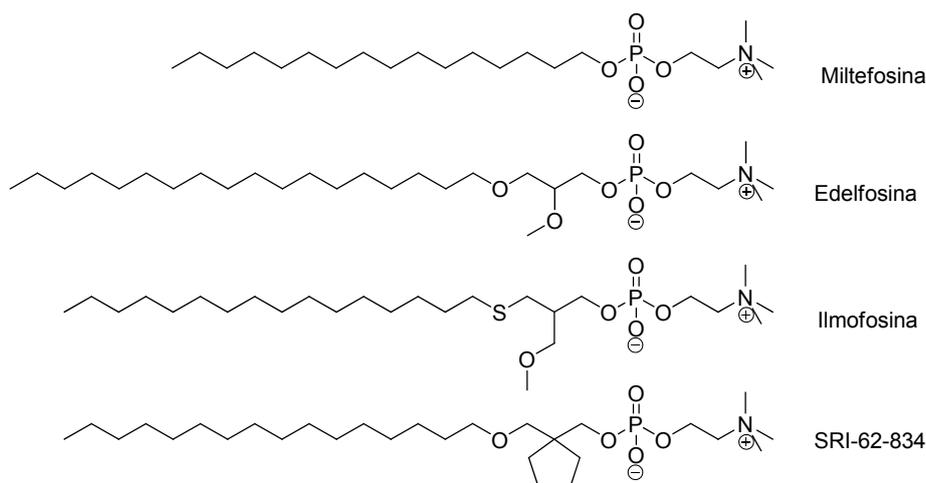


Figura 2.6. Estructura química de hexadecilfosfocolina (Milttefosina) y los alquil-lisofosfolípidos en fase de estudio clínico.

Sin embargo, la molécula de Miltefosina interesa especialmente por su actividad antiparasitaria, constituyendo actualmente el primer y único fármaco eficaz en uso de administración oral frente a la leishmaniasis humana. Se incluye, a continuación, una breve descripción de esta enfermedad.

<sup>40</sup> Vink, S. R., van Blitterswijk, W. J., Schellens, J. H., Verheij, M. *Cancer Treat. Rev.* **2007**, *33*, 191-202.

<sup>41</sup> Clive, S., Gardiner, J., Leonard, R. C. *Cancer Chem. Pharm.* **1999**, *44 Suppl.* S29-S30.

## 2.3.1 Leishmaniasis

### 2.3.1.1 Introducción

El término leishmaniasis define genéricamente a un conjunto de patologías causadas por la infección con diferentes especies del protozoo *Leishmania* (Figura. 2.7). Sus manifestaciones clínicas dependen tanto de la especie infectante como del estado inmunológico del hospedador. La enfermedad es endémica en regiones tropicales, subtropicales y templadas de América Central y del Sur, Próximo y Medio Oriente, cuenca mediterránea, Sudán, Kenia, India, Bangladesh y China, abarcando un total de 88 países. La O.M.S. estima una prevalencia global de la enfermedad que oscila entre 12 y 14 millones de personas, con una incidencia anual cercana a los 2 millones y una población en riesgo de aproximadamente 350 millones (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>).<sup>42,43</sup>

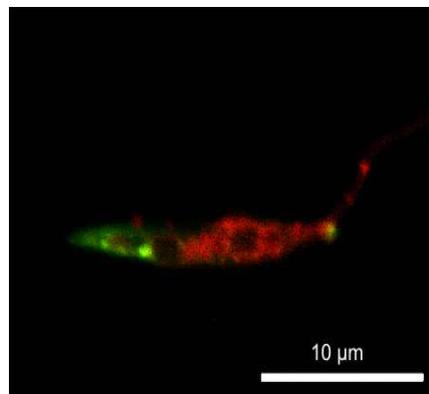


Figura 2.7. Promastigote de *Leishmania donovani* marcado por endocitosis con rodamina B-dextrano (rojo) e incubado con el péptido Hst5-fluoresceína (verde).

La leishmaniasis es una zoonosis en la que determinados mamíferos, tanto domésticos como silvestres, actúan como reservorios del parásito. Sin embargo, se clasifica como antroponosis en determinadas zonas endémicas con alta densidad humana, como en los casos de la leishmaniasis visceral causada por *L. donovani* en India, China y Bangladesh, o la forma cutánea causada por *L. tropica* en Próximo y Medio Oriente. El incremento global de casos que se observa actualmente se asocia al subdesarrollo de las principales zonas endémicas, con problemas de desnutrición y escasa o nula cobertura

<sup>42</sup> Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., Saravia, N. G. *Lancet* **2005**, 366, 1561–1577.

<sup>43</sup> Desjeux, P. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, 27, 305-318.

sanitaria, así como a los grandes desplazamientos de población, la mejora en el diagnóstico y la aparición de especies resistentes del parásito frente a los fármacos habituales. En el mundo desarrollado, el aumento de su incidencia se debe al carácter de *Leishmania* como patógeno oportunista asociado a estados de inmunodepresión, especialmente en la coinfección *Leishmania*-VIH, descrita en 33 países y con una mayor relevancia en el sureste de Europa.

Tradicionalmente se distinguen tres tipos básicos de leishmaniasis: **leishmaniasis cutánea**, **leishmaniasis mucocutánea** y **leishmaniasis visceral** (Figura 2.8).<sup>44</sup>

**Leishmaniasis cutánea:** Las manifestaciones clínicas varían según la especie, asociada a su distribución geográfica. En general, se caracteriza porque a las pocas semanas de la picadura aparece una pápula eritematosa sobre la que se forma una costra que, tras desprenderse, da lugar a una úlcera con fondo húmedo. Generalmente es de evolución benigna y cura espontáneamente. Una complicación de la misma es la leishmaniasis cutánea recidivante, de evolución muy lenta y escasa carga parasitaria en la úlcera, que persiste toda la vida. Algunas de las especies causantes de la enfermedad son *Leishmania major*, *Leishmania tropica* y *Leishmania aethiopica* en Europa, Asia, y África, y *L. mexicana* y *L. amazonensis* en América.

**Leishmaniasis mucocutánea:** Es típica del continente americano, aunque se han observado variedades en Kenia y Etiopía producidas por *L. aethiopica*, pero de evolución más lenta. En América, son las especies del complejo *braziliensis*, especialmente *L. braziliensis* y *L. panamensis*, las responsables de esta patología. Su comienzo es semejante al de una leishmaniasis cutánea, con una pápula que se ulcera y acaba curando espontáneamente. A partir de la lesión cutánea primaria, el parásito se extiende por vía linfática. Aunque las lesiones en las mucosas pueden aparecer simultáneamente a las cutáneas, en general lo hacen meses o incluso años después de haber desaparecido la lesión cutánea primaria.

**Leishmaniasis visceral:** Es la forma más grave de la enfermedad, con una mortalidad cercana al 100% si no es tratada. Es conocida tanto en el Viejo Mundo, producida por *L. infantum* y *L. donovani*, como en América, causada por *L. chagasi*. La enfermedad cursa con la invasión de las células del sistema mononuclear-fagocítico de bazo, médula ósea, hígado y mucosa intestinal, principalmente. Tras un período de incubación, que puede durar hasta un año, las manifestaciones clínicas aparecen gradualmente. Los primeros síntomas suelen ser fiebre, anorexia, pérdida de peso, palidez en piel y mucosas, hepatoesplenomegalia y leucopenia, que finalizan en

---

<sup>44</sup> Alvar, J., Croft, S., Olliaro, P. *Advan. Parasitol.* **2006**, *61*, 223–274.

pancitopenia. Se distinguen dos formas de la enfermedad: la leishmaniasis visceral antroponótica (también denominada *kala-azar*) y la leishmaniasis visceral zoonótica. La primera está causada por *L. donovani* en India, Nepal, Bangladesh, Sudán y Etiopía.

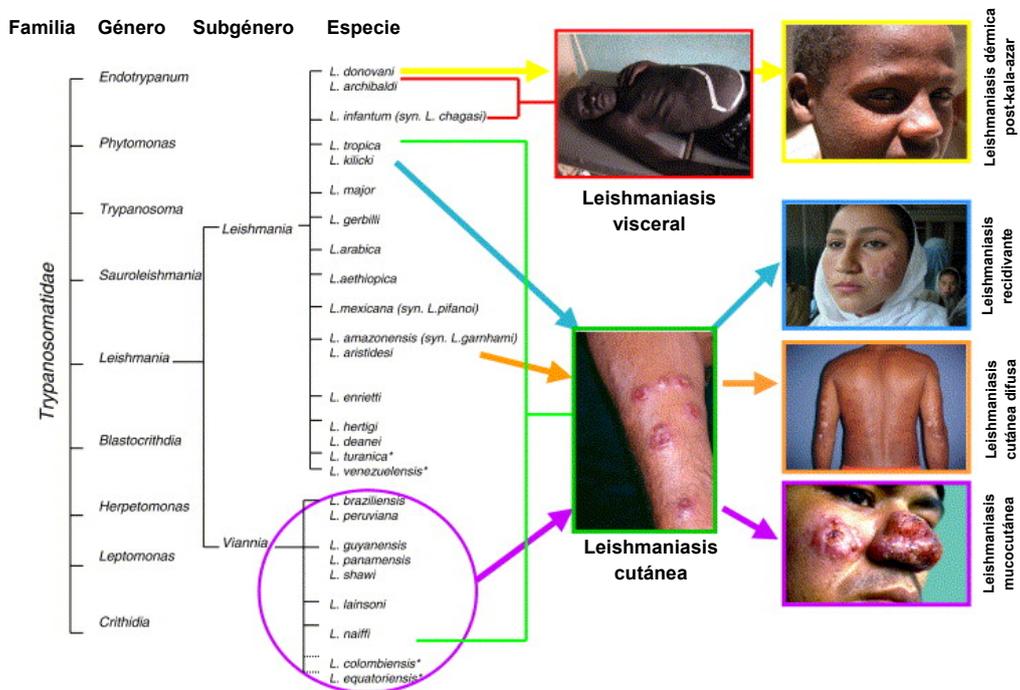


Figura 2.8. Manifestaciones clínicas en función de la especie de *Leishmania* infectante.

### 2.3.1.2 Ciclo biológico de *Leishmania*

*Leishmania* es un parásito digénico, al precisar de dos hospedadores para completar su ciclo biológico. Las diferentes condiciones ambientales a las que debe adaptarse el parásito determinan dos morfologías claramente diferenciadas: el promastigote, forma flagelada presente en el tubo digestivo del vector invertebrado, y el amastigote, carente de flagelo, que se desarrolla en el interior de las células del sistema mononuclear-fagocítico del hospedador vertebrado.<sup>45</sup> El vector es un díptero de los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Cuando un flebotomo hembra pica a un mamífero infectado con *Leishmania*, ingiere con la sangre macrófagos con amastigotes intracelulares. Una vez en el tubo digestivo, los macrófagos

<sup>45</sup> Handman, E. *Adv. Parasitol.* **1999**, *44*, 1-39.

son lisados, quedando libres los amastigotes que se transforman en promastigotes. Los promastigotes se reproducen en el tubo digestivo. Al cabo de unos diez días, los promastigotes cesan su división y cuando el flebotomo vuelve a picar a un mamífero le inocula los promastigotes en la ingesta de sangre. Dichos promastigotes son rápidamente fagocitados por los macrófagos cercanos, logrando el parásito entrar en su célula huésped de una forma “silenciosa”. Allí el parásito se diferencia a amastigote en unas condiciones ambientales más favorables. Tras sucesivas divisiones de los amastigotes, se produce la lisis del macrófago, con liberación de los parásitos al medio e infección de nuevos macrófagos. El destino final de *Leishmania* viene determinado por el balance entre los mecanismos defensivos del macrófago, especialmente la producción de metabolitos oxigenados y NO, destinados a la eliminación del parásito, y los mecanismos de evasión propios de *Leishmania*, tendentes a reprimir la posible activación del macrófago por una respuesta inflamatoria. El ciclo se completa cuando un nuevo flebotomo pica al hospedador parasitado, e ingiere los macrófagos infectados o los amastigotes circulantes (Figura 2.9).

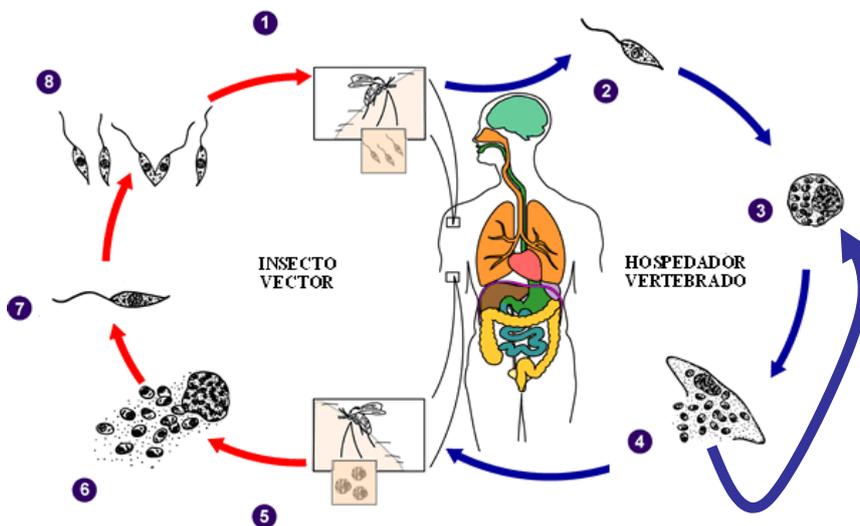


Figura 2.9. 1) Inoculación de promastigotes por la picadura del flebotomo hembra; 2) fagocitosis de los promastigotes por los macrófagos; 3) diferenciación de promastigote a amastigote en el macrófago y multiplicación de los amastigotes; 4) lisis del macrófago parasitado, liberación de amastigotes y diseminación de la infección; 5) ingestión de macrófagos parasitados durante la alimentación del flebotomo; 6) liberación de los amastigotes en el tubo digestivo del vector; 7) transformación de amastigotes en promastigotes; 8) división de los promastigotes (Centre for Disease Control, <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

Los promastigotes axénicos son parásitos que proliferan en ausencia de células huésped. Su uso *in vitro* elimina las interferencias derivadas de la toma y distribución de Miltefosina a través del macrófago hasta alcanzar el amastigote de su interior. Se ha demostrado mediante criterios funcionales, morfológicos, antigénicos y metabólicos que los promastigotes axénicos y aquellos obtenidos de macrófagos infectados son muy similares.<sup>46</sup>

### 2.3.1.3 Control de la leishmaniasis

Conforme al ciclo vital de *Leishmania*, su control puede realizarse en tres frentes: 1) la actuación sobre el reservorio, con el perro como principal foco, implicando un control veterinario de todos los perros domésticos, así como el sacrificio de todos aquellos infectados; 2) la fumigación con insecticidas de efecto residual y la utilización de mosquiteras,<sup>47</sup> y 3) empleo de vacunas y quimioterapia.

No existe actualmente ninguna vacuna totalmente eficaz frente a la leishmaniasis humana, en buena parte debido a la ausencia de un mercado rentable para la industria farmacéutica, por encontrarse el grueso de la población afectada en los países más pobres del planeta.<sup>48</sup>

Tradicionalmente, los fármacos de primera elección para el tratamiento de la leishmaniasis han sido compuestos antimoniales orgánicos pentavalentes.<sup>44</sup> Su utilización clínica actual se reduce a dos formulaciones: antimonio de meglumina (Glucantime®) y estibogluconato sódico (Pentostam®) (Figura 2.10). Ambos medicamentos son de administración intravenosa durante cuatro semanas. Los importantes efectos secundarios y el aumento de los casos de resistencia amenazan su eficacia de forma creciente. La utilización de dosis subóptimas y la interrupción prematura de los tratamientos ocasiona la aparición, cada vez más frecuente, de cepas resistentes, principalmente en países subdesarrollados.

---

<sup>46</sup> Pan, A. A., Duboise, S. M., Eperon, S., Rivas, L., Hodgkinson, V., Traub-Cseko, Y., McMahon-Pratt, D. J. *Eukaryot. Microbiol.* **1993**, 40, 213.

<sup>47</sup> Alexander, B., Maroli, M. *Med. Vet. Entomol.* **2003**, 17, 1-18.

<sup>48</sup> Khamesipour, A., Rafati, S., Davoudi, N., Maboudi, F., Modabber, F. *Indian J. Med. Res.* **2006**, 123, 423-438.

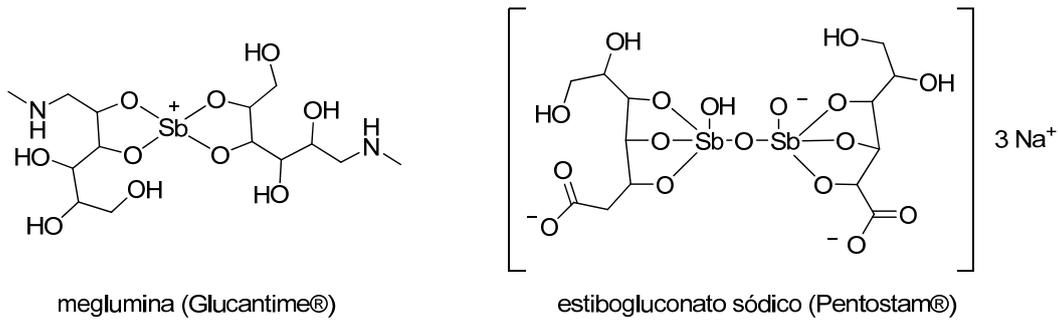


Figura 2.10. Estructura química de dos fármacos antimoniales para el tratamiento de la leishmaniasis.

Anfotericina B es un fármaco de gran eficacia para el tratamiento de la leishmaniasis visceral. Se trata de un antibiótico de la familia de los polienos (Figura 2.11), obtenido del actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Se ha empleado como sustituto de los antimoniales pentavalentes tradicionales en caso de fallo terapéutico de éstos, con un porcentaje de curación de entre el 90 y el 98%, independientemente del resultado de anteriores tratamientos. No obstante, presenta inconvenientes importantes, como la administración intravenosa, los importantes efectos adversos y la duración del tratamiento, que ha de realizarse con estricto control hospitalario. Actualmente, las nuevas formulaciones lipídicas de anfotericina B en liposomas (Ambisome®), en dispersión coloidal (Amphocil®) o en complejos lipídicos (Abelcet®), aumentan la tolerancia del fármaco y, a la vez, favorecen su fagocitosis por el macrófago, pero aumentan considerablemente el coste del tratamiento, por lo que su utilización no es posible en países poco desarrollados.

Otros fármacos utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis, con mayor o menor éxito, son Pentamidina, Paromomicina, azoles, Alopurinol o diversos productos naturales.<sup>44</sup>

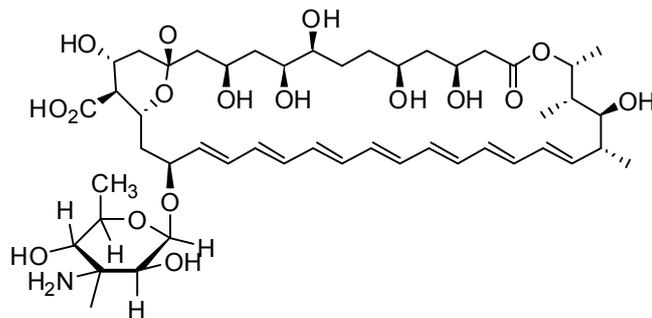


Figura 2.11. Estructura de Anfotericina B

Miltefosina (MT) constituye actualmente el primer y único fármaco en uso de administración oral frente a la leishmaniasis. La actividad leishmanicida de MT fue descrita por primera vez en 1987 en promastigotes y amastigotes de *L. donovani*.<sup>49</sup> Desde entonces, su rápido desarrollo farmacológico ha desembocado en la aprobación de Miltefosina en marzo de 2002 para el tratamiento de la leishmaniasis visceral en India, bajo el nombre comercial de Impavido® (Zentaris, Alemania). El porcentaje de curaciones fue superior al 95 % en ensayos clínicos realizados en Bihar (India), en pacientes con leishmaniasis visceral leve o moderada, con una posología de 2.5 mg/kg × día durante 28 días, incluso frente a casos resistentes a antimoniales, siendo los principales efectos secundarios trastornos gastrointestinales leves y reversibles.<sup>50,51,52,53</sup> Recientemente, también se ha aprobado para el tratamiento de la leishmaniasis canina como disolución acuosa denominada Milteforan.

A pesar de la eficacia leishmanicida de Miltefosina, su mecanismo de acción está lejos de conocerse con exactitud.<sup>54</sup> Sus características anfipáticas sugieren un posible efecto detergente sobre la membrana plasmática de *Leishmania*. Sin embargo, muy probablemente más del 95% del fármaco estará unido a proteínas del suero, por lo que dicho efecto no es esencial en el mecanismo letal.

Una característica de Miltefosina, extrapolable a otros leishmanicidas de tipo alquilfosfolípido, es la posible inducción de un proceso apoptótico en el parásito, con fragmentación de ADN y condensación de ADN nuclear.<sup>55,56</sup> Sin embargo, queda por determinar cómo se origina dicho proceso. Se ha descrito que Miltefosina interfiere con procesos relacionados con la síntesis, modificación y metabolismo lipídico del parásito. Esta posibilidad ha servido de estímulo a una larga serie de estudios de estos posibles efectos de MT, que se han revisado recientemente.<sup>57</sup> La inducción de apoptosis por MT ha llevado al estudio de la posible disfunción mitocondrial como causa de dicho proceso.

---

<sup>49</sup> Croft, S. L., Neal, R. A.; Pendergast, W., Chan, J. M. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 2633-2336.

<sup>50</sup> Croft, S. L., Barrett, M. P., Urbina, J. A. *Trends Parasitol.* **2005**, *21*, 508-512.

<sup>51</sup> Sindermann, H., Engel, J. T. *Roy. Soc. Trop. Med. H.* **2006**, *100 Suppl 1*, S17-S20.

<sup>52</sup> Soto, J., Soto, P. *Expert Rev. Antiinfect. Ther.* **2006**, *4*, 177-185.

<sup>53</sup> Sundar, S., Rai, M. *Expert Opin. Pharmacother.* **2005**, *6*, 2821-2829.

<sup>54</sup> Loiseau, P. M., Bories, C. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 539-550.

<sup>55</sup> Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C., Breard, J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 852-859.

<sup>56</sup> Verma, N. K., Dey, C. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3010-3015.

<sup>57</sup> Urbina, J. A. *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.* **2006**, *100 S*, 59-516.

Parámetros tales como el consumo de O<sub>2</sub> y el potencial electroquímico de mitocondria se reducen significativamente en parásitos tratados con Miltefosina.<sup>58</sup>

Hasta alcanzar sus dianas intracelulares, el fármaco Miltefosina debe atravesar la membrana plasmática del parásito. Las cepas de *L. donovani* resistentes a Miltefosina, obtenidas en laboratorio, siempre han mostrado una incorporación deficiente del fármaco.<sup>59</sup> Recientemente se ha identificado en *Leishmania* un transportador de Miltefosina (LdMT) que, junto a su potencial subunidad LdRos3, constituyen los únicos responsables descritos hasta el momento del fenotipo resistente en *Leishmania*. LdMT es una ATPasa tipo-P, de la subfamilia de las aminofosfolípido-translocasas. Las cepas con una funcionalidad deficiente en dicho sistema transportador muestran un fenotipo resistente a Miltefosina.<sup>60</sup>

---

<sup>58</sup> Santa-Rita, R. M., Henriques-Pons, A., Barbosa, H. S., de Castro, S. L. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 704-710.

<sup>59</sup> Pérez-Victoria, F. J., Sánchez-Cañete, M. P., Seifert, K., Croft, S. L., Sundar, S., Castanys, S., Gamarro, F. *Drug Resist. Update* **2006**, *9*, 26-39.

<sup>60</sup> Pérez-Victoria, F. J., Gamarro, F., Ouellette, M., Castanys, S. *J. Biol. Chem* **2003**, *278*, 49965-49971.

## 2.4 Edelfosina y cáncer

Un éter-lípido que ha despertado un gran interés a causa de su acción antitumoral selectiva es el alquilglicerofosfolípido racémico denominado Edelfosina (1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina, abreviadamente ET-18-OCH<sub>3</sub> ó ET). La estructura de Edelfosina, aunque no sus propiedades fisiológicas, es muy similar a la del factor de activación plaquetaria (PAF,<sup>61</sup> *Platelet Activating Factor*, Figura 2.12), con un grupo metilo en lugar de acetilo en el oxígeno en posición *sn*-2.

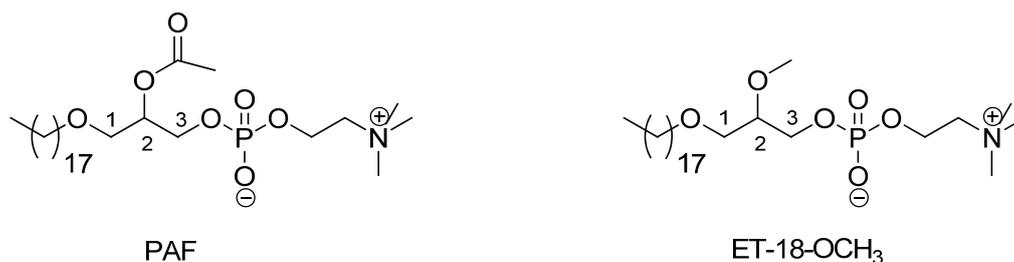


Figura 2.12. Similitud estructural entre el factor de activación plaquetaria (PAF) y Edelfosina (ET-18-OCH<sub>3</sub>)

La molécula de Edelfosina se ha mostrado *in vitro* como un rápido, eficiente y selectivo inductor de apoptosis (muerte celular programada) en células leucémicas y en células procedentes de una gran variedad de tumores,<sup>62</sup> por lo que se considera un interesante compuesto para el estudio del mecanismo de la selectividad en células cancerosas. En contraste, las células normales de la misma procedencia no se ven afectadas.

Originalmente se diseñó la síntesis de éter-lípidos, como Edelfosina y otros alquilglicerofosfolípidos, por su actividad inmunomoduladora. El objetivo era obtener análogos con la función éter, en vez de éster, para prolongar la vida media de dichos compuestos a nivel celular.

La primera síntesis de Edelfosina se llevó a cabo en 1969 en Freiburg (Alemania), por G. Kny, dentro del grupo de O. Westphal, aunque aparentemente no se llegó a publicar.<sup>63</sup> En el año 1982 se publicaron las dos primeras síntesis de Edelfosina,

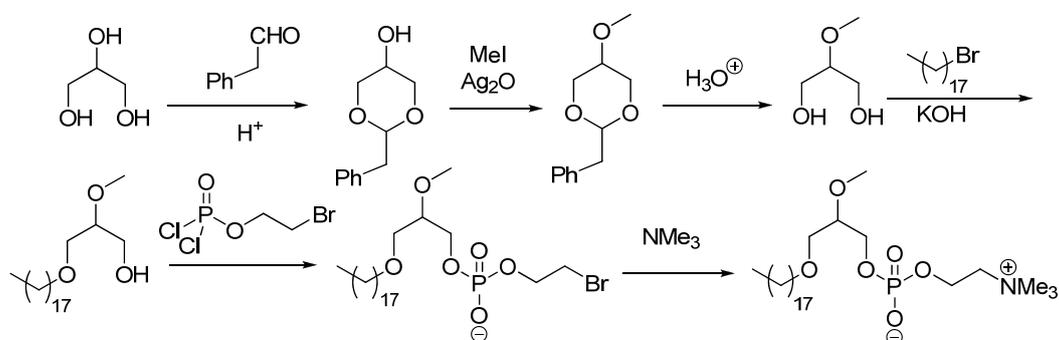
<sup>61</sup> Rosario-Jansen, T., Jiang, R.-T., Tsai, M.-D. *Biochemistry* **1988**, 27, 4619-4624.

<sup>62</sup> Mollinedo, F., Martínez-Dalmau, R., Modolell, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 192, 603-609.

<sup>63</sup> Kny, G. *Tesis Doctoral*, Universidad de Freiburg, **1969**.

una en la que se alcanzó el producto en forma racémica<sup>64</sup> y otra en la que se obtuvieron los enantiómeros (*R*) y (*S*) por separado.<sup>65</sup>

La Edelfosina racémica se obtuvo a partir de glicerina en seis etapas, por un método que, con ligeras modificaciones, permitió la obtención de una colección de análogos del éter-lípido (Esquema 2.7).



Esquema 2.7 Primera síntesis de Edelfosina racémica a partir de un 1,3-acetal de glicerina

Los dos enantiómeros de Edelfosina se sintetizaron en secuencias independientes de 6 pasos cada una, a partir del sustrato quiral 1,2-isopropilideno-*sn*-glicerol, obtenido a partir de D-manitol.

Se han sintetizado también los isómeros (*R*) y (*S*) de un análogo de Edelfosina marcado con <sup>125</sup>I (NM-294).<sup>66</sup> Se comprobó que estos análogos radiactivos se incorporan preferentemente a las membranas de las células tumorales, y que ambos isómeros tienen prácticamente la misma actividad antitumoral (Figura 2.13).

De modo parecido, se ha sintetizado un análogo fotoactivable y radiactivo de Edelfosina conteniendo el grupo fotoactivable 3-trifluorometil-3-(*o*-yodofenil)diazirina (TID) con <sup>125</sup>I, con el propósito de identificar un posible receptor celular específico (Figura 2.13).<sup>67</sup> Este análogo radioyodado mimetiza los efectos antiproliferativos de Edelfosina sobre varios tipos de células tumorales, aunque no se ha medido la capacidad para inducir apoptosis. Usando este análogo se ha logrado la identificación de dos polipéptidos que median en esta bioactividad, de pesos moleculares 47 y 170 kDa.

<sup>64</sup> Tsushima, S., Yoshioka, Y., Tanida, S., Nomura, H., Nojima, S., Hozumi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 3260-3270.

<sup>65</sup> Hirth, G., Barner, R. *Helv. Chim. Acta* **1982**, 1059-1084.

<sup>66</sup> Rampy, M. A., Pinchuk, A. N., Weichert, J. P., Skinner, R. W., Fisher, S. J., Wahl, R. L., Gross, M. D., Counsell, R. E. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3156-3162.

<sup>67</sup> Bittman, R., Qin, D., Wong, D.-A., Tigyi, G., Samadder, P., Arthur, G. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4277-4282.

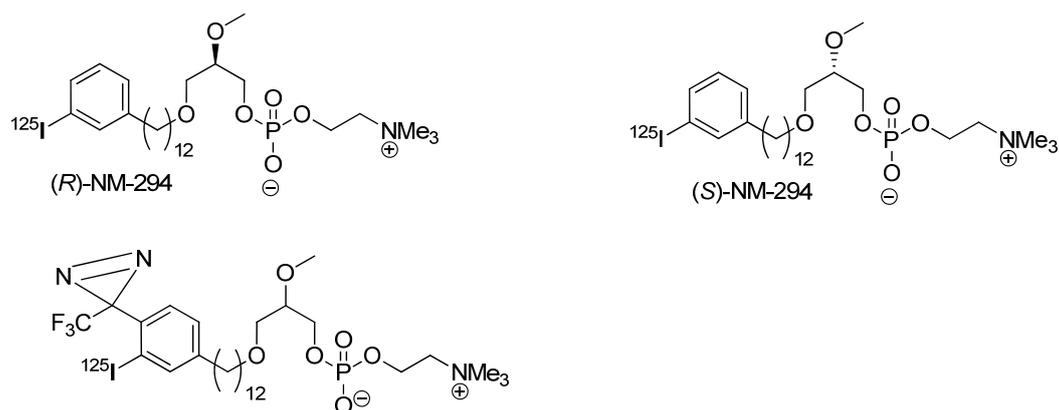


Figura 2.13 Isómeros (*R*) y (*S*) de un análogo radiactivo de Edelfosina y de un análogo de Edelfosina fotoactivable y radiactivo, conteniendo todos  $^{125}\text{I}$ .

#### 2.4.1 Actividad pro-apoptótica de Edelfosina

A continuación se resumen los aspectos más importantes del efecto antitumoral de Edelfosina que han motivado el desarrollo de los análogos fluorescentes descritos en esta Memoria.

Durante muchos años se ha definido a la célula tumoral como aquella que tiene un crecimiento no controlado, y la investigación sobre terapias eficaces ha estado dirigida fundamentalmente a inhibir ese crecimiento mediante agentes antiproliferativos, como es el caso de taxol, ya mencionado. Sin embargo, el impacto real de dichas terapias ha sido menor del esperado, sobre todo cuando se tratan tumores de lento crecimiento.<sup>68</sup> Además, estos agentes actúan también inhibiendo el crecimiento de tejidos normales, como los de la médula ósea, las células epiteliales gastrointestinales, las células de los folículos pilosos y de la piel, etc., dando lugar a múltiples manifestaciones clínicas de esta toxicidad.

Hoy día se tiende a considerar la célula tumoral como aquella que intenta sobrevivir y que, para ello, soporta ciertos daños genéticos que en una célula normal inducirían un mecanismo de muerte programada (apoptosis). Toda célula normal está programada para autodestruirse tras cierto tiempo, después de haber completado su función fisiológica o tras percibir un daño genético o de otro tipo. El suicidio celular programado de cualquier tipo de célula se inicia mediante un estímulo externo o interno y termina en la muerte celular, generando vesículas que son reabsorbidas, evitándose la

<sup>68</sup> Mollinedo, F., Gajate, C., Modolell, M. *Mundo Científico* **1998**, *186*, 32-39.

liberación al medio de material celular aún activo, que podría provocar diversas respuestas agresivas.<sup>68</sup>

Sin embargo, la célula tumoral ha desarrollado mecanismos que impiden este proceso natural, eliminando o alterando los mecanismos que en condiciones normales dispararían la señal apoptótica. Cada célula tumoral trataría así de sobrevivir a costa de acumular mutaciones. Se supone que los tratamientos convencionales antitumorales (quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia) funcionan iniciando la respuesta apoptótica a través de una avalancha de mecanismos múltiples, que todavía no están bien definidos. Las células detectan las alteraciones que estos tratamientos producen en sistemas bioquímicos cruciales para su funcionamiento, e inician la respuesta apoptótica de una forma muy indirecta.

En 1993 dos grupos, trabajando de modo independiente, descubrieron que el éter fosfolípido Edelfosina inducía una rápida y selectiva apoptosis en líneas celulares leucémicas humanas en concentraciones del orden de 5  $\mu\text{M}$ .<sup>69,70</sup> Hasta entonces la actividad antitumoral de este tipo de lípidos se atribuía generalmente a la perturbación del metabolismo celular de los fosfolípidos<sup>71</sup> y/o al incremento de la actividad citotóxica de los macrófagos frente a células tumorales.<sup>62</sup> El descubrimiento de la actividad proapoptótica dio lugar a la revisión de estas hipótesis iniciales y a un renovado interés por identificar los detalles del mecanismo de activación de este proceso.<sup>72</sup>

El paso previo para la activación de la apoptosis por Edelfosina es la incorporación del éter-lípido a la membrana plasmática celular.<sup>72</sup> Como se ha mencionado, esta incorporación es altamente selectiva, ya que la diferencia de concentración en la membrana entre células tumorales y normales puede llegar a ser de un orden de magnitud. En consecuencia, se cree que la membrana plasmática actúa como barrera protectora de la acción de Edelfosina en células normales, lo cual no deja de ser sorprendente, ya que la lipofilia de este compuesto favorece su incorporación a la membrana lipídica. Para explicar la acumulación en la membrana de la célula cancerosa se postula que debe existir algún tipo de proteína de membrana responsable de la incorporación selectiva del lípido a dichas células. Dicha proteína, todavía no

---

<sup>69</sup> Diomedede, L., Colotta, F., Piovani, B., Re, F., Modest, E. J., Salmona, M. *Int. J. Cancer* **1993**, *53*, 124.

<sup>70</sup> Mollinedo, F., Martínez-Dalmau, R., Modolell, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *192*, 603-609.

<sup>71</sup> Modolell, M., Andressen, R., Pahlke, W., Brugger, U., Munder, P. G. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 4681.

<sup>72</sup> Mollinedo, F., Gajate, C., Martín-Santamaria, S., Gago, F. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3163-3184.

identificada, estaría ausente en las células normales, lo que justificaría la mencionada selectividad. Sin embargo, pueden existir otros mecanismos alternativos para este fenómeno, como la posible presencia en la membrana lipídica de las células tumorales de dominios de lípidos que interaccionen específicamente con Edelfosina.

Se ha intentado, sin mucho éxito, encontrar respuesta a varios de los interrogantes mencionados más arriba, relacionados con el mecanismo de acción de Edelfosina, utilizando derivados radiactivos de la misma. Por estas razones, se pensó que el uso de análogos fluorescentes facilitaría considerablemente dicha investigación. Así, por ejemplo, los estudios de incorporación selectiva, transporte y distribución en la bicapa lipídica serían de una relativa sencillez usando dichos análogos emisivos.

## 2.5 Polienos conjugados como grupos fluorescentes

### 2.5.1 Introducción

Los lípidos son componentes esenciales de todos los organismos vivos, por lo que resulta de gran interés el estudio de sus estructuras, su dinámica, sus funciones y su metabolismo a nivel molecular y celular.<sup>73</sup> Además, existe un número creciente de lípidos sintéticos, como los que se presentan en este trabajo, con propiedades biológicas y terapéuticas de gran interés.

### 2.5.2 Métodos de obtención

Se resumen a continuación, las principales reacciones utilizadas actualmente en la síntesis de compuestos poliénicos<sup>74</sup> y su aplicación para la obtención de análogos fluorescentes de lípidos y, en concreto, de Miltefosina y Edelfosina. Estas reacciones se han usado con frecuencia en la síntesis total de productos naturales con dobles enlaces, conjugados o no, entre los que se incluyen los ácidos araquidónicos derivados de leucotrienos y lipoxinas<sup>75</sup> (eicosanoides), los ácidos retínicos<sup>76</sup> o los macrólidos, entre otros.<sup>77</sup>

En general, los polienos con dobles enlaces de geometría todo-(*E*) son más estables que los que presentan algún doble enlace (*Z*), siendo estos últimos más difíciles de sintetizar y especialmente propensos a isomerizar a (*E*). Por otro lado, cuando se requiere la obtención de un único isómero, cualquier método que conduzca a la mezcla de isómeros (*E*)/(*Z*) implicará el uso de pasos adicionales de separación, que muchas veces son poco efectivos y disminuyen de manera importante los rendimientos, o bien un paso de isomerización (*Z*)→(*E*). Es por tanto necesario disponer de procedimientos de olefinación que generen alquenos con alta pureza configuracional y que permitan la

---

<sup>73</sup> Nicolaou, A., Kokotos, G. (Eds.), *Bioactive Lipids*, The Oily Press Lipid Library, Bridgewater, UK **2004**, vol. 17.

<sup>74</sup> Thirsk, C., Whiting, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **2002**, 999-1023.

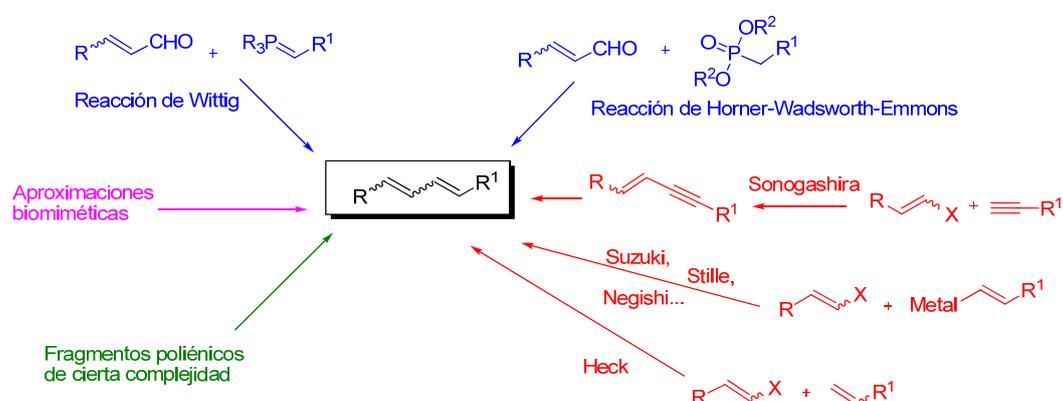
<sup>75</sup> (a) *Leukotrienes and Lipoxygenase*, Rockack, J., ed., Elsevier, Nueva York, **1989**; (b) Green, R. H., Lambeth, P. F. *Tetrahedron* **1983**, 39, 1687; (c) Evans, J., Zamboni, R., Nathaniel, D., Leveille C., Ford-Hutchinson, A. W. *Prostaglandins* **1985**, 30, 981; (d) Simmonds, R. J. *Chemistry of Biomolecules. An Introduction*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1992**, cap. 7.

<sup>76</sup> *Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids*, Dawson, M. L., Okamura, W. H., ed., CRC Press, Boca Raton, FL, **1990**.

<sup>77</sup> Semlyen, J. A. *Large Ring Molecules*, Wiley, Chichester, **1996**.

obtención del isómero requerido en condiciones suaves, respetando otras funcionalidades presentes en la molécula.

Las principales estrategias para la obtención de polienos conjugados se pueden dividir en dos grandes grupos: las que utilizan iluros de fósforo (Wittig y Horner-Wadsworth-Emmons, HWE) y las que se basan en la química del paladio (Esquema 2.8).



Esquema 2.8. Estrategias para la obtención de polienos.

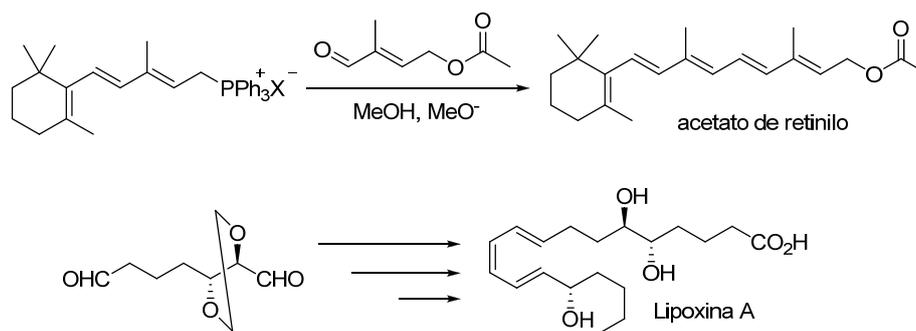
### 2.5.2.1 Reacciones de Wittig y de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)

La reacción de Wittig,<sup>78</sup> en la cual se activan fosforanos con bases fuertes para dar iluros no estabilizados que se hacen reaccionar con aldehidos, ha sido, históricamente, la reacción de elección para la obtención de olefinas. Sin embargo, esta reacción está limitada por su baja selectividad, ya que, invariablemente, conduce a mezclas de isómeros (*E*)/(*Z*) en proporciones que dependen de los sustituyentes de los compuestos que intervienen, necesitándose por tanto isomerizar la mezcla obtenida, o separar el isómero no buscado. Por otro lado, también es necesario eliminar el óxido de fosfina generado en la reacción, requiriéndose procedimientos de purificación.

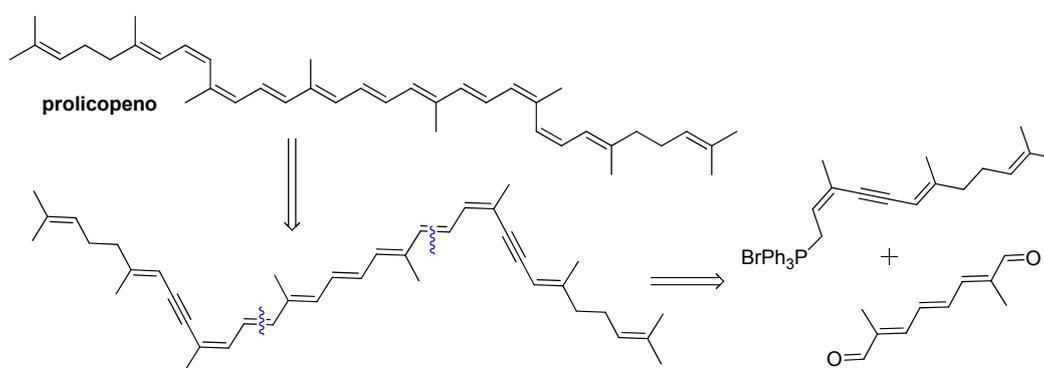
La síntesis a nivel industrial de la Vitamina A (BASF) utiliza la reacción de Wittig para la preparación de acetato de retinilo (Esquema 2.9). También se ha utilizado esta reacción para preparar lipoxina A, un metabolito de los ácidos araquidónicos (Esquema 2.9).<sup>79</sup>

<sup>78</sup> Maryanoff, B. E., Reitz, A. B. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863.

<sup>79</sup> Yadav, J. S., Barma, D. K. Dutta, D. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 143.



Más recientemente se ha utilizado la reacción de Wittig en la síntesis total de prolicopeno, un caroteno presente en el tomate tangerina. La hidrogenación parcial de los triples enlaces del intermedio obtenido, en presencia del catalizador de Lindlar, y la posterior purificación mediante HPLC, condujo al pigmento esperado (Esquema 2.10).<sup>80</sup>

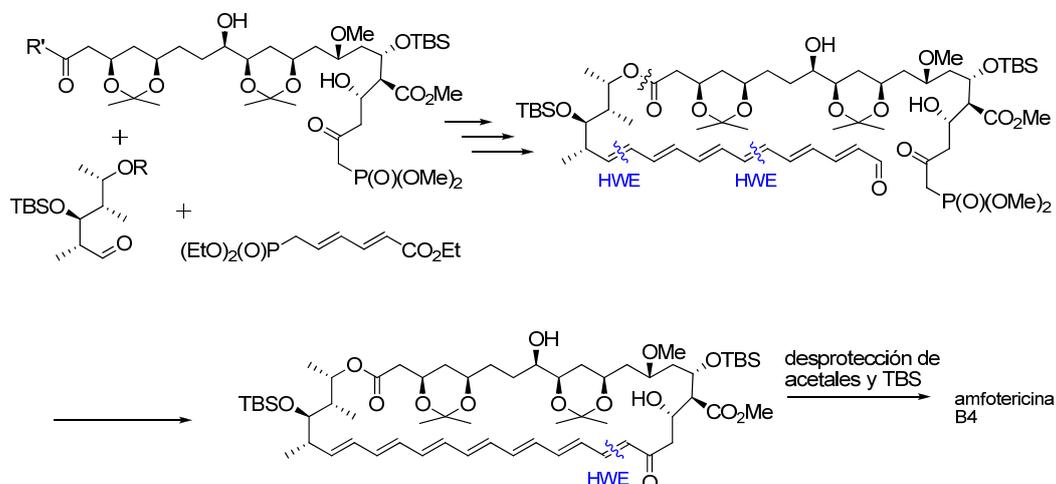


Muchos de los problemas experimentados con la reacción de Wittig se evitan utilizando la reacción de HWE,<sup>81</sup> en la que se activan fosfonatos con bases fuertes dando iluros estabilizados que también se hacen reaccionar con aldehidos, ya que se obtienen de manera estereoselectiva alquenos de estereoquímica (*E*).

<sup>80</sup> Pattenden, G., Robson, D. C. *Tetrahedron* **2006**, 62, 7477-7483.

<sup>81</sup> Kelly, S. E. En *Comprehensive Organic Synthesis*, Trost, B. M. y Fleming, I., ed., Pergamon, Oxford, 1991, vol. 1, 729-817.

El esqueleto poliénico de amfotericina B4 se ha sintetizado utilizando tres reacciones de HWE. Las dos primeras conducen a un intermedio hexaénico acíclico. La última cierra el anillo macrocíclico precursor del antibiótico (Esquema 2.11).<sup>82</sup>



Esquema 2.11. Síntesis de amfotericina B4

### 2.5.2.2 Acoplamiento catalizado por paladio

Estos acoplamientos permiten la formación de enlaces sencillos entre dos centros  $sp^2$  o  $sp/sp^2$  de manera estereoespecífica, en condiciones suaves y evitando algunos de los problemas inherentes a los métodos anteriores. Además, la alta tolerancia frente a otros grupos funcionales hace que estas reacciones sean, por lo general, empleadas en el último paso de la construcción de la cadena poliénica, o incluso de la síntesis del producto final.

La reacción de Stille<sup>83,84</sup> presenta como ventaja principal su alta compatibilidad con la práctica totalidad de los grupos funcionales, sin necesidad de protección. Además, se puede utilizar no sólo con halogenuros de alqueno o arilo, sino también con triflatos, normalmente en presencia de sales de litio para facilitar la transformación, como único requisito adicional. Por otro lado, esta reacción transcurre con retención de la

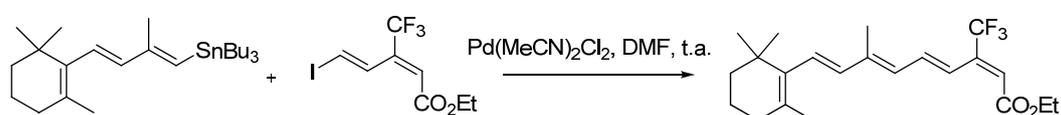
<sup>82</sup> Nicolaou, K. C., Sorensen, E. J. *Classics in Total Synthesis: Targets, Strategies, Methods*, Wiley-VCH, **1996**, p. 24.

<sup>83</sup> Espinet, P., Echavarren, A. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4704-4734.

<sup>84</sup> Stille, J. K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 508-524.

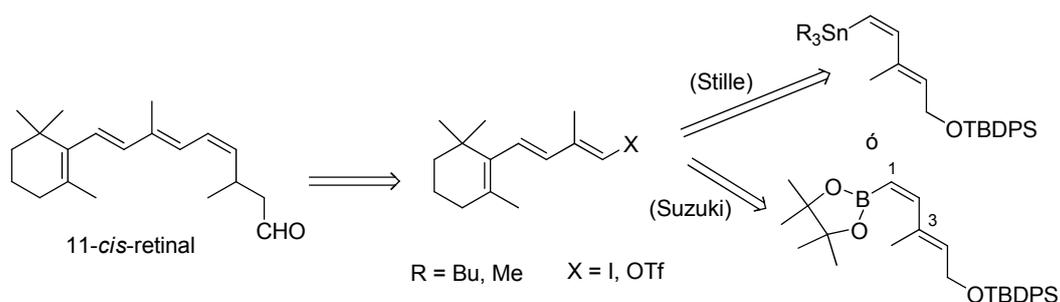
configuración del haluro de alqueno utilizado, generando polienos con una elevada pureza isomérica.

La reacción de Stille ha sido ampliamente utilizada en la obtención de moléculas complejas con grupos polienos, como micotrienol,<sup>85</sup> y una gran variedad de derivados de los ácidos retínicos, incluyendo 3-trifluorometilretinoato de etilo (Esquema 2.12).<sup>74</sup>



Esquema 2.12. Síntesis de 3-trifluorometilretinoato de etilo

Más recientemente, se ha sintetizado de manera estereoespecífica 11-*cis*-retinal mediante acoplamiento de Stille o de Suzuki entre los halotrienos precursores y un (1*Z*,3*E*)-3-metilpenta-1,3-dienilstannano o un (1*Z*,3*E*)-3-metilpenta-1,3-dienilboronato, ambos con un grupo alcohol terminal protegido, constituyendo hasta la fecha los primeros derivados organometálicos con geometría (*Z*) empleados en la síntesis de derivados del ácido retínico (Esquema 2.13).<sup>86</sup>



Esquema 2.13. Retrosíntesis de 11-*cis*-retinal

Los acoplamientos cruzados entre alquenoil-boronatos (derivados del ácido borónico) y halogenuros o triflatos de alquenoil, en presencia de cantidades catalíticas de Pd, se denominan *reacciones de Suzuki-Miyaura*.<sup>87</sup> En estos casos, se requiere la presencia de una base (carbonato potásico o sódico, alcóxidos o hidróxidos metálicos), disuelta en agua o suspendida en un disolvente orgánico, para activar los intermedios de

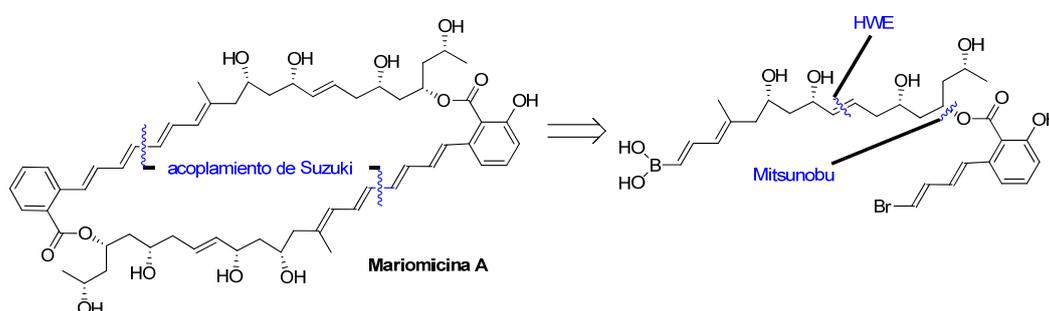
<sup>85</sup> Panek, J. S., Masse, C. E. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8290.

<sup>86</sup> Lopez, S., Montenegro, J., Saa, C. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9572-9581.

<sup>87</sup> (a) Suzuki, A., Miyaura, N. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457; (b) Suzuki, A. en *Metal-catalyzed Cross-coupling Reactions*, Diederich, F., Stang, P. J., eds., Wiley VCH, Nueva York, 1998, p. 49.

paladio  $R'-Pd-X \rightarrow R'-Pd-OR''$ , siendo  $OR''$  = resto de una base. Esta reacción puede transcurrir en condiciones muy suaves, convirtiéndose en una herramienta ideal para la obtención de polienos potencialmente inestables.

Utilizando esta reacción, se han sintetizado recientemente el polieno macrocíclico Mariomicina A y sus diastereoisómeros B y C (mediante fotoisomerización de A), aislados inicialmente del actinomiceto marino *Marinispora CNQ-140*. Estos productos naturales presentan una potente actividad antibiótica y una elevada citotoxicidad frente a células cancerosas. El análisis retrosintético, basado en la simetría de la molécula, genera dos subunidades idénticas, obtenidas a su vez por reacción de Mitsunobu y olefinación de HWE. Los ácidos borónicos de los monómeros se generaron de manera estereoselectiva a partir de los correspondientes alquinos terminales (Esquema 2.14).<sup>88</sup>



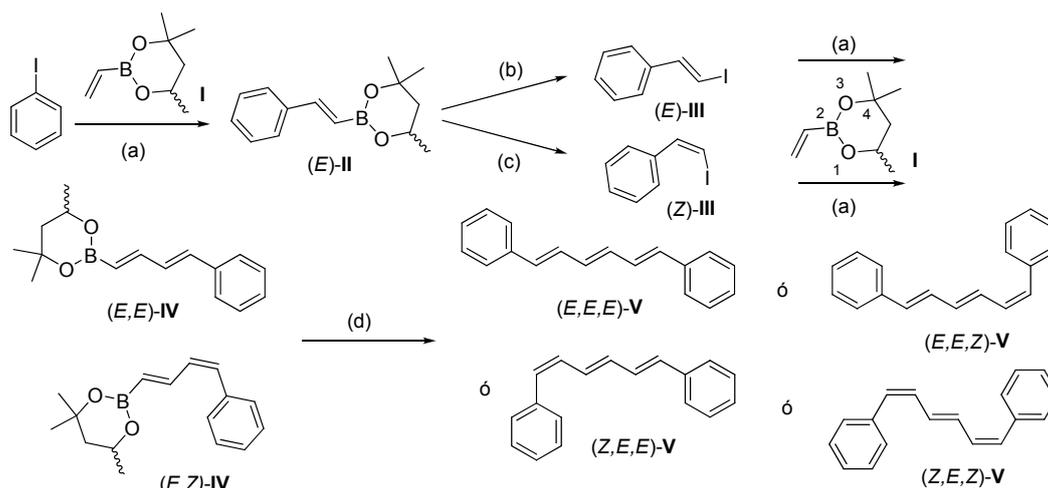
Esquema 2.14. Síntesis de Mariomicina A.

La reacción de Heck-Mizoroki<sup>89</sup> presenta menor utilidad en la obtención de polienos, debido a que transcurre sin retención de la configuración de los reactivos de acoplamiento. No obstante, se ha descrito la síntesis de un éster vinilborónico (1,3,2-dioxaborinano de 4,4,6-trimetil-2-vinilo, **I** en Esquema 2.15) y su uso en la preparación de varios estereoisómeros de 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno. Los isómeros se prepararon a partir de yodobenceno y tres moléculas del éster **I**, mediante reacciones iterativas de Heck, Suzuki y yododeboronación estereocontrolada (Esquema 2.15). Variando las condiciones de cada reacción (aditivos, orden de adición de reactivos ...) se obtuvieron selectivamente cuatro diastereoisómeros distintos del cromóforo (Esquema 2.15).<sup>90</sup>

<sup>88</sup> Nicolaou, K. C., Nold, A. L., Milburn, R. R., Schindler, C. S., Cole, K. P., Yamaguchi, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1760-1768.

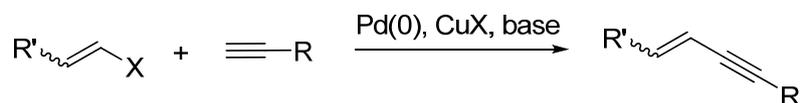
<sup>89</sup> Knowles, J. P., Whiting, A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 31-44.

<sup>90</sup> Lightfoot, A. P., Twiddle, S. J. R., Whiting, A. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3167-3172.



Esquema 2.15. Reactivos y condiciones: (a) Pd(OAc)<sub>2</sub>, PPh<sub>3</sub>, *n*Bu<sub>3</sub>N, AgOAc, tolueno, 110 °C, 24 h; (b) (1) NaOMe/MeOH, THF, -78 °C, 30 min; (2) ICl/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C a t.a., 2 h; (c) (1) ICl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> -78 °C, 4 h, (2) NaOMe/MeOH, -78 °C a t.a., 30 min; (d) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Ag<sub>2</sub>O, (E)-III ó (Z)-III, THF, 65 °C, 24 h.

En contraste con la reacción de Heck, la reacción de Sonogashira-Hagihara<sup>91</sup> se muestra como una de las herramientas más potentes para la obtención de compuestos poliénicos conjugados. Los primeros antecedentes bibliográficos que hacen referencia a los acoplamientos cruzados entre alquinos terminales no activados y halogenuros vinílicos, en presencia de catalizadores de paladio, datan del año 1975, cuando dos grupos independientes los describieron de forma simultánea.<sup>92</sup> Pero el mismo año se publicó un procedimiento en el que, mediante la adición de sales de cobre(I), se conseguía que la reacción trascurriese a temperatura ambiente (Esquema 2.16).<sup>93</sup>



Esquema 2.16. Reacción de Sonogashira-Hagihara

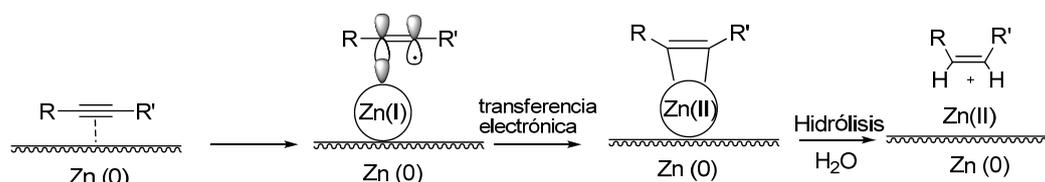
<sup>91</sup> Chinchilla, R., Nájera, C. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 874-922.

<sup>92</sup> (a) Casser, L. *J. Organomet. Chem.* **1975**, *93*, 253-258; (b) Dick, H. A., Heck, R. F. *J. Organomet. Chem.* **1975**, *93*, 259-263.

<sup>93</sup> Sonogashira, K., Tohda, Y., Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467.

Por tanto, a partir de alquinos terminales y alquenos, se obtienen de modo estereoespecífico compuestos con ambos tipos de insaturaciones, manteniéndose la estereoquímica del grupo alqueno que interviene. Las excepciones suelen producirse como consecuencia de isomerizaciones posteriores a la reacción, derivadas de la inestabilidad configuracional de los productos finales o de los intermedios.

La generación de polienos mediante semirreducción de los triples enlaces de los productos de acoplamiento, obtenidos por reacción de Sonogashira-Hagihara, se ha dado en llamar, en el campo de la síntesis de productos naturales poliénicos, la “*aproximación acetilénica*” (*acetylenic approach*). La semirreducción se realiza con Zn activado con sales de cobre y plata, cuyos potenciales de reducción permiten la eliminación de la pátina de óxido de la superficie del Zn, con formación parcial de la aleación Zn/Cu/Ag (método de Boland).<sup>94</sup> Un rasgo característico de esta semirreducción es que se obtiene siempre la olefina de estereoquímica (*Z*), ya que la reacción evoluciona a través de un proceso en el cual el alquino se coordina sobre la superficie del cinc activado (Esquema 2.17). Además, en contraste con el catalizador de Lindlar,<sup>95</sup> el sistema Zn/Cu/Ag no reduce acetilenos no activados o no conjugados.

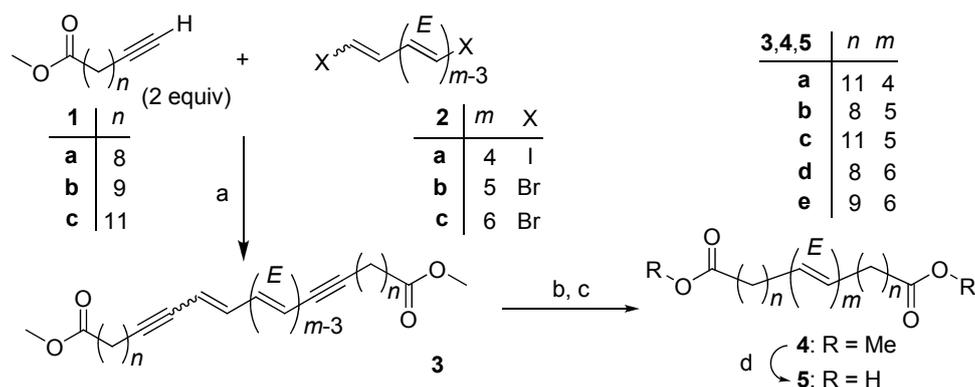


Por ejemplo, la combinación acoplamiento/semirreducción se ha usado en nuestro grupo para obtener una serie de sondas fluorescentes con grupos polieno conjugados en el centro de su estructura y con restos ácido carboxílico o éster en los extremos, de carácter bifílico, para el estudio de propiedades específicas de bicapas lipídicas y membranas celulares (Esquema 2.18).<sup>96</sup>

<sup>94</sup> Boland, W., Pantke, S. *J. Prakt. Chem.* **1994**, 336, 714-715.

<sup>95</sup> Lindlar, H., Dubuis, R. *Org. Synth.* **1973**, 5.

<sup>96</sup> (a) Quesada, E., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2095-2097; (b) Quesada, E., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1308-1318.



Esquema 2.18. Síntesis de sondas fluorescentes bianfílicas. Reactivos y condiciones: a) **1**:**2** = 3:1 (mol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>2</sub>NH, THF, t.a., 3 h, >95%; b) Zn(Cu/Ag), MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1), t.a., 24 h, >95%; b) I<sub>2</sub> (traza), hexano, ref., 15 min, >95%; d) KOH, EtOH, ref., 5 h; luego 0°, HCl, >95%

### 2.5.2.3 Empleo de fragmentos poliénicos bifuncionales

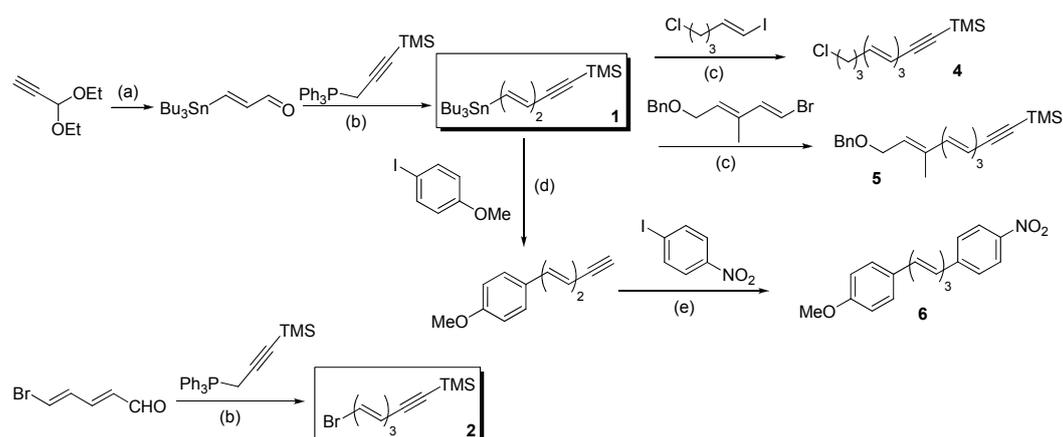
En los últimos años se han desarrollado moléculas altamente especializadas, con grupos funcionales ortogonales entre sí, que reaccionan de manera consecutiva o en *one pot*, para la preparación directa de polienos.

En este sentido, Lipshutz y Lindsley han descrito la preparación de los eninos **1** y **2** (Esquema 2.19), con funcionalidades ortogonales entre sí. **1** es un dienilestannano que se prepara fácilmente por reacción de Wittig, y que por acoplamiento de Stille con distintos haluros genera los correspondientes trieninos y tetraeninos conjugados **4** y **5**.<sup>97</sup> Sobre el grupo alquino terminal se puede llevar a cabo una hidrocirconación seguida de transmetalación con aluminio, o una carboaluminación directa de Negishi seguida de reacción con un electrófilo, obteniéndose de forma directa polienos con geometría todo (*E*). Como ejemplo, se muestra la síntesis del todo-(*E*)-1,6-difenilhexatrieno **6** (Esquema 2.19).

El segundo compuesto es el bromotrienino **2**, que incorpora una inversión de la polaridad respecto a **1**, al sustituir el grupo estannano por un bromuro.<sup>98</sup>

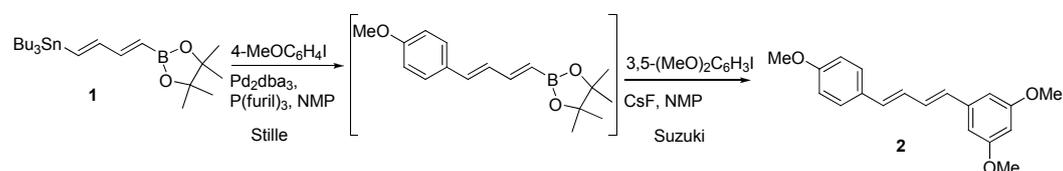
<sup>97</sup> Lipshutz, B. H., Lindsley, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4555.

<sup>98</sup> Lipshutz, B. H., Ullman, B., Lindsley, C., Pecchi, S., Buzard, D. J., Dickson, D. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6092.



Esquema 2.19. Reactivos y condiciones: (a) 1)  $\text{Bu}_3\text{Sn(Bu)Cu(CN)Li}_2$ . 2)  $\text{TsOH}$ , acetona/ $\text{H}_2\text{O}$ . (b)  $\text{NaH(TMS)}_2$ , THF, t.a. (c) 1)  $\text{BuLi}$ , THF,  $-78^\circ\text{C}$ ; 2)  $\text{ZnCl}_2$   $0^\circ\text{C}$ ; 3)  $\text{Pd(PPh}_3)_4$ ; 4)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , EtOH. (d) 1)  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ ,  $\text{P(Fur)}_3$ , NMP,  $50^\circ\text{C}$ ; 2)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , EtOH. e) 1)  $\text{Cp}_2\text{Zr(H)Cl}$ , THF, t.a. a  $50^\circ\text{C}$ ; 2)  $\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ , DIBAL,  $\text{P(Fur)}_3$ .<sup>97,98</sup>

Coleman y Walczak han preparado el butadieno hetero-bis-1,3-metalado **1** (Esquema 2.20), con funcionalidades diferentes en cada extremo de la molécula para poder dar reacciones de Stille y Suzuki, y han demostrado su utilidad en la síntesis en “one pot” del 1,4-difenilbutadieno **2**, entre otras moléculas. La síntesis de **2** transcurre a través de una reacción de Stille seguida de adición de una base ( $\text{CsF}$ ) que promueve el acoplamiento de Suzuki-Miyaura.<sup>99</sup>

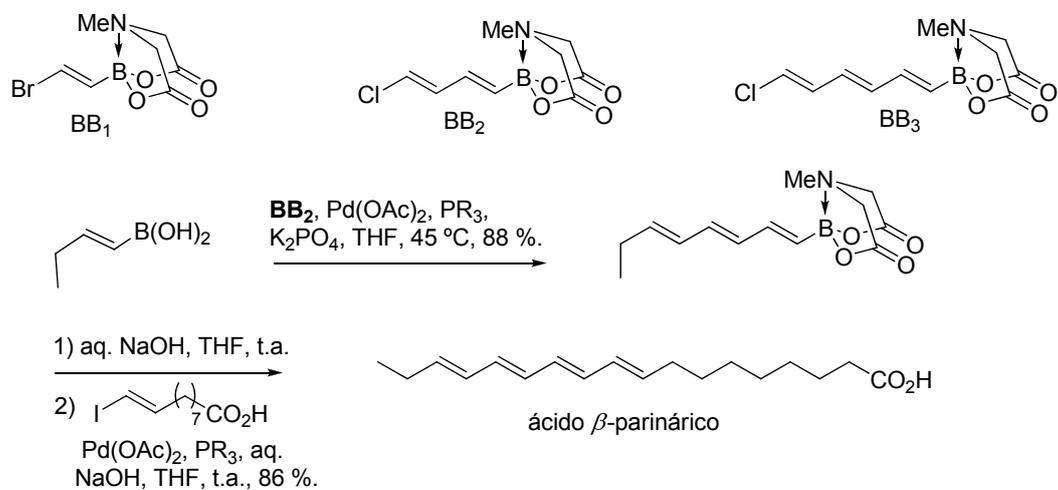


Esquema 2.20

Más recientemente, se han descrito tres derivados haloalquenilborónicos (Esquema 2.21,  $\text{BB}_{1-3}$ ) y su uso en reacciones consecutivas de acoplamiento catalizadas por paladio. Estos compuestos presentan el átomo de boro protegido como complejo intramolecular con una amina, mejorando así la baja estabilidad que caracteriza a los ácidos polienilborónicos. Los derivados  $\text{BB}_{1-3}$  son estables y selectivos frente al conjunto de acoplamientos catalizados por paladio. El átomo de boro se desprotege fácilmente en

<sup>99</sup> Coleman, R. S., Walczak, M. C. *Org. Lett.* **2005**, 7, 2289-2291.

medio básico, permitiendo su participación en reacciones de Suzuki. Como ejemplo, se muestra la aplicación de  $BB_2$  en la síntesis del ácido  $\beta$ -parinámico.<sup>100</sup>



Esquema 2.21. Estructura de los complejos  $BB_{1-3}$  y aplicación de  $BB_2$  en la síntesis de ácido  $\beta$ -parinámico.

<sup>100</sup> Lee, S. J., Gray, K. C., Paek, J. S., Burke, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 466-468.

### 2.5.3 Lípidos poliénicos fluorescentes como sondas moleculares

Las técnicas espectroscópicas de fluorescencia figuran entre los métodos principales para el estudio de proteínas y ácidos nucleicos.<sup>101,102</sup> Esto se debe a que se dispone de un gran número de fluoróforos en forma de sondas orgánicas hidrosolubles, proteínas fluorescentes o nanocristales. Sin embargo, para aplicar estos métodos al estudio de lípidos se hace necesario disponer de fluoróforos con características similares a las de los grupos presentes en los lípidos naturales, dada la habitual ausencia de fluoróforos intrínsecos en los mismos (Figura 2.14).

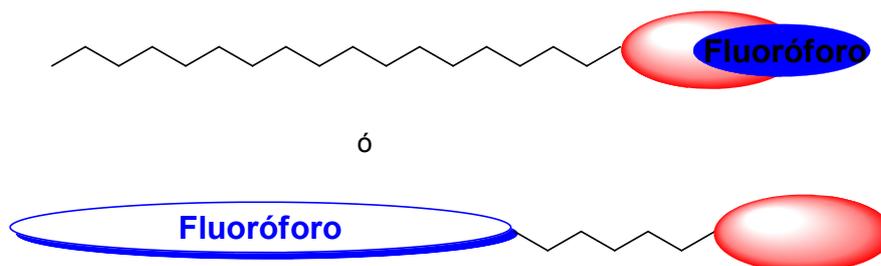


Figura 2.14. Fluoróforos mimetizados en la estructura de un lípido

Como ya se discutió antes, se pueden definir dos métodos genéricos de marcado fluorescente de moléculas de interés biológico, que son también aplicables al caso de los lípidos. El primero consiste en la unión covalente de etiquetas fluorescentes a la estructura original del lípido, generando así un derivado fluorescente, del mismo modo que en el caso de las proteínas y los ácidos nucleicos. Sin embargo, al ser los lípidos moléculas anfipáticas, la etiqueta fluorescente se puede incorporar en la zona polar o en la apolar de la molécula. Para el marcado de la región polar se han utilizado, entre otros grupos emisores, rodaminas, dansilo, 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazol (NBD), cumarinas o cianinas (Figura 2.15). Desafortunadamente, el grupo emisor suele contener en su estructura grupos ionizables que no estaban presentes en la molécula original, variando además el tamaño, la distribución de carga y el punto isoeléctrico, con lo que se altera el balance hidrófilo-lipófilo del lípido original.

<sup>101</sup> Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H., Tsien, R. Y. *Science* **2006**, *312*, 217-224.

<sup>102</sup> Navratil, M., Mabbott, G. A., Arriaga, E. A. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4006-4020.

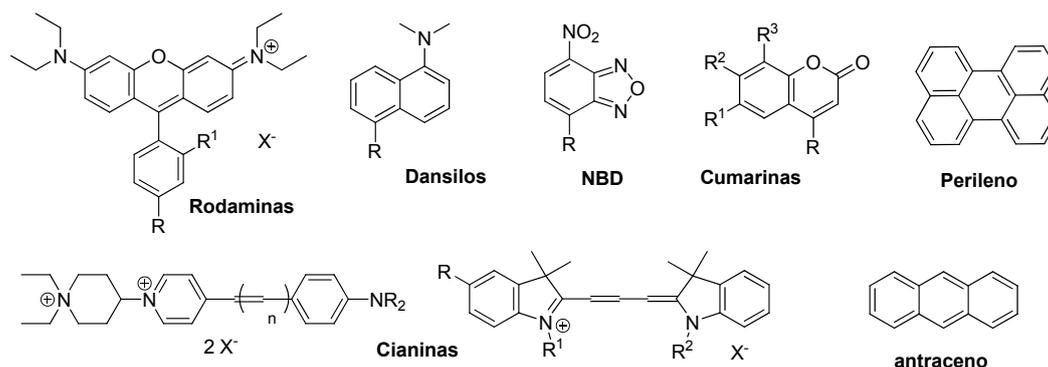


Figura 2.15. Estructura de algunos grupos fluorescentes para el etiquetado de lípidos

Alternativamente, la región apolar del lípido se puede etiquetar con grupos fluorescentes poliaromáticos, como antraceno, fenantreno, perileno... (Figura 2.15). Sin embargo, estos grupos presentan problemas adicionales, tales como provocar baja solubilidad acuosa del derivado, inducir cambios conformacionales de las cadenas apolares a las que se enlazan, y, a veces, poseer fotofísica compleja.

La segunda aproximación para el marcado fluorescente de lípidos, para obtener análogos útiles en el estudio de bioprocesos, consiste en la construcción del grupo fluoróforo sobre la molécula mediante síntesis completa de un nuevo análogo fluorescente conteniendo grupos polieno conjugado. Esta aproximación, aunque más compleja experimentalmente, permite un control más preciso de las propiedades químico-físicas del producto resultante.

### 2.5.3.1 Polienos lineales conjugados fluorescentes

Los polienos conjugados lineales son apolares, tienen coeficientes de absorción molar altos y valores del rendimiento cuántico modestos, pero útiles. Estos grupos tienen muchas de las características de las cadenas alifáticas de la mayoría de los lípidos y no provocan cambios estructurales significativos, una vez insertados en membranas lipídicas naturales o artificiales.<sup>103,104</sup>

Los ácidos parináricos son polienos naturales que destacan entre las sondas fluorescentes de lípidos disponibles por ser los análogos emisivos estructuralmente más cercanos a los lípidos naturales de las membranas. El ácido *cis*-parinárico (9*Z*,11*E*,13*E*,15*Z*)-octadeca-9,11,13,15-tetraenoico (*c*-PnA) (**2**) (Figura 2.16), es

<sup>103</sup> Yeagle, P. L. *The structure of biological membranes*, CRC Press, New York, **1992**.

<sup>104</sup> Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lehninger, Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, Nueva York, **2000**.

moderadamente fluorescente, y puede ser convertido en su isómero todo-(*E*)-octadeca-9,11,13,15-tetraenoico o ácido *trans*-parinárico (*t*-PnA) (**1**). La aplicación de ambos ácidos como sondas de membrana se debe a Sklar y colaboradores.<sup>105</sup> Sus propiedades químicas y físicas están bien caracterizadas.<sup>106,107</sup> El cromóforo de estas sondas lineales (un tetraeno conjugado) es una unidad rígida en la que los momentos dipolares de absorción y emisión se disponen preferentemente a lo largo de la cadena, lo que facilita la interpretación de los experimentos de anisotropía de fluorescencia. También presentan ventajas por algunas de sus propiedades ópticas, ya que muestra un gran desplazamiento de Stokes (~100 nm) y la fluorescencia es prácticamente inexistente en disolución acuosa. Sin embargo, otras características son menos satisfactorias, como el bajo rendimiento cuántico de fluorescencia (<0.07), su poca estabilidad química y fotoquímica, la muy corta vida media de fluorescencia, y la complejidad de la cinética de la emisión, todo lo cual ocasiona serios problemas en su utilización como sondas de membrana. A esto hay que añadir que el espectro de absorción tiene máximos hacia 300 y 320 nm, lo que limita sus potenciales aplicaciones biológicas.

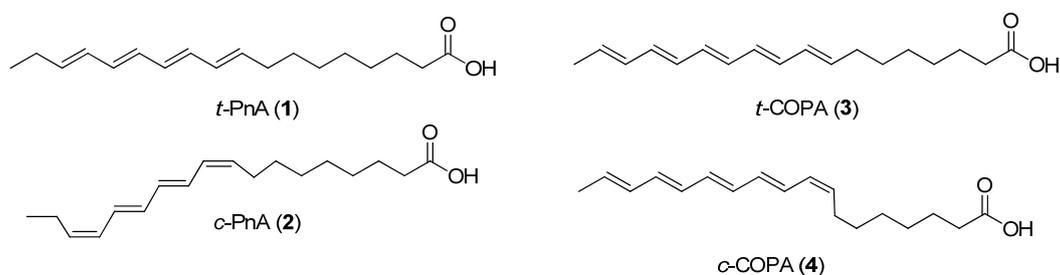


Figura 2.16. Ácidos *trans*- y *cis*-parináricos (**1** y **2**) y *trans*- y *cis*-COPA (**3** y **4**).

Buscando eliminar o disminuir estas limitaciones, nuestro grupo ha diseñado y sintetizado una serie de ácidos carboxílicos básicamente similares a los ácidos parináricos, pero con cinco dobles enlaces conjugados y longitudes de cadena de 12, 15 y 18 átomos de carbonos.<sup>108</sup> Dos de ellos, los ácidos *trans*- y *cis*-COPA (Conjugated

<sup>105</sup> Sklar, L. A., Hudson, B., Simoni, R. D. *Biochemistry* **1977**, *16*, 819-828.

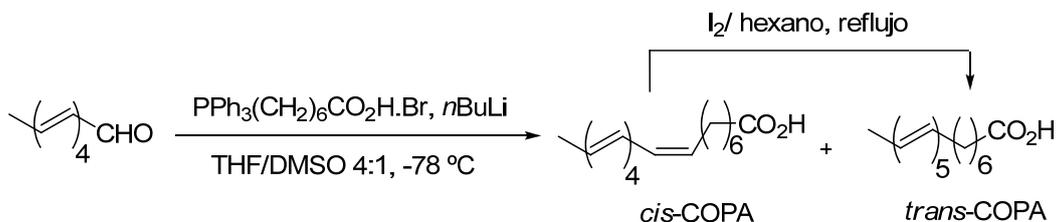
<sup>106</sup> Hudson, B. S., Cavalier, S., en *Spectroscopic Membrane Probes*, Loew, L. M. Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, EEUU, **1988**, *1*, 43-62.

<sup>107</sup> a) Castanho, M., Prieto, M. E., Acuña, A. U. *Biochim. Biophys. Acta.* **1996**, *1279*, 164-168. b) Mateo, C. R., Acuña, A. U., Brochon, J. C. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 978-987.

<sup>108</sup> Souto, A. A., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5907-5910.

OctadecaPentaenoic Acids) (**3** y **4**, respectivamente, Figura 2.16) han demostrado una gran sensibilidad a los cambios de orden y dinámica de bicapas lipídicas.<sup>109</sup>

La síntesis de estos ácidos se llevó a cabo por aplicación de la reacción de olefinación de Wittig al aldehído todo-(*E*)-deca-2,4,6,8-tetraenal (obtenido con un 49 % de rendimiento global mediante dos sucesivas elongaciones a partir de (2*E*,4*E*)-hexa-2,4-dienal). La isomerización a todo-(*E*) se llevó a cabo en un último paso por tratamiento con trazas de yodo en hexano (Esquema 2.22).



Los dos ácidos COPA son razonablemente estables en disolución, presentan una intensa banda de absorción en el ultravioleta próximo ( $\epsilon_{350 \text{ nm}} \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) que solapa muy bien la emisión de fluorescencia del triptófano, y una banda de emisión de fluorescencia centrada a 470 nm, con un rendimiento cuántico de  $\sim 0.2$ . Los experimentos de transferencia de energía resonante en bicapas lipídicas, desde los residuos de triptófano del péptido Gramicidina al ácido *t*-COPA, demostraron que esta sonda es un aceptor de la energía de excitación del triptófano proteico, con valores de la distancia  $R_0$  de 30-34 Å.<sup>109</sup>

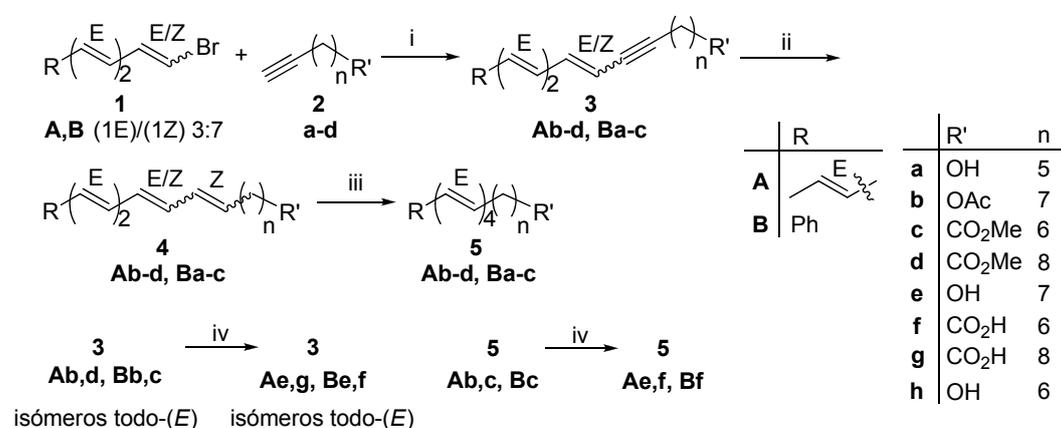
El grupo de Thiele ha utilizado estos compuestos para estudios de biosíntesis lipídica y marcado fluorescente de dominios en membranas celulares (*rafts*). Así se ha demostrado que un precursor lipídico etiquetado con el fluoróforo *t*-COPA se incorpora de manera satisfactoria a células de mamíferos, sin alterar su metabolismo. Además, también demostraron, mediante microespectroscopía de dos fotones, que se pueden visualizar con un gran contraste los microdominios celulares en los que se incorpora el cromóforo pentaénico.<sup>110</sup>

<sup>109</sup> Mateo, C. R., Souto, A. A., Amat-Guerri, F., Acuña, A. U. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2177-2191.

<sup>110</sup> Kuerschner, L., Ejsing, C. S., Ekroos, K., Shevchenko, A., Anderson, K. I., Thiele, C. *Nat. Methods* **2004**, *2*, 39-45.

### 2.5.3.2 Fenilpolienos fluorescentes

Las propiedades espectroscópicas del grupo pentaeno conjugado se pueden mejorar considerablemente mediante la sustitución del doble enlace terminal por un grupo fenilo, lo cual conlleva un incremento relativamente modesto del tamaño molecular. En este sentido, y con el objetivo de preparar análogos fluorescentes de lípidos con grupos polienos y fenilpolienos, nuestro grupo ha desarrollado recientemente una metodología general para la síntesis de moléculas anfipáticas con estos cromóforos lipofílicos. Las estructuras de estos lípidos poseen grupos conjugados todo-(*E*)-pentaeno, tetraenino,  $\omega$ -feniltetraeno y  $\omega$ -feniltrienino enlazados a restos polares (acetoxi, alcohol, ácido carboxílico o ésteres metílicos) mediante una cadena alquílica lineal. La síntesis de los análogos se basa en la *aproximación acetilénica*. Los dobles enlaces con geometría *cis* se isomerizaron a *trans* con yodo/hexano, y la hidrólisis de los ésteres se realizó en medio alcalino (Esquema 2.23).<sup>111</sup>



Esquema 2.23. Reactivos y condiciones: i) **1:2** = 1.3 (molar), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>2</sub>NH, THF, t.a., 1–3 h; ii) Zn/Cu/Ag, MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1, t.a., 24 h; iii) I<sub>2</sub> (traza), hexano, 15 min ref; iv) KOH, EtOH, t.a., 3 h.

Los análogos con grupo todo-(*E*)-feniltetraeno **5B** presentan su máximo de absorción a 342 nm en DMSO, con coeficientes de absorción molar cercanos a 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. La emisión de fluorescencia en este disolvente aparece a 467 nm, con un gran desplazamiento de Stokes (Figura 2.17). El máximo de absorción se desplaza a longitudes de onda superiores cuando los análogos se incorporan a vesículas

<sup>111</sup> Quesada, E., Delgado, J., Hornillos, V., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2285-2295.

unilaminares gigantes (LUV) de 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fofatidilcolina, mientras que el espectro de emisión permanece prácticamente invariable con la polaridad del disolvente. El rendimiento cuántico de fluorescencia en vesículas lipídicas es 0.24, mientras que en EtOH es 0.15. Los análogos **3B** con el grupo todo-(*E*)-feniltrienino, no presentan variaciones significativas respecto a los anteriores, aunque mostraron ser más fotoestables.

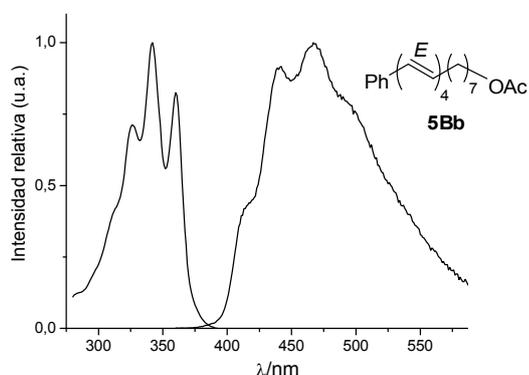


Figura 2.17. Espectros de absorción y de fluorescencia corregida del acetato de todo-(*E*)-feniltetraeno **5Bb** en disolución de DMSO. Concentraciones:  $2 \times 10^{-5}$  M (absorción),  $2 \times 10^{-6}$  M (emisión);  $\lambda_{\text{exc}} = 347$  nm; 22 °C.

Otro tipo de fenilpolieno es todo-(*E*)-1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH, Figura 2.18), una sonda fluorescente muy utilizada para el estudio de membranas debido a sus favorables propiedades fotofísicas (de entre las que cabe destacar su elevado rendimiento cuántico de fluorescencia) y a la abundante información disponible sobre su comportamiento difusional en bicapas.<sup>112,113</sup> Es una molécula relativamente rígida, con simetría cilíndrica, y su carácter lipofílico hace que se localice preferentemente en la parte más interna de las bicapas lipídicas, distribuyéndose entre las fases gel y fluida con igual afinidad. Sin embargo, precisamente debido a su carácter no polar y a su gran lipofilia, no es fácil determinar su localización exacta en el interior de la membrana. Esta

<sup>112</sup> a) Dale, R. E. *Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology*, NATO ASI, serie A 69, Plenum Press, Nueva York, **1988**. b) Shinitzky, M., Barenholz, Y. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 2652-2657. c) Lackowicz, J. R., Prendergast, F. G., Hogen, D. *Biochemistry* **1979**, *18*, 508-519. d) Engel, L. W., Prendergast, F. G. *Biochemistry* **1981**, *20*, 7338-7345.

<sup>113</sup> Para algunas aplicaciones, véase: a) Pap, E. H., Horst, J. J., van Hoek, A., Visser, A. J. W. G. *Biophys. Chem.* **1994**, *48*, 337-351. b) Lentz, B. R. *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 99-116.

característica impone limitaciones importantes a la hora de interpretar los experimentos de anisotropía de fluorescencia, y limita su utilidad.

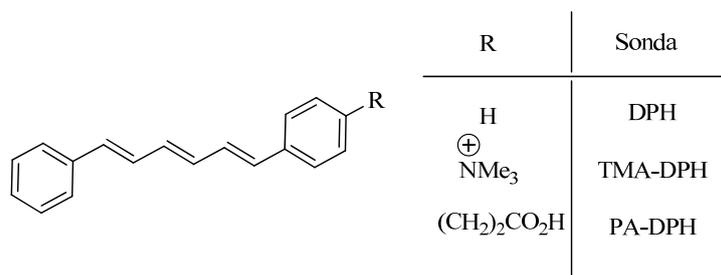


Figura 2.18. Sondas fluorescentes basadas en el grupo 1,6-difenilhexatrieno (DPH)

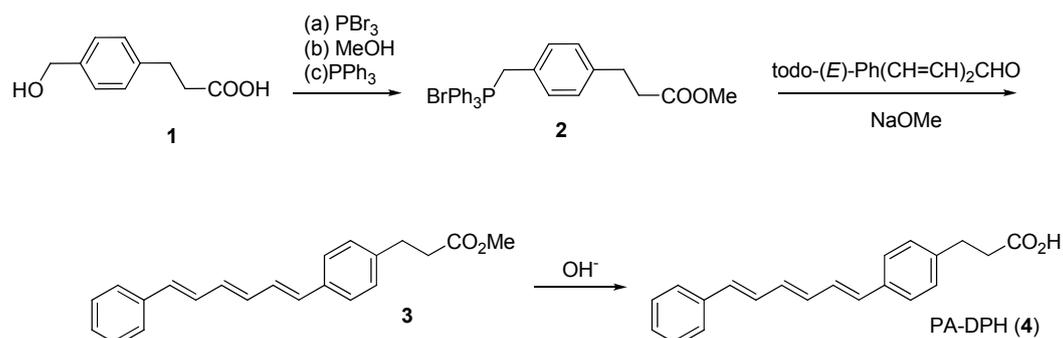
El *p*-toluensulfonato de todo-(*E*)-*N*-[*p*-(6-fenil-1,3,5-hexatrienil)fenil]trimetilamonio (TMA-DPH, Figura 2.18) se diseñó para subsanar el problema de la localización.<sup>114,115</sup> En esta molécula, la localización del fluoróforo queda establecida con menos ambigüedad, al disponer de una cabeza polar (grupo sal de amonio) en un extremo de su estructura, que se sitúa a la altura de las cabezas polares de los fosfolípidos, de forma que, en la membrana, el cromóforo queda paralelo a la parte más próxima al grupo polar de las cadenas de ácidos grasos. Esta sonda conserva sin grandes alteraciones las propiedades fotofísicas de DPH. Sin embargo, a pesar de su definida localización en el interior de la bicapa, tiene menor sensibilidad que el propio DPH para detectar la transición entre las fases gel y cristal-líquido, pues el grado de movilidad de las cadenas lipídicas aumenta hacia el interior de la membrana. Otro factor importante es que su estabilidad en membranas naturales es baja, y que, además, la carga neta del extremo polar hace preveer una distribución preferente en un entorno aniónico.

El ácido todo-(*E*)-3-[*p*-(6-fenil-1,3,5-hexatrienil)fenil]propiónico (PA-DPH, Figura 2.18) fue preparado<sup>116</sup> como producto intermedio para la obtención de DPH-fosfatidilcolina. Su síntesis (Esquema 2.24) se llevó a cabo por reacción de Wittig entre bromuro de *p*-(2-metoxicarboniletíl)enciltrifenilfosfonio (**2**) y todo-(*E*)-5-fenilpentadienal. El ácido *p*-(hidroximetil)fenilpropiónico (**1**), precursor de la sal de fosfonio, se preparó a partir de ácido 4-formilcinámico mediante hidrogenación catalítica.

<sup>114</sup> Cundall, R. B., Johnson, Y., Jones, M. W., Thomas, E. W., Munro, H. Y. *Chem. Phys. Lett.* **1979**, *64*, 39-42.

<sup>115</sup> Prendergast, F. G., Haugland, R. P., Callahand, P. J. *Biochemistry*, **1981**, *20*, 7333-7338.

<sup>116</sup> Morgan, C. G., Thomas, E. W., Moras, T. S., Yiannis, P. Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *692*, 196-201.



Esquema 2.24. Síntesis de PA-DPH.

Esta sonda (4) presenta propiedades fotofísicas y difusivas similares a las observadas para DPH,<sup>117</sup> y su cromóforo se localiza en una región intermedia de la bicapa, entre las de TMA-DPH y DPH. En relación a sus análogos, presenta las ventajas de que el grupo polar es aniónico y más estable y, pese a la presencia de los anillos aromáticos, no parece perturbar la estructura de la bicapa lipídica en concentraciones inferiores al 2% molar, como demuestran los estudios calorimétricos de transición de fase.<sup>118</sup> Es presumible que se acumule en zonas eléctricamente positivas.

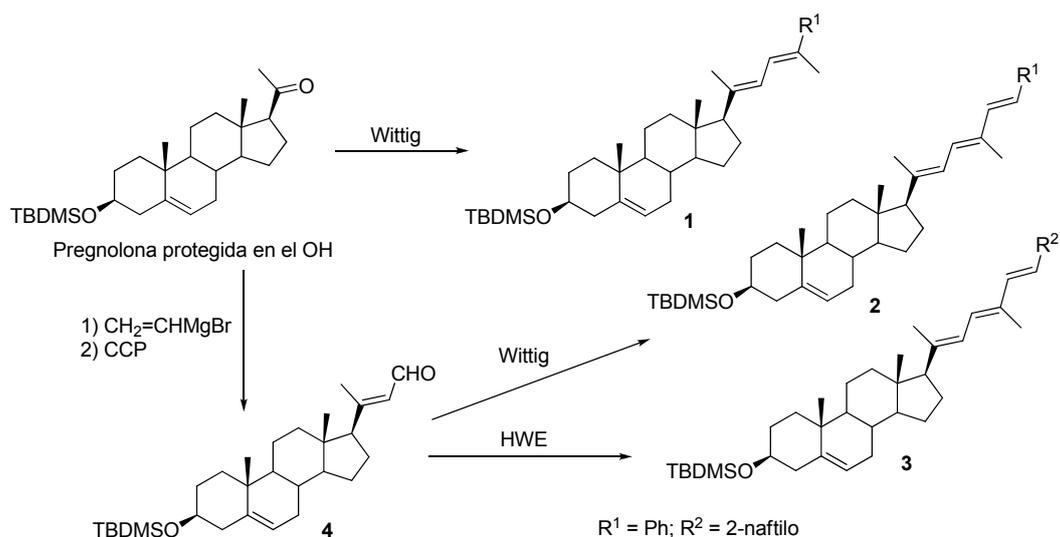
### 2.5.3.3 Análogos fluorescentes de colesterol

Se ha descrito la obtención de tres análogos fluorescentes de colesterol con grupos arildieno y ariltrieno en la cadena lateral, como sondas para el estudio y la localización de los dominios lipídicos, o *rafts*, en las membranas celulares.<sup>119</sup> La síntesis del análogo 1 se llevó a cabo por reacción de Wittig sobre pregnolona protegida en C-3 (Esquema 2.25). Para la síntesis de los análogos 2 y 3 fue necesaria la obtención del aldehído precursor 4, preparado a partir de pregnolona protegida, por adición de bromuro de vinilmagnesio, seguida de oxidación con clorocromato de piridinio (CCP). Los análogos 2 y 3 se obtuvieron por reacción de Wittig y HWE, respectivamente.

<sup>117</sup> a) Allen, M. T., Miola, L., Whitten, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3198-3206. b) Mateo, C. R., Lillo, M. P., Brochon, J. C., Martínez-Ripoll, M., Sanz-Aparicio, J., Acuña, A. U. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 3486-3491.

<sup>118</sup> Parente, R. A., Lentz, B. R. *Biochemistry* **1985**, *24*, 6178-6185.

<sup>119</sup> Drew, J., Letellier, M., Morand, P., Szabo, A. G. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4047-4052.



Esquema 2.25. Etapas clave en la síntesis de tres análogos fluorescentes de colesterol, con grupos polieno conjugado.

#### 2.5.4 Análogos poliénicos y fenilpoliénicos de Edelfosina y Miltefosina

Se presentan a continuación dos ejemplos, descritos recientemente por nuestro grupo, de la obtención de análogos fluorescentes con grupos polieno de los fármacos objetivo de este trabajo: Edelfosina y Miltefosina (Figura 2.19). Ambos compuestos se han diseñado y caracterizado para la investigación de dos procesos biológicos respectivamente asociados a los fármacos originales: la apoptosis (muerte celular programada) selectiva de varios tipos de células cancerosas<sup>72</sup> y el potente efecto antiparasitario frente a organismos del tipo *Leishmania*.<sup>44</sup> En estos dos procesos, aparentemente tan diferentes, el efecto biológico se produce por el mismo tipo de moléculas fosfolipídicas. En el apartado correspondiente de estos Antecedentes se da una descripción más detallada sobre estos compuestos y su uso terapéutico. Ambas moléculas son de origen sintético, tienen una estructura relativamente simple y con claras similitudes, y presentan además propiedades anfífilicas. Sin embargo, ni Edelfosina ni Miltefosina disponen de grupos emisivos de fluorescencia intrínseca. Por esta razón se sintetizó la primera generación de análogos emisivos de ET y MT incorporando grupos fenilpoliénicos.

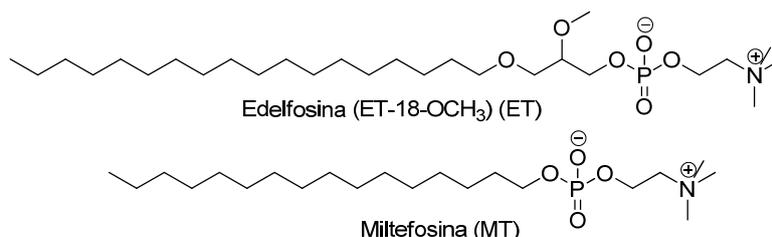
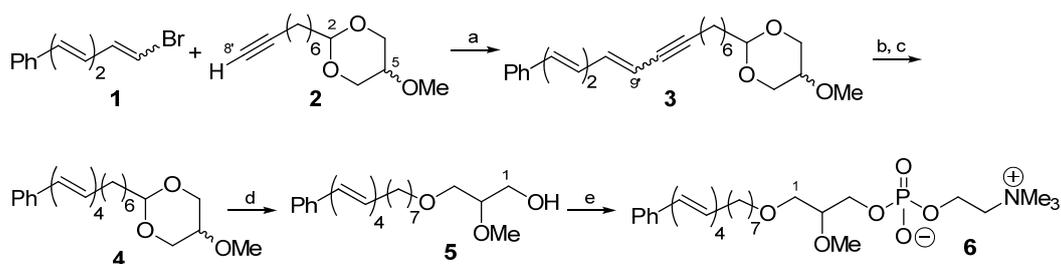


Figura 2.19. Edelfosina y Miltefosina.

Los análogos fluorescentes de Edelfosina sintetizados poseen un grupo  $\omega$ -feniltetraenilheptilo y  $\omega$ -feniltrieninilheptilo, en lugar del resto *n*-octadecilo de la posición 1 de la glicerina. La síntesis del primer análogo (**6**) (Esquema 2.26) se llevó a cabo por reacción de Sonogashira-Hagihara entre el fenilbromotrieno **1** (utilizado como mezcla de isómeros 3:7 (1*E*)/(1*Z*)) y el *cis*- o *trans*-1,3-dioxano **2** con un grupo acetileno al final de la cadena en la posición 2. Ambos alquinos **2** se obtuvieron de forma simultánea por acetalización de non-8-inal con *rac*-2-*O*-metilglicerol. La proporción inicial 3:7 (*E*)/(*Z*) de diastereoisómeros en **1** no varió después de la reacción, y *cis*-**3** y *trans*-**3** se aislaron como la misma mezcla (*E*)/(*Z*) inicial. Ambos isómeros se separaron por precipitación selectiva en *n*-pentano. Tras la reducción parcial del triple enlace e isomerización con yodo de los tetraenos resultantes, se obtuvieron los correspondientes tetraenos todo-(*E*)-*cis*-**4** y todo-(*E*)-*trans*-**4**, que se cambiaron a los alcoholes todo-(*E*)-**5** por apertura reductiva con DIBAL-H. La introducción del grupo fosfatidilcolina en **5** condujo al análogo de Edelfosina **6** con rendimientos moderados (23-35 %).<sup>120</sup>

Mientras que el análogo **6** induce muerte celular programada en células humanas T-leucémicas, no se observó ningún tipo de actividad apoptótica para el alcohol **5**, que carece del grupo fosfatidilcolina y que se utilizó como control. El análisis de incorporación celular por microscopía de fluorescencia reveló que el fármaco fluorescente **6** se incorporó en grandes cantidades a células leucémicas, pero no a células normales. Además, la distribución intracelular del análogo no es totalmente homogénea, sino que se acumula en pequeños dominios de la membrana plasmática (*rafts*) (Figura 2.20).

<sup>120</sup> Quesada, E., Delgado, J., Gajate, C., Mollinedo, F., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5333-5335.



Esquema 2.26. (a) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>2</sub>NH, THF, t.a., 2 h, 90%; (b) Zn(Cu/Ag), MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1, t.a., 24 h, 95%; (c) I<sub>2</sub> (traza), hexano, 15 min ref., 95%; (d) DIBAL-H, MePh, 0°C, 93-99%; (e) i) 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-oxido, Me<sub>3</sub>N, acetonitrilo, -78 °C; ii) t.a., 2 h, y 70 °C, 1 h, 23-35%.

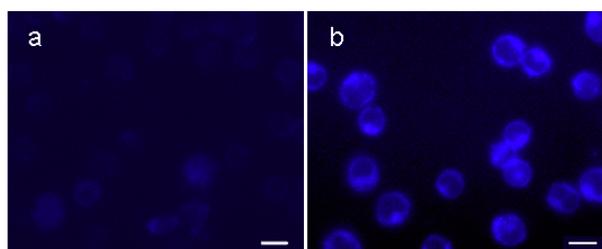


Figura 2.20. Imágenes de fluorescencia de (a) linfocitos periféricos humanos normales, y (b) células leucémicas humanas (Jurkat T), tras tratamiento con el análogo **6** (20 μM) durante 7 h. Límite de detección ~5 μM. Barra, 10 μm.

Más recientemente se ha descrito el diseño, la síntesis, y la actividad leishmanicida de los análogos de Miltefosina todo-(*E*)-13-feniltrideca-6,8,10,12-tetraenilfosfatidilcolina (PTE-MT) y todo-(*E*)-13-feniltrideca-8,10,12-trien-6-inilfosfatidilcolina (PTRI-MT).<sup>121</sup> Su síntesis (Esquema 2.27) se ha llevado a cabo usando el mismo paso clave que en la del análogo de Edelfosina **6**. El alcohol todo-(*E*)-**8** (PTRI-OH) se separó fácilmente de la mezcla de isómeros (8*E*)/(8*Z*) mediante precipitación selectiva con *n*-pentano de una disolución concentrada en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.<sup>122</sup>

Tras varios experimentos comparables, se concluyó que ambos análogos (PTE-MT y PTRI-MT) tienen la misma actividad citotóxica que Miltefosina frente a cultivos celulares de amastigotes de *L. pifanoi*, y menor actividad, aunque suficiente, frente a

<sup>121</sup> Saugar, J. M., Delgado, J., Hornillos, V., Luque-Ortega, J. R., Amat-Guerri, F., Acuña, A. U., Rivas, L. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5994-6003.

<sup>122</sup> El titular de la presente Memoria de Tesis Doctoral colaboró activamente en el desarrollo del trabajo experimental de estas síntesis.

cultivos celulares de promastigotes de *L. donovani*. Dado que los correspondientes alcoholes precursores **8** y **9** carecen de actividad, se concluyó que la actividad citotóxica no viene dada por la presencia de los grupos polieno. Los estudios de microscopía confocal utilizando el análogo más fotoestable PTRI-MT (**11**) revelaron que la distribución intracelular de MT en promastigotes de *L. donovani* es uniforme en toda la célula, sin acumulación privilegiada en ningún orgánulo (Figura 2.21).

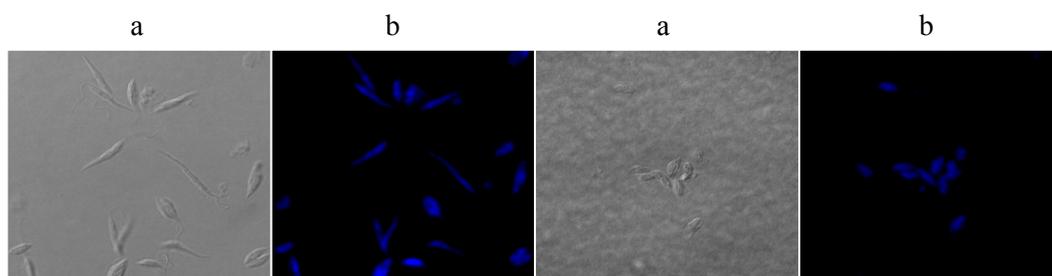
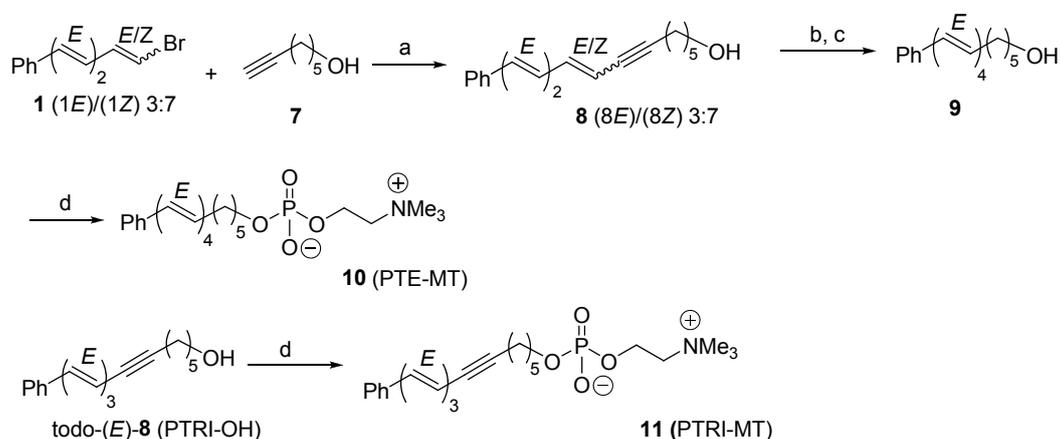


Figura 2.21. Parásitos de *Leishmania* marcados con PTRI-MT: (a) visualizados con microscopía de transmisión; (b) visualizados con microscopía confocal. Los parásitos se incubaron 4 h con  $7.5\ \mu\text{M}$  PTRI-MT. Valores del microscopio:  $\lambda_{\text{exc}}$  351 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  460 nm.

## 2.6 El cromóforo BODIPY: estructura, síntesis, propiedades espectroscópicas y aplicaciones

### 2.6.1 Estructura básica

Entre la gran variedad de cromóforos conocidos, el grupo difluoroborodipirrometeno (BODIPY) está aceptado como uno de los más útiles para el diseño de sondas y etiquetas fluorescentes, gracias a sus favorables propiedades espectroscópicas y a su lipofilia. El primer miembro de esta familia de colorantes fue descubierto por casualidad por Treibs y Kreuzer<sup>123</sup> en 1968, mientras se intentaba la acetilación, catalizada por  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ , de 3,5-dimetilpirrol. Sin embargo, hasta el final de los 80 no se retomó el estudio y las aplicaciones de estos colorantes.<sup>124</sup> Desde entonces, el uso de este grupo en diversas aplicaciones se ha incrementado de manera exponencial. Muchos compuestos de esta familia se comercializan<sup>125</sup> como sondas para el etiquetado de una gran variedad de moléculas de interés biológico bajo el nombre de BODIPY, convirtiéndose en un sustituto más fotoestable de la fluoresceína.

La reacción de trifluoruro de boro con un dipirrometeno conduce a la formación de un dipirrometeno. $\text{BF}_2$  que podría asimilarse a una cianina cíclica (Figura 2.22). Además, como veremos más adelante, el grupo BODIPY combina las excelentes propiedades espectroscópicas de las cianinas, como su alto coeficiente de absorción molar o sus estrechas bandas de absorción, con valores del rendimiento cuántico de fluorescencia que, dependiendo de sus sustituyentes, pueden ser cercanos a la unidad. El grupo BODIPY presenta conjugación electrónica a lo largo de todo su esqueleto y esta conjugación puede extenderse fuera de éste mediante la incorporación de sustituyentes insaturados.

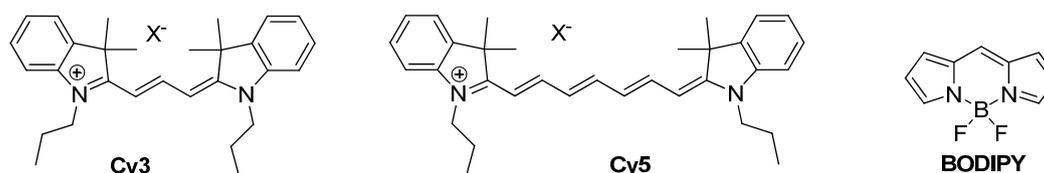


Figura 2.22. Estructura química de las cianinas Cy3, Cy5 y del cromóforo BODIPY

<sup>123</sup> Treibs, A., Kreuzer, F. H. *Liebigs Ann. Chem.* **1968**, 718, 208-223.

<sup>124</sup> Shah, M., Thangraj, K., Soong, M. L., Wolford, L., Boyer, J. H., Politzer, I. R., Pavlopoulos, T. G. *Heteroatom Chem.* **1990**, 1, 389-399.

<sup>125</sup> Molecular Probes; <http://probes.invitrogen.com>.

El sistema de numeración IUPAC para el grupo BODIPY es diferente del utilizado para los dipirrometenos.<sup>126</sup> Además, por analogía con las porfirinas, en el grupo BODIPY las posiciones 3 y 5 se llaman  $\alpha$ , y la 8 *meso*. (Figura 2.23).



Figura 2.23. Estructura y numeración del núcleo BODIPY y de su dipirrometeno precursor

El esqueleto básico de BODIPY no se conoce, ya que al carecer de sustituyentes reacciona fácilmente con muchos electrófilos. Sin embargo, se conoce el correspondiente dipirrometeno precursor, aunque se descompone a temperaturas superiores a  $-30$  ó  $-40$  °C.<sup>127</sup> Tampoco se conocen los otros tres compuestos de la Figura 2.24,<sup>128</sup> lo que refleja las limitaciones sintéticas existentes para las estructuras más simples del grupo BODIPY.

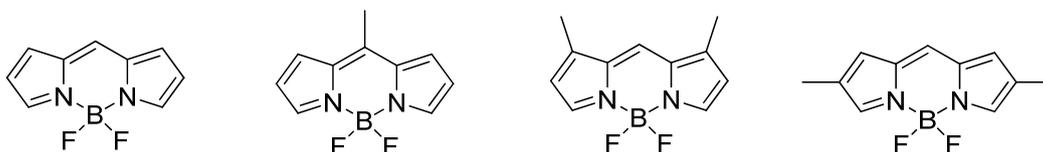


Figura 2.24. Algunos BODIPYs desconocidos

## 2.6.2 Síntesis de BODIPYs simétricos

### 2.6.2.1 Condensación de pirroles con cloruros de ácido o anhídridos

La forma más directa de preparar BODIPYs simétricos y mesosustituídos es la condensación entre cloruros de ácido y  $\alpha$ -H pirroles (Esquema 2.28).<sup>124,129</sup> Los hidroccloruros de dipirrometeno intermedios se pueden aislar, pero generalmente se hacen

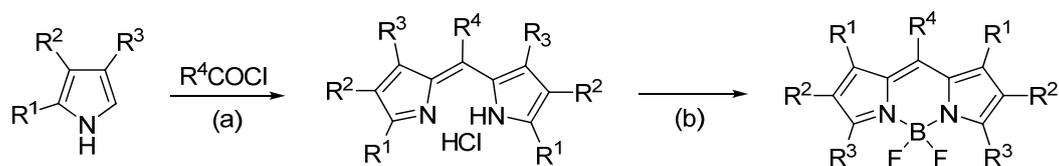
<sup>126</sup> Dixon, H. B. F., Cornish-Bowden, A., Liebecq, C., Loening, K. L., Moss, G. P., Reedijk, J., Velick, S. F., Venetianer, P., Vliegthart, J. F. G. *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 779.

<sup>127</sup> Van, Koevinge, J. A., Lugtenburg, J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1977**, *96*, 55.

<sup>128</sup> Wael, E. V. D., Pardoën, J. A., Koevinge, J. A. V., Lugtenburg, J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* **1977**, *96*, 306.

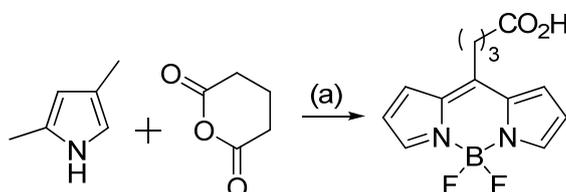
<sup>129</sup> Boyer, J. H., Haag, A. M., Sathyamoorthi, G., Soong, M. L., Thangaraj, K., Pavlopoulos, T. G. *Heteroatom Chem.* **1993**, *4*, 39.

reaccionar *in situ* con  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  en presencia de una base, para formar el correspondiente colorante.



Esquema 2.28. Síntesis de colorantes BODIPY simétricos a partir de cloruros de ácido y pirroles. Reactivos y condiciones: (a)  $\text{CHCl}_3$ ,  $40^\circ\text{C}$ , 1 h, éter de petróleo,  $25^\circ\text{C}$ , 12 h; (b)  $i\text{Pr}_2\text{EtN}$ , MePh,  $25^\circ\text{C}$ , 15 min,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ,  $80^\circ\text{C}$ , 15 min.

En esta reacción también pueden usarse anhídridos (Esquema 2.29). Cabe destacar que en este caso se genera un grupo carboxílico que puede ser utilizado para incorporar el colorante como sonda a una molécula diana.<sup>130</sup>



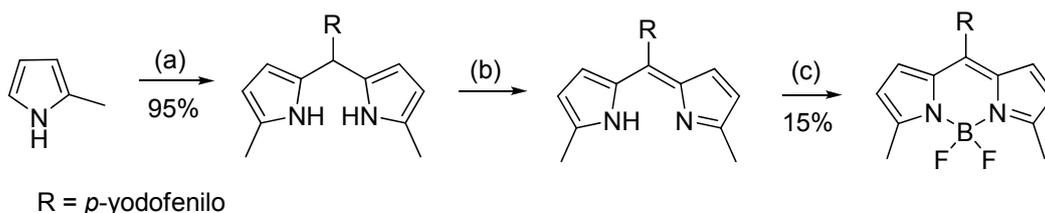
Esquema 2.29. Síntesis de colorantes BODIPY a partir de anhídrido glutámico. Reactivos y condiciones: (a)  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ , reflujo, 5 h, luego  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $25^\circ\text{C}$ , 12 h.

### 2.6.2.2 Condensación de pirroles y aldehidos

La síntesis de BODIPYs simétricos también puede llevarse a cabo a través de la condensación de aldehidos aromáticos con pirroles, en medio ácido. Se obtiene así un dipirrometano intermedio que es necesario oxidar a dipirrometeno, antes de la reacción con  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (Esquema 2.30).<sup>131</sup> Existe una gran variedad de reactivos para llevar a cabo la oxidación. El más comúnmente usado es 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ), aunque si se requieren condiciones más suaves el oxidante puede ser *p*-cloranilo.

<sup>130</sup> Li, Z., Mintzer, E., Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1718.

<sup>131</sup> Wagner, R. W., Lindsey, J. S. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1373-1380



Esquema 2.30. Síntesis de BODIPYs a partir de aldehidos. Reactivos y condiciones: (a) R-CHO, 1 mM TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25°C, 1.5 h; (b) *p*-cloranilo, PhMe, 25°C, 5 min; (c) Et<sub>3</sub>N, BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, PhMe, 25°C, 1 h.

Trabajando con pirrol sin sustituir, las condiciones óptimas para la reacción consisten en el empleo de un aldehido aromático y un gran exceso de pirrol (100 equivalentes), en presencia de un ácido de Lewis débil como catalizador.<sup>132</sup> Mediante esta metodología se han preparado BODIPYs simétricos sustituidos únicamente en la posición 8. En este caso, los cloruros de ácido no se podrían emplear, porque reaccionarían con las posiciones libres del pirrol.

### 2.6.2.3 Síntesis de BODIPYs asimétricos

La condensación en medio ácido de un 2-formilpirrol con un  $\alpha$ -H-pirrol genera un dipirrometeno con la posición *meso* libre. Este procedimiento es conocido como acoplamiento de MacDonald, por analogía con una reacción similar de la química de porfirinas desarrollada por este químico canadiense.<sup>133</sup> Los catalizadores ácidos más comunes utilizados en esta condensación son el ácido bromhídrico<sup>134</sup> y oxiclورو de fósforo (POCl<sub>3</sub>).<sup>135</sup> Este acoplamiento es adecuado para la síntesis de dipirrometenos asimétricos. Utilizando este procedimiento, Meltola y col.<sup>136</sup> han sintetizado una serie de reactivos diseñados para el etiquetado fluorescente de inmunoglobulina G (Esquema 2.31). Estos BODIPYs están conjugados en su posición 5 con diversos sustituyentes, para desplazar al rojo los máximos de absorción y emisión. Además, presentan en la posición 6 un espaciador que incrementa la solubilidad en agua de las sondas y que sirve para unir el fluoróforo y la molécula diana. Se han sintetizado así, condensando un pirrol

<sup>132</sup> Baruah, M., Qin, W., Basaric, N., De Borggraeve, W. M., Boens, N. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4152-4157.

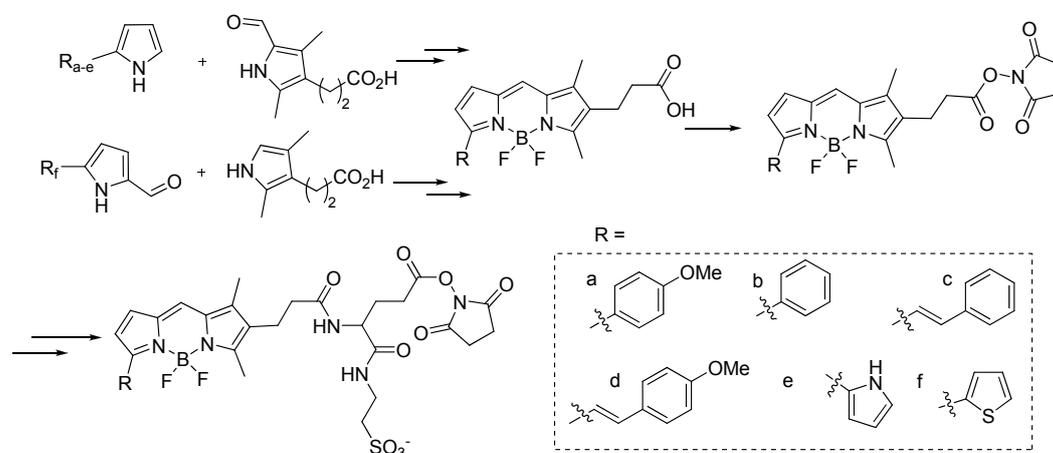
<sup>133</sup> Arsenault, G. P., Bullock, E., MacDonald, S. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4384-4396.

<sup>134</sup> Al-Sheikh-Ali, A., Cameron, K. S., Cameron, T. S., Robertson, K. N., Thompson, A. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4773.

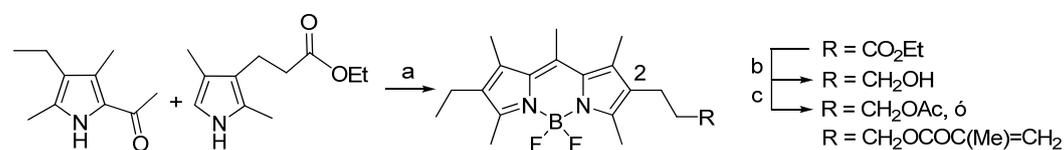
<sup>135</sup> Wan, C.-W., Burghart, A., Chen, J., Bergstroem, F., Johansson, L. B.-A., Wolford, M. F., Kim, T. G., Topp, M. R., Hochstrasser, R., Burgess, K. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4430-4441.

<sup>136</sup> Meltola, N. J., Wahlroos, R., Soini, A. E. *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 635-647.

con un sustituyente formilo en  $\alpha$  y un  $\alpha$ -H pirrol, una serie de colorantes como los mostrados. Debido a la inestabilidad de 2-(tiofen-2-il)-1*H*-pirrol ( $R_f$ ), incluso a bajas temperaturas, se llevó a cabo la  $\alpha$ -formilación del mismo, a fin de estabilizarlo.



En la búsqueda de medios activos láser eficientes y fotoestables, se ha sintetizado<sup>137</sup> un análogo de 2,6-dietil-1,3,5,7,8-pentametil-4,4-difluoro-4-bora-3*a*,4*a*-diaz-a-indaceno (PM 567) con un grupo polimerizable en el sustituyente de la posición 2, y se han estudiado sus propiedades en forma de copolímero con metacrilato de metilo (Esquema 2.32).



Esquema 2.32. Reactivos y condiciones: a)  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ , reflujo, 12 h, luego  $\text{Et}_3\text{N}$ , reflujo, 1 h, luego  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ , reflujo, 3 h; b) DIBAL, THF, Ar,  $-78^\circ\text{C}$ , 3 h; c)  $\text{AcCl}$  o cloruro de metacrililo,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Ar,  $0^\circ\text{C}$ , luego t.a., 24 h.

Otro procedimiento usado para la síntesis de BODIPYs asimétricos se basa en la condensación en medio ácido de 2-halometil- o 2-acetoximetilpirroles con los adecuados

<sup>137</sup> García-Moreno, I., Amat-Guerri, F., Lira, M., Costela, A., Infantes, L., Sastre, R., López Arbeloa, F., Bañuelos, J., López Arbeloa, I. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 3088-3098.

$\alpha$ -H pirroles. En este caso, la reacción transcurre a través de un catión carbinol intermedio (Esquema 2.33).<sup>138</sup>



X = OAc, Br, Cl      R<sub>1-6</sub> = alquilo o arilo

Esquema 2.33

## 2.6.3 Reactividad del grupo BODIPY

### 2.6.3.1 Sustitución electrófila

En las estructuras resonantes clásicas del núcleo de BODIPY, la densidad de carga positiva se sitúa con preferencia sobre las posiciones 1, 3, 5 y 7, por lo que las posiciones 2 y 6 serán las más susceptibles de ataque electrófilo (Figura 2.25). Sin embargo, no existen estudios concluyentes sobre la regioselectividad de esta reacción, ya que, invariablemente, algunas de las posiciones del núcleo siempre se encuentran ocupadas.

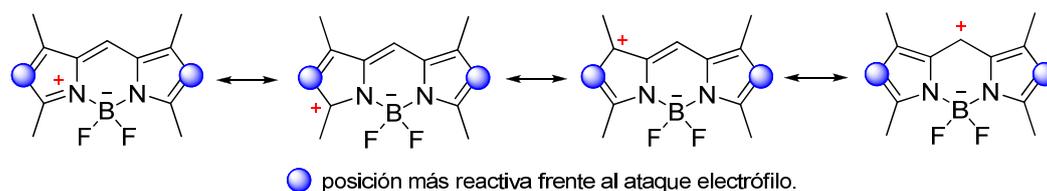
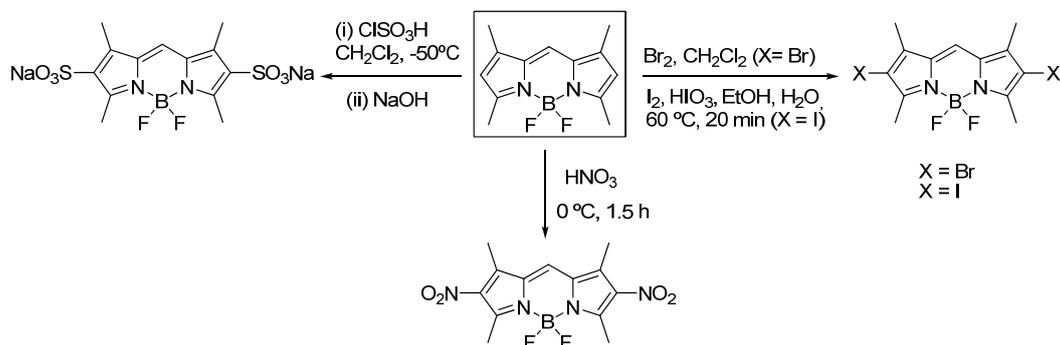


Figura 2.25.

El primer ejemplo de sustitución electrófila sobre el núcleo de BODIPY se describió en el trabajo pionero de Treibs y Kreuzer.<sup>123</sup> Estos autores sulfonaron las posiciones 2 y 6 de 4,4-difluoro-2-yodo-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno con ácido clorosulfónico. La reacción fue utilizada años más tarde<sup>129</sup> para la obtención de BODIPYs solubles en medio acuoso. De modo similar, se han introducido grupos

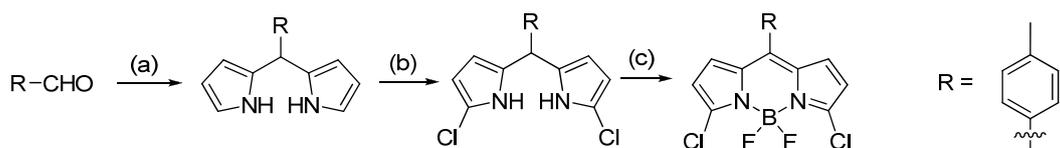
<sup>138</sup> Wood, T. E., Thompson, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1831-1861.

nitro,<sup>129</sup> bromo<sup>139</sup> o iodo<sup>140</sup> (Esquema 2.34). Los derivados halogenados pueden ser utilizados, posteriormente, en reacciones de acoplamiento catalizadas por metales de transición.



Esquema 2.34. Reacciones de SE sobre el núcleo de BODIPY

Los derivados halogenados 2,6-dibromo ó 2,6-diiodo muestran los máximos de absorción y emisión desplazados hacia el rojo. Además, el rendimiento cuántico de fluorescencia disminuye drásticamente debido al efecto de átomo pesado de los halógenos. Otro modo de introducir halógenos consiste en halogenar el dipirrometano intermedio sobre sus posiciones  $\alpha$  (Esquema 2.35).<sup>141</sup>



Esquema 2.35. Reactivos y condiciones: (a) pirrol en exceso, TFA, 25°C, 10 min; (b) NCS, THF, -78 °C, 2 h; (c) *p*-cloranilo, luego Et<sub>3</sub>N, BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub>.

### 2.6.3.2 Sustitución nucleófila sobre BODIPYs halogenados

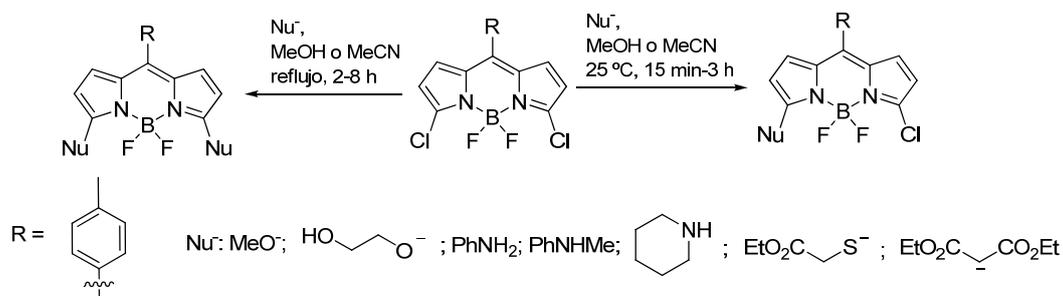
El método más directo para introducir sustituyentes en las posiciones 3 y 5 del núcleo BODIPY consiste en la síntesis *de novo* del núcleo a partir de pirroles sustituidos apropiadamente. Sin embargo, esto también puede hacerse vía sustitución nucleófila sobre 3,5-dicloro-BODIPYs.<sup>141,142</sup> Entre los nucleófilos utilizados se encuentran

<sup>139</sup> Haugland, R. P., Kang, H. C. *U.S. Patent* 4,774,339, **1988**.

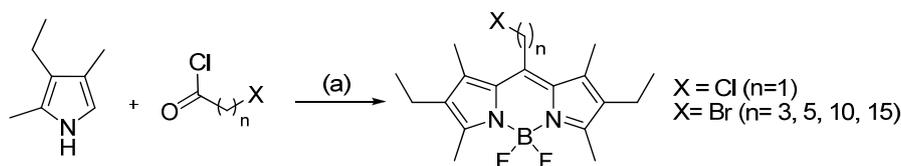
<sup>140</sup> Yogo, T., Urano, Y., Ishitsuka, Y., Maniwa, F., Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12162-12163.

<sup>141</sup> Rohand, T., Baruah, M., Qin, W., Boens, N., Dehaen, W. *Chem. Commun.* **2006**, 266.

alcóxidos, aminas, tioalcóxidos y malonato de dietilo (Esquema 2.36). Además, las reacciones pueden detenerse en la etapa de monosustitución, o bien obtener productos de disustitución, generándose de este modo productos asimétricos o simétricos y que serían difíciles de obtener por otras rutas. El estudio de las propiedades espectroscópicas de estos compuestos revela que la presencia de grupos donadores de electrones en las posiciones 3 y/o 5 desplazan hacia el rojo los máximos de absorción y emisión y disminuyen el rendimiento cuántico de fluorescencia.<sup>141</sup>



Unos BODIPYs interesantes son los que tienen una cadena  $\omega$ -halometilénica en posición 8, ya que pueden ser incorporados a moléculas de interés biológico a través de esta posición (Esquema 2.37).<sup>143</sup>



Esquema 2.37. Reactivos y condiciones: (a)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 50 °C, 2 h, luego  $\text{Et}_3\text{N}$ , 25 °C, 30 min,  $\text{PhMe-CH}_2\text{Cl}_2$  95:5, luego  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ , 50 °C, 1.5 h.

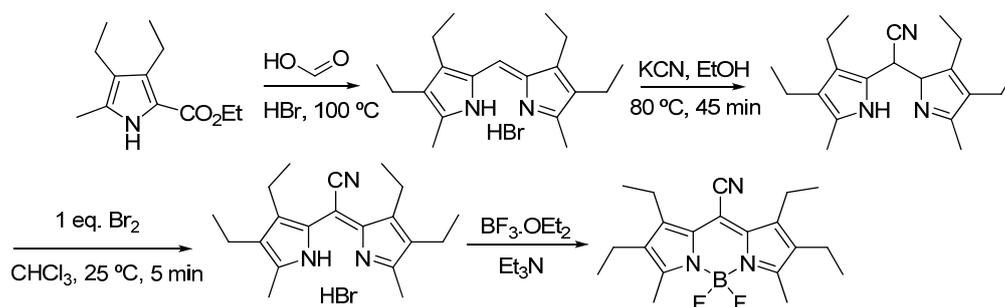
### 2.6.3.3 Adición nucleófila en la posición 8

Los 8-ciano-BODIPYs presentan su máximo de emisión considerablemente desplazado al rojo respecto a sus análogos sin grupo ciano.<sup>123</sup> Boyer y col. desarrollaron

<sup>142</sup> Baruah, M., Qin, W., Vallee, R. A. L., Beljonne, D., Rohand, T., Dehaen, W., Boens, N. *Org. Lett.* **2005**, 7, 4377-4380.

<sup>143</sup> Amat-Guerri, F., Liras, M., Carrascoso, M. L., Sastre, R. *Photochem. Photobiol.* **2003**, 77, 577-584.

una ruta para sintetizarlos basada en la adición de anión cianuro sobre el dipirrometeno correspondiente (Esquema 2.38).<sup>144</sup>



Esquema 2.38

Estos compuestos presentan el máximo de absorción desplazado al rojo unos 60 nm respecto de aquellos en los que el núcleo BODIPY contiene únicamente sustituyentes alquílicos, lo que se atribuye a la estabilización de energía que ejerce el grupo ciano sobre el LUMO. En estos compuestos también se ha observado un descenso considerable en el coeficiente de absorción molar.

#### 2.6.3.4 Condensaciones a través de metilos en 3 y 5

Cuando un BODIPY tiene grupos metilos en las posiciones 3 y 5, éstos pueden participar en reacciones tipo Knoevenagel, debido a su acidez. Así, se han obtenido derivados de BODIPYs con grupos estirenilo mediante reacciones de condensación entre 3,5-dimetil-BODIPYs y aldehidos aromáticos.<sup>145,146</sup> Cuando se utilizan *p*-dialquilaminobenzaldehidos, la reacción se puede detener en el producto de monosustitución, algo que no es posible cuando se utilizan 4-alcóxibenzaldehidos, ya que en este caso siempre se obtienen mezclas correspondientes a mono y di condensación.<sup>147</sup> Para la obtención de BODIPYs con grupos *p*-dimetilaminoestirenilo en 3 y 5 es necesario forzar las condiciones de reacción (Esquema 2.39).<sup>148</sup> El uso de radiación microondas disminuye los tiempos de reacción a tan sólo 15 minutos,

<sup>144</sup> Sathyamoorthi, G., Boyer, J. H., Allik, T. H., Chandra, S. *Heteroatom Chem.* **1994**, *5*, 403.

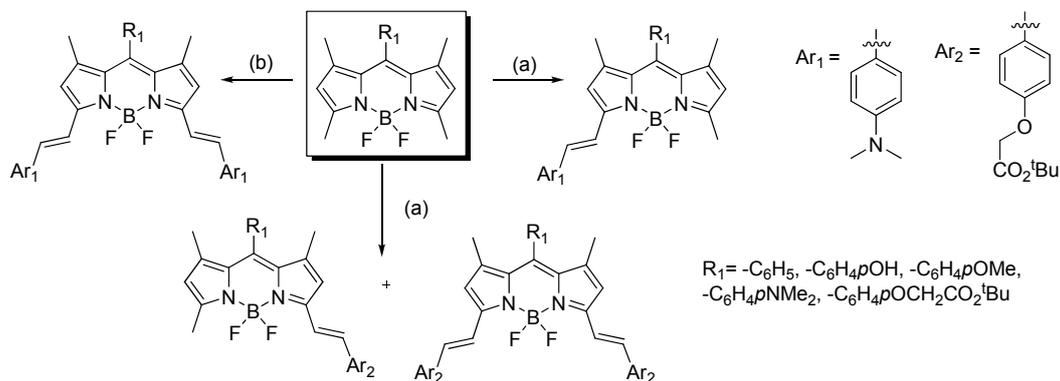
<sup>145</sup> Rurack, K., Kollmannsberger, M., Daub, J. *New J. Chem.* **2001**, *25*, 289-292.

<sup>146</sup> Coskun, A., Akkaya, E. U. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4947-4949.

<sup>147</sup> Dost, Z., Atilgan, S., Akkaya, E. U. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8484-8488.

<sup>148</sup> Yu, Y.-H., Descalzo, A. B., Shen, Z., Röhr, H., Liu, Q., Wang, Y.-W., Spieles, M., Rurack, Y.-Z., Li, K., You, X.-Z. *Chem. Asian J.* **2006**, *1*, 176-187.

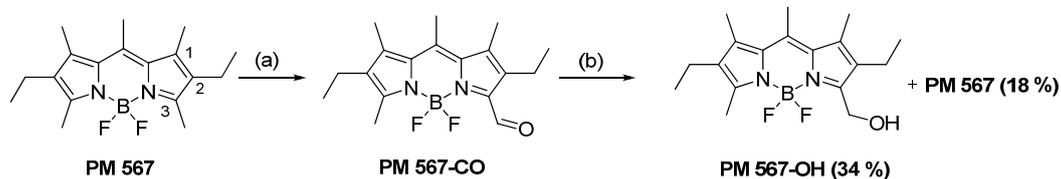
manteniendo invariables los rendimientos.<sup>149</sup> En general la presencia de los grupos estirenilo desplaza hacia el rojo el máximo de emisión de estos compuestos.



Esquema 2.39. Reactivos y condiciones: (a)  $Ar_1CHO$  ó  $Ar_2CHO$ , PhMe, AcOH, piperidina, tamiz molecular, reflujo, 26 h; (b) como en (a), 7 días.

### 2.6.3.5 Oxidación del metilo en 3

Otro interesante modo de funcionalizar 3-metil-BODIPYs consiste en la oxidación de un grupo metilo en esa posición. Generalmente, esto conduce a la obtención de un 3-formil-BODIPY. En el caso de 3,5-dimetil-BODIPYs, no se ha logrado hasta ahora obtener el producto de dioxidación a 3,5-diformil-BODIPY. Como ejemplo, se muestra la oxidación del colorante láser **PM567** con DDQ. **PM567-CO** se redujo posteriormente al correspondiente alcohol, obteniéndose como producto secundario **PM567** (Esquema 2.40).<sup>150</sup>



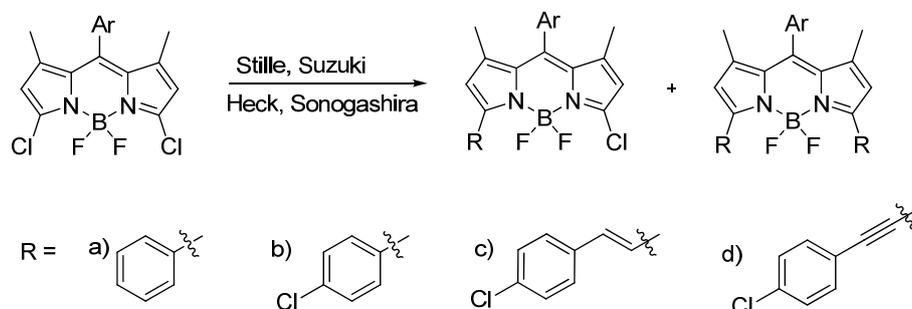
Esquema 2.40. Oxidación de **PM567** con DDQ y su reducción posterior. Reactivos y condiciones: (a) DDQ (4 eq.), THF,  $H_2O$ , 0 °C a t.a., 28 h; (b)  $H_2$ , Pd/C, EtOH (anh.), t.a., 48 h.

<sup>149</sup> Baruah, M., Qin, W., Flors, C., Hofkens, J., Vallee, R. A. L., Beljonne, D., Van der Auweraer, M., De Borggraeve, W. M., Boens, N. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 5998.

<sup>150</sup> (a) Chen, T., Boyer, J. H., Trudell, M. L. *Heteroatom Chem.* **1997**, *8*, 51-54. (b) Sathyamoorthi, G., Wolford, L. T., Haag, A. M., Boyer, J. H. *Heteroatom Chem.* **1994**, *5*, 245.

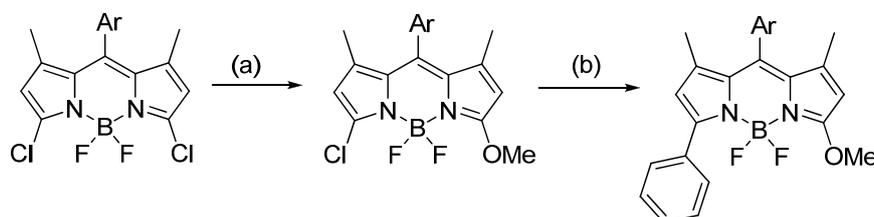
### 2.6.3.6 Reacciones de acoplamiento en las posiciones 3 y 5

Los 3,5-dicloro-8-aryl-BODIPYs se pueden funcionalizar mediante reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio, a través de los átomos de cloro. De este modo se ha sintetizado una serie de BODIPYs sustituidos en las posiciones 3 y/o 5 con arilos, ariltenilos o ariltenilos mediante reacciones de Stille, Suzuki, Heck y Sonogashira (Esquema 2.41).<sup>151</sup>



Esquema 2.41.

Nuevamente, esta sustitución desplaza hacia el rojo el máximo de fluorescencia entre 20 y 50 nm. Los derivados monosustituidos pueden ser funcionalizados nuevamente mediante un nuevo acoplamiento catalizado por paladio, o mediante una sustitución nucleófila (Esquema 2.42).<sup>152</sup>



Esquema 2.42. Reactivos y condiciones: (a) NaOMe/metanol, t.a., 30 min; (b) ácido fenilborónico, Ph(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DME, MW/150 °C, 20 min.

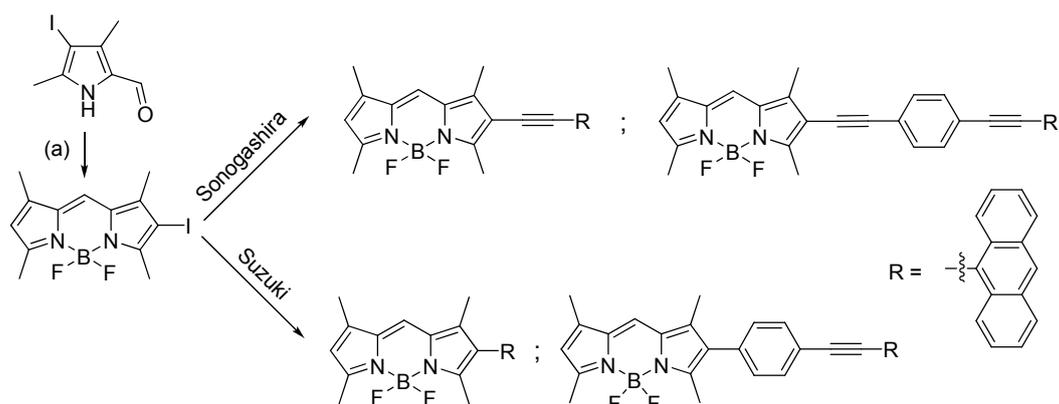
<sup>151</sup> Rohand, T., Qin, W., Boens, N., Dehaen, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4658.

<sup>152</sup> Qin, W., Rohand, T., Dehaen, W., Clifford, J. N., Driesen, K., Beljonne, D., Van Aeverbeke, B., Van der Auweraer, M., Boens, N. *J. Phys. Chem. A.* **2007**, *111*, 8588-8594.

### 2.6.3.7 Síntesis de “cassettes”

Uno de los principales problemas que presentan muchos colorantes orgánicos, incluidos los BODIPYs, es que el desplazamiento de Stokes (diferencia de energía entre los máximos de absorción y emisión) suele ser demasiado pequeño para su aplicación en microscopios de fluorescencia, lectores de placas y citómetros de flujo. Como estos instrumentos utilizan sistemas de filtros para separar los haces de excitación y de emisión de fluorescencia, la proximidad de las bandas de absorción y emisión dificulta dicha separación. En el caso de marcadores basados en la emisión de grupos BODIPYs, se evita este problema utilizando el fenómeno de transferencia no radiante de energía electrónica. Con este fin se han construido estructuras moleculares con un grupo donador y un grupo BODIPY como aceptor de energía. Se excita el grupo donador en la zona azul de longitudes de onda, y la energía de excitación, transferida al grupo BODIPY, aparece como fluorescencia de éste. Existe una gran variedad de estos compuestos, denominados *cassettes*,<sup>153</sup> muchos de ellos resultantes del anclaje de un grupo BODIPY a un núcleo de porfirina, lo que supone un aumento apreciable del tamaño del conjunto. En la búsqueda de estructuras de menor tamaño, se han sintetizado BODIPYs unidos a unidades poliaromáticas mediante reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio en las que intervienen 2-yodo-BODIPY's (Esquema 2.43).<sup>135</sup>

En todos estos compuestos se ha observado una rápida transferencia de energía en la escala de tiempos del orden del subpicosegundo.

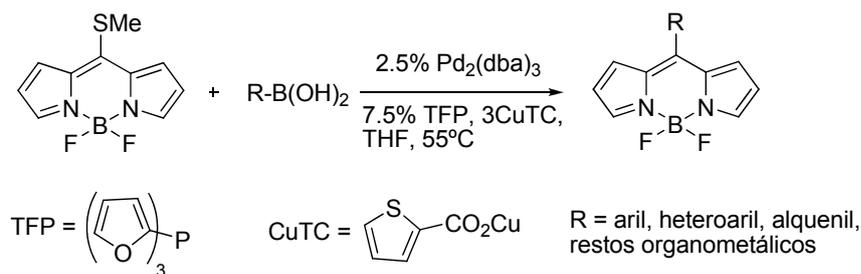


Esquema 2.43. Síntesis de cassettes. Reactivos y condiciones: (a) 2,4-dimetilpirrol,  $\text{POCl}_3$ , *n*-pentano, 0 °C, 10 min, luego  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ , PhMe, 70 °C, 2 h.

<sup>153</sup> Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.

### 2.6.3.8 Síntesis a partir de 8-metiltio-BODIPY

Recientemente, el grupo de Peña-Cabrera<sup>154</sup> ha desarrollado una metodología sintética para acceder de modo directo y eficiente a BODIPYs mesosustituídos, basada en el acoplamiento de Liebeskind-Srögl.<sup>155</sup> Para llegar a estos derivados se hizo reaccionar 8-metiltio-BODIPY con una gran variedad de ácidos borónicos, entre los que se encuentran ácidos fenil-, estirenil-, pirenil-, furil-, bifenil- y ferrocenilborónicos, utilizando como catalizador el sistema Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>/TFP. En todos los casos los rendimientos fueron buenos o excelentes y se alcanzaron conversiones de hasta el 100 %. (Esquema 2.44).



### 2.6.3.9 Sustitución de los átomos de flúor

Una estrategia que aumenta de modo considerable las posibles aplicaciones del cromóforo BODIPY consiste en la sustitución de los átomos de flúor. El primer ejemplo de esta transformación fue descrito por Murase y col. cuando sintetizaron una serie de diarilborodipirrometenos mediante el uso de fenilmagnesio.<sup>156</sup> Posteriormente, Ziessel y col. han introducido arilos,<sup>157</sup> etinilarilos,<sup>158</sup> y etinilos,<sup>159</sup> generando una biblioteca de sondas para diversas aplicaciones. Para esta transformación se han utilizado reactivos organolitados o de Grignard, dependiendo del tipo de sustrato y de las condiciones de

<sup>154</sup> Peña-Cabrera, E., Aguilar-Aguilar, A., Gonzalez-Dominguez, M., Lager, E., Zamudio-Vazquez, R., Godoy-Vargas, J., Villanueva-García, F. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3985-3988.

<sup>155</sup> Yang, H., Hao, L., Wittenberg, R., Egi, M., Huang, W., Liebeskind, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1132-1140.

<sup>156</sup> Murase, S., Tominaga, T., Kohama, A. *Eur. Patent* 1253151a, **2002**.

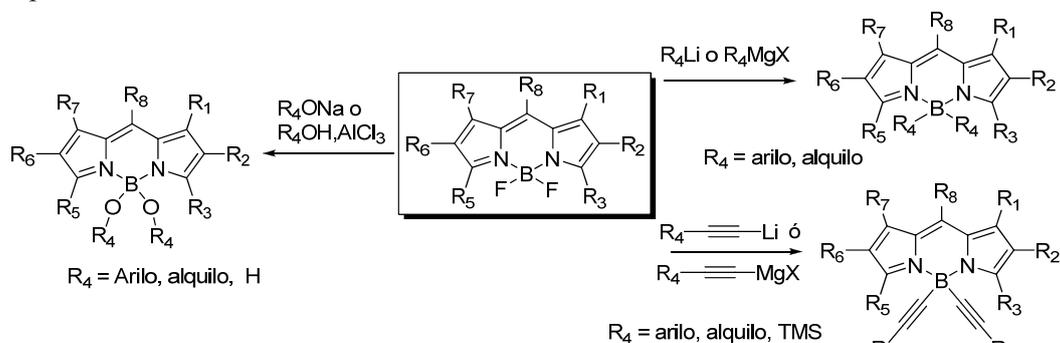
<sup>157</sup> Goze, C., Ulrich, G., Mallon, L. J., Allen, B. D., Harriman, A., Ziessel, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10231-10239.

<sup>158</sup> Goze, C., Ulrich, G., Ziessel, R. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 313-322.

<sup>159</sup> Goze, C., Ulrich, G., Ziessel, R. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4445-4448.

reacción (Esquema 2.45). De modo similar, se han sintetizado BODIPYs desplazando los átomos de flúor por grupos alcóxido.<sup>160</sup>

Estos compuestos son herramientas muy útiles en microscopía de absorción debido a su alto coeficiente de absorción molar y al desplazamiento hacia el rojo de su máximo de absorción. Además, se ha comprobado que el proceso de transferencia de energía desde los sustituyentes del boro al núcleo de BODIPY es extremadamente rápido.<sup>161</sup>



En el caso de sustituyentes aromáticos en el átomo de boro, las propiedades espectroscópicas del núcleo de BODIPY prácticamente no se afectan, si se comparan con las de las moléculas con fluor. Esto contrasta marcadamente con lo que ocurre en muchos de los ejemplos citados anteriormente, en los que las posiciones de los máximos de absorción y de fluorescencia pueden ser moduladas por los sustituyentes en un amplio entorno de longitudes de onda.

## 2.6.4 Estructuras relacionadas

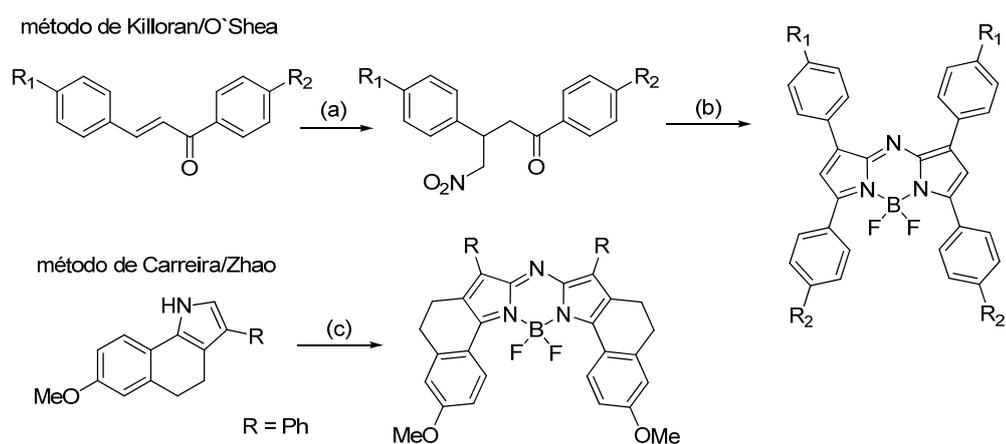
### 2.6.4.1 El grupo 8-aza-BODIPY

Recientemente ha aumentado el interés por los derivados de 4-bora-3a,4a,8-triazaindacenos (comúnmente conocidos como aza-BODIPYs) debido a sus excelentes propiedades emisoras en el rojo y en el infrarrojo cercano. Esto se atribuye a que la presencia del par electrónico del átomo de nitrógeno en 8 disminuye la diferencia de energía entre los orbitales HOMO y LUMO, respecto a un 8-C-BODIPY, lo cual ha sido confirmado mediante medidas electroquímicas y cálculos semiempíricos.

<sup>160</sup> Hiroyuki, S., Yojiro, K., Tsutayoshi, M., Keisuke, T. *Japan Patent* 11043491, **1999**.

<sup>161</sup> Harriman, A., Izzet, G., Ziessel, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10868-10875.

Aunque la primera referencia a estos compuestos se debe a Morgan y Boyer,<sup>162</sup> fueron Killoran y O'Shea y Carreira y Zhao quienes, motivados por su potencial uso como sondas para biología o como sensibilizadores en terapia fotodinámica,<sup>163</sup> desarrollaron métodos más eficientes para su obtención (Esquema 2.46). El método de Killoran/O'Shea, se basa en la adición de nitrometano a una chalcona, seguida de condensación con una sal de amonio.<sup>164</sup> En contraste, Carreira y Zhao obtuvieron una serie de derivados del grupo 8-aza-BODIPY de estructura rígida mediante la reacción de 2,5-diarilpirroles con  $\text{NaNO}_2$  en una mezcla ácido acético/anhídrido acético.<sup>165</sup> En ambos casos, los compuestos 8-aza-BODIPYs se obtuvieron por reacción con  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  en presencia de diisopropiletilamina (base de Hünig).



Esquema 2.46. Síntesis de 8-aza-BODIPYs. Reactivos y condiciones: a)  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ,  $\text{MeOH}$ , reflujo; b)  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , luego  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ , DIPEA, t.a.; c)  $\text{AcOH}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_2$ , luego  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ , DIPEA, t.a.

#### 2.6.4.2 Otras estructuras

En los últimos años han aparecido en la bibliografía nuevas estructuras análogas a la del grupo BODIPY, en las que uno o los dos anillos de pirrol se sustituyen por heterociclos como imidazol o piridina. Una reciente revisión muestra en detalle la síntesis y las propiedades de estos análogos.<sup>166</sup>

<sup>162</sup> Morgan, L. R., Boyer, J. H. *US Patent* 5446157, **1993**.

<sup>163</sup> Carreira, E., Zhao, W. *PCT Patent* WO 058448, **2006**

<sup>164</sup> Killoran, J., O'Shea, D. F. *Chem. Commun.* **2006**, 1503.

<sup>165</sup> Zhao, W., Carreira, E. M. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7254-7264.

<sup>166</sup> Loudet, A., Burgess, K. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.

## 2.6.5 Pirroles para construir el cromóforo BODIPY

### 2.6.5.1 Introducción

El material de partida para la construcción del esqueleto carbonado del grupo BODIPY proviene, casi exclusivamente, del heterociclo pentagonal pirrol. Desde que Knorr y Paal llevaran a cabo las primeras síntesis<sup>167</sup> al final del siglo XIX, el estudio y la obtención de pirroles ha sido un campo de mucha actividad dentro de la química orgánica, abarcando la síntesis de productos naturales, la química médica o la ciencia de materiales. Para avanzar en todos estos campos es necesario disponer de pirroles funcionalizados. Sin embargo, la síntesis de pirroles presenta todavía una serie de problemas que aún no se han resuelto satisfactoriamente.<sup>168</sup> Normalmente, los rendimientos en la síntesis de pirroles son bajos, por el gran número de subproductos que suelen aparecer. Además, los pirroles pueden degradarse químicamente, principalmente a través de reacciones de oxidación, lo que dificulta su síntesis, aislamiento y purificación.

En la mayor parte de la química con pirroles se emplean derivados polisustituídos y, con menos frecuencia, el esqueleto sin funcionalizar. La síntesis de los primeros puede llevarse a cabo mediante reacciones de sustitución, o mediante ciclación directa, utilizando los productos de partida adecuados.<sup>169</sup>

A continuación se presenta una perspectiva general de la síntesis y reactividad de pirroles especialmente útiles para la obtención de dipirrometenos y sus correspondientes colorantes BODIPY.

### 2.6.5.2 Reacciones de sustitución en pirroles

El heterociclo pirrol presenta exceso de densidad electrónica  $\pi$  y, por tanto, reacciona principalmente por sustitución electrófila aromática (SEA). En este sentido, la reactividad de pirrol es comparable a la de bencenos sustituidos con donadores de electrones, como la anilina o el fenol. Además, el pirrol presenta un grupo NH polar y, por tanto, una acidez similar a la de un alcohol ( $pK_a \approx 17.5$ ). En un núcleo de pirrol existen tres posiciones reactivas en las que se pueden introducir sustituyentes:  $N$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  (Figura 2.26), en función de las condiciones de reacción. Si la reactividad intrínseca no

---

<sup>167</sup> Knorr, L., Lange, K. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, 35, 2998.

<sup>168</sup> (a) Gilchrist, T. L. *Heterocyclic Chemistry*, 3<sup>a</sup>. ed.; Longman Scientific & Technical: Essex, **1997**. (b) Eicher, T., Hauptmann, S. *The Chemistry of Heterocycles*, 2<sup>a</sup>. ed.; Wiley-VCH: Weinheim, **2003**.

<sup>169</sup> Patterson, J. M. *Synthesis* **1976**, 281.

proporciona el regioisómero esperado, una vía de actuación adicional consiste en el bloqueo de algunas posiciones mediante grupos protectores.

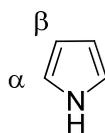
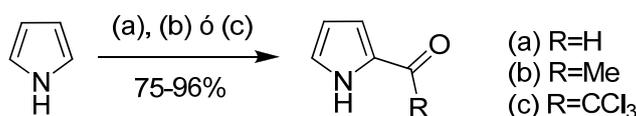


Figura 2.26. Molécula de pirrol

La sustitución electrófila sucede, preferentemente, sobre los átomos de carbono del pentaciclo. En general, el ataque electrófilo sobre la posición  $\alpha$  está cinéticamente más favorecido.

Desde el punto de vista de la obtención de pirroles como productos de partida en síntesis de BODIPYs, la reacción de sustitución electrófila más importante es la introducción de un grupo carbonilo o formilo. Existen dos procedimientos para llevar a cabo esta conversión: la reacción de Vilsmeier-Haack, empleando *N,N*-dimetilformamida (DMF) y cloruro de fosforilo ( $\text{POCl}_3$ ) en 1,2-dicloroetano, y la formilación tipo Clezy,<sup>170</sup> en la que el agente formilante se obtiene por hidrólisis de ortoformiato de alquilo en ácido trifluoroacético (Esquema 2.47). Recientemente se han desarrollado algunas variantes de esta transformación, como la acetilación catalizada por Zn, con rendimientos del 90%.<sup>171</sup>



Esquema 2.47. Ejemplos de 2-carbonilación de pirrol. Reactivos y condiciones: (a) DMF,  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ , ó  $\text{CH}(\text{OMe})_3$ , TFA, 89%; (b)  $\text{Me}_2\text{NAc}$ ,  $\text{POCl}_3$ , benceno, 75%; (c)  $\text{Cl}_3\text{CC}(\text{O})\text{Cl}$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , 96%.

Otros compuestos de interés para la posterior preparación de BODIPYs son los derivados de  $\alpha$ -tricloroacetilpirrol ( $\text{R} = \text{CCl}_3$ , Esquema 2.47). Su síntesis se lleva a cabo por acilación de Friedel-Crafts con cloruro de tricloroacetilo, en este caso sin la necesidad de un ácido de Lewis, lo que pone de manifiesto el exceso de densidad

<sup>170</sup> Clezy, P. S., Fookes, C. J. R., Liepa, A. J. *Aust. J. Chem.* **1972**, *25*, 1979-1990.

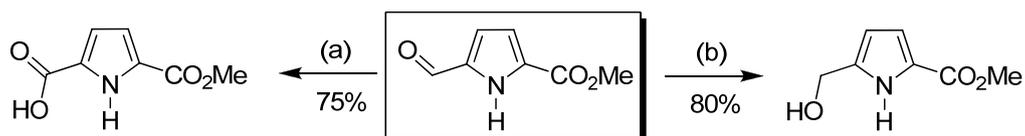
<sup>171</sup> Yadav, J. S., Reddy, B. V. S., Kondaji, G., Srinivasa Rao, R., Pravee Kumar, S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8133-8135.

electrónica  $\pi$  del pirrol.<sup>172,173</sup> El grupo tricloroacetilo se puede, a continuación, transformar en una gran variedad de grupos funcionales, como amidas, ésteres, etc.

### 2.6.5.3 Interconversión de grupos funcionales

Cuando la introducción directa de un sustituyente en una posición determinada no es fácilmente alcanzable, por su inestabilidad en las condiciones de reacción o bien porque la regioquímica no es favorable, la alternativa más directa para solucionar el problema consiste en el intercambio de grupos funcionales. Mediante esta vía, en general, se evitan isomerizaciones no deseadas y cambios en el patrón de sustitución.

**Transformaciones del grupo carbonilo:** Los  $\alpha$ -formilpirroles se oxidan con  $\text{KMnO}_4$  dando el ácido carboxílico correspondiente con buenos rendimientos,<sup>174</sup> y se reducen con borohidruro sódico dando el alcohol de manera selectiva, sin afectar a grupos ésteres presentes en la molécula (Esquema 2.48).<sup>175,176</sup> También, la aminación reductiva con  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  y valina genera la correspondiente amina secundaria con excelentes rendimientos.



Esquema 2.48. Oxidación y reducción selectivas de un formilpirrol. Reactivos y condiciones: (a)  $\text{KMnO}_4$ , acetona- $\text{H}_2\text{O}$  1:1,  $40^\circ\text{C}$ ; (b)  $\text{NaBH}_4$ , THF o MeOH.

**$\alpha$ -Halogenación radicalica:** Otra posibilidad para la incorporación de grupos funcionales al anillo de pirrol consiste en el empleo de reacciones radicalicas. Existe una gran diferencia de reactividad radicalica entre las posiciones  $\alpha$  y  $\beta$ . Así, sobre un grupo metilo en posición  $\alpha$  pueden introducirse hasta tres átomos de cloro sin afectar a los restos alquilo en  $\beta$ . Esta reacción es muy interesante, ya que cada átomo de cloro que entra desactiva más la posición  $\alpha$  para la siguiente reacción radicalica. Esta selectividad

<sup>172</sup> Wallace, D. M., Leung, S. H., Senge, M. O., Smith, K. M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7245-7257.

<sup>173</sup> Schmuck, C. *Chem. Commun.* **1999**, 843-844.

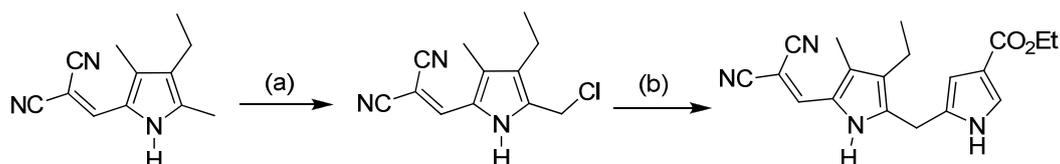
<sup>174</sup> Schmuck, C. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2397-2403.

<sup>175</sup> Schmuck, C., Graupner, S. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1295-1298.

<sup>176</sup> Martyn, D. C., Abell, A. D. *Aust. J. Chem.* **2004**, *57*, 1073-1077.

sobre la posición  $\alpha$  se debe a que el radical obtenido tras la abstracción de un hidrógeno del grupo metilo en  $\alpha$  está mucho más estabilizado por resonancia que el radical formado igualmente en un metilo en  $\beta$ . Por otro lado, el grado de cloración se puede controlar mediante la cantidad y el tipo de agente clorante (por ejemplo, cloruro de sulfurilo,  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ).

La oxidación  $\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_2\text{OH}$  se lleva a cabo por adición de un equivalente de cloruro de sulfurilo e hidrólisis del monocloruro o, más fácilmente, mediante el uso de tetraacetato de plomo.<sup>177</sup> En el Esquema 2.49 se muestra un ejemplo de la aplicación de esta reacción en la obtención de un precursor en la síntesis de clorofila A.<sup>178</sup>



Esquema 2.49. Transformación de un  $\alpha$ -clorometilpirrol, sintetizado por cloración de un metilpirrol. Reactivos y condiciones: (a)  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ , AcOH,  $55^\circ\text{C}$ , 1 h, 85%; (b) 3-etoxicarbonil-5-metilpirrol, HCl, EtOH, reflujo, 1 h, 55%.

El grupo  $\alpha$ -metilo puede oxidarse a aldehído mediante  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ ,  $\text{Cl}_2\text{SO}_2$ <sup>179</sup> (Esquema 2.50), o nitrato de cerio y amonio (CAN).<sup>180</sup> Éste método también se puede utilizar para la obtención directa del correspondiente acetal, como versión protegida del aldehído. El uso de CAN para la obtención de  $\alpha$ -formilpirroles, cuando la posición  $\alpha'$  está bloqueada con un grupo éster, presenta indudables ventajas respecto a otros oxidantes, ya que la reacción transcurre en condiciones muy suaves y con excelentes rendimientos.<sup>181</sup>

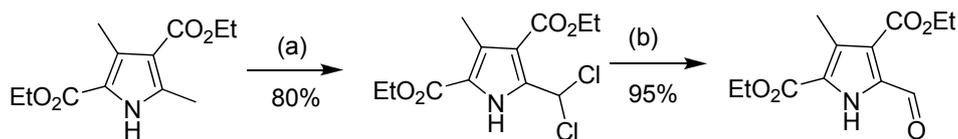
<sup>177</sup> Clezy, P. S., Fookes, C. J. R., Prashar, J. K. *Aust. J. Chem.* **1989**, *42*, 766.

<sup>178</sup> Woodward, R. B., Ayer, W. A., Beaton, J. M., Bickelhaupt, F., Bonnett, R., Buchschacher, P., Closs, G. L., Dutler, H., Hannah, J., Hauck, F. P., Ito, S., Langemann, A., Le Goff, E., Leimgruber, W., Lwowski, W., Sauer, J., Valenta, Z., Volz, H. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7599-7659.

<sup>179</sup> (a) Harrison, P. J., Sheng, Z.-C., Fookes, C. J. R., Battersby, A. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, 1667-1678. (b) Bauer, V. J., Clive, D. L. J., Dolphin, D., Paine, J. B. III, Harris, F. L., King, M. M., Loder, J., Chien Wang, S.-W., Woodward, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6429-6436.

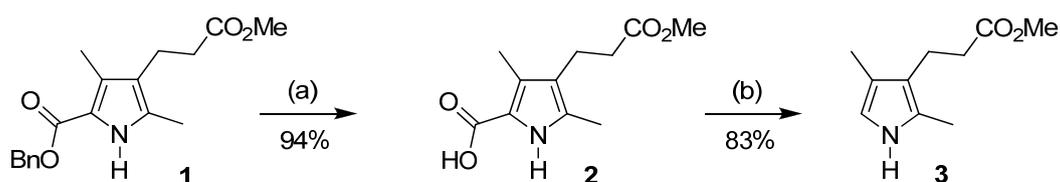
<sup>180</sup> Paine, J. B. III., Dolphin, D. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2787-2795.

<sup>181</sup> Thyran, T., Lightner, D. A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4345-4348.



Esquema 2.50. Oxidación de un  $\alpha$ -metilpirrol al correspondiente  $\alpha$ -formilpirrol. Reactivos y condiciones: (a)  $2 \text{ SO}_2\text{Cl}_2$ , AcOH,  $50^\circ\text{C}$ , 30 min; (b)  $\text{H}_2\text{O}$ , EtOH, reflujo.

El grupo  $\alpha$ -metilo puede oxidarse a  $\alpha$ - $\text{CO}_2\text{H}$  a través del derivado  $\alpha$ -triclorometilo, que no se aísla debido a su gran electrofilia. El principal inconveniente asociado a la síntesis de  $\alpha$ -carboxipirroles es su tendencia a la descarboxilación. Por otro lado, esta descarboxilación se puede utilizar para la síntesis de pirroles con la posición  $\alpha$  libre. Así, si el grupo carboxilo ha sido necesario para dirigir la regioselectividad, o si viene de la propia síntesis del anillo pirrólico, se podrá eliminar posteriormente si está en posición  $\alpha$ . En el Esquema 2.51, se muestra la síntesis de un posible precursor de BODIPYs. El pirrol de partida **1** presenta un grupo metilo en posición  $\alpha$  que, a través de su efecto +I, favorece la tendencia general de estos ácidos a la descarboxilación. Tras la desbencilación del pirrol **1** mediante hidrogenólisis, se genera el ácido carboxílico **2**, que debe ser almacenado a  $-20^\circ\text{C}$  para evitar la descarboxilación, y que por adición de ácido trifluoroacético conduce al pirrol correspondiente, con la posición  $\alpha$  libre.<sup>182</sup>

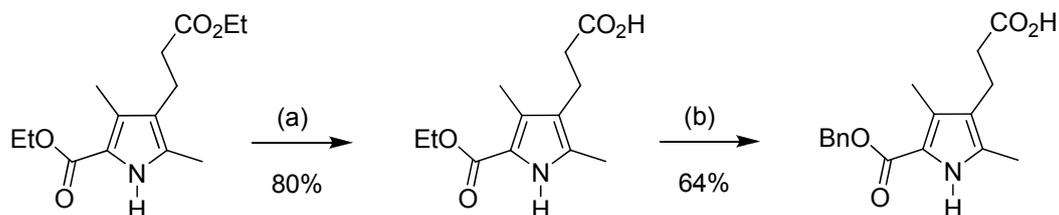


Esquema 2.51. Obtención de un  $\alpha$ -H pirrol a partir de un  $\alpha$ -benciloxycarbonilpirrol. Reactivos y condiciones: (a)  $\text{H}_2$ , Pd/C, THF,  $\text{Et}_3\text{N}$ ; (b) TFA, t. a.

**Transesterificación selectiva:** La mayor densidad electrónica en la posición  $\alpha$  respecto de la  $\beta$  del núcleo pirrólico se puede utilizar para el intercambio selectivo de grupos funcionales. Así, el efecto +K del heterociclo desactiva un grupo éster directamente unido a la posición  $\alpha$ , frente a reacciones como la transesterificación o la hidrólisis básica. Un ejemplo ilustrativo se muestra en el Esquema 2.52, donde el grupo éster terminal en la cadena lateral del pirrol se hidroliza selectivamente sin afectarse otro

<sup>182</sup> Mackman, R. L., Micklefield, J., Block, M. H.; Leeper, F. J., Battersby, A. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 2111.

éster en la posición  $\alpha$ , por estar desactivado. Éste último, se transesterifica en condiciones básicas sin afectarse el primero, por estar ionizado.<sup>183</sup>



Esquema 2.52. Hidrólisis y transesterificación selectiva. Reactivos y condiciones: (a) NaOH, H<sub>2</sub>O, EtOH, 60 °C, 3.5 h; (b) NaOBn, BnOH, 100 °C, 6 h, reflujo.

#### 2.6.5.4 Síntesis de pirroles mediante ciclaciones

A pesar del abanico de reacciones existentes para la incorporación de grupos funcionales a anillos pirrólicos, las síntesis de pirroles con una determinada funcionalización se lleva a cabo, en general, mediante síntesis *de novo* del heterociclo a través de alguna de las numerosas ciclaciones descritas. En cada una de estas aproximaciones se puede controlar la regioselectividad de la sustitución mediante la adecuada elección de los compuestos de partida y las condiciones de reacción.<sup>184</sup>

Existen muchos modos de construir un pirrol mediante reacciones de condensación de tipo polar. Las más comunes se muestran en la Figura 2.27 y se diferencian en la forma de abordar las rupturas retrosintéticas del heterociclo. Por tanto, *a priori* es difícil predecir qué aproximación sintética es la más adecuada para cada pirrol, y cuestiones como la disponibilidad de los productos de partida o la facilidad para purificar y aislar los compuestos finales suelen decidir la mejor opción. En nuestro caso, nos centraremos principalmente en la reacción de Knorr y sus variantes, ya que ésta es la

<sup>183</sup> Schmuck, C., Rupprecht, D., Urban, C., Walden, N. *Synthesis* **2006**, 89.

<sup>184</sup> Algunas síntesis recientes de pirroles polisustituidos: (a) Su, S., Porco, J. A., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7744. (b) Shindo, M., Yoshimura, Y., Hayashi, M., Soejima, H., Yoshikawa, T., Matsumoto, K., Shishido, K. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1963. (c) Rodríguez Rivero, M., Buchwald, S. L. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 973. (d) Cyr, D. J. S., Martin, N., Arndtsen, B. A. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 449. (e) Binder, J. T., Kirsch, S. F. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2151. (f) Gorin, D. J., Davis, N. R., Toste, F. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11260. (g) Bharadwaj, A. R., Scheidt, K. A. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2465. (h) Dhawan, R., Arndtsen, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 468. (i) Kelin, A. V., Sromek, A. W., Gevorgyan, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2074. (j) Boger, D. L., Boyce, C. W., Labroli, M. A., Schon, C. A., Jin, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 54.

reacción que parece más adecuada para la obtención de los pirroles necesarios en las reacciones de formación de BODIPYs, como se muestra a continuación.

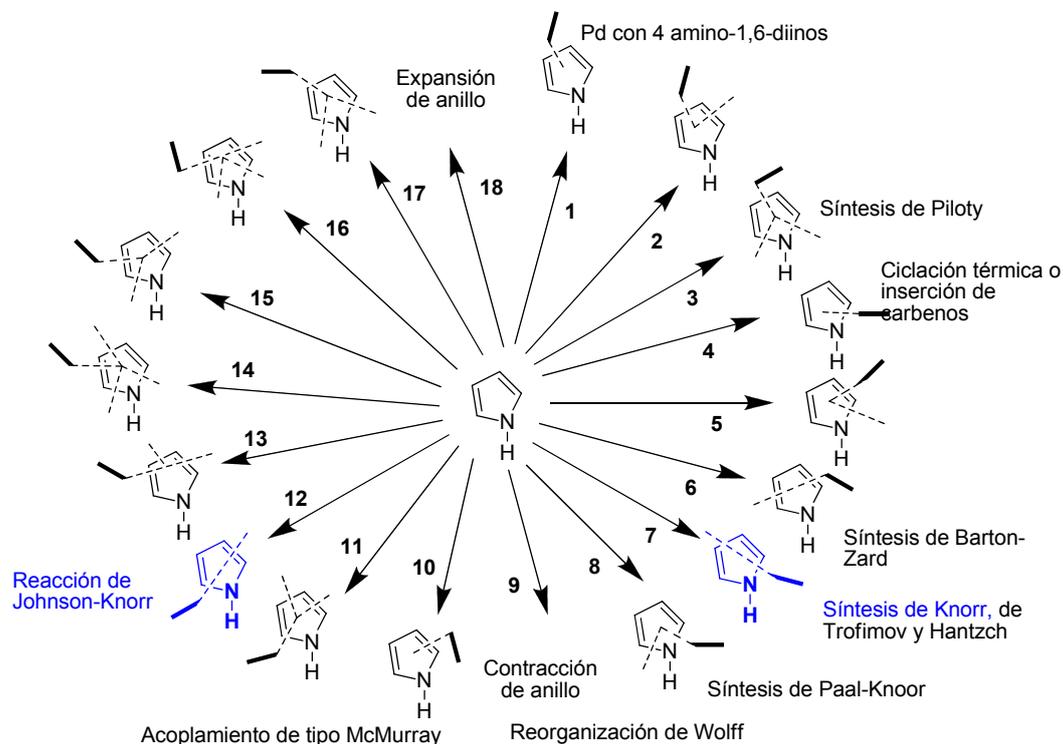


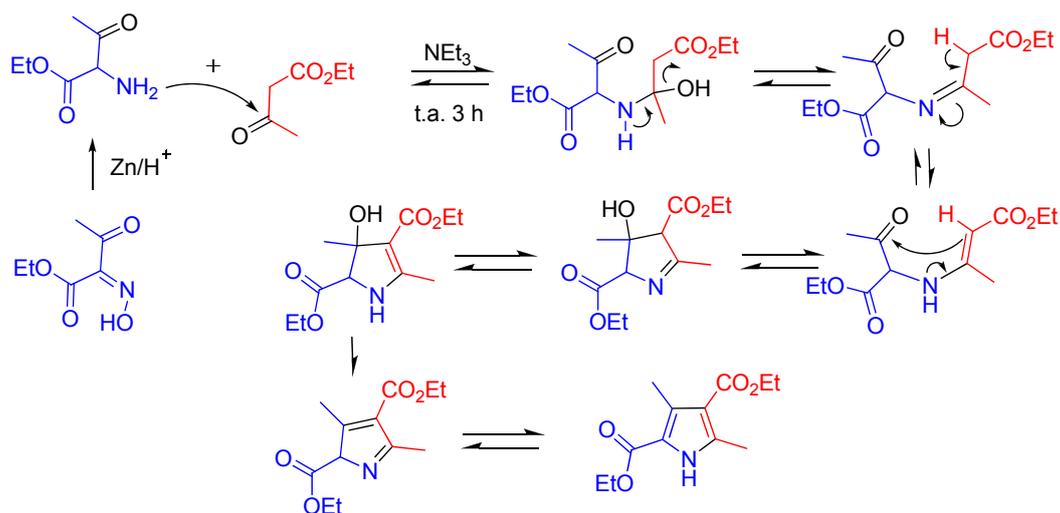
Figura 2.27. Diversos análisis retrosintéticos en la síntesis de pirrol<sup>185</sup>

**Síntesis de Knorr:**<sup>167,186</sup> Consiste en la condensación de una  $\alpha$ -aminocetona o  $\alpha$ -amino- $\beta$ -cetoéster con una cetona o cetoéster. El análisis retrosintético para esta reacción corresponde al número 7 de la Figura 2.27. La autocondensación de la  $\alpha$ -aminocetona se evita generándola *in situ* a partir de su correspondiente oxima con Zn. En el Esquema 2.53 se muestra el mecanismo de esta reacción. Aparte del alto grado de funcionalización obtenido, la reacción exhibe un alto nivel de regioselectividad.<sup>187</sup>

<sup>185</sup> Richter, J. M. *Indole and Pyrrole Synthesis*. The phill. S. Baran laboratory/group seminars.

<sup>186</sup> Schmuck, C., Rupprecht, D. *Synthesis* **2007**, *20*, 3095-3110.

<sup>187</sup> Fabiano, E., Golding, B. T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, 3371.



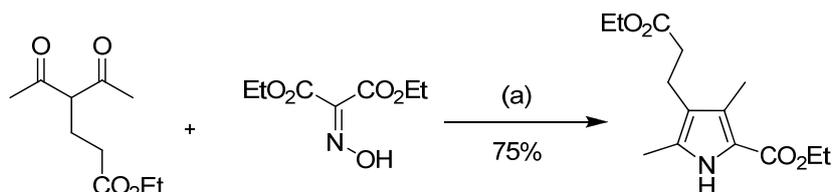
Esquema 2.53. Mecanismo de la reacción de Knorr para obtener pirroles sustituidos.<sup>186</sup>

**Síntesis de Knorr modificada:** Esta variante de la síntesis de Knorr se usa para la obtención de 2-alcoxicarbonil-3,5-dimetilpirroles sustituidos en la posición 4. En este caso, la reacción se lleva a cabo entre una  $\beta$ -dicetona y un  $\alpha$ -aminocarbonil derivado. En contraste con la reacción original de Knorr, donde ambos reactivos iniciales contribuyen con dos átomos de carbono ( $C2+C2$ ) para formar el heterociclo, en este caso la  $\beta$ -dicetona contribuye con 3 átomos de carbono y el  $\alpha$ -aminocarbonil derivado contribuye con uno solamente ( $C3+C1$ ) (vía **12**, Figura 2.27). Existen dos posibles aproximaciones para llevar a cabo esta transformación en función del aminocarbonilo utilizado. La primera opción, desarrollada por Kleinspehn<sup>188</sup> y mejorada por Paine y Dolphin,<sup>189</sup> consiste en la reacción entre  $\beta$ -dicetonas y oxiiminomalonato de dialquilo, para formar pirroles sustituidos con grupos ésteres en la posición  $\alpha$  (Esquema 2.54).<sup>190</sup> En este caso, el oxiiminomalonato de dietilo se reduce *in situ* mediante la adición de Zn sobre la mezcla de reacción. Sin embargo, el aminomalonato correspondiente se puede preparar previamente mediante reducción con hidrógeno catalizada por paladio, ya que dicho aminomalonato es estable, permitiendo incluso la destilación.<sup>189</sup>

<sup>188</sup> Kleinspehn, G. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1546-1548.

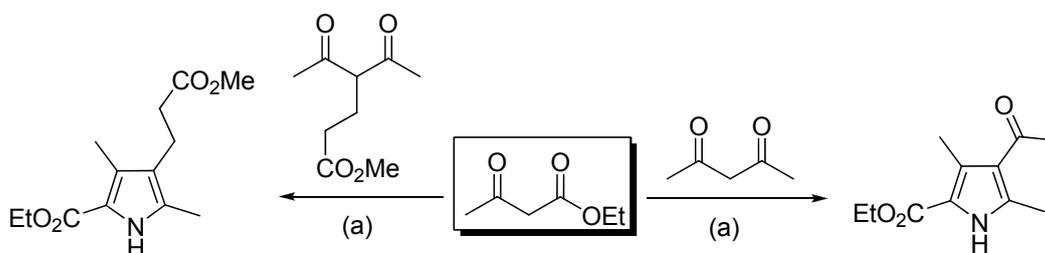
<sup>189</sup> Paine III, J. B., Dolphin, D. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5598-5604.

<sup>190</sup> Xie, M., Lightner, D. A. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 2185.



Esquema 2.54. Síntesis de Kleinspehn-Knorr. Reactivos y condiciones: (a) Zn, AcOH, NaOAc, reflujo, 2 h.

La segunda aproximación, desarrollada por el grupo de Johnson,<sup>191</sup> consiste en utilizar un aminoacetoacetato en lugar de un aminomalonato. En este caso, el compuesto 1,3-dicarbonílico debe estar funcionalizado en el puente metilénico, para evitar una reacción de Knorr clásica. Esto es debido a que la presencia de sustituyentes en esta posición disminuye la facilidad de formación del carbanión correspondiente y, por tanto, cambia el curso de la reacción (Esquema 2.55).<sup>191,192</sup> Por otro lado, los 2-aminoacetoacetatos necesarios se deben sintetizar *in situ* en el medio de reacción, ya que, contrariamente a lo que ocurría con los aminomalonatos, dimerizan rápidamente, formando la correspondiente pirazina simétrica.



Esquema 2.55. Quimioselectividad de la reacción de Johnson-Knorr. Reactivos y condiciones: a)  $\text{NaNO}_2$ , AcOH,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 12 h, luego Zn,  $65^\circ\text{C}$ , 12 h.

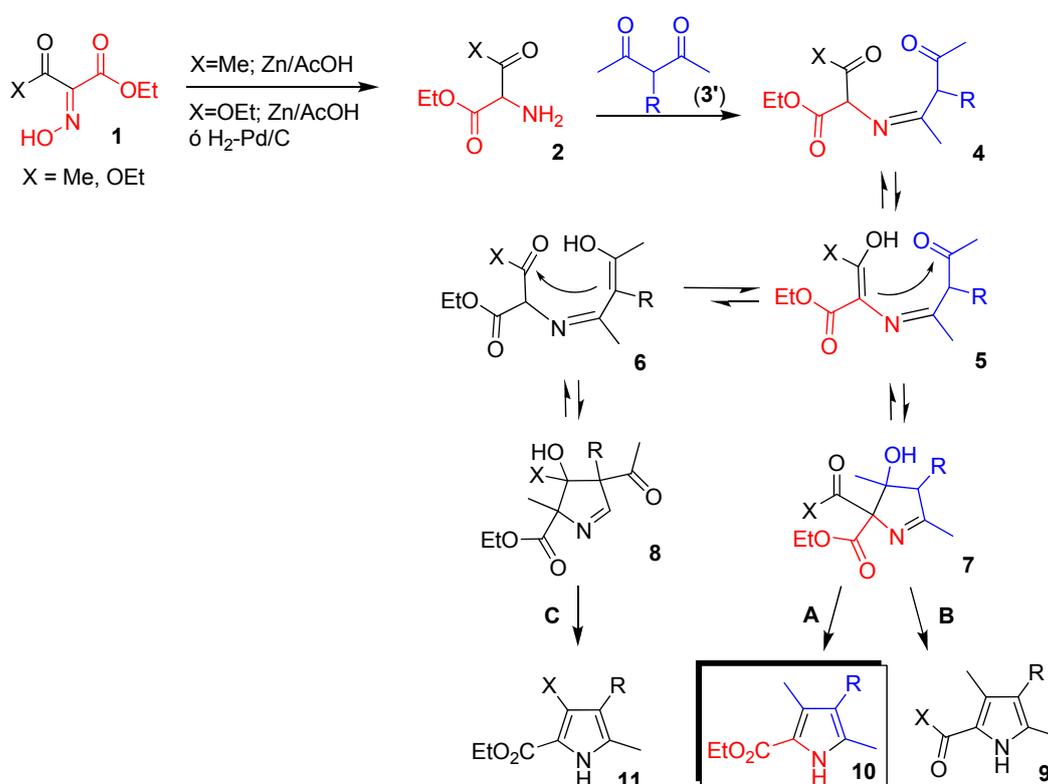
De lo anterior se concluye que:

- 1) Si se utilizan hidroxiiiminomalonatos de alquilo, tendrá lugar una reacción de Knorr modificada, independientemente de la funcionalización de la 1,3-dicetona.
- 2) Si se emplean hidroxiiminoacetoacetatos de alquilo, el curso de la reacción dependerá de que estén sustituidos (Knorr modificada) o no (Knorr clásica).

<sup>191</sup> Bullock, E., Johnson, A. W., Markham, E., Shaw, K. B. *J. Chem. Soc.* **1958**, 1430.

<sup>192</sup> Harbuck, J. W., Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 853.

En el Esquema 2.56 se muestra el mecanismo de la reacción de Knorr modificada, con 3 diferentes productos de reacción. El equilibrio entre los enoles **5** y **6** y la cinética de los ataques nucleófilos sobre el intermedio **7** determinarán el tipo de pirrol (**9**, **10** u **11**) que se obtenga mayoritariamente. Como se puede observar, el intermedio **5** tiene el grupo etoxicarbonilo conjugado con el doble enlace enólico, de manera que el equilibrio en este caso debe estar desplazado hacia **5**, no detectándose por tanto ninguna cantidad de **11** (camino **C**). Por otro lado, cuando  $X = \text{CH}_3$ , el camino de reacción **B** se puede descartar, ya que el ataque nucleófilo sobre el carbonilo del grupo acetilo (camino **A**) está mucho más favorecido que el ataque sobre el carbonilo del grupo éster. De aquí se deduce, también, que la reacción de Johnson-Knorr es más eficiente que la de Kleinspehn-Knorr, en la que, por ser  $X = \text{OCH}_3$ , necesariamente debe eliminarse un grupo etoxicarbonilo.



Esquema 2.56. Mecanismo de la reacción de Knorr modificada

### 2.6.6 Propiedades espectroscópicas del cromóforo BODIPY

Una de las características más importantes del cromóforo BODIPY consiste en que es posible variar sus propiedades espectroscópicas con relativa facilidad, modificando los sustituyentes. Los compuestos que incorporan el grupo BODIPY presentan en sus espectros de absorción y de emisión bandas en la zona del visible generalmente estrechas, con anchuras medias de 25 y 30 nm, tienen coeficientes de absorción altos, entre 40000 y 110000  $M^{-1} cm^{-1}$ , altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, a veces cercano a la unidad, vida media de fluorescencia en la zona de 1 a 10 ns, excelente estabilidad química y fotoquímica tanto en disolución como en estado sólido, y espectros de emisión/absorción relativamente insensibles a la polaridad del disolvente y al pH. El grupo BODIPY es más hidrofóbico que el grupo nitrobenzoxadiazol (NBD), aunque menos que el pireno, y sus derivados son solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, incluso en agua, si se introducen sustituyentes polares adecuados. El espectro de absorción muestra en general una banda principal intensa, correspondiente a la transición al primer estado excitado ( $S_0-S_1$ ), con un hombro debido a la estructura vibracional, y una segunda banda, a menor longitud de onda y más débil, asociada a la transición ( $S_0-S_2$ ). Independientemente de que se excite al estado  $S_1$  o  $S_2$ , el proceso de emisión de fluorescencia siempre parte de  $S_1$  (regla de Kasha) y su espectro es la imagen especular del de absorción, poniendo de manifiesto que las conformaciones de los estados fundamental ( $S_0$ ) y excitado ( $S_1$ ) son muy similares (Figura 2.28).

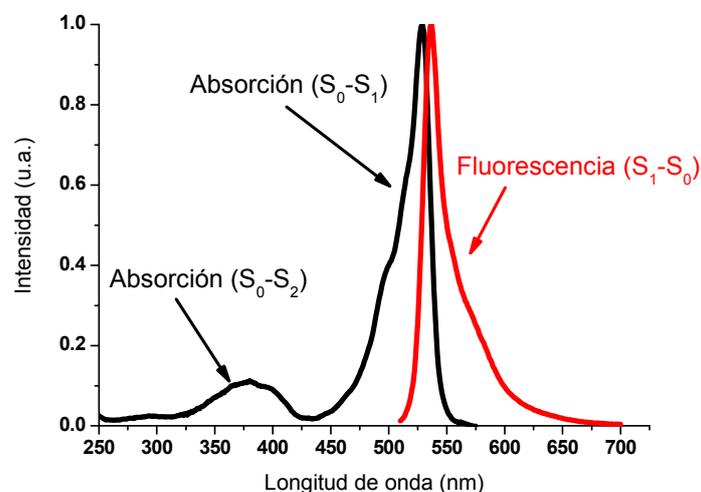


Figura 2.28. Espectro típico de absorción y emisión de un BODIPY.

Como se desprende de los valores elevados del rendimiento cuántico de fluorescencia, la excitación del grupo BODIPY genera muy poca concentración de estados triplete. De hecho, existe un solo ejemplo de detección de fosforescencia de un derivado BODIPY a baja temperatura, en el que fue necesario utilizar un átomo pesado externo para estimular el cruce intersistémico.<sup>193</sup>

En general, el cromóforo BODIPY se encuentra en forma monomérica en disoluciones no muy concentradas ( $\sim 10^{-3}$ - $10^{-6}$ M). Sin embargo a muy altas concentraciones las propiedades espectroscópicas pueden cambiar apreciablemente. Por ejemplo, se ha observado<sup>166</sup> la formación de procesos de agregación de dos tipos de dímeros, H y J (Figura 2.29). En el primer caso las moléculas sitúan sus dipolos de transición de modo paralelo, con los momentos de transición antiparalelos. El dímero H no es fluorescente y presenta un espectro de absorción desplazado al azul respecto del correspondiente al monómero. Los dímeros tipo J sí son fluorescentes y su espectro de absorción está desplazado batocrómicamente respecto del monómero. En este caso, los dipolos de transición se orientan con un ángulo de unos 55°.

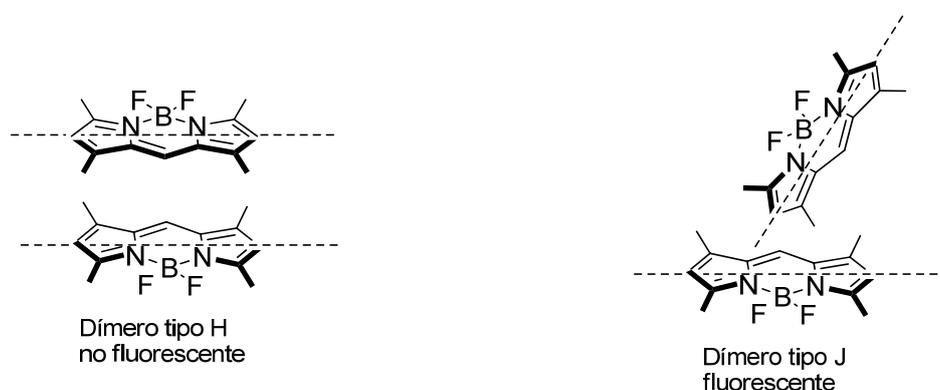


Figura 2.29. Estructuras de los dímeros H y J en BODIPY's, mostrando los dipolos de transición  $S_0$ - $S_1$  (-----).

### 2.6.7 Aplicaciones

Desde el descubrimiento del cromóforo BODIPY por Treibs y colaboradores, el número de aplicaciones de compuestos con este grupo fluorescente ha aumentado casi de modo exponencial, incluyendo usos como el marcado fluorescente de moléculas con

<sup>193</sup> Arriman, A., Rostron, J. P., Cesario, M., Ulrico, G. Ziesel, R. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 7994-8002.

interés en biología, sondas cromogénicas, sensores en la detección de cationes, interruptores fluorescentes, films electroluminiscentes, sondas láser, colectores de luz, sensibilizadores para células solares, emisores en el infrarrojo cercano, sensibilizadores para la generación de oxígeno singlete, sensores de pH, dispositivos electroluminiscentes o materiales mesomórficos, entre otros. Estos y otros aspectos han sido recogidos con suficiente detalle en una reciente revisión.<sup>194</sup> Por estar relacionados con los objetivos de este trabajo, se recogen a continuación algunos ejemplos significativos del uso del cromóforo BODIPY como etiqueta fluorescente en el marcado de biomoléculas.

### 2.6.7.1 Sondas moleculares para el estudio de membranas lipídicas

Existen numerosos estudios biológicos en los que intervienen derivados del grupo BODIPY, entre los que se incluyen ácidos grasos y lípidos de mayor complejidad. Una gran parte de estos compuestos están disponibles comercialmente (Figura 2.30).<sup>125</sup>

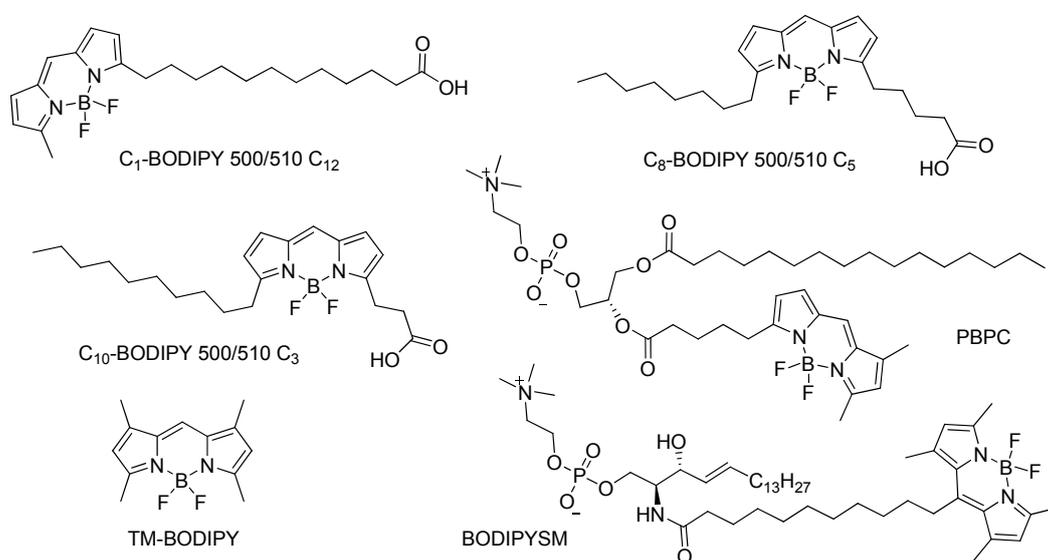


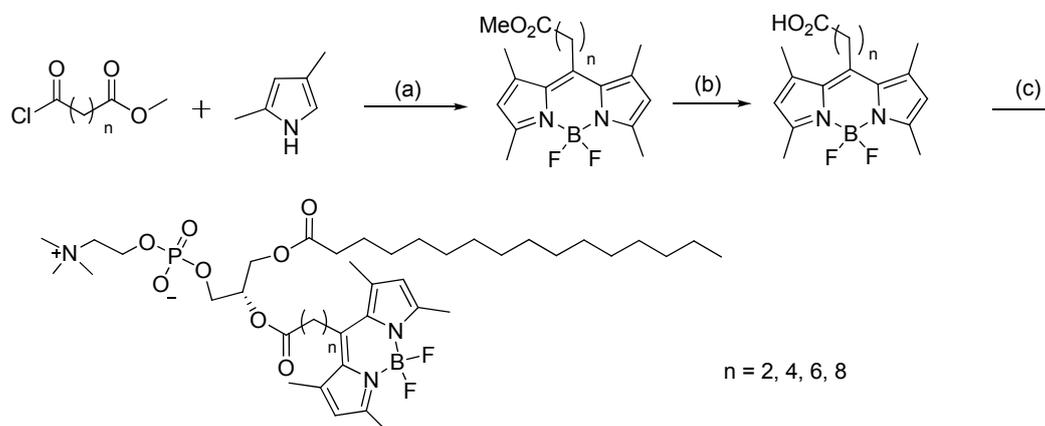
Figura 2.30. Algunas sondas lipídicas fluorescentes comerciales con grupo BODIPY

Una de las aplicaciones más interesantes de las sondas lipídicas fluorescentes consiste en el estudio de propiedades estructurales y dinámicas de membranas, utilizando sondas en las que se varía la posición del fluoróforo a lo largo del eje transversal (profundidad) de la bicapa lipídica a la que se incorpora, ya que su conocimiento puede ayudar a comprender el comportamiento y la estructura de los componentes de las

<sup>194</sup> Ulrich, G., Ziessel, R., Arriman, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184.

membranas celulares. Con el objetivo de estudiar los perfiles de movilidad en membranas lipídicas modelo, el grupo de Molotkovsky ha sintetizado una colección de sondas lipídicas fluorescentes en las que se ha incorporado un grupo 1,3,5,7-tetrametil-BODIPY anclado por su posición 8 al final del resto acilo situado en posición *sn*-2 de un fosfolípido.<sup>195,196</sup> En cada caso, la cadena espaciadora tiene una longitud de 1, 3, 5, y 7 grupos metileno.

En el Esquema 2.57 se muestra la síntesis de los ácidos grasos precursores y su incorporación, mediante reacciones de acilación, sobre la estructura de lisofosfatidilcolina (LYPC) en presencia de dicitlohexilcarbodiimida (DCC). El estudio del comportamiento de las sondas en bicapas modelo muestra que la distorsión causada en la bicapa a bajas concentraciones de sonda es mínima.<sup>197</sup> Por otro lado, la anisotropía de fluorescencia a distintas temperaturas (17-37 °C) de las sondas con el grupo fluorescente situado cerca del centro de la bicapa es menor que la de aquellas en las que el fluoróforo está próximo a la superficie de la bicapa. Esto implica que la movilidad en el microentorno cercano al centro de la bicapa es mayor que en otras posiciones cercanas a los grupos polares, como era de esperar.



Esquema 2.57. Síntesis de fosfolípidos marcados con grupo BODIPY. Reactivos y condiciones: (a)  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ; (b)  $\text{KOH}$ , *i*PrOH; (c) LYPC, DCC.

<sup>195</sup> Boldyrev, I. A., Molotkovsky, J. G. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2006**, 32, 78.

<sup>196</sup> Omel'kov, A. V., Pavlova, Y. B., Boldyrev, I. A., Molotkovsky, J. G. *Rus. J. Bioorg. Chem.* **2006**, 33, 505.

<sup>197</sup> Boldyrev, I. A., Zhai, X., Momsen, M. M., Brockman, H. L., Brown, R. E., Molotkovsky, J. G. *J. Lipid Res.* **2007**, 48, 1518-1532.

### 2.6.7.2 Marcadores fluorescentes de fármacos

Se presenta a continuación un resumen de las publicaciones en las que se ha utilizado el fluoróforo BODIPY para aplicaciones similares a las de nuestro trabajo.

Zhenkun y col. han sintetizado tres derivados fluorescentes del antibiótico eritromicina mediante el anclaje de un BODIPY comercial sobre la posición 9 ó 4'' de su estructura (Figura 2.31). Se comprobó que los análogos emisivos presentan una gran afinidad por el sitio de unión de eritromicina y de otros antibióticos en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, ya que, además de unirse específicamente, desplazaba de dicha posición a los compuestos sin marcar. Se midió la interacción ribosoma-ligando mediante anisotropía de fluorescencia, comprobándose que el complejo ribosoma-ligando fluorescente presenta una mayor anisotropía que la sonda libre.<sup>198</sup>

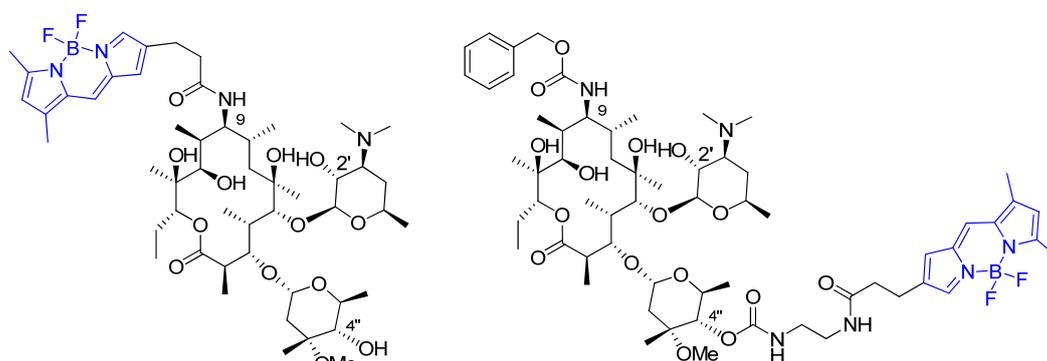
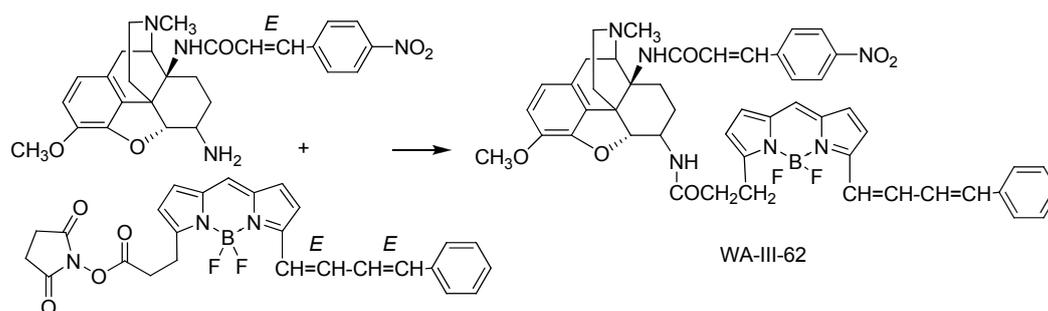


Figura 2.31. Derivados fluorescentes de eritromicina

Emmerson y col.<sup>199</sup> sintetizaron una serie de derivados fluorescentes del opioide WA-III-62 y estudiaron su capacidad de unión al receptor  $\eta$ . Concluyeron que los derivados fluorescentes opioides tenían una gran afinidad por los receptores  $\eta$  y afinidad variable por los receptores  $\delta$  y  $\kappa$ . En el esquema 2.58 se muestra su síntesis.

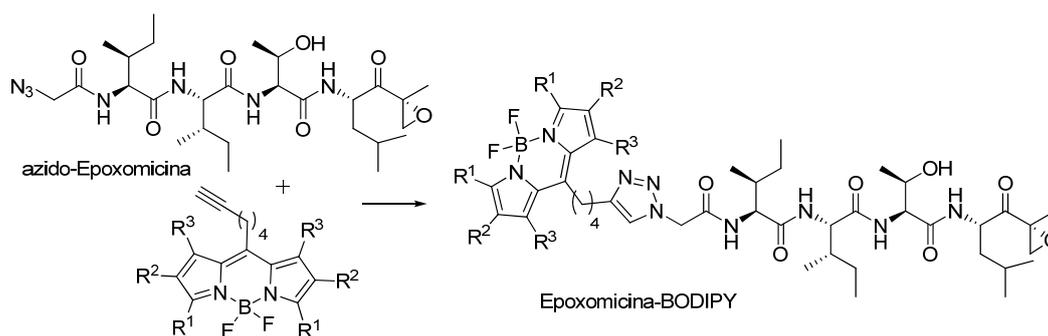
<sup>198</sup> Li, J., Kim, I. H., Roche, E. D., Beeman, D., Lynch, A. S., Ding, C. Z., Ma. Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 794-797.

<sup>199</sup> Emmerson, P. J., Archer, S., El-Hamouly, W., Mansour, A., Akil, H., Medzihradsky, F. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, 54, 1315.



Esquema 2.58. Obtención de un derivado fluorescente (WA-III-62) de un opioide

Otra estrategia para el marcado fluorescente de moléculas biológicas consiste en incorporar el grupo fluorescente empleando la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen.<sup>200</sup> Así, el grupo de Overkleeft ha preparado una serie de análogos fluorescentes, con grupos BODIPY, del potente antitumoral Epoxomicina, mediante la reacción entre un análogo con grupo azida de la Epoxomicina y 8-(hex-5-inil)-BODIPYs (Esquema 2.59).<sup>201</sup> Tras incubar estos análogos con proteínas provenientes de la lisis de células de ratones murinos EL4, se visualizaron bandas cuyo peso molecular se corresponde con la subunidad proteasomal  $\beta$ , que es proteolíticamente activa. Además, los análogos fluorescentes son capaces de atravesar, en mayor o menor medida, la membrana de estas células.



Esquema 2.59

<sup>200</sup> Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596-2599.

<sup>201</sup> Verdoes, M., Hillaert, U., Floreaa, B. I., Sae-Henga, M., Risseuwa, M. D. P., Filippova, D. V., van der Marela, G. A., Overkleeft, H. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6169-6171.

### 2.6.7.3 BODIPYs para el estudio de transporte, difusión y localización de moléculas bioactivas

Los análogos fluorescentes con grupos BODIPY se han utilizado asimismo en estudios de transporte, difusión pasiva y activa, o detección y localización de moléculas bioactivas. Por ejemplo, los oligómeros poliédricos silsesquioxanos funcionalizados con grupos amonio (OctaAmmonium-POSS<sup>®</sup>) presentan una serie de características (alta estabilidad química y térmica, tamaño del orden del nm, baja toxicidad, solubles en agua) que los convierten en potenciales agentes transportadores de fármacos en el organismo. Con este objetivo, el grupo de Rotello incorporó unidades de BODIPY sobre la superficie de un POSS por reacción de grupos succinimidil éster de la sonda BODIPY con grupos amonio en la superficie del oligómero (Figura 2.32).<sup>202</sup>

El tráfico y la distribución celular de los derivados emisivos se estudiaron mediante microscopía confocal en células Cos-1. Se comprobó que el conjugado POSS-n(BODIPY) entra de forma eficiente en el citoplasma de las células y presenta muy baja toxicidad para las mismas. Además, el patrón de incorporación del conjugado es distinto del patrón del control, siendo, por tanto, el grupo POSS responsable directo de este comportamiento.

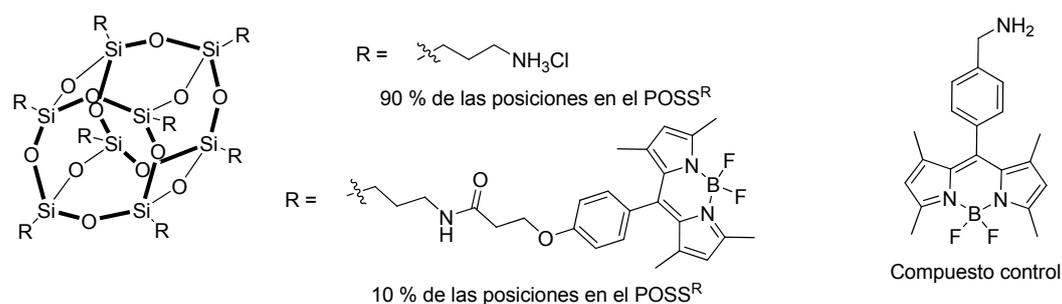


Figura 2.32

La distribución intracelular de glicosfingolípidos marcados con una etiqueta fluorescente se puede estudiar en células vivas mediante espectroscopía de fluorescencia. Así, Pagano y col. marcaron con una etiqueta BODIPY comercial el extremo de la cadena alquímica de (2*S*,3*R*)- $\beta$ -lactosilceramida (LacCer) de origen natural (Figura 2.33, a) y examinaron el tráfico intracelular en fibroblastos.<sup>203</sup> De esta forma se observó que el

<sup>202</sup> McCusker, C., Carroll, J. B., Rotello, V. M. *Chem. Comm.* **2005**, 996-1001.

<sup>203</sup> Pagano, R. E., Watanabe, R., Wheatley, C., Dominguez, M. *Methods Enzymol.* **2000**, 312, 523-534.

glicosfingolípido fluorescente se localiza en los lisosomas y en el aparato de Golgi de éstas células. Continuando con estos estudios, Bittman y Liu sintetizaron el resto de diastereoisómeros [**b** (2*R*,3*R*), **c** (2*S*,3*S*) y **d** (2*R*,3*S*)] de la cadena de esfingosina y compararon la influencia de la estereoquímica en el mecanismo de incorporación endocítico.<sup>204</sup>

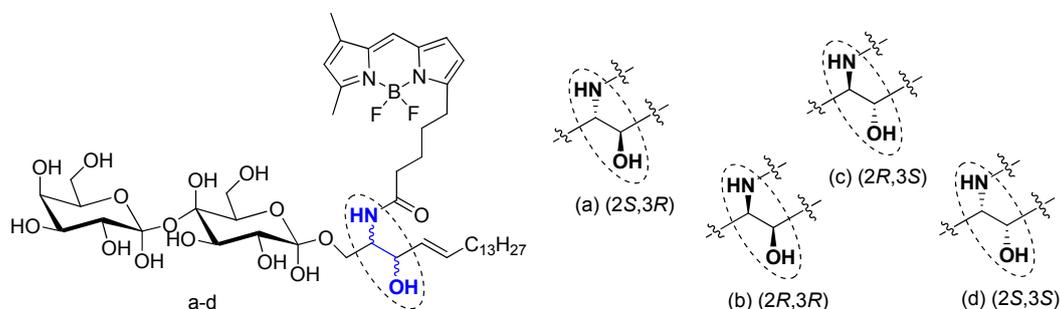


Figura 2.33. Estructura de los diastereoisómeros de LacCer-BODIPY

Mintzer y Bittman sintetizaron colesterol marcado con grupos BODIPY.<sup>205</sup> Uno de estos análogos se construyó anclando el fluoróforo a la cadena lateral a través de un grupo éster. En otros dos compuestos la unión se realizó únicamente a través de enlaces C-C, intentando mimetizar al compuesto natural (Figura 2.34). Tras la evaluación biofísica de los compuestos, se dedujo que la utilización de un grupo éster para incorporar el fluoróforo interfiere con la capacidad del colesterol de empaquetarse con los fosfolípidos de las monocapas en estudio. Sin embargo, en el caso del análogo B, sin elementos polares en la cadena, se observó un comportamiento físico similar al que tiene colesterol en membranas modelo, respecto a su localización en dominios lipídicos.

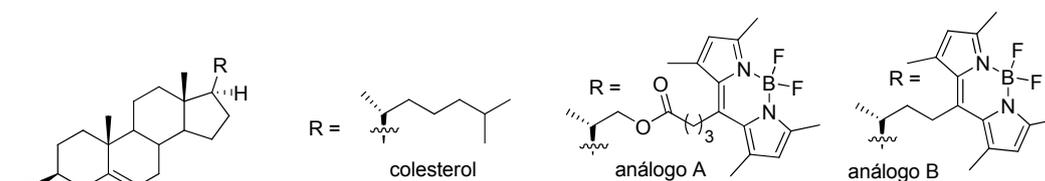


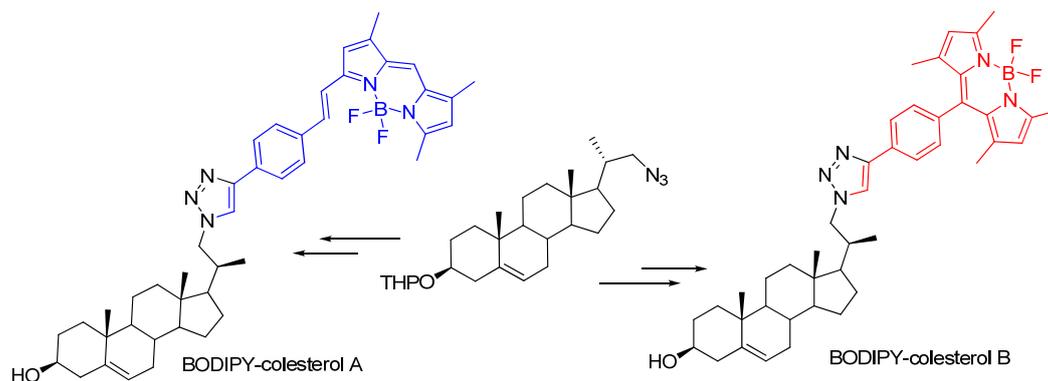
Figura 2.34. Análogos fluorescentes de colesterol

Continuando con estos estudios, Bittman y Li han preparado dos nuevos análogos de colesterol mediante cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre colesterol con

<sup>204</sup> Liu, Y., Bittman, R. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *142*, 58.

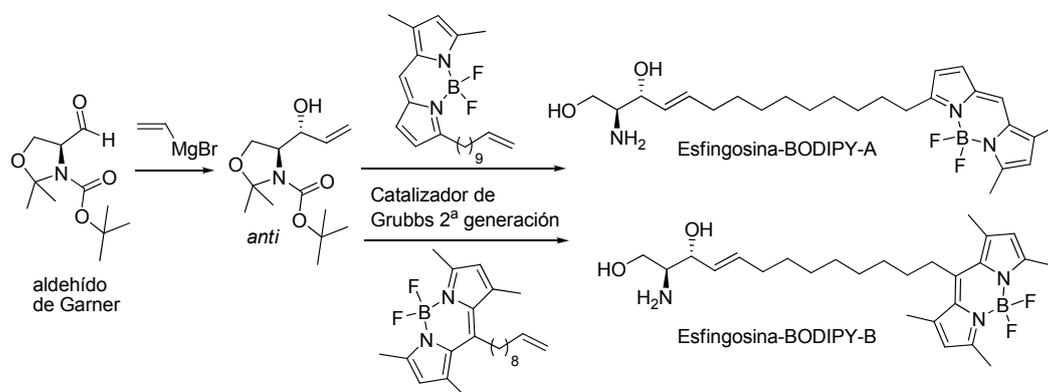
<sup>205</sup> Li, Z., Mintzer, E., Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1718.

un grupo azida en su cadena alquílica lateral y BODIPYs con un resto acetilénico en la posición 8 o 3 de su núcleo (Esquema 2.60).<sup>206</sup>



Esquema 2.60. Obtención de análogos fluorescentes de colesterol con grupos BODIPY mediante reacciones de alta eficiencia (“click reaction”).

Finalmente, Nussbaumer y col. han marcado esfingosina con grupos BODIPYs mediante una reacción de metátesis cruzada. Para ello hicieron reaccionar el alcohol alílico proveniente de la adición diastereoselectiva de bromuro de vinilmagnesio al aldehído de Garner, con dos grupos BODIPY con restos alquénicos en las posiciones 8 ó 3 de su núcleo, en presencia del catalizador de Grubbs de 2ª generación. Una ventaja importante de esta metodología es que evita el uso de conectores polares (de tipo amida, éster o carbamato) para la incorporación de la etiqueta fluorescente (Esquema 2.61).



Esquema 2.61. Análogos fluorescentes de esfingosina obtenidos mediante metátesis cruzada.

<sup>206</sup> Li, Z., Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8376.

Se comprobó que las esfingosinas fluorescentes, obtenidas de esta forma, se fosforilan eficientemente por las enzimas esfingosina-kinasa 1 y 2 (SPHK-1 y -2), indicando bioequivalencia entre los análogos fluorescentes y el sustrato natural.<sup>207</sup>

---

<sup>207</sup> Peters, C., Billich, A., Ghobrial, M., Hogenauer, K., Ullrich, T., Nussbaumer, P. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 1842-1845.

## 2.7 Synthesis of sphingolipids

### 2.7.1 Introduction

Sphingolipids are characterized by a long-chain base (sphingoid) backbone, commonly comprising 18 to 20 carbon atoms, substituted by two or three hydroxy groups (at least at positions 1 and 3, see Fig. 4.35) and in most cases a *trans* double bond in position 4. In human cells, the common backbone of the majority of sphingolipids is (2*S*,3*R*,4*E*)-2-amino-4-octadecene-1,3-diol, that is, *D*-erythro-sphingosine, whereas the corresponding saturated analogue dihydrosphingosine is also present as a minor component.

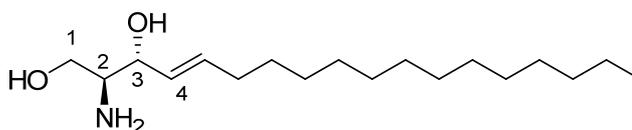


Figure 4.35. *D*-Erythro-sphingosine.

Ceramides are derivatives of *D*-erythro-sphingosine acylated at the amino group with fatty acids, and more polar and complex sphingolipids feature a further modification at position 1. The fatty acids of ceramides vary in chain length, degree of unsaturation (most are saturated), and presence or absence of a hydroxy group at the  $\alpha$  or  $\omega$  carbon atom. The headgroups at position 1 range in complexity from simple phosphodiester to complex carbohydrates (Figure 4.36).<sup>208</sup> Lysosphingolipids are characterized by a free amino group, but with polar head groups at position 1. In total, sphingolipids are a class of more than 1000 different, naturally occurring compounds. The first component of this structural class was isolated and identified by Thudichum<sup>209</sup> in 1884 when investigating brain extracts. As the substance posed so many mysteries and puzzles to him, he called it “sphingosine” after the Egyptian Sphinx. For more than 100 years, it was believed that sphingolipids were merely structural components of higher eukaryotic cells. In the meantime, it was well established that sphingolipids can also serve as extra- and intracellular mediators in cell signaling, and that specific receptors exist. Consequently,

<sup>208</sup> Merrill, A. H., Sullards, C. M., Wang, E., Voss, K. A., Riley, R. T. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*, 283-289.

<sup>209</sup> Thudichum, J. L.W., *A treatise on the chemical constitution of the brain*, Londres, 1884.

sphingolipid research has become a very active field, and a number of hypotheses for therapeutic opportunities have emerged.<sup>210,211</sup>

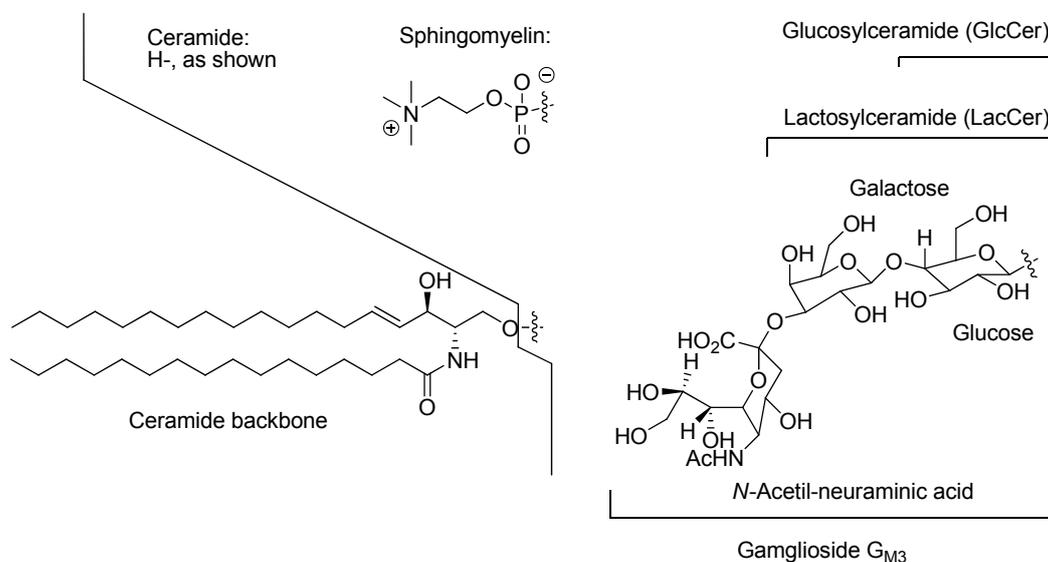


Figure 4.36. Sphingoid backbone and headgroups.

### 2.7.2 Sphingolipid functions

Sphingolipids are located in cellular membranes, lipoproteins (especially low-density lipoproteins) and other lipid-rich structures. Complex sphingolipids are critical for the maintenance of membrane structure (especially microdomains), serve as binding sites for extracellular matrix proteins, as well as for some microorganisms, microbial toxins, and viruses, and modulate the behavior of growth factor receptors. Complex sphingolipids also function as precursors for second messengers that mediate cell responses to growth factors, cytokines, differentiation factors,  $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>, and a growing list of agonists.<sup>212</sup>

<sup>210</sup> Baumruker, T., Billich, A., Brinkman, V. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2007**, *16*, 283-289.

<sup>211</sup> Nussbaumer, P. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 543-551.

<sup>212</sup> Liao, J., Tao, J., Lin, G., Liu, D. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4715-4733.

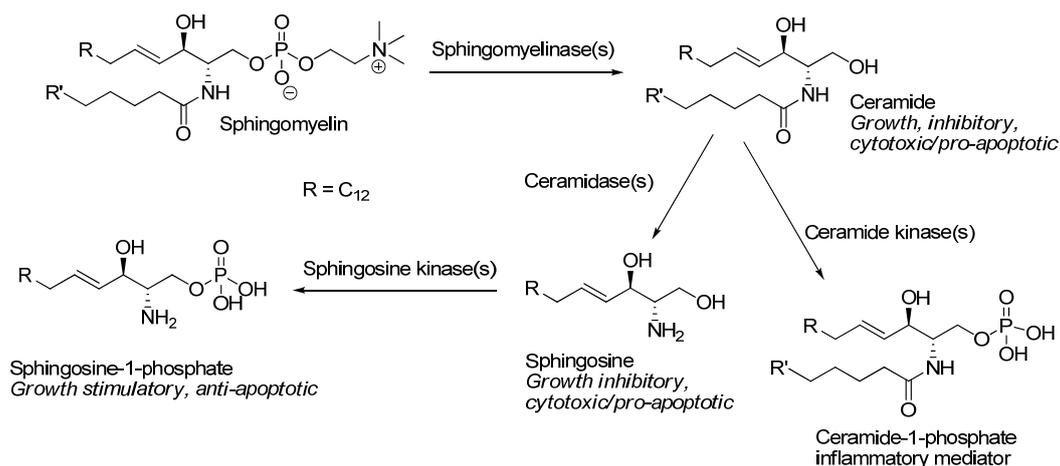


Figure 4.37. Sphingolipid functions

This signaling function of sphingolipids is illustrated in Figure 4.37. Some agonists, such as the platelet-derived growth factor (PDGF), activate a panel of enzymes that hydrolyze sphingomyelin to ceramide (sphingomyelinases), ceramide to sphingosine (ceramidases), and sphingosine to sphingosine 1-phosphate (sphingosine kinases). Each intermediate is a bioactive compound that can affect protein kinases, phosphoprotein phosphatases, and other cell regulatory pathways. Sphingosine 1-phosphate is an additionally intriguing compound because it has both extracellular and intracellular functions.

Ceramide 1-phosphate (C1P, generated from ceramide by ceramide kinase) is the central molecule in the metabolism of sphingolipids. The importance of C1P as signaling molecule has only recently begun to be recognized and investigated.<sup>213,214,215,216</sup> C1P is postulated to interact directly with cytosolic phospholipase A2 alpha, resulting in activation and, hence, increased release of arachidonic acid and downstream inflammatory mediators.<sup>217</sup> Ceramide and C1P occur as mixtures of analogues with a constant sphingosine backbone and *N*-acyl residues varying mainly in length ranging from C14 to C32 with optional  $\alpha$ - or  $\omega$ -hydroxy substitution. Therefore, C1P analogues with different, well defined *N*-acyl side chains (only few are commercially available) and

<sup>213</sup> Chalfant, C. E., Spiegel, S. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 4605-4612.

<sup>214</sup> Baumruker, T., Bornancin, F., Billich, A. *Immunol. Lett.* **2005**, *96*, 175-185.

<sup>215</sup> Marcu, A. C., Chalfant, C.E. *Future Lipidol.* **2007** *2*, 75-84.

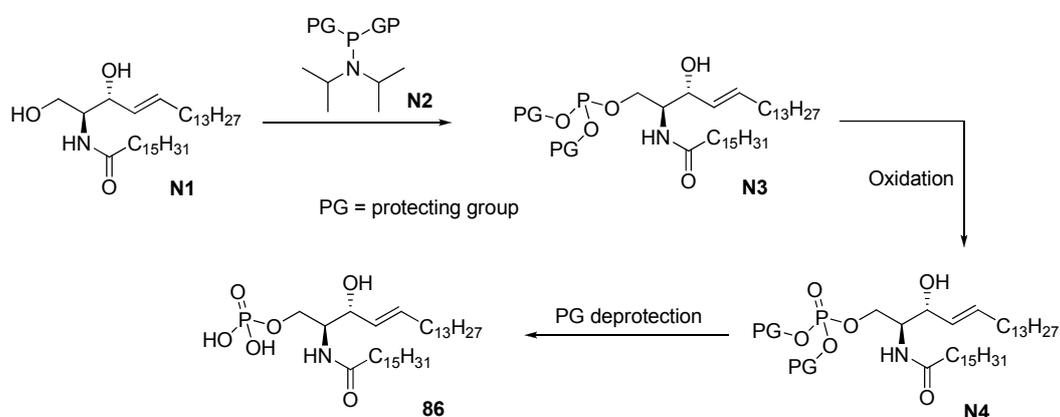
<sup>216</sup> Graf, C., Rovina, P., Tauzin, L., Schanzer, A. Bornancin, F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *354*, 309-314.

<sup>217</sup> Pettus, B. J., Bielawska, A., Subramanian, P., Wijesinghe, D. S., Maceyka, M., Leslie, C. C. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 11320-11326.

labeled C1P analogues are required as tool and reference compounds for further biological investigations such as metabolism and interaction studies, as well as for measuring C1P concentrations in cells and tissues (sphingolipidomics).

### 2.7.3 Synthetic routes towards ceramide-1-phosphates

Most of the known synthetic methods for C1Ps require protection of the 3-hydroxy group. Besides enzymatic methods, that are mainly used to prepare radiolabeled analogues and that can deliver only very minute quantities, there is only one published procedure for phosphorylation of ceramide without the need of protection protocols.<sup>218</sup> The synthesis starts from commercially available C-18-ceramide (**N1**), affording C1P (**86**) in only three steps. Ceramide was reported to be easily phosphorylated by a phosphoramidate reagent (**N2**), requiring subsequent oxidation of the phosphorus (III) species (**N3**) to the phosphorus(V) species (**N4**). Finally, the protective groups can be removed (Scheme 4.62).

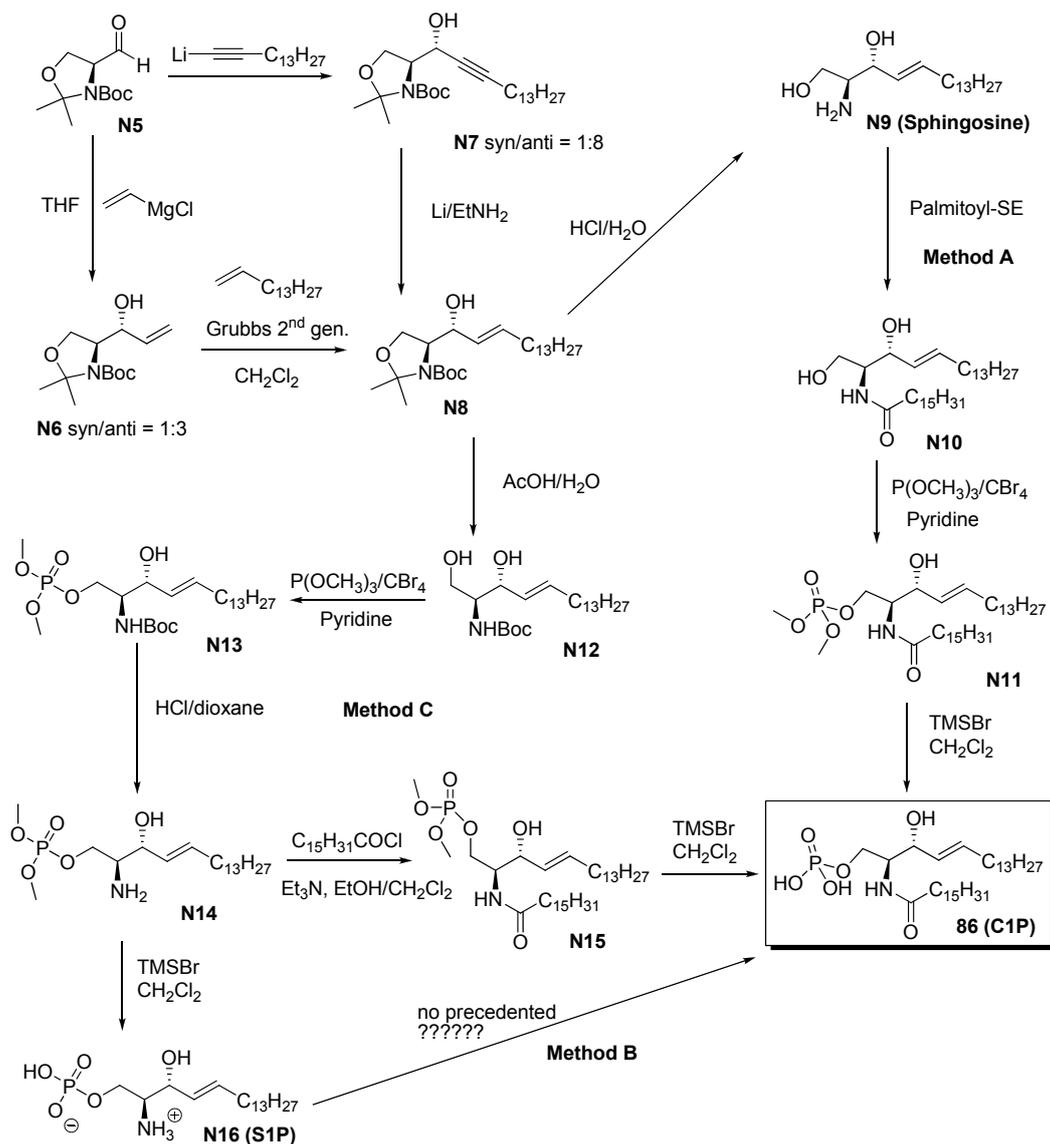


Scheme 4.62. Described synthetic route from ceramide towards C1P.<sup>218</sup>

However, each corresponding ceramide is required in sufficient quantity as starting material, and the low solubility is often a limiting factor. More recently, phosphorylation of *N*-Boc protected sphingosine (**N12**) and acylation of the deprotected phosphate diester (**N14**), followed by ester cleavage, was reported for the synthesis of C1P (**86**) (Scheme 4.63, Method C).<sup>219</sup>

<sup>218</sup> Byun, H.-S., Erukulla, R. K., Bittmann, R. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6495-6498.

<sup>219</sup> Szulc, Z. M., Hannun, Y. A., Bielawska, A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7821-7824.



Scheme 4.63. Synthetic routes toward ceramide-1-phosphate.

Diastereoselective addition of vinyl organometallic reagents to the Garner aldehyde (N5) leads to the allyl alcohol N6, with the *syn:anti* ratio depending upon the choice of metal. Vinyl lithium provides *syn:anti* = 1:5, vinylmagnesium bromide gives *syn:anti* = 1:3, whereas vinylzinc chloride reverses the ratio to *syn:anti* = 6:1. The *anti*

product represents the desired diastereomer, featuring the correct stereochemistry that is characteristic of sphingolipids.<sup>220</sup>

An alternative route is the addition of lithiumpentadec-1-yne to the Garner aldehyde (**N5**) with very good diastereoselectivity, to give a *syn:anti* 8:1 mixture of the propargylic alcohol **N7**. Treatment of **N7** with lithium in ethylamine at -78°C leads to the clean formation of the protected sphingosine derivative **N8**. Deprotection with hot aqueous HCl affords sphingosine (**N9**) in 65% overall yield (Scheme 4.63).<sup>221</sup>

An indirect, common strategy for the synthesis of C1P is also shown in Scheme 4.63 (Method A) and involves acylation of sphingosine (**N9**) with palmitoyl-*N*-hydroxy-succinimidyl ester, subsequent *O*-phosphorylation of **N10** with trimethylphosphite, and selective phosphate ester hydrolysis.<sup>219</sup> Synthesis of ceramide-1-phosphate (**86**) via direct acylation of commercially available S1P (**N16**) (Method B) has not been reported in the literature. In the present memory, a new procedure is described for this reaction.<sup>222</sup>

---

<sup>220</sup> Garner, P., Park, J.M. *Org. Synth.* **1991**, *70*, 18-28

<sup>221</sup> Garner P., Park, J. M., Malecki, E. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4395-4398.

<sup>222</sup> Nussbaumer, P., Hornillos, V., Ghobrial, M., Ullrich, T. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *151*, 125-128.



### 3. Compuestos sintetizados en este trabajo

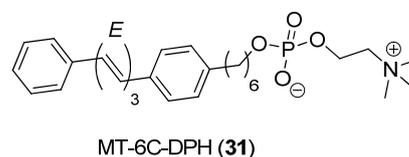
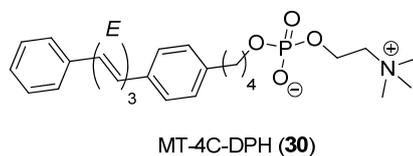
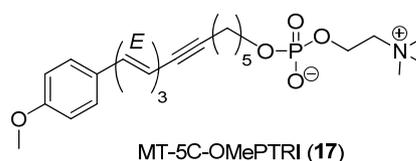
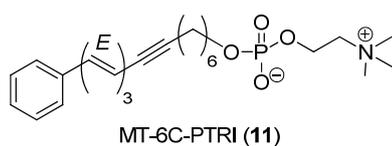


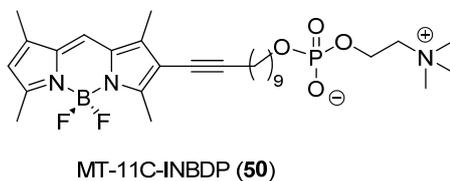
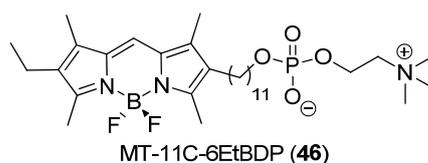
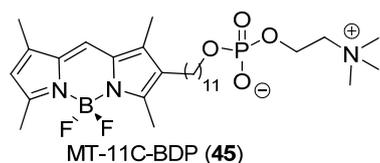
### 3 Compuestos sintetizados en este trabajo

Se presentan a continuación las fórmulas de todos los compuestos finales sintetizados en este trabajo; la mayoría ya se han evaluado biológicamente y se están utilizando para los estudios mecanísticos proyectados. Otros compuestos se encuentran en diferentes fases del proceso de evaluación biológica.

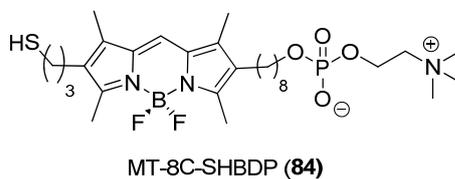
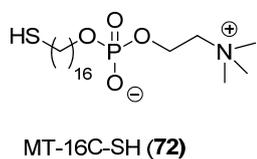
#### 3.1 Análogos de Miltefosina

Se prepararon dos tipos de análogos fluorescentes: 1) con grupos feniltrienino conjugado (PTRI, compuestos **11** y **17**) y 1,6-difenilhexatrieno (DPH, compuestos **30** y **31**); todos introducen la mínima perturbación posible compatible con propiedades espectroscópicas adecuadas para las aplicaciones posteriores. 2) Con el grupo fluorescente difluoroborodipirrometeno (BODIPY, compuestos **45**, **46** y **50**), un cromóforo que muestra propiedades fotoquímicas más útiles que las de los grupos poliénicos, aunque su mayor volumen introduce una mayor perturbación en la estructura original.



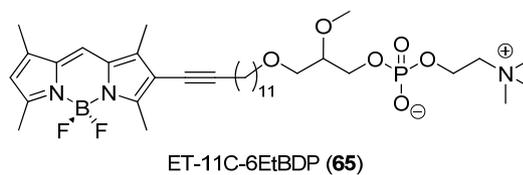
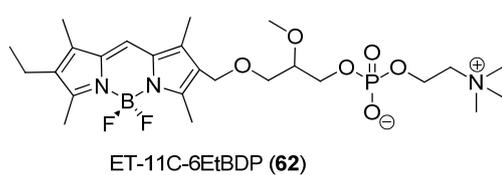


Se han preparado también dos análogos conteniendo el grupo  $-SH$  en posición distal, uno no fluorescente (compuesto **72**) y otro con un grupo BODIPY insertado en la cadena alifática (compuesto **84**).



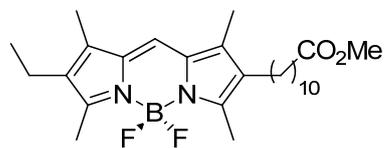
### 3.2 Análogos fluorescentes de Edelfosina.

Se obtuvieron dos análogos (compuestos **62** y **65**) con el grupo fluorescente BODIPY.



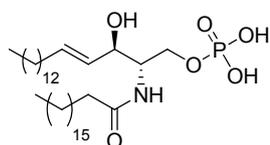
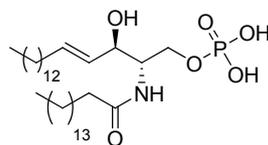
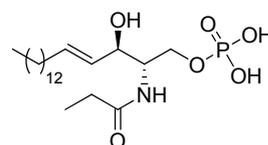
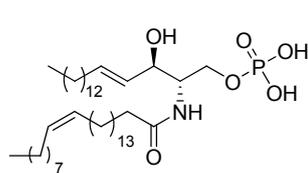
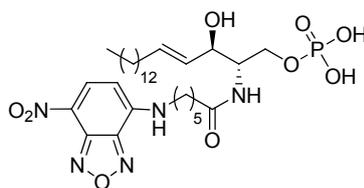
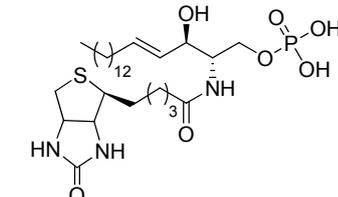
### 3.3 Análogos fluorescentes del ácido esteárico

Se obtuvieron un ácido (compuesto **39**) y el éster metílico correspondiente (compuesto **38**), con una longitud total en máxima extensión equivalente a la de ácido esteárico y su éster metílico.

COOMe-11C-2EtBDP (**38**)COOH-11C-2EtBDP (**39**)

### 3.4 Ceramidas con sustituyentes fluorescentes o no-emisivos

Se obtuvieron tres ceramidas 1-fosfato con diferentes longitudes de la cadena del resto *N*-acilo (compuestos **85**, **86** y **87**), otra con un resto de *N*-tetraeicosenoicoilo (**88**), otra con el grupo biotina (**89**) y otra fluorescente, con el grupo NBD (**90**).

C18-ceramida 1-fosfato (**85**)C16-ceramida 1-fosfato (**86**)C3-ceramida 1-fosfato (**87**)C24:1-ceramida 1-fosfato (**88**)biotina-ceramida 1-phosphato (**89**)NBD-C6-ceramida 1-phosphato (**90**)



## 4. Resultados y discusión



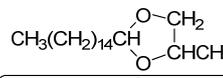
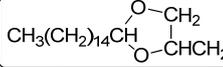
## 4 Resultados y discusión

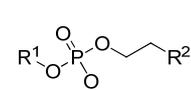
### 4.1 Análogos fluorescentes de Miltefosina con grupos polieno

#### 4.1.1 Diseño

El diseño de los análogos fluorescentes de MT se basa en los escasos estudios existentes sobre las relaciones estructura-actividad parasiticida (SAR). Como se comentó en el capítulo de *Antecedentes bibliográficos*, MT se desarrolló originalmente como un fármaco antineoplásico, por lo que la mayor parte de estos estudios están dirigidos a este uso.<sup>1,2,3,4</sup> Dado que, hasta ahora, no se conoce si el efecto antitumoral y antileishmania de MT está mediado por los mismas dianas terapéuticas, solo se considerarán aquí las conclusiones deducidas del estudio del efecto leishmanicida.

Se ha estudiado *in vitro* el efecto producido en la actividad antileishmania al variar en MT la longitud de la cadena alquímica (C-15 a C-20), o al introducir ramificaciones u otras variaciones estructurales, utilizando amastigotes de *L. donovani* en macrófagos infectados del peritoneo de ratón y en promastigotes extracelulares (Figura 4.1).

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>15</sub> -	<sup>+</sup> NMe <sub>3</sub> <sup>a</sup>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> CH(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )CH <sub>2</sub> -	<sup>+</sup> NMe <sub>3</sub> <sup>b</sup>
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>19</sub> -	<sup>+</sup> NMe <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> CH(C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )CH <sub>2</sub> -	<sup>+</sup> NMe <sub>3</sub>
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> CH(CH <sub>3</sub> )-	<sup>+</sup> NHMe <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH 	<sup>+</sup> NMe <sub>3</sub>
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>15</sub> CH(CH <sub>3</sub> )-	<sup>+</sup> NHMe <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH 	<sup>+</sup> NH <sub>4</sub> <sup>c</sup>



a: MT  
 b: Compuesto más activo *in vitro* contra amastigotes de *L. donovani* en macrófagos de peritoneo de ratón  
 c: Compuesto inactivo *in vivo* en ratones infectados con *L. donovani*

Figura 4.1. Efecto sobre la actividad antileishmania de la longitud de la cadena y de la presencia de ramificaciones en análogos de MT.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Hilgard, P., Stekar, J., Voegeli, R., Engel, J., Schumacher, W., Eibl, H., Unger, C., Berger, M. R. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1988**, *24*, 1457-1461.

<sup>2</sup> Lohmeyer, L., Bittman, R. *Drug Future* **1994**, *19*, 1021-1037.

<sup>3</sup> Brachwitz, H., Vollgraf, C. *Pharmacol. Therapeut.* **1995**, *66*, 39-82.

<sup>4</sup> Holý, A., Otová, B., Buděšinský, M., Emerson, D., Wiles, M. E. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4462-4467.

Los ocho compuestos que se utilizaron para el estudio, entre los que se incluía una alquilfosfoetanolamina, mostraron ser activos a concentraciones inferiores a  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , aunque no se vio una relación clara entre la longitud de la cadena y la actividad antiparasitaria. Sin embargo, de los ensayos *in vivo* se concluyó que tan sólo los compuestos que contienen el grupo fosfatidilcolina son activos, careciendo de actividad el análogo con grupo amonio.<sup>5</sup>

En otro estudio se ensayaron varios análogos de MT, entre los que se incluyeron alquilfosfocolinas saturadas con longitudes comprendidas entre C14 y C22 y algunas *N,N,N*-trialquilfosfoetanolaminas insaturadas. Este estudio se realizó primero *in vitro*, utilizando promastigotes de diferentes cepas de *Leishmania* aisladas de pacientes con leishmaniasis visceral. Se concluyó que, en estas condiciones, los análogos con 16 y, sobre todo, con 18 átomos de carbono presentaron la mayor actividad. Por otro lado, la presencia de dobles enlaces *cis* o *trans* en dicha cadena no cambió de manera importante la actividad. El estudio *in vivo* en ratones infectados mostró nuevamente que los análogos con 16 y 18 átomos de carbono presentaron la mayor actividad, siendo esta vez el más activo el análogo con 16 átomos de carbono (Figura 4.2).<sup>6</sup>

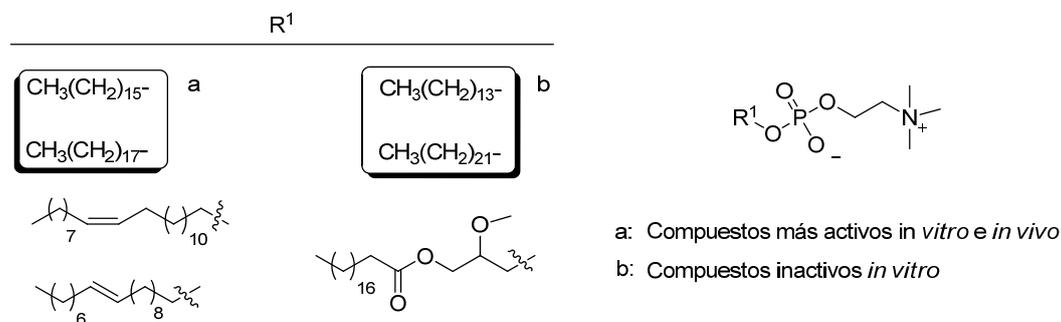


Figura 4.2. Efecto sobre la actividad antileishmania de la longitud de la cadena y de la presencia de dobles enlaces en ella, en análogos de MT.<sup>6</sup>

En un tercer estudio *in vitro* sobre promastigotes de *L. donovani* y *L. infantum*, se midió la actividad de tres series diferentes de análogos de MT con grupos cicloalquilideno, anillos aromáticos en la cadena alquílica y grupos polares terminales *N,N,N*-trimetilamonio, *N*-metilpiperidinio o *N*-metilmorfolinio (Figura 4.3). Se concluyó que la presencia de grupos cicloalquilideno en alquilfosfocolinas aumentan la actividad

<sup>5</sup> Croft, S. L., Neal, R. A., Pendergast, W., Chan, J. M. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 2633-2336.

<sup>6</sup> Unger, C., Maniera, T., Kaufmann-Kolle, P., Eibl, H. *Drugs Today* **1998**, *34*, 133-140.

antileishmania. Por otro lado, los cambios del resto trimetilamonio por *N*-metilpiperidonio o *N*-metilmorfolonio disminuyen la actividad antileishmania,<sup>7</sup> y la presencia de heteroátomos en la cadena alquílica disminuye notablemente la actividad. La sustitución del resto de colina por *N,N*-dimetil-4-piperidinio (compuesto de nombre comercial Perifosina, en Figura 4.3) parece aumentar la actividad.<sup>8</sup>

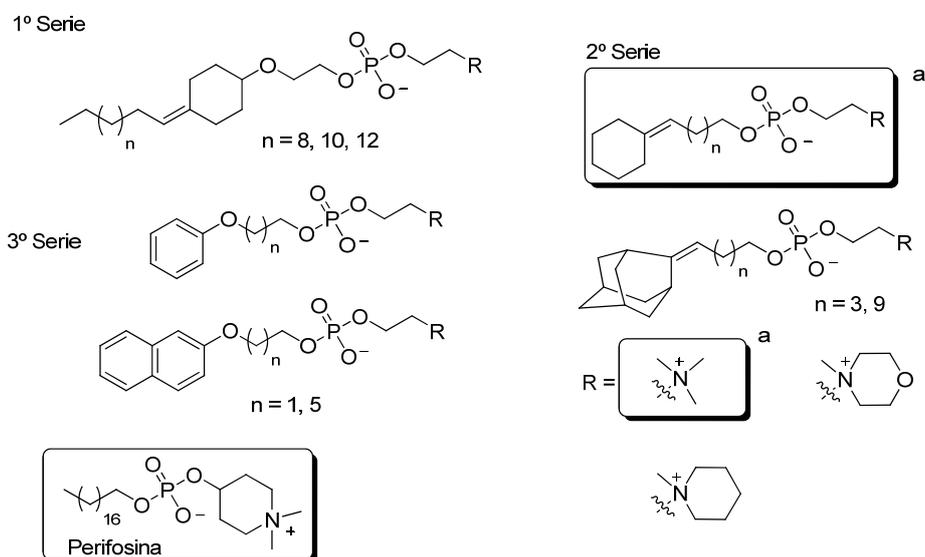


Figura 4.3. Efecto sobre la actividad antileishmania de la presencia en la cadena alquílica de restos cicloalquilideno, adamantilideno, o aromáticos, y restos trimetilamonio, *N*-metilpiperidonio y *N*-metilmorfolonio y en el resto polar (a: compuestos con mayor actividad antileishmania).<sup>7</sup>

En la Figura 4.4 se resumen de forma gráfica los resultados más relevantes de los anteriores estudios.

<sup>7</sup> Avlonitis, N., Lekka, E., Detsi, A., Koufaki, M., Calogeropoulou, T., Scoulica, E., Siapi, E., Kyrikou, I., Mavromoustakos, T., Tsoinias, A., Grdadolnik, S. G., Makriyannis, A. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 755-767.

<sup>8</sup> Nössner, G., Kutscher, B., Engel, J., Schumacher, W., Steker, J., Hilgard, P. Patente US 6172050 (2001).

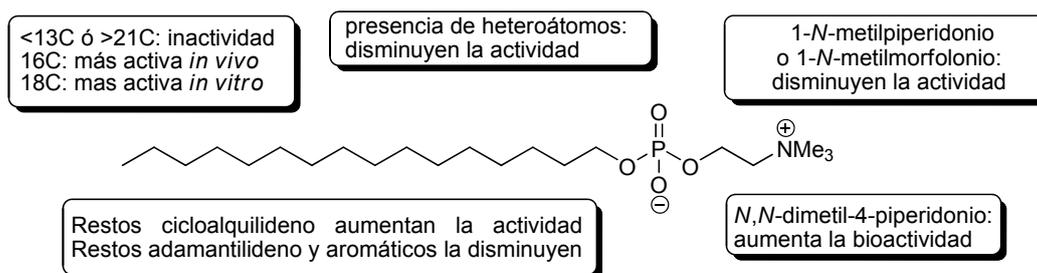


Figura 4.4. Relación estructura-actividad antileishmania *in vitro* en MT.<sup>5,6,7</sup>

Se puede concluir de estos estudios que la incorporación de un grupo fluoróforo debe llevarse a cabo en la cadena alifática. Esto implica que ha de tratarse de un fluoróforo lipofílico, con geometría preferentemente lineal, para que tanto la conformación como la relación hidrofília-lipofília del análogo no varíen demasiado respecto a la de Miltefosina. Además, es importante que la longitud de onda de excitación del grupo fluorescente no sea menor de 360 nm, para facilitar el uso del análogo emisor en microscopios de fluorescencia con excitación monofotónica (Figura 4.5).

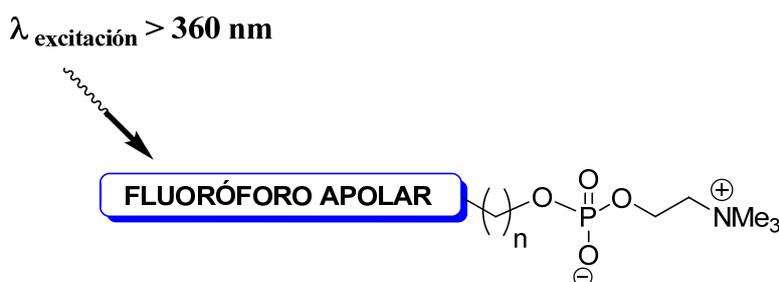
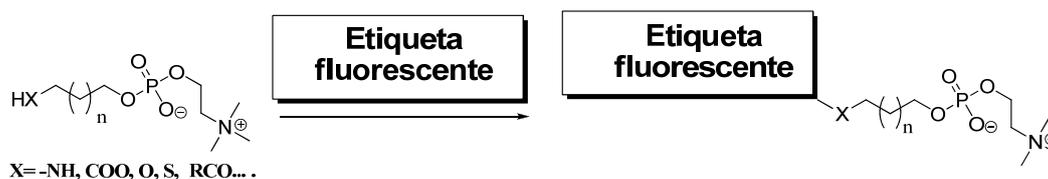


Figura 4.5. Estructura propuesta para los análogos emisivos de Miltefosina

El procedimiento más frecuente para introducir grupos con emisión de fluorescencia en moléculas de compuestos bioactivos consiste en la unión covalente de etiquetas fluorescentes a través de grupos funcionales ya presentes en el compuesto o introducidos previamente con este fin (Esquema 4.1). Sin embargo, este método presenta una serie de inconvenientes, que en el caso del fármaco Miltefosina son críticos. Así, si se utilizan los grupos fluoróforos habituales se incrementa considerablemente la masa y las dimensiones moleculares del fármaco, varía la distribución de carga y el punto isoeléctrico y se altera el balance hidrofília-lipofília del fármaco. Ésta es una de las

principales razones que explican la existencia de pocos ejemplos descritos de fármacos bioactivos con etiquetas fluorescentes.



Esquema 4.1. Procedimiento habitual para el etiquetado de una molécula bioactiva como Miltefosina. Síntesis de derivados por un grupo reactivo introducido.

Algunos de estos problemas podrían atenuarse con el uso de grupos fluorescentes lipófilos poliaromáticos, como antraceno, fenantreno, perileno, etc. Sin embargo, estos grupos presentan problemas adicionales, tales como provocar baja solubilidad acuosa del derivado, inducir cambios conformacionales en la cadena alquílica y, muy frecuentemente, los grupos poseen fotofísica compleja. Otros grupos como NBD o dansilo, a pesar de que tienen menor tamaño, contienen grupos polares en su estructura y tienen propiedades fotofísicas (absorción, rendimiento cuántico) no del todo adecuadas (Figura 4.6).



Figura 4.6. Posibles grupos fluorescentes para la síntesis de análogos fluorescentes de Miltefosina

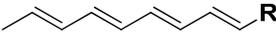
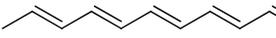
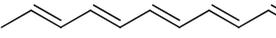
En este trabajo se seleccionó una aproximación diferente, consistente en la construcción del grupo fluoróforo sobre la molécula mediante síntesis completa de un nuevo análogo fluorescente conteniendo grupos polieno conjugado. Esta estrategia permite un control más preciso de las propiedades del producto resultante.

Como ya se ha comentado en el capítulo de *Antecedentes bibliográficos*, los polienos conjugados lineales son apolares, tienen coeficientes de absorción molar relativamente altos, y valores del rendimiento cuántico de fluorescencia modestos, pero útiles. Estos grupos tienen muchas de las características de las cadenas alifáticas de la

mayoría de los lípidos y no provocan perturbaciones importantes al insertarse en membranas lipídicas naturales o artificiales.<sup>9,10</sup>

Dado que los polienos con 4 y 5 dobles enlaces conjugados presentan la absorción demasiado desplazada al ultravioleta, y que los de 6 dobles enlaces no son fluorescentes (Tabla 1.1), decidimos incorporar grupos arilo conjugados en el extremo de la cadena polimetilénica. Las propiedades espectroscópicas del grupo pentaeno conjugado se mejoran así de manera considerable, con un modesto incremento del tamaño molecular. Conviene, sin embargo, destacar que el grupo pentaeno conjugado puede ser de gran interés si se dispone de microscopios de fluorescencia con fuentes de excitación bifotónica.

Tabla 4.1. Datos aproximados de las longitudes de onda de absorción, de emisión y del rendimiento cuántico de fluorescencia de los grupos tetraeno, pentaeno y hexaeno conjugados, en etanol.

		Absorción (nm)	Emisión (nm)	$\Phi_F$
tetraeno		<b>320</b>	<b>410</b>	<b>0.04</b>
pentaeno		<b>350</b>	<b>470</b>	<b>0.1</b>
hexaeno		<b>380</b>	<b>540</b>	<b>0.008</b>

Por tanto, se propusieron inicialmente los grupos todo-(*E*)-feniltetraeno conjugado, todo-(*E*)-feniltrienino conjugado y todo-(*E*)-difenilhexatrieno como posibles fluoróforos para el marcado de Miltefosina (Figura 4.7).

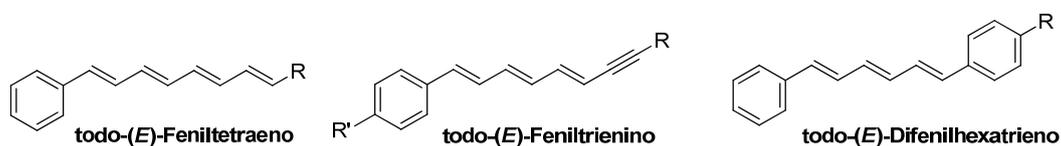


Figura 4.7

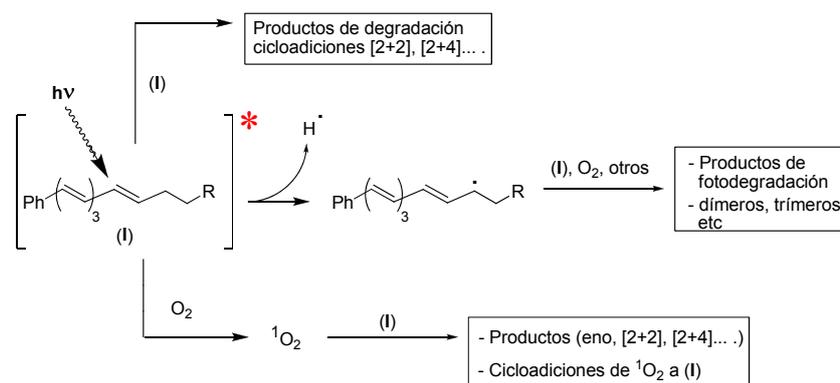
Como se muestra en el apartado de *Antecedentes bibliográficos*, el cromóforo todo-(*E*)-feniltetraeno ya se ha incorporado en la estructura del fármaco antitumoral

<sup>9</sup> Yeagle, P. L. *The structure of biological membranes*, CRC Press, New York, **1992**.

<sup>10</sup> Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lehninger, Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, Nueva York, **2000**.

Edelfosina mediante síntesis *de novo* de un nuevo análogo (ET-PTE). Actualmente se está utilizando dicho análogo en el estudio del mecanismo de acción antineoplásica del compuesto original.<sup>11</sup> Sin embargo, se ha encontrado que su utilidad es limitada cuando se trabaja con microscopios de fluorescencia con excitación láser, debido a la rápida fotodegradación del grupo emisor. Esta fotodegradación es probablemente el resultado de reacciones fotoquímicas del polieno, ya que, a partir del estado excitado, se pueden generar radicales alílicos que reaccionan con el propio análogo fluorescente, con el oxígeno o con otros compuestos del medio en el que se encuentra. Además, este estado excitado puede generar oxígeno singlete y dar lugar a varias reacciones bien conocidas, como la reacción eno y la cicloadición [2+2] o [2+4] a grupos insaturados. Por otro lado, pueden darse también cicloadiciones entre dos o más moléculas de polieno. Cualquiera de estas reacciones reduciría el número de dobles enlaces y, por tanto, la eficacia de la fluorescencia (Esquema 4.2).

En el caso de los análogos con el grupo todo-(*E*)-feniltrienino conjugado y todo-(*E*)-difenilhexatrieno, en los que el doble enlace más separado del extremo apolar se ha sustituido por un triple enlace o un grupo *p*-fenileno, se minimiza considerablemente el proceso de fotodescomposición como se ha observado en nuestros laboratorios. En consecuencia, se decidió utilizar el grupo fenilpolieno para la obtención de la primera generación de análogos, incorporando estos grupos fluorescentes en la estructura de Miltefosina mediante síntesis *de novo* de nuevos análogos fluorescentes.



Esquema 4.2. Posibles reacciones de fotodegradación del grupo todo-(*E*)-feniltetraeno.

<sup>11</sup> Quesada, E., Delgado, J., Gajate, C., Mollinedo, F., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5333-5335.

Por otro lado, para evitar en lo posible cambios en la bioactividad, el análogo fluorescente debería tener dimensiones moleculares no muy diferentes de las de Miltefosina, de modo que el conjunto fluoróforo-espaciador conserve aproximadamente la longitud de la cadena C16 original de MT. Si los grupos poliénicos conjugados todo-(*E*)-feniltrienino y todo-(*E*)-difenilhexatrieno se colocan en posición terminal, la distancia entre el resto fosfato y el carbono más alejado de la cadena espaciadora, en extensión máxima, se puede variar mediante la inserción de  $n$  grupos metileno. Para seleccionar el valor más apropiado del número  $n$  se construyó un modelo molecular del alcohol precursor de Miltefosina (programa Hyperchem™ 6.03) y de los alcoholes precursores de los nuevos análogos. En el análogo conteniendo el grupo todo-(*E*)-feniltrienino, esta distancia ya había sido calculada anteriormente en nuestro grupo, deduciéndose una distancia óptima de 5 metilenos. Para el cálculo de la distancia óptima en el análogo conteniendo el grupo todo-(*E*)-1,6-difenilhexatrieno (DPH), se varió el número de metilenos entre 3 y 5 (Figura 4.8, Tabla 4.2). En todos los casos se minimizó la energía de la conformación más extendida mediante cálculos de mecánica molecular MM2.

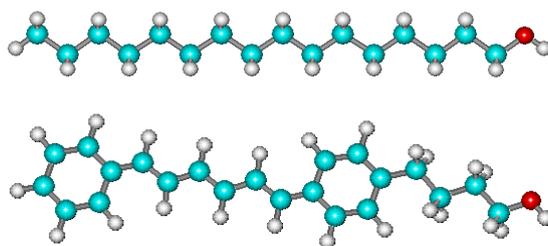
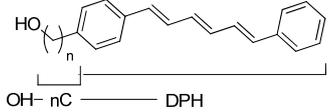


Figura 4.8. Modelo molecular del alcohol precursor de Miltefosina (arriba) y su análogo con un grupo todo-(*E*)-difenilhexatrieno, ambos en la conformación extendida de mínima energía, estimada mediante el programa MM2.

En hexadecanol, el alcohol precursor de Miltefosina, la distancia es de 20.2 Å, por lo que el espaciador polimetilénico debería tener 4 grupos metilenos (OH-4C-DPH). Teniendo en cuenta los trabajos mencionados sobre las relaciones estructura-actividad para Miltefosina, es de esperar que un valor menor de  $n$  traiga como consecuencia una disminución de bioactividad, mientras que una cadena más larga posiblemente aumentaría las propiedades detergentes del análogo.

Tabla 4.2. Distancia (Å) entre el átomo de oxígeno del grupo *OH* y el átomo de carbono terminal del cromóforo todo-(*E*)-1,6-difenilhexatrieno (DPH) calculadas mediante el programa Hyperchem™ 6.03.

	Número de metilenos de la cadena espaciadora (n)	Distancia C más alejado-O (Å)
OH-3C-DPH	3	18.8
OH-4C-DPH	4	20.1
OH-5C-DPH	5	21.2
hexadecanol	16	20.2

En conclusión, a partir del conjunto de observaciones discutidas más arriba, la estructura que aparece como más apropiada para un análogo emisor de Miltefosina estaría compuesta por los siguientes elementos:

- Un grupo polar constituido por fosfatidilcolina
- Un grupo fluorescente lipofílico, de pequeño tamaño molecular
- Un fragmento de cadena alquílica saturada conectando ambos grupos, de forma que la distancia total esté próxima a la de Miltefosina.

Como otro de nuestros objetivos es lograr una vía de síntesis para los análogos MT-PTRI con elevada diastereoselectividad, decidimos también sintetizar otros dos análogos con ciertas diferencias estructurales, para, además, intentar mejorar sus propiedades parasiticidas y espectroscópicas. Así, nos propusimos la síntesis de un análogo con un metileno adicional en la cadena espaciadora ( $n = 6$ ) y otro análogo con un grupo *p*-metoxilo en el fenilo terminal del cromóforo, a fin de desplazar al rojo la longitud de onda de absorción, facilitando así su uso en microscopía de fluorescencia (Figura 4.9).

También se decidió sintetizar otro análogo con un grupo terminal todo-(*E*)-difenilhexatrieno y con 6 metilenos en la cadena espaciadora, buscando la comprobación de las anteriores hipótesis sobre la necesaria longitud de dicha cadena. En definitiva, se seleccionaron finalmente las estructuras de los análogos mostrados en la Figura 4.9. La estereoquímica (*E*) de los dobles enlaces es necesaria para facilitar que las moléculas adopten una conformación aproximadamente lineal, similar a la del fármaco original.

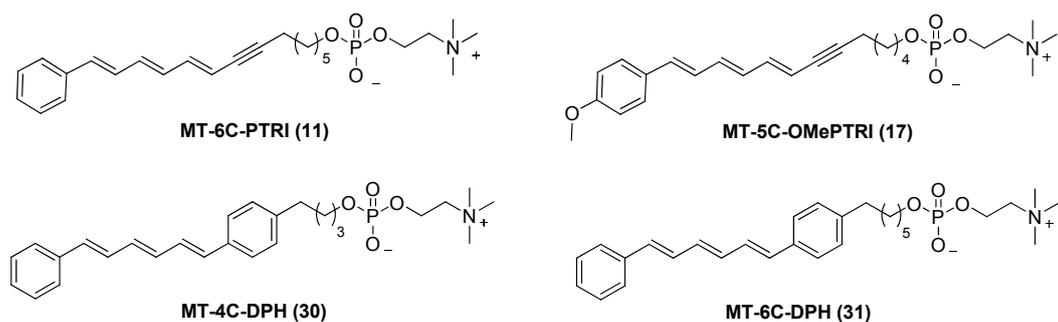


Figura 4.9. Análogos fluorescentes de Miltefosina con grupos feniltrienino y difenilhexatrieno.

## 4.1.2 Síntesis

### 4.1.2.1 Análogos con grupos todo-(*E*)-feniltrienino

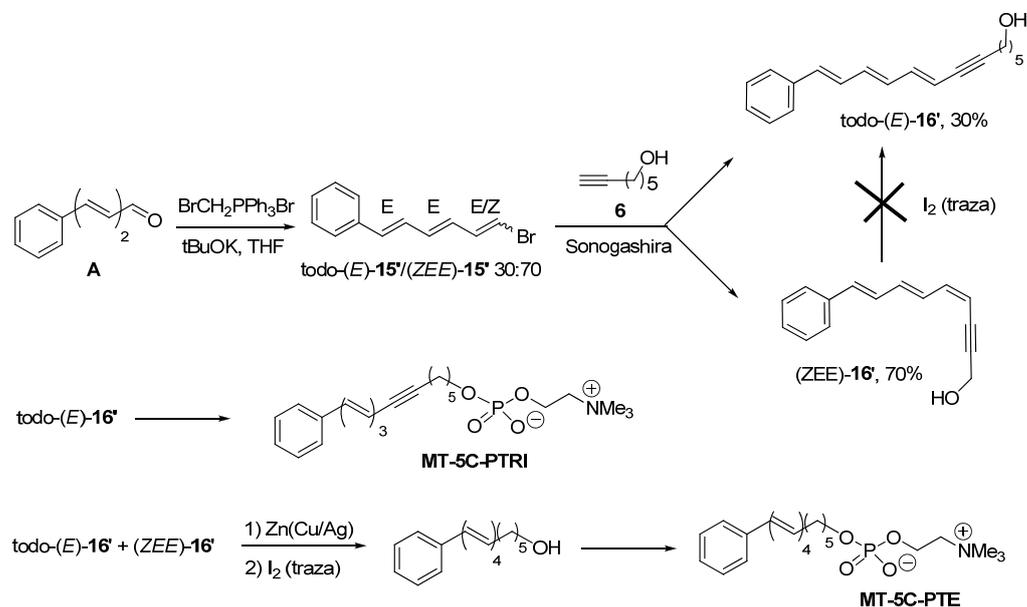
Como se mostró en el capítulo de *Antecedentes bibliográficos*, nuestro grupo había descrito previamente la obtención de dos análogos fluorescentes de Miltefosina con grupos todo-(*E*)-feniltetraeno (MT-5C-PTE) y todo-(*E*)-feniltrienino (MT-5C-PTRI).<sup>12</sup> Su síntesis tiene como paso clave un acoplamiento sp-sp<sup>2</sup> (Sonogashira-Hagihara) entre el alquino terminal **6** y la mezcla de isómeros todo-(*E*)-**15'**/(*ZEE*)-**15'** 30:70, obtenida mediante la reacción entre el aldehído **A** y bromuro de bromometilfosfonio (Esquema 4.3). Debido a la difícil separación de estos isómeros por cromatografía o precipitación, se utilizó en dicho acoplamiento la mezcla de ambos bromuros. La geometría de los dos nuevos estereoisómeros así obtenidos, todo-(*E*)-**16'** y (*ZEE*)-**16'**, es la misma que la de los compuestos vinilbromados empleados. El isómero minoritario todo-(*E*)-**16'** se puede separar fácilmente por precipitación selectiva de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con *n*-pentano, obteniéndose así el alcohol precursor de MT-5C-PTRI. Por otro lado, la reducción parcial del triple enlace de ambos isómeros (todo-(*E*)-**16'** y (*ZEE*)-**16'**) con Zn (método de Boland)<sup>13</sup> y la posterior isomerización de los dobles enlaces *cis* a *trans* con yodo condujeron al alcohol con el cromóforo todo-(*E*)-feniltetraeno, precursor de MT-5C-PTE (Esquema 4.3).

Dado que en la obtención de análogos de Miltefosina con grupo feniltrienino sólo es útil el alcohol precursor minoritario de geometría todo-(*E*), y que no ha sido posible isomerizar ni el isómero (*ZEE*)-**16'** ni su bromuro precursor (*ZEE*)-**15'** a los

<sup>12</sup> Saugar, J. M., Delgado, J., Hornillos, V., Luque-Ortega, J. R., Amat-Guerri, F., Acuña, A. U., Rivas, L. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5994-6003.

<sup>13</sup> Boland, W., Pantke, S. *J. Prakt. Chem.* **1994**, *336*, 714-715.

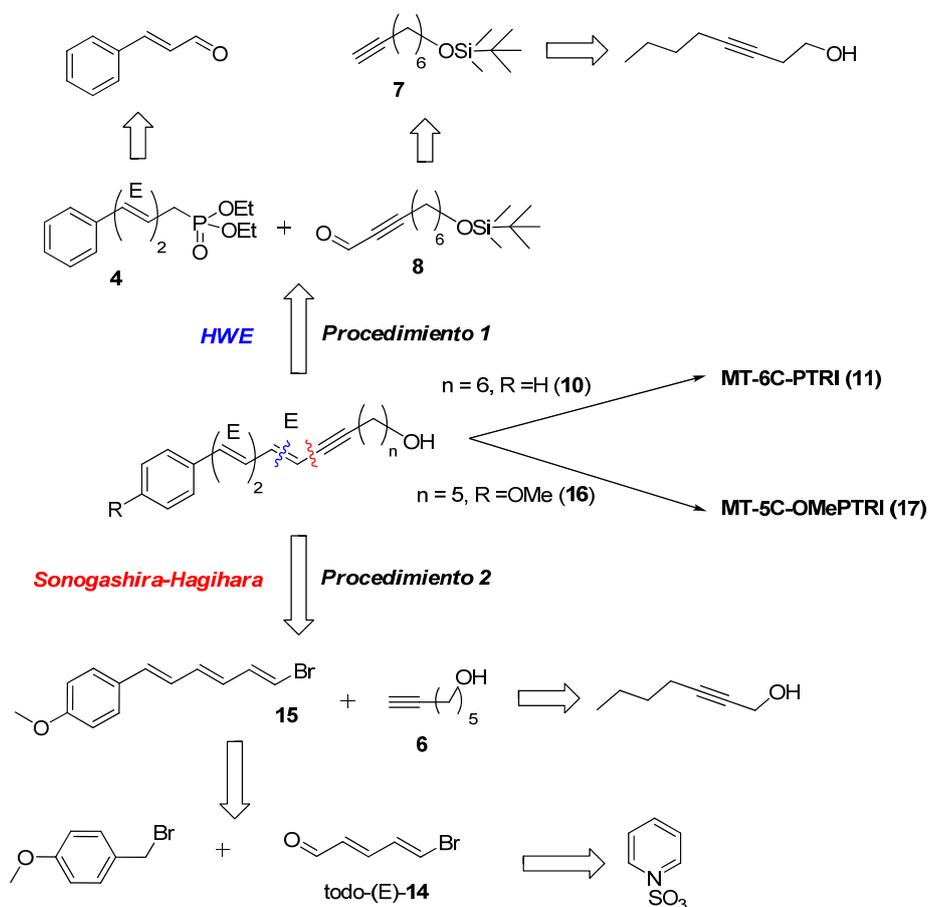
respectivos isómeros todo-(*E*), se hizo aconsejable la búsqueda de un procedimiento alternativo de síntesis más sencillo, versátil y eficiente. Desarrollamos así dos nuevas estrategias sintéticas en las que se mejoró considerablemente la estereoselectividad hacia la obtención de este cromóforo todo-(*E*).



Esquema 4.3. Síntesis de MT-5C-PTE y MT-5C-PTRI.<sup>12</sup>

La primera ruta sintética, aplicada a la obtención del homólogo de feniltrienino con 6 metilenos (Procedimiento 1, Esquema 4.4), tiene como etapa clave un acoplamiento diastereoselectivo HWE hacia el doble enlace de geometría (*E*) entre el fosfonato 4 y el aldehído 8, obtenido este último por formilación de Vilsmeier-Haack del alquínol terminal sililado 7. El fosfonato 4 se obtendría por vinilogación de (*E*)-cinamaldehído. La segunda ruta sintética (Procedimiento 2, Esquema 4.4) se aplicó a la obtención del homólogo de feniltrienino con un grupo *p*-metoxilo en el anillo aromático. Esta ruta tiene como paso clave un acoplamiento estereoespecífico  $\text{sp-sp}^2$  (Sonogashira-Hagihara) entre el alquínol terminal 6 y el bromuro vinílico 15. La estereoquímica del producto obtenido debe ser la misma que la de 15. 15 se obtendría de forma estereoselectiva por reacción de bromuro de *p*-metoxibencilo con todo-(*E*)-5-bromopenta-2,4-dienal (todo-(*E*)-14), obtenido a su vez a partir del complejo de trióxido de azufre con piridina. Sobre los correspondientes alcoholes 10 y 16 se introduciría el

grupo fosfocolina, generándose finalmente los análogos buscados MT-6C-PTRI (11) y MT-5C-OMePTRI (17).



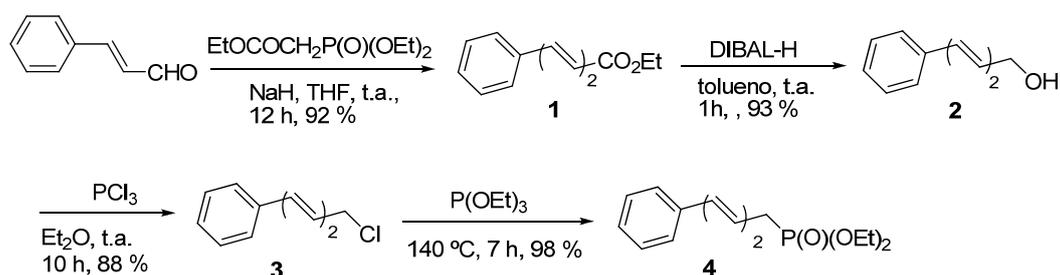
Esquema 4.4. Análisis retrosintético de los procedimientos 1 y 2 para la síntesis de análogos de MT 11 y 17, con el grupo todo-(*E*)-feniltrienino.

Ambos métodos se pueden aplicar a la obtención de otros polienos, siendo además posible regular la longitud de la cadena espaciadora y la naturaleza de la cabeza polar. Además, como se verá, los productos de partida son de fácil acceso, las condiciones experimentales de los pasos de síntesis no implican mucha complejidad, y existe abundante bibliografía sobre cada transformación. En general, la mayoría de las reacciones transcurren en condiciones experimentales suaves, sin que se afecten los grupos insaturados de los compuestos intermedios o finales. Las ventajas y limitaciones de ambos métodos se discuten más adelante.

#### 4.1.2.1.1 Síntesis de MT-6C-PTRI (11)

##### Síntesis de productos de partida

El fosfonato diénico **4** se obtuvo en cuatro pasos partiendo del compuesto comercial *trans*-cinamaldehído (Esquema 4.5). La primera etapa de síntesis consistió en una reacción de vinilogación de Horner-Wadsworth-Emmons<sup>11,14</sup> con fosonoacetato de trietilo,<sup>15</sup> activado previamente con NaH como base para formar el iluro estabilizado. Se generó así el éster etílico con un doble enlace adicional (**1**), que se aisló fácilmente con alto rendimiento (92 %). Según el análisis <sup>1</sup>H-RMN de **1**, la estereoquímica del doble enlace generado es (*E*) (aparece un doblete con una constante de acoplamiento de 15.6 Hz a 5.99 ppm, correspondiente al H en posición α respecto al grupo éster), sin que se aprecie por este método la presencia de isómero (*Z*).



Esquema 4.5. Obtención de (2*E*,4*E*)-5-fenilpenta-2,4-dienilfosfonato de dietilo (**4**)

El éster **1** se redujo a continuación al alcohol alílico **2** con DIBAL a temperatura ambiente (93%), siguiendo las condiciones descritas en la bibliografía, con ligeras modificaciones. Trabajando en la escala del multigramo, resulta conveniente llevar a cabo la reducción con H<sub>4</sub>LiAl, aunque la reacción transcurre con menor rendimiento (85 %) debido a adiciones del hidruro en el sistema diénico. El espectro <sup>1</sup>H-RMN del sistema de dobles enlaces de **2** es similar al obtenido para **1**, aunque las señales de los protones del doble enlace en posición 2 se desdoblan por acoplamiento con el metileno en posición 1.

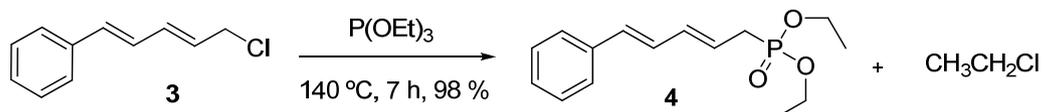
El alcohol **2** se transformó en el correspondiente cloruro alílico **3** por reacción con un equivalente de PCI<sub>3</sub>, que se corresponde con 0.33 moles por mol de **2**, siguiendo un método descrito.<sup>16</sup> El uso de 1/3 mol de agente clorante es suficiente para completar la reacción.

<sup>14</sup> Maryanoff, B. E., Reitz, A. B. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863-927.

<sup>15</sup> Villieras, J., Rambaud, M. *Synthesis* **1983**, 300-303.

<sup>16</sup> Beck, A., Heissler, D., Duportail, G., *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1459-1472.

La reacción de HWE requiere el empleo del fosfonato **4** como producto de partida, que puede prepararse fácilmente por reacción de Michaelis-Arbuzov<sup>17</sup> entre fosfito de trietilo y el cloruro **3** (Esquema 4.6) con rendimientos casi cuantitativos (Esquema 4.6). El fosfito de trietilo actúa como disolvente, además de como reactivo, por lo que se añade en exceso frente al cloruro. Completada la reacción, dicho exceso se elimina mediante destilación a vacío. El compuesto **4** se obtuvo con la suficiente pureza para ser utilizado en la siguiente reacción, a la vista de su espectro <sup>1</sup>H-RMN.



Esquema 4.6. Síntesis de **4** por reacción de Michaelis-Arbuzov

La identificación de **4** se realizó fácilmente a partir de sus datos espectroscópicos. Aparte de los protones del sistema poliénico, las señales más características corresponden a los protones del grupo metileno unido al fósforo. Éstas aparecen como un doblete de dobletes a 2.71 ppm, con constantes de acoplamiento de 7.8 y 22.7 Hz, por acoplamiento con el protón en posición 2 y con el átomo de fósforo, respectivamente.

Para la olefinación de HWE con el fosfonato **4** fue necesaria la preparación del aldehído  $\alpha,\beta$ -acetilénico **8**, accesible a partir del correspondiente alquínol terminal (**5**) con el resto hidroxilo protegido, **7**. El alquínol **5** se obtuvo a partir de un isómero con el grupo acetilénico interno, oct-7-in-1-ol (Esquema 4.7). Este alcohol se isomerizó (isomerización *zipper*), desplazando el triple enlace a la posición terminal mediante el empleo de un medio superbásico (amiduro potásico de 1,3-diaminopropano,  $\text{KNHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ , o KAPA), dando lugar a **5**.<sup>18,19</sup>

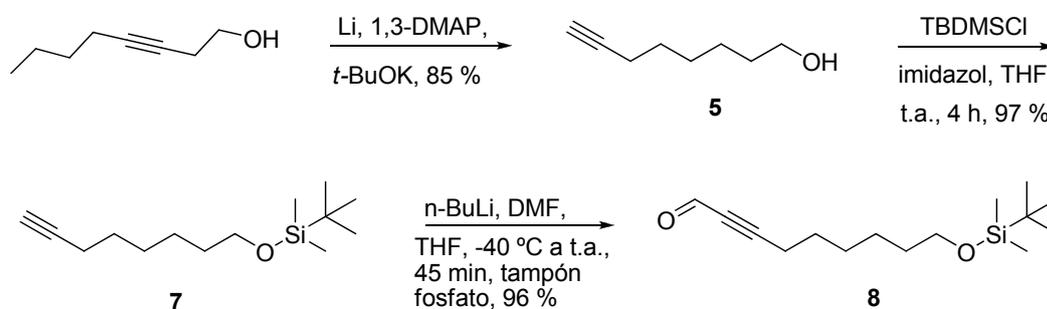
Para la formilación sobre el triple enlace de **5** es necesario proteger el resto hidroxilo con un grupo que, a ser posible, sea útil también en la etapa de olefinación de HWE. Además, este grupo debe ser fácilmente eliminable en condiciones experimentales que no afecten al sistema poliénico conjugado generado tras dicho acoplamiento. Dado que los polienos conjugados son sensibles al hidrógeno, usado habitualmente para la desprotección del grupo bencilo, así como a los medios ácidos, usados para separar muchos grupos protectores del resto hidroxilo, se decidió utilizar cloruro de *terc*-

<sup>17</sup> Bhattacharya, A. K., Thyagarajan, G. *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 415-430.

<sup>18</sup> Kimmel, T., Becker, D. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 2494-2496.

<sup>19</sup> Hopf, H., Krüger, A. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4378-4385.

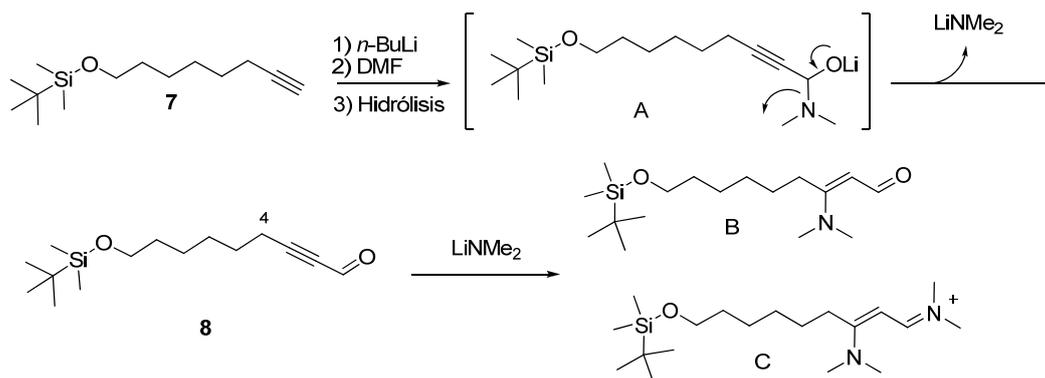
butildimetilsililo (TBDMSCl), que no necesita estas condiciones para su desprotección. Este grupo es fácilmente eliminable empleando fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF), sin afectar en principio al sistema poliénico conjugado. El uso de 1.3 equivalentes de imidazol como catalizador y 1.1 equivalentes de TBDMSCl en THF como disolvente permitió la conversión de **5** en **7** con rendimientos del 97%.



Finalmente, la síntesis del aldehído  $\alpha,\beta$ -acetilénico **8** se logró con rendimientos casi cuantitativos por reacción del correspondiente acetiluro de litio (generado a partir del alquino **7** con butillitio) con dimetilformamida (DMF) (Esquema 4.8). Para evitar la adición sobre el grupo formilo de las especies organometálicas generadas en el medio de reacción, se hidrolizó el  $\alpha$ -aminoalcóxido intermedio utilizando fosfato monopotásico al 10 % en agua. Durante la hidrólisis, el intermedio A evoluciona hacia la formación del aldehído **8**, liberando al medio dimetilamiduro de litio, un nucleófilo que puede adicionarse al grupo formilo generado (Esquema 4.8). El tampón fosfato hidroliza de manera adecuada este amiduro, evitando así la aparición de esta reacción secundaria. El uso de agua o condiciones más enérgicas (HCl 3 M) para la hidrólisis conduce invariablemente a rendimientos inferiores al 50 %.<sup>20</sup>

El aldehído **8** presenta en su espectro  $^1\text{H-RMN}$  un triplete a 9.18 ppm ( $J = 0.6$  Hz), por el acoplamiento homopropargílico del protón del grupo formilo con los protones del metileno en posición 4. El carbono del grupo formilo aparece en el espectro  $^{13}\text{C-RMN}$  a 177.6 ppm.

<sup>20</sup> Journet, M., Cai, D., Dimichele, L. M., Larsen, R. D. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6427-6428.



Esquema 4.8. Formilación del alquino terminal **7** y sus posibles reacciones secundarias

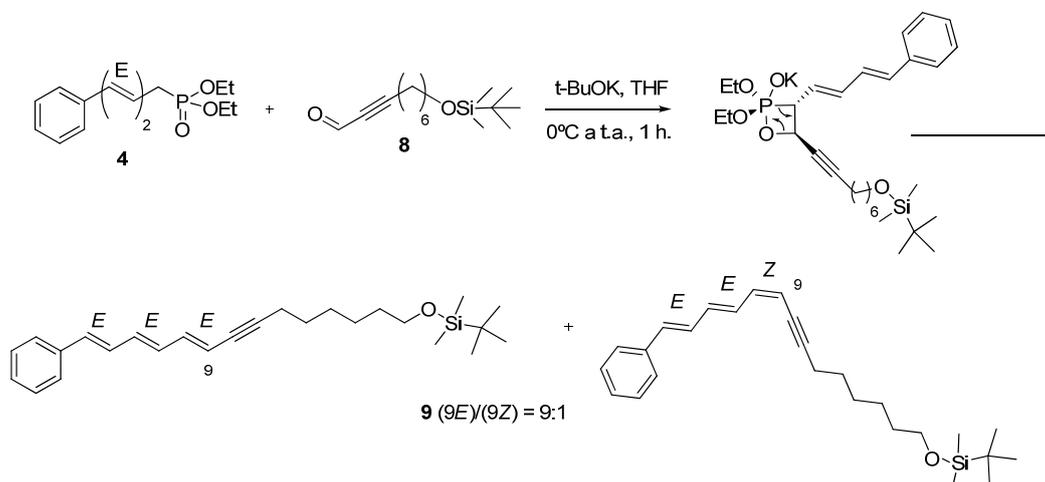
### Síntesis de MT-6C-PTRI (**11**) mediante olefinación de HWE

Para llegar al compuesto **9**, con grupo feniltrienino conjugado, se empleó el acoplamiento diastereoselectivo de HWE entre **4** y **8** (Esquema 4.9). El producto **9** así obtenido debe tener geometría predominantemente todo-(*E*).<sup>14</sup> En su obtención se siguieron las condiciones experimentales descritas en la bibliografía para sustratos similares (*tert*-butóxido potásico en THF seco a 0°C), generándose **9** (60 %) como una mezcla 9:1 de estereoisómeros (*E*)/(*Z*) en el nuevo doble enlace formado (<sup>1</sup>H-RMN). En este caso, el tamaño de ambos reactivos favorece la estereoselectividad, dirigiendo la reacción hacia la formación del doble enlace con geometría (*E*), ya que en la formación del oxafosfetano intermedio existe un control estérico que determina la geometría preferente del producto final. No fue posible separar los estereoisómeros mediante cromatografía sobre gel de sílice o por cristalización. También se intentó la isomerización (*Z*)→(*E*) con trazas de yodo, sin que se apreciara variación alguna en la proporción inicial 9:1 de los isómeros (*E*)/(*Z*). La isomerización de un doble enlace conjugado con un triple enlace en polienos conjugados aparentemente sólo se ha logrado en compuestos en los que el grupo alquino está unido a un grupo silano terminal.<sup>21</sup>

En el espectro <sup>1</sup>H-RMN en CDCl<sub>3</sub> de la mezcla (*9E*,11*E*,13*E*)-**9**/(*9Z*,11*E*,13*E*)-**9** aparecen dos dobletes de tripletes a 2.35 y 2.43 ppm, en proporción 9:1, respectivamente, que se asignaron a los protones de los metilenos en posición 6 de la cadena polimetilénica para cada isómero. Estos protones se encuentran acoplados con los del metileno contiguo y, a través del triple enlace, con el protón en posición 9. El protón olefínico en posición 9 resuena a 5.46 ppm (dt, *J*<sub>(*E*)</sub> = 10.2 Hz, *J*<sub>homopropargílica</sub> = 2.2 Hz) en el isómero (*9Z*), y a 5.64 ppm (dt, *J* = 15.2, 2.1 Hz) en el isómero (*9E*), con intensidades

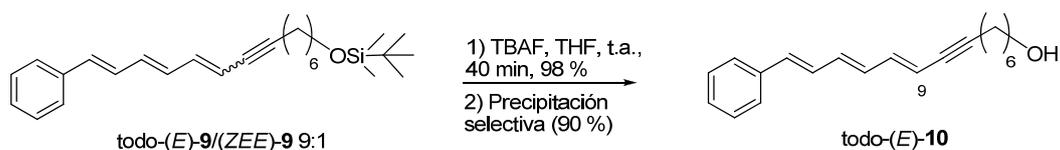
<sup>21</sup> Harris, S. J., Walton, D. R. M. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1037-1042.

relativas 1:9, confirmando así que el isómero mayoritario formado tiene el nuevo doble enlace con geometría (*E*). En el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de la mezcla aparecen las señales correspondientes a los carbonos del triple enlace del isómero todo-(*E*)-**9** a 80.8 y 94.9 ppm, como era de esperar. La baja proporción del isómero (*Z*) provoca señales muy débiles, no útiles para el diagnóstico. En el espectro de masas, obtenido por impacto electrónico, se observó señal a  $m/z$  394, que se corresponde con el ión molecular.



Esquema 4.9. Síntesis del compuesto **9** con el cromóforo feniltrienino conjugado, mediante olefinación de HWE

La desprotección del grupo OH en la mezcla de isómeros todo-(*E*)-**9** + (*ZEE*)-**9** con TBAF en THF transcurrió de modo prácticamente cuantitativo, si bien fue necesaria la adición de más de dos equivalentes para llevar a término la reacción (Esquema 4.10). La proporción de isómeros en los nuevos compuestos, todo-(*E*)-**10** y (*ZEE*)-**10** es, obviamente, la misma que la de los compuestos de partida. El isómero todo-(*E*)-**10** se aisló en estado de gran pureza mediante precipitación selectiva desde una disolución en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de la mezcla (9*E*,11*E*,13*E*)-**10** y (9*Z*,11*E*,13*E*)-**10**, adicionando *n*-pentano (rendimiento final en isómero todo-(*E*): 90 %).



Esquema 4.10. Desprotección del hidroxilo en la mezcla de isómeros todo-(*E*)-**9**/(*ZEE*)-**9**

EL espectro  $^1\text{H}$ -RMN de todo-(*E*)-**10** muestra las señales asignables al grupo todo-(*E*)-14-feniltrienino conjugado (Figura 4.10). Entre ellas destaca el doblete a 5.64 ppm ( $J_{(E)} = 15.3$  Hz) del protón en posición 9, que apoya que la geometría del doble enlace en esa posición es (*E*). En el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN aparecen, como era de esperar, las señales correspondientes a los carbonos del triple enlace a 81.8 y 95.2 ppm. La asignación del resto de las señales se ha realizado mediante espectros bidimensionales COSY y HSQC, para  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, respectivamente.

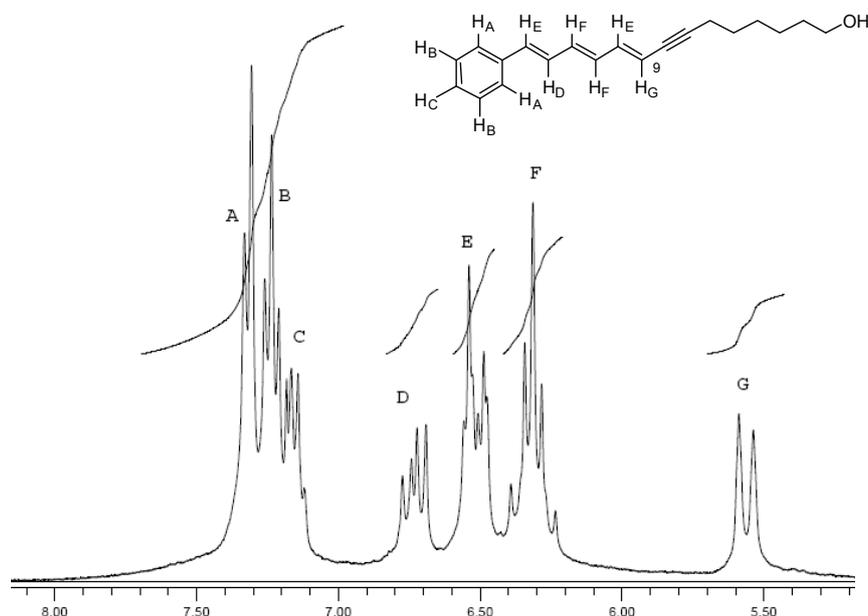


Figura 4.10. Señales características del grupo todo-(*E*)-feniltrienino en el espectro  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$  de todo-(*E*)-**10**

El espectro IR del isómero todo-(*E*)-**10** presenta la señal característica de la tensión C-C en triples enlaces a  $2208\text{ cm}^{-1}$ . En el espectro de masas por impacto electrónico se observó señal a  $m/z$  280, que se corresponde con el ión molecular.

La última etapa de síntesis consiste en la introducción del grupo fosfatidilcolina en el alcohol todo-(*E*)-**10**. Existen varios procedimientos para la introducción de la funcionalidad fosfatidilcolina en una molécula con un grupo alcohol. El más utilizado en el pasado, actualmente en desuso, requiere cantidades estequiométricas de sales de plata, y requiere medio acuoso<sup>22</sup> Sin embargo, hoy día existen procedimientos más flexibles y

<sup>22</sup> Hirt, R., Berchtold, R. *Pharm. Acta Helv.* **1958**, *33*, 349-354.

económicos. El más aplicado utiliza 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-óxido y trimetilamina (Esquema 4.11).<sup>23</sup> Una tercera vía emplea tres pasos: reacción del alcohol, por ejemplo una glicerina disustituída, con oxiclورو de fósforo, luego con tosilato de colina y, por fin, con agua.<sup>24</sup> En este caso, se ha descrito que el uso de tetrafenilborato de colina, en lugar del tosilato de colina, mejora de manera considerable los rendimientos de reacción.<sup>25</sup> También se han sintetizado fosfocolinas con oxiclورو de fósforo y etilén-glicol,<sup>26</sup> y su síntesis pasa por el mismo fosfolano intermedio que en el procedimiento de la ref. 23. Además, en algunos casos es posible activar estos intermedios con triflato de trimetilsililo a temperatura ambiente,<sup>27</sup> aumentando así los rendimientos. También es conocido el método de Hansen, que utiliza diclorofosfito de 2-bromoetilo y trimetilamina.<sup>28</sup> Sin embargo, el método aparentemente más eficaz emplea la reacción con clorofosfito de etileno para dar un fosfolano cíclico que se oxida a continuación con bromo; el bromuro se desplaza del intermedio obtenido con trimetilamina.<sup>29</sup>

Los reactivos utilizados como fuente de fosfato en los métodos de Brockeroff,<sup>24</sup> Magolda<sup>26</sup> y Hansen<sup>28</sup> son oxiclورو de fósforo o diclorofosfito de 2-bromoetilo. Estos reactivos son más baratos que el reactivo 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-óxido.<sup>23</sup> Sin embargo, estos precursores no parecen adecuados para sustratos poliénicos, ya que el ácido clorhídrico generado por los cloruros que quedan sin sustituir en la primera etapa puede, junto con el propio reactivo, reaccionar de diversos modos con los dobles enlaces del sistema poliénico del cromóforo. De modo similar, la aplicación del método de Bittman<sup>29</sup> se descartó ante la segura adición de bromo a los dobles enlaces.

---

<sup>23</sup> Thuong, N. T., Chabrier, P. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1974**, 667-676.

<sup>24</sup> Brockeroff, H., Ayengar, N. K. N. *Lipids* **1978**, **14**, 88-89.

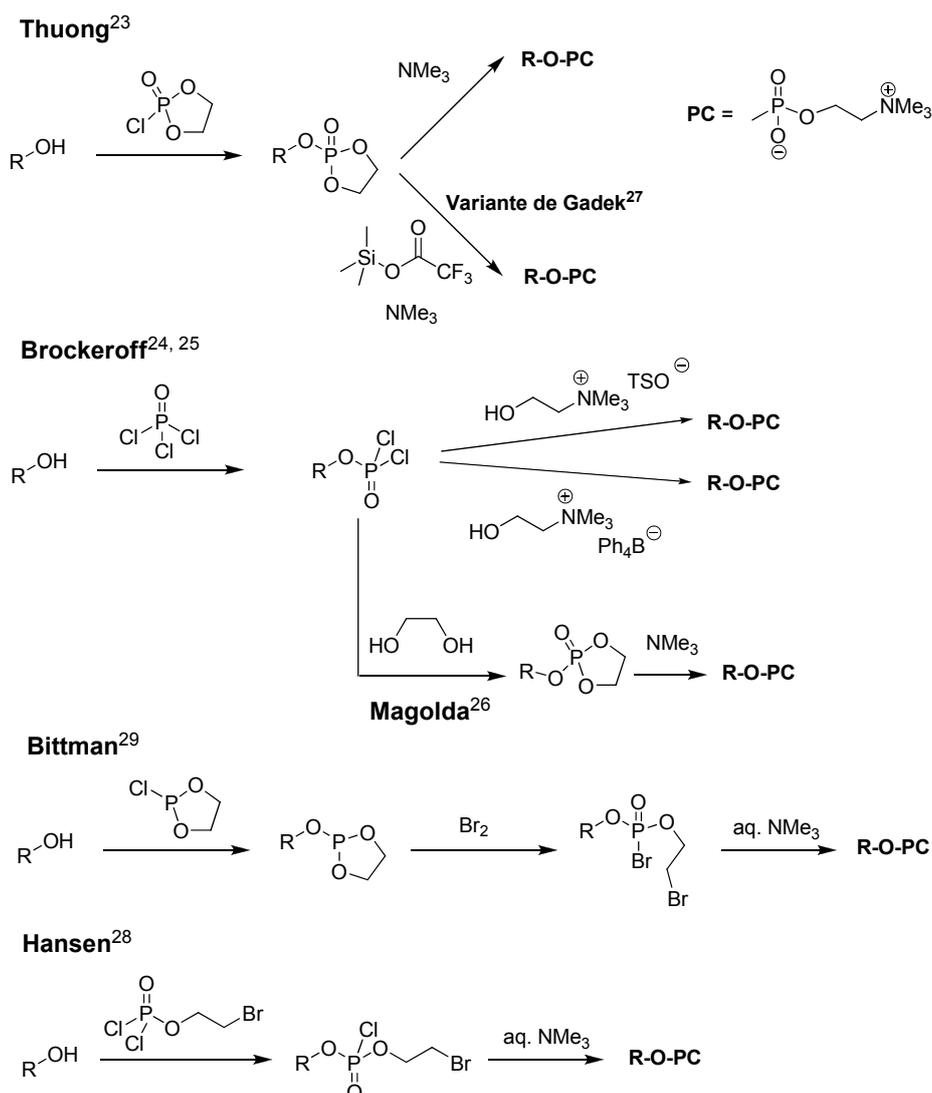
<sup>25</sup> Huang, Z., Guo, X., Li, W., MacKay, J. A., Szoka, F. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, **128**, 60-61.

<sup>26</sup> Magolda, R. L., Johnson, P. R. *Tetrahedron Lett.* **1985**, **26**, 1167-1170.

<sup>27</sup> Gadek, T. R. *Tetrahedron Lett.* **1989**, **30**, 915-918.

<sup>28</sup> Hansen, W. J., Ramaswamy, M., Wedmid, Y., Baumann, W. J. *Lipids* **1982**, **17**, 453-459.

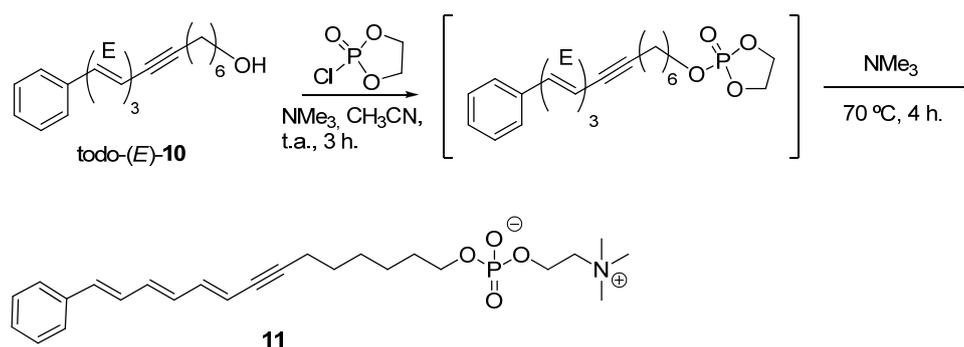
<sup>29</sup> Erukulla, R. K., Byun, H. S., Bittman, R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, **35**, 5783-5784.



Esquema 4.11. Métodos de introducción del grupo fosfatidilcolina en alcoholes

En consecuencia, se decidió incorporar el grupo fosfatidilcolina a los alcoholes poliénicos mediante el método de Thuong<sup>23</sup> en dos etapas de reacción (Esquema 4.12), llevadas a cabo en un solo recipiente: la condensación del grupo OH del alcohol todo-*(E)*-**10** con 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-óxido en presencia de trimetilamina, que dio lugar al correspondiente fosfolano que, a continuación, se abrió con exceso de trimetilamina. Esta última actúa como base en la primera etapa y como nucleófilo en la segunda. Operando de esta forma se hace necesario eliminar el clorhidrato de

trimetilamonio formado en la primera reacción y presente en el producto final. Para ello se utilizó una mezcla de resinas de intercambio de catión y de anión, antes de purificar por cromatografía en columna de gel de sílice, ya que, debido a la alta polaridad de las mezclas de disolventes que se usan como eluyentes, dicho clorhidrato sería de difícil separación del producto final **11**. El rendimiento de esta reacción es siempre bajo, seguramente por dos razones: 1) la necesidad de calentar en la segunda etapa, provocando la descomposición parcial de **11**; y 2) la fuerte retención de los fosfolípidos por la sílice de las columnas cromatográficas. Para eluir los productos en la cromatografía sobre gel de sílice es necesario emplear mezclas MeOH/CHCl<sub>3</sub>,<sup>30</sup> y los sistemas poliénicos se descomponen parcialmente en estas condiciones.



Esquema 4.12. Introducción del grupo fosfatidilcolina en todo-(*E*)-**10**

La estructura del análogo **11** se confirmó mediante sus datos espectroscópicos. En el espectro <sup>1</sup>H-RMN en CD<sub>3</sub>OD (Figura 4.11) aparecen las señales correspondientes al cromóforo todo-(*E*)-feniltrienino conjugado, a los protones de la cadena de 6 metilenos y al resto de fosfatidilcolina. Las señales de los protones en los metilenos del resto de fosfocolina aparecen como dos multipletes debido a que se acoplan entre sí y con el átomo de fósforo. Los protones en posición 1 de la cadena polimetilénica aparecen como un cuadruplete debido al acoplamiento H-P. Los protones del grupo todo-(*E*)-feniltrienino presentan el mismo patrón que en el alcohol precursor todo-(*E*)-**10**, confirmando que durante la introducción del resto de fosfocolina no se ha producido ningún tipo de isomerización del sistema polienínico. En general, las señales del espectro

<sup>30</sup> Technical Support, © *Avanti Polar Lipids, Inc.* ([www.avantilipids.com/TechnicalSupport.asp](http://www.avantilipids.com/TechnicalSupport.asp)).

son agudas, por lo que se puede afirmar que el compuesto **11** no produce asociaciones ni agregados micelares en CD<sub>3</sub>OD.<sup>31</sup>

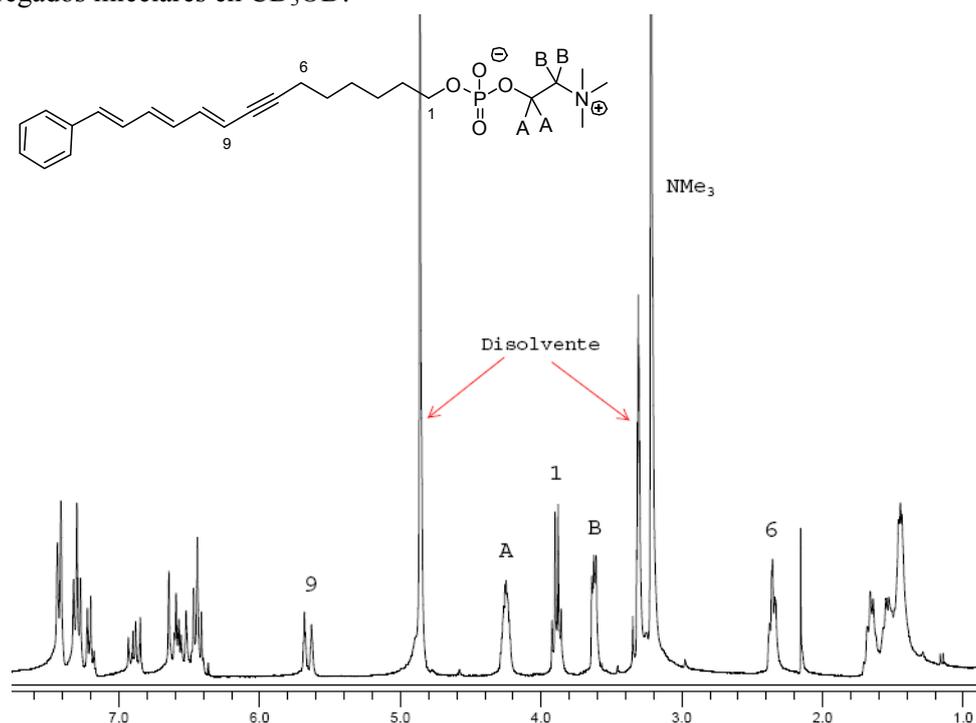


Figura 4.11. Espectro <sup>1</sup>H-RMN en CD<sub>3</sub>OD del análogo **11**

En el espectro <sup>13</sup>C-RMN aparecen todas las señales asignables a los carbonos del compuesto **11**. Entre ellas caben destacar las señales de los carbonos situados a dos o tres enlaces del átomo de fósforo, ya que aparecen, como era de esperar, acopladas con este último (Figura 4.12). La magnitud de este acoplamiento ha permitido asignar inequívocamente las señales correspondientes a los C-metilénicos en el resto de fosfatidilcolina y, a través del espectro 2D HSQC, en el espectro <sup>1</sup>H-RMN. El espectro FT-IR de **11** muestra las bandas de absorción características de la cadena polimetilénica a 2940 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>C-H</sub>) y a 1479 cm<sup>-1</sup> (δ<sub>C-H</sub>). Las bandas correspondientes al grupo fosfatidilcolina aparecen a 1229 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>P=O</sub>), 1085 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>C-O-P</sub>) y 968 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>N-C</sub>). En el espectro de masas de **11** (ESI<sup>+</sup>) se observan las señales correspondientes a la masa molecular más un protón o un catión sodio. También se observan las señales correspondientes a los dímeros más un protón o un catión sodio. La pureza de este

<sup>31</sup> Kang, E., Kataoka, S., Kato, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, *78*, 1558-1564.

compuesto se comprobó por  $^1\text{H}$ -RMN, HPLC y análisis elemental. Su inequívoca fórmula molecular se demostró por masas de alta resolución, utilizando la técnica  $\text{ESI}^+$ .

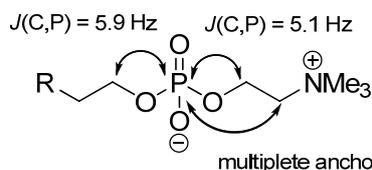
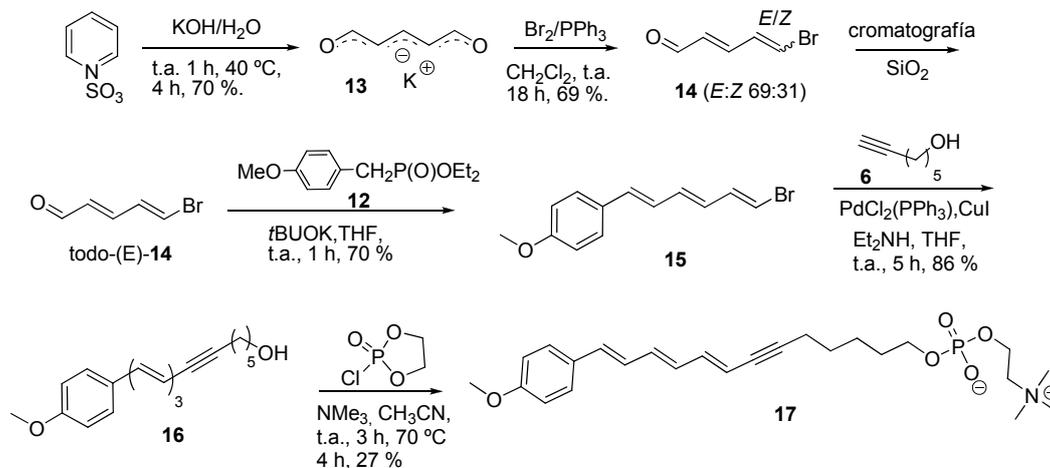


Figura 4.12. Acoplamientos C,P observables en el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del fosfolípido **11**

#### 4.1.2.1.2 Síntesis de MT-5C-OMePTRI (**17**)

De acuerdo con el análisis retrosintético del Esquema 4.4, el procedimiento **2** tiene como paso clave un acoplamiento  $\text{sp-sp}^2$  (Sonogashira-Hagihara) entre el alquino terminal **6** y el bromuro vinílico todo-(*E*)-**15**, dando lugar al correspondiente alcohol precursor con el grupo *p*-metoxifeniltrienino, **16** (Esquema 4.13). Este acoplamiento ocurre con retención de la configuración del doble enlace implicado. Por otro lado, el precursor todo-(*E*)-**15** se obtuvo mediante olefinación de HWE con *p*-metoxibencilfosfonato de dietilo (**12**) de (2*E*,4*E*)-5-bromo-2,4-pentadienal (todo-(*E*)-**14**) (obtenido a su vez mediante hidrólisis del complejo trióxido de azufre-piridina, seguido de bromación estereoselectiva de la sal **13** generada, según el procedimiento descrito por Duhamel y col.<sup>32</sup>).

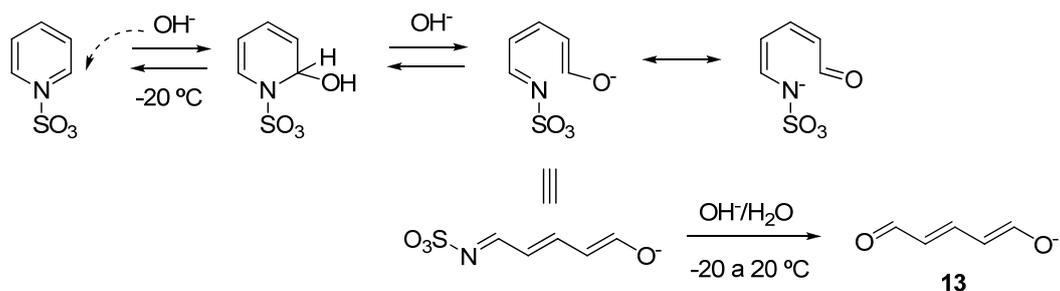


Esquema 4.13. Síntesis del análogo MT-5C-OMe PTRI (**17**) mediante el procedimiento **2**

<sup>32</sup> Soullez, D., Plé, G., Duhamel, L., Duhamel, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 563-564.

### Síntesis de todo-(E)-5-bromopentadienal (14)

todo-(E)-5-Bromopentadienal (**14**) se obtuvo en dos pasos partiendo del complejo de trióxido de azufre con piridina. El primer paso consiste en la apertura nucleófila de dicho complejo mediante una disolución acuosa de hidróxido potásico en agua.<sup>33</sup> En una primera etapa a -20 °C se produce la hidrólisis de dicho complejo, generándose iminosulfonato de gluconaldehído. Tras aumentar la temperatura, este intermedio evoluciona en una segunda etapa (hidrólisis) a gluconaldehído potásico, **13** (Esquema 4.14).<sup>34</sup>



Esquema 4.14. Mecanismo postulado para la apertura nucleófila, en medio básico, del complejo de trióxido de azufre y piridina en la síntesis de **13** (gluconaldehído).

La apertura nucleófila del anillo de piridina requiere la presencia de sustituyentes electrófilos sobre el átomo de nitrógeno ( $\text{SO}_3$ , CN, 2,4-dinitrobenceno) y el uso de nucleófilos fuertes, como disolución concentrada de hidróxido sódico o hidróxido potásico en agua. Esta apertura siempre tiene lugar en el átomo de carbono en posición 2, por lo que en derivados sustituidos estas posiciones deben estar libres.

En los espectros  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$  de la sal **13** en  $\text{D}_2\text{O}$  aparecen tres únicas señales, lo que pone de manifiesto la alta simetría de la molécula en disolución. Esta simetría implica una deslocalización de la carga negativa por toda la estructura que, además, junto a la constante de acoplamiento del protón en posición 3 ( $J = 13.0$  Hz) apoya que la stereoquímica de los dos enlaces  $\text{C}=\text{C}$  en la molécula es (E).

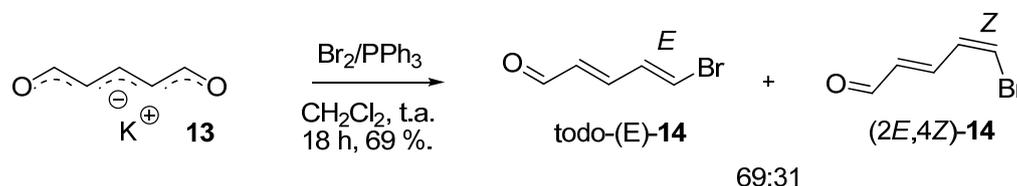
La bromación de la sal **13**, utilizando bromuro de bromotrifetilfosfonio (generado por adición de  $\text{Br}_2$  sobre una disolución de trifetilfosfina en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), condujo a los diastereoisómeros (2E,4E)-**14** y (2E,4Z)-**14** en proporción 69:31, con un rendimiento global del 69 % (Esquema 4.15).<sup>35</sup> Lipshutz y col.<sup>36</sup> han descrito una mejora

<sup>33</sup> Becher, J. *Org. Synth.* **1979**, 59, 79.

<sup>34</sup> Becher, J. *Synthesis* **1980**, 589.

<sup>35</sup> Soullez, D., Plé, G., Duhamel, L., Duhamel, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 563-564.

de esta reacción utilizando la mezcla NBS/PPh<sub>3</sub> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, debido a los bajos rendimientos que obtuvieron estos autores utilizando el anterior bromuro. Sin embargo, en nuestro caso no hubo mejora substancial utilizando estas últimas condiciones. Los isómeros obtenidos se separaron fácilmente por cromatografía en columna. El isómero (2*E*,4*E*)-**14** presenta menor *R<sub>f</sub>* que el isómero (2*E*,4*Z*)-**14**.



Esquema 4.15. Bromación de la sal **13** utilizando bromuro de bromotriphenilfosfonio

(2*E*,4*Z*)-**14** tiene en su espectro <sup>1</sup>H-RMN cinco señales distintas, asignables a cada uno de los protones del sistema poliénico. Entre ellas destaca el doblete de dobletes a 6.90 ppm ( $J_{4,5(Z)} = 10.5$  Hz,  $J_{4,3} = 7.0$  Hz) del protón en posición 4, que apoya que la estereoquímica del doble enlace directamente unido al bromo es (*Z*). La mayor simetría del isómero (2*E*,4*E*)-**14** hace que en su espectro <sup>1</sup>H-RMN las señales de los protones en posiciones 3, 4 y 5 se solapen para dar una señal única. La masa de ambos isómeros se confirmó por el espectro de masas (EI).

La síntesis de todo-(*E*)-**15** por reacción de HWE requiere también la preparación del fosfonato **12**, el cual se obtuvo fácilmente por reacción de Michaelis-Arbuzov entre bromuro de *p*-metoxibencilo y fosfito de trietilo en exceso (Esquema 4.16).<sup>37</sup> El compuesto **12** se obtuvo como un aceite incoloro y con la suficiente pureza (espectro <sup>1</sup>H-RMN) como para ser utilizado en la siguiente reacción.

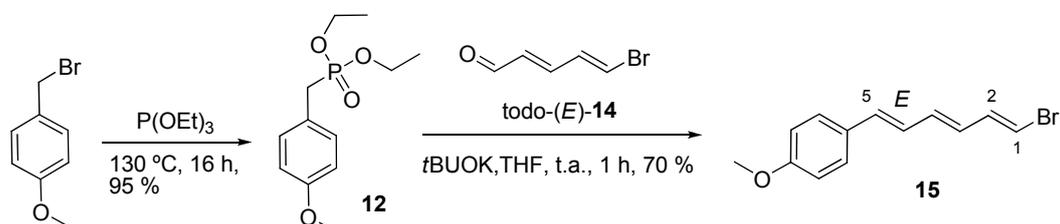
El tratamiento del aldehído todo-(*E*)-**14** con el fosfonato **12** (activado con <sup>t</sup>BuOK), siguiendo las condiciones experimentales descritas en la bibliografía para otros aldehídos α,β-insaturados,<sup>38</sup> dio lugar al compuesto todo-(*E*)-**15** con un rendimiento del 70% (Esquema 4.16). De acuerdo con el espectro <sup>1</sup>H-RMN, la estereoquímica del doble enlace generado es (*E*) ( $J_{5,6(E)} = 14.1$  Hz), sin que se aprecie la presencia del isómero *Z*. Se puede comprobar que las constantes de acoplamiento para los protones vecinales de

<sup>36</sup> Lipshutz, B. H., Ullman, B., Lindsley, C., Pecchi, S., Buzard, D. J., Dickson, D. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6092.

<sup>37</sup> Murias, M., Handler, N., Erker, T., Pleban, K., Ecker, G., Saico, P., Szekeres, T., Häger, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5571-5578.

<sup>38</sup> Lei, Y., Wroblewski, A. D., Golden, J. E., Powel, D. R., Aubé, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4552-4553.

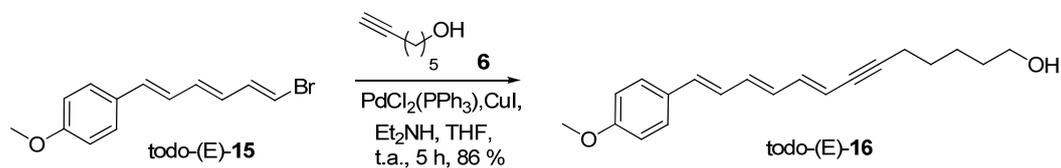
los dobles enlaces ( $J_{1-2}$ ,  $J_{3-4}$ ,  $J_{5-6}$ ) son cercanas a 14 Hz (configuración (*E*)), descartando cualquier posible isomerización de los mismos. La masa molecular del compuesto se confirmó por el espectro de masas (EI). El análisis HPLC mostró que todo-(*E*)-**15** se obtuvo con una pureza superior al 98 %.



Esquema 4.16. Síntesis de **15**

### Síntesis de MT-5C-OMePTRI (**17**)

Como se muestra en el análisis retrosintético del Esquema 4.4, la etapa clave en el procedimiento 2 consiste en un acoplamiento sp-sp<sup>2</sup> de Sonogashira-Hagihara entre el alquino terminal **6** (obtenido por isomerización de tipo *zipper*, del mismo modo que se hizo para la obtención del alquino terminal **5**) y el bromuro vinílico todo-(*E*)-**15** (Esquema 4.17). En nuestro grupo se han determinado las condiciones óptimas para el acoplamiento entre bromopolienos y alcoholes acetilénicos.<sup>39</sup> Esta reacción es rápida (en apenas 30 min a temperatura ambiente se consume la casi totalidad de **15**), lo cual es consistente con la elevada reactividad de los haluros de alqueno, superior a la de los haluros de arilo. En todo caso, para garantizar altos rendimientos la reacción se mantuvo durante 5 h.



Esquema 4.17. Acoplamiento de S.-H. entre todo-(*E*)-**15** y **6** para dar todo-(*E*)-**16**.

Por otra parte, la proporción de alquino **6** más conveniente, con respecto a todo-(*E*)-**15**, no debe ser la estequiométrica, puesto que entonces no se consume la totalidad de **15** en la reacción. Sin embargo, es suficiente un exceso de **6** del orden del 20 al 30%

<sup>39</sup> Quesada, E., Delgado, J., Hornillos, V., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2285-2295.

para que se consuma **15**. El exceso de **6** se consume en la reducción Pd(II)→Pd(0), generándose además el producto de homoacoplamiento alquino-alquino de **6** (homodímero) durante el proceso. El homodímero, por otra parte, es un producto fácilmente separable por cromatografía del producto de acoplamiento cruzado todo-(*E*)-**16**.

La naturaleza de la base no parece ser determinante en este acoplamiento, por lo que se utilizó únicamente dietilamina anhidra. Para facilitar la solubilidad de los productos, se utilizó además THF anhidro como co-disolvente.

En relación con el tipo de catalizador, siempre se empleó yoduro cuproso como fuente de Cu(I), estableciéndose un porcentaje molar óptimo con respecto a **6** en el entorno del 10%. Respecto a los complejos de paladio, los mejores resultados, en cuanto a limpieza, eficiencia y rapidez de la reacción de acoplamiento, se obtuvieron cuando se utilizó paladio(II) diclorobis(trifenilfosfina) (Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) en un 5% molar respecto de **6**. De este modo, el producto de acoplamiento todo-(*E*)-**16** se logró con alto grado de pureza y un rendimiento del 86%, tras la purificación cromatográfica del crudo de reacción. Como era de esperar, la reacción transcurrió con retención de la configuración del doble enlace implicado en el acoplamiento, y la estereoquímica del alcohol **16** es la misma que la del correspondiente compuesto vinilbromado todo-(*E*)-**15**.

La estructura del análogo **16** se confirmó por sus datos espectroscópicos. El espectro <sup>1</sup>H-RMN mostró señales asignables al grupo todo-(*E*)-13-(*p*-metoxifenil)trienino conjugado (Figura 4.13). A 2.38 ppm aparece un triplete de dobletes asignable a los protones del metileno en posición 5 de la cadena polimetilénica ( $\alpha$  respecto al triple enlace). Estos protones se encuentran acoplados con los del metileno contiguo en 4 y con el protón en posición 8, a través del triple enlace. El protón olefínico en posición 8 resuena a 5.60 ppm (dt,  $J_{(E)} = 15.4$  Hz,  $J_{\text{homopropargílica}} = 1.9$  Hz), confirmando así que la estereoquímica del doble enlace en esa posición es (*E*). La asignación del resto de las señales <sup>1</sup>H-RMN se ha realizado mediante el espectro bidimensional COSY.

En el espectro <sup>13</sup>C-RMN aparecen, como era de esperar, las señales correspondientes a los carbonos del triple enlace a 80.6 y 93.9 ppm. La asignación del resto de las señales, en este espectro, se ha realizado mediante el espectro bidimensional HSQC.

El espectro IR del isómero todo-(*E*)-**16** presenta la señal característica de la tensión C-C en triples enlaces a 2197 cm<sup>-1</sup>. En el espectro de masas del derivado, obtenido por impacto electrónico, se observó el ión molecular a  $m/z$  296 uma. El análisis HPLC mostró que todo-(*E*)-**15** se obtuvo con una pureza superior al 97 %.

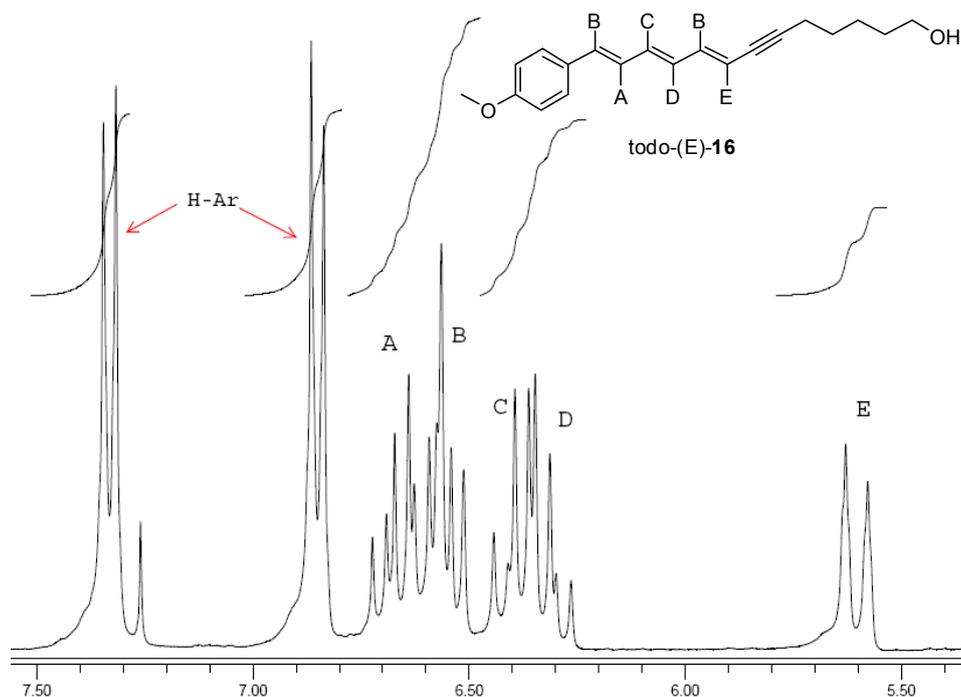
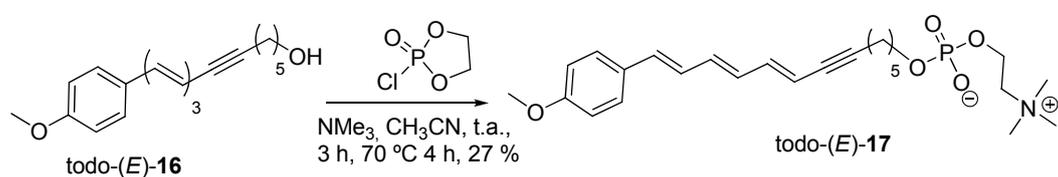


Figura 4.13. Señales características del grupo *p*-metoxifeniltrienino conjugado en el espectro de todo-(*E*)-16 en  $\text{CDCl}_3$ .

La obtención del análogo MT-5C-OMePTRI (**17**) se llevó a cabo por introducción del resto de fosfatidilcolina, mediante el mismo procedimiento utilizado para obtener el análogo **11** (Esquema 4.18).



Esquema 4.18. Introducción del grupo fosfatidilcolina en todo-(*E*)-16

La estructura del análogo **17** se confirmó mediante sus datos espectroscópicos. En el espectro  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CD}_3\text{OD}$  aparecen las señales correspondientes al cromóforo todo-(*E*)-*p*-metoxifeniltrienino conjugado, a la cadena de 5 metilenos, al metoxilo en posición *para* del grupo arilo y al resto de fosfatidilcolina (Figura 4.14). Las señales de los protones de los metilenos en el resto de fosfocolina aparecen como dos multipletes

debido a que se acoplan entre sí y con el átomo de fósforo. Aparentemente, los protones en posición 1 de la cadena polimetilénica aparecen como un cuadruplete, debido a este acoplamiento. La resonancia de los protones del grupo todo-(*E*)-feniltrienino presenta el mismo patrón que en el alcohol precursor todo-(*E*)-**16**, confirmando que durante la introducción del resto de fosfocolina no se ha producido alteración del sistema polienínico. En general, todas las señales del espectro  $^1\text{H-RMN}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  son agudas, por lo que se puede afirmar que en este disolvente el compuesto **17** no da lugar a asociaciones ni agregados micelares.<sup>31</sup>

En el espectro  $^{13}\text{C-RMN}$  aparecen todas las señales asignables a los carbonos del compuesto **17**. Entre ellas cabe destacar las señales de los carbonos situados a dos o tres enlaces del átomo de fósforo, que aparecen, como era de esperar, acopladas con este último. El espectro FT-IR del análogo **17** muestra las bandas de absorción características de la cadena polimetilénica a  $2938\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ ) y a  $1476\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{C-H}}$ ). Las bandas correspondientes al grupo fosfatidilcolina aparecen a  $1247\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{P=O}}$ ),  $1088\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-O-P}}$ ) y  $968\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{N-C}}$ ). El espectro de masas de **17** ( $\text{ESI}^+$ ) muestra la masa molecular esperada más un protón. También se observan las señales correspondientes al dímero con un protón. La pureza de este compuesto se comprobó por el espectro  $^1\text{H-RMN}$  mediante análisis HPLC y análisis elemental. Su fórmula molecular se confirmó por espectrometría de masas de alta resolución.

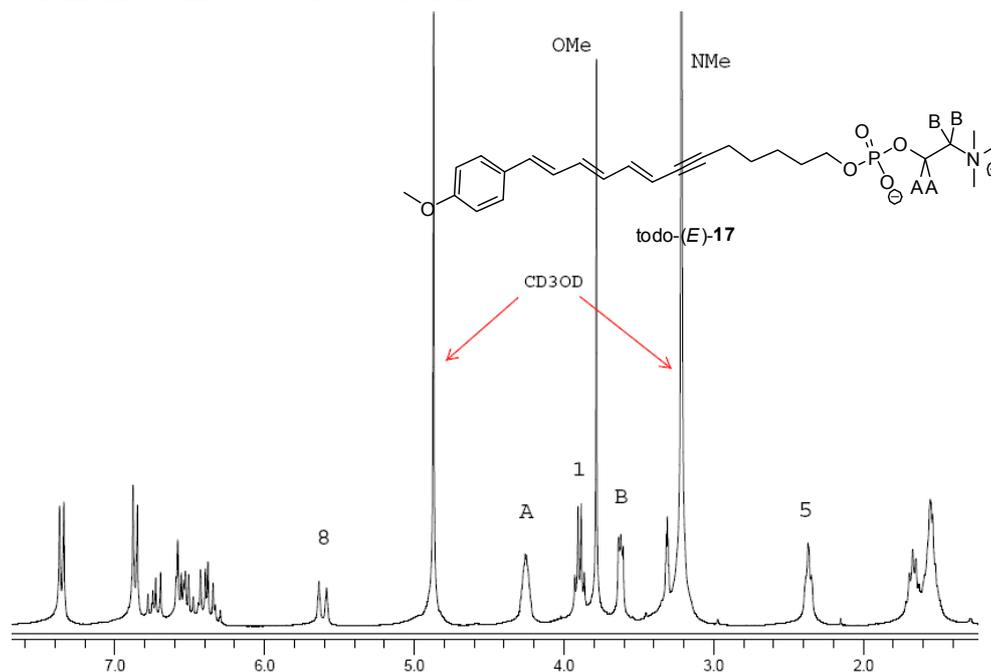


Figura 4.14. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del análogo **17**

## Comparación de métodos para obtener análogos con grupo PTRI

### *Método 1*

Ventajas: 1) la etapa clave de síntesis (reacción de HWE) transcurre con buena diastereoselectividad (relación *(E)/(Z)* 9:1); 2) el rendimiento global en el alcohol **10**, precursor del fosfolípido, que además es el compuesto de control en los ensayos biológicos de actividad y que se obtiene por reacción de HWE y 3 etapas posteriores, es casi 2.5 veces mayor que usando el método 2.

Inconvenientes: 1) los compuestos **4** (con grupo conjugado fenildieno) y **8** (con grupo aldehído acetilénico), necesarios para el acoplamiento HWE, tienen que obtenerse a partir de productos comerciales en 4 y 3 etapas de reacción, respectivamente, aunque con buenos rendimientos globales: 73 y 79 %; 2) el cromóforo PTRI se forma en el acoplamiento HWE entre **4** y **8**, lo cual, junto a sus etapas posteriores de desprotección y precipitación, pueden impedir la aplicación de este procedimiento a la obtención de estructuras lipídicas de mayor complejidad.

### *Método 2*

Ventajas: 1) el alcohol precursor del fosfolípido se obtiene en sólo 4 etapas (5, si se tiene en cuenta la etapa de obtención del alcohol con grupo acetilénico terminal que interviene en dicho acoplamiento), frente a las 9 que son necesarias con el método 1; 2) el bromuro de feniltrieno **15**, que también participa en el acoplamiento, puede incorporarse con facilidad a estructuras lipídicas complejas si éstas poseen un triple enlace terminal, utilizando para ello el mismo acoplamiento, y en condiciones suaves que, en principio, no afectarían al resto de la estructura lipídica. Por ello, este método es más versátil para el etiquetado de moléculas de interés biológico.

Inconvenientes: 1) hay una etapa que limita los rendimientos debido a que en la síntesis de **14** se llega a una mezcla *(E)/(Z)* 69:31 que hay que separar, para trabajar después sólo con el isómero *(E)*; 2) el rendimiento global en el alcohol precursor es menor (0.20 %) que usando el método 1.

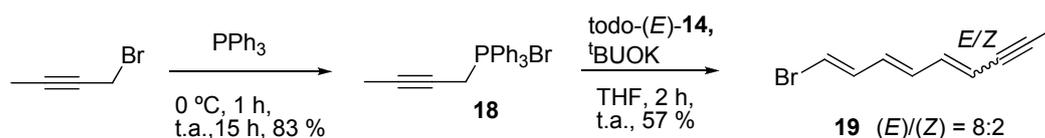
De lo expuesto anteriormente se concluye que ambos métodos de síntesis ofrecen claras ventajas para la obtención del cromóforo todo-*(E)*-feniltrienino, con mayor diastereoselectividad, de manera más simple y con mayor rendimiento que el utilizado anteriormente para la síntesis de un análogo similar, MT-5C-PTRI.<sup>11,12</sup> Además, ambos métodos son fácilmente escalables y son versátiles, al permitir la regulación de la longitud de la cadena espaciadora y la modificación de la cabeza polar, permitiendo también la incorporación de sustituyentes en el anillo aromático. Ambos métodos tienen

ventajas y limitaciones específicas, por lo que la utilización de una u otra estrategia depende del tipo de estructura molecular que se quiera marcar y del objetivo de la investigación.

#### 4.1.2.1.3 Síntesis de (1*E*,3*E*,5*E*)-1-bromonona-1,3,5-trien-7-ino (**19**)

Se ha sintetizado también un compuesto que podría ser usado en la obtención de análogos con el grupo terminal todo-(*E*)-triendiino conjugado siguiendo el procedimiento 2. Este cromóforo es un análogo más fotoestable que el grupo pentaeno conjugado, en el que se sustituyen los dobles enlaces extremos por sendos triples enlaces. Así, el cromóforo triendiino podría ser útil para el marcado fluorescente de lípidos, para estudios de biosíntesis lipídica mediante espectroscopía de dos fotones y para el marcado fluorescente de dominios en membranas celulares. Un lípido etiquetado con este cromóforo seguramente se podría incorporar a membranas celulares sin alterar el metabolismo lipídico, en forma similar a lo observado con el fluoróforo pentaeno conjugado *t*-COPA.

El precursor se preparó por reacción de Wittig<sup>14</sup> entre bromuro de 2-butiniltrifenilfosfonio (**18**) y el aldehído todo-(*E*)-**14**, de modo similar a como se obtuvo el intermedio todo-(*E*)-**15** (Esquema 4.19).



Esquema 4.19. Síntesis del intermedio **19**

La sal de fosfonio **18**, necesaria para la olefinación de Wittig, se obtuvo por reacción entre 1-bromo-2-butino y trifenilfosfina, siguiendo un procedimiento descrito.<sup>40</sup> Para evitar la polimerización del bromuro propargílico fue necesario mantener la temperatura a 0 °C durante la primera hora de reacción. Tras eliminar el bromuro y la trifenilfosfina sin reaccionar, la sal **18** se obtuvo como un sólido ligeramente amarillo y con la suficiente pureza, a la vista de su espectro <sup>1</sup>H-RMN, como para ser utilizado en la siguiente reacción.

La identificación de la sal **18** se realizó fácilmente por sus datos espectroscópicos. La señal de los protones del metilo aparecen en el espectro <sup>1</sup>H-RMN como un triplete de dobletes a 1.65 ppm, con constantes de acoplamiento de 2.7 y 6.4

<sup>40</sup> Navarro, I., Mas, E., Fabriàs, G., Camps, F. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1267-1274.

Hz, por acoplamiento con los protones del metileno en posición 1 (tripleto) a través del triple enlace, y con el átomo de fósforo (doblete), respectivamente. Del mismo modo, los protones del metileno se muestran como un doblete de cuádrupletes.

El tratamiento del aldehído todo-(*E*)-**14** con **18**, activado con <sup>t</sup>BuOK, dio lugar a los compuestos bromados **19** (rendimiento: 57 %) como mezcla de isómeros (*E*)/(*Z*) 8:2 en el nuevo doble enlace, generado junto al triple enlace (Esquema 4.19). Ambos isómeros pueden separarse fácilmente por cromatografía en columna de sílice, presentando el isómero todo-(*E*)-**19** menor *R<sub>f</sub>* en TLC que el isómero (*E,E,Z*)-**19**.

La estructura de todo-(*E*)-**19** se confirmó por sus datos espectroscópicos. A 1.98 ppm aparece un doblete asignable a los protones del metilo, acoplado con el protón en posición 6 a través del triple enlace. El protón olefínico en posición 6 resuena a 5.65 ppm (dc,  $J_{(E)} = 15.4$  Hz,  $J_{\text{homopropargílica}} = 2.0$  Hz), confirmando así que la estereoquímica del doble enlace en esa posición es (*E*).

En el espectro <sup>13</sup>C-NMR aparecen, como era de esperar, las señales correspondientes a los carbonos del triple enlace a 79.2 y 90.5 ppm. La asignación del resto de las señales se ha realizado a partir de los espectros bidimensionales COSY y HSQC, para <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN respectivamente.

El espectro IR del isómero todo-(*E*)-**19** presenta la señal característica de la vibración de tensión C-C en triples enlaces, a 2208 cm<sup>-1</sup>. En el espectro de masas por impacto electrónico se observó el ión molecular. El análisis HPLC mostró que todo-(*E*)-**19** se obtuvo con una pureza superior al 97 %.

Por tanto, este precursor **19** puede usarse en la obtención de análogos similares a los anteriormente descritos, pero con un triple enlace en posición ω menos 1.

#### 4.1.2.2 Análogos con el grupo 1,6-difenilhexatrieno (DPH)

El cromóforo lipofílico todo-(*E*)-1,6-difenilhexatrieno (DPH) ha sido ampliamente utilizado en sondas fluorescentes de bicapas lipídicas y biomembranas, como se dijo en *Antecedentes*. Además, es una molécula muy adecuada para nuestros propósitos debido a su marcado carácter lipofílico. Por ello se proyectó la síntesis de análogos fluorescentes de MT conteniendo dicho grupo, de modo similar a como se obtuvieron los análogos con el grupo todo-(*E*)-feniltrienino. Para incorporar esta sonda de la manera más lineal posible en el esqueleto de MT, se estableció la posición *para*, respecto al esqueleto poliénico, como la más adecuada para el anclaje a la cadena polimetilénica lineal de MT (Figura 4.15).

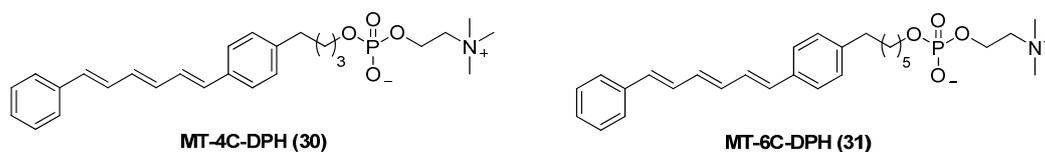
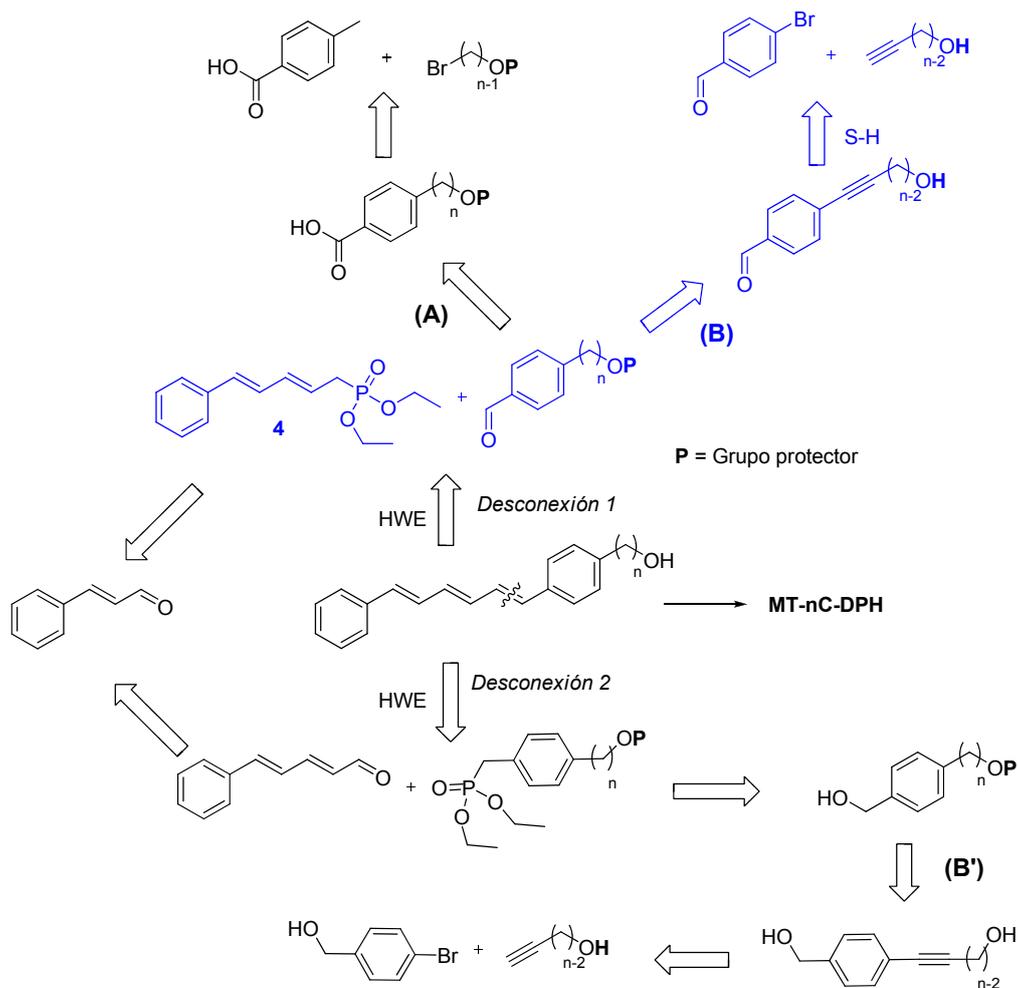


Figura 4.15. Análogos fluorescentes de MT proyectados, conteniendo el grupo DPH

La síntesis de análogos fluorescentes de Miltefosina con el grupo DPH presenta la dificultad de que es necesario generar un enlace  $Csp^2-Csp^3$  en el anillo bencénico del fluoróforo, para unirlo al resto de la molécula. Los métodos que en principio parecen más adecuados para esta sustitución son dos (Esquema 4.20, desconexión 1): **(A)** creación directa de este enlace por reacción entre el dianión litiado del ácido 4-metilbenzoico y el correspondiente bromoalcohol-protegido, con (n-1) átomos de carbono, siendo n el número de metilenos totales de la cadena espaciadora.<sup>41</sup> Seguidamente, el grupo ácido se reduciría a aldehído, a través de la amida de Weinreb<sup>42</sup> y éste se condensaría con (2*E*,4*E*)-5-fenilpenta-2,4-dienilfosfonato de dietilo (**4**) mediante reacción de HWE, del mismo modo que se hizo en la síntesis del alcohol precursor del análogo **11**. **(B)** Acoplamiento de Sonogashira entre 4-bromobenzaldehído y el adecuado alquínol con n-2 átomos de carbono, transformando a continuación el triple enlace del producto en sencillo mediante hidrogenación. Como antes, el resto formilo se condensaría con el fosfonato **4** para generar el alcohol precursor buscado.

<sup>41</sup> Beck, A., Heissler, D., Duportail, G., *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1459-1472.

<sup>42</sup> De Luca, L., Giacomelli, G., Taddei, M. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2534-2537.



Esquema 4.20. Análisis retrosintético para la obtención de los análogos con el grupo DPH. La vía de síntesis finalmente elegida aparece en azul. (P: grupo protector).

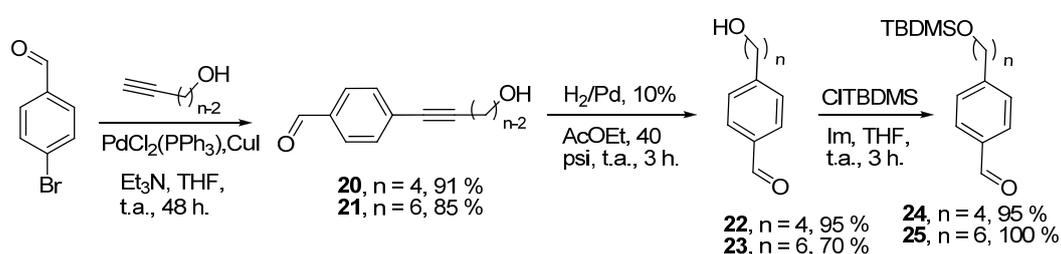
Por otra parte, también es posible plantear una inversión de polaridad entre los reactivos participantes en la olefinación de HWE (Desconexión 2). En este caso, sería necesario hacer reaccionar (2*E*,4*E*)-5-fenilpenta-2,4-dienal (obtenido mediante homologación de cinamaldehído) con el adecuado fosfonato bencílico.<sup>43</sup> En ambos casos es previsible que la olefinación ocurra de manera diastereoselectiva, dirigiendo la

<sup>43</sup> Morgan, C. G., Thomas, E. W., Moras, T. S., Yiannis, P. Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 692, 196-201.

reacción hacia la formación del doble enlace todo-(*E*). Sin embargo, la desconexión 2 se descartó, por presentar mayor número de etapas de reacción.

En el método **B**, el resto arilo, precursor del fluoróforo DPH, se une a la cadena polimetilénica a través de un acoplamiento de Sonogashira-Hagihara, por lo que se decidió emplear este método debido a nuestra experiencia previa con esta reacción, a su compatibilidad con los grupos funcionales presentes en ambos reactivos, a las suaves condiciones experimentales, y a los altos rendimientos con los que habitualmente transcurre. Además, los rendimientos descritos para la alquilación del grupo metilo del dianión litiado del ácido 4-metilbenzoico (método A) apenas superaron el 50%.<sup>41</sup>

Los aldehidos necesarios para la reacción de olefinación de HWE con el fosfonato **4** fueron fácilmente accesibles a partir de 4-bromobenzaldehído y los adecuados alquinos (Esquema 4.21).



Esquema 4.21. Síntesis de los aldehidos precursores **24** y **25**

La primera etapa de síntesis consistió en el acoplamiento entre un exceso de 3-butin-1-ol o 5-hexin-1-ol con 4-bromobenzaldehído, empleando las condiciones experimentales descritas en la bibliografía para reacciones similares:<sup>44</sup> un 5% de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ , un 10% de  $\text{CuI}$ , y, como disolvente, una mezcla de  $\text{THF}:\text{Et}_3\text{N}$  5:4. Se alcanzaron así buenos rendimientos en producto aislado: **20**, 91 %; **21** 85 %.

En los espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN de ambos productos aparecen las señales esperadas para todos los protones. En el espectro de masas (EI) se observó a  $m/z$  174 (**20**) y a  $m/z$  198 (**21**), respectivamente, las señales de los correspondientes iones moleculares.

La hidrogenación total del triple enlace se llevó a cabo a presión y a temperatura ambiente, utilizando como catalizador  $\text{Pd/C}$  (10%) y  $\text{AcOEt}$  como disolvente.<sup>45</sup> Esta hidrogenación presenta la dificultad de llevarse a cabo en presencia de un grupo

<sup>44</sup> Chinchilla, R., Najera, C. *Chem. Rev.* **2007**, 107 874-922.

<sup>45</sup> Perchonock, C. D., Uzinskas, I., McCarthy, M. E., Erhard, K.F., Gleason, J. G., Wasserman, M. A., Muccitelli, R. M. DeVan, J. F., Tucker, S.S., Vickery, L. M., Kirchner, T., Weichman, B. M., Mong, S., Scott, M. O., Rosso, G. C., Wu, H. L., Croke, S. T., Newton, J. F. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1442-1452.

aldehído, por lo que, para no afectar al mismo, fue necesario disminuir la reactividad del H<sub>2</sub> mediante el empleo de AcOEt como disolvente, en lugar de los habitualmente utilizados MeOH o EtOH. Todos los intentos de hidrogenar el triple enlace a presión atmosférica, empleando diferentes disolventes, fueron infructuosos, debido, probablemente, a que el triple enlace se encuentra desactivado por estar conjugado con el anillo aromático. Recientemente se ha descrito la hidrogenación de triples enlaces en sustratos similares empleando el catalizador de Lindlar.<sup>46</sup> Sin embargo, en nuestro caso los rendimientos fueron similares o incluso superiores a los descritos: **22**, 95 %; **23**, 70 %.

El transcurso de la reacción se siguió mediante HPLC midiendo a 280 nm, interrumpiendo la reacción cuando dejaron de detectarse los compuestos sin hidrogenar (**20** o **21**), y los correspondientes alquenos intermedios, ya que de otro modo la purificación del producto final sería difícil, dada su escasa diferencia de movilidad cromatográfica (TLC), arrastrándose las impurezas durante los siguientes pasos de síntesis.

Los espectros <sup>1</sup>H-RMN de los compuestos reducidos **22** y **23** presentaron las señales correspondientes a los protones de los metilenos generados a partir del triple enlace. La señal del protón del grupo aldehído aparece hacia 9.97 ppm para ambos compuestos. El espectro de masas confirmó sus masas moleculares.

Para llevar a cabo el acoplamiento de HWE es recomendable la protección del resto hidroxilo con un grupo protector que sea fácilmente eliminable en condiciones experimentales que no afecten al sistema poliénico conjugado generado tras dicho acoplamiento. Por razones expuestas anteriormente, decidimos utilizar cloruro de *tert*-butildimetilsililo, un grupo fácilmente eliminable empleando TBAF como fuente de fluoruro, sin afectar, en principio, al sistema poliénico conjugado. El uso de imidazol como catalizador y THF como disolvente fue efectivo para la obtención de **24** y **25**, con rendimientos cercanos al 100 %.

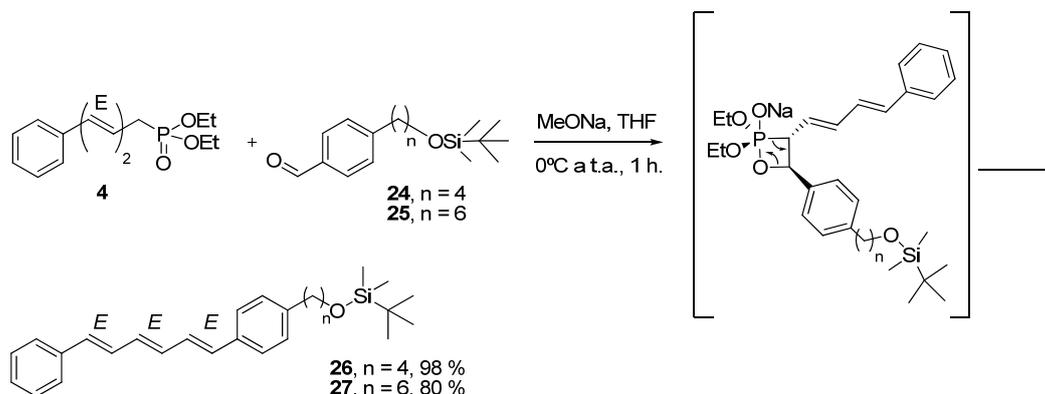
En los espectros <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN de **24** y **25** se observa el mismo patrón que para los precursores **22** y **23**, junto a las señales del grupo protector.

Para obtener los análogos buscados, con el grupo todo-(*E*)-difenilhexatrieno, se empleó el acoplamiento diastereoselectivo de HWE. La estereoquímica de los productos **26** y **27** así obtenidos debe ser predominantemente todo-(*E*).<sup>14</sup> En su obtención se siguieron las condiciones experimentales descritas en la bibliografía para sustratos

---

<sup>46</sup> Lee-Dutra, A., Arienti, K. L., Buzard, D. J., Hack, M. D., Khatuya, H., Desai, P. J., Nguyen, S., Thurmond, R. L., Karlsson, L., Edwards, J. P., Breitenbucher, J. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 6043-6048.

similares (metóxido sódico en THF seco a 0°C), generándose los alcoholes precursores protegidos **26** y **27** con excelentes rendimientos: **26**, 98 %; **27**, 80 % (Esquema 4.22).



Esquema 4.22. Síntesis de los alcoholes protegidos, con el grupo todo-(*E*)-difencilhexatrieno, mediante olefinación de HWE

Los compuestos todo-(*E*)-**26** y todo-(*E*)-**27** presentan en su espectro  $^1\text{H-RMN}$  las señales características del grupo todo-(*E*)-difencilhexatrieno conjugado,<sup>41</sup> de la cadena polimetilénica intermedia y de los metilos del grupo TBDMS. Las señales de los seis protones olefínicos aparecen como un sistema complejo de segundo orden (Figura 4.16, arriba), por lo que para determinar la geometría del nuevo doble enlace formado ( $\text{CH}_\text{A}=\text{CH}_\text{B}$ ) se irradió selectivamente el multiplete formado por los dos protones centrales ( $\text{H}_\text{C}$  y  $\text{H}_\text{D}$ ) (Figura 4.16, abajo), aislando así los dos dobles enlaces de los extremos del sistema ( $\text{CH}_\text{A}=\text{CH}_\text{B}$  y  $\text{CH}_\text{E}=\text{CH}_\text{F}$ ). De este modo, el sistema ABCDEF se simplificó en dos sistemas diferentes, de donde se pudieron determinar las constantes de acoplamiento de los protones de los dobles enlaces  $\text{CH}_\text{A}=\text{CH}_\text{B}$  y  $\text{CH}_\text{E}=\text{CH}_\text{F}$ .

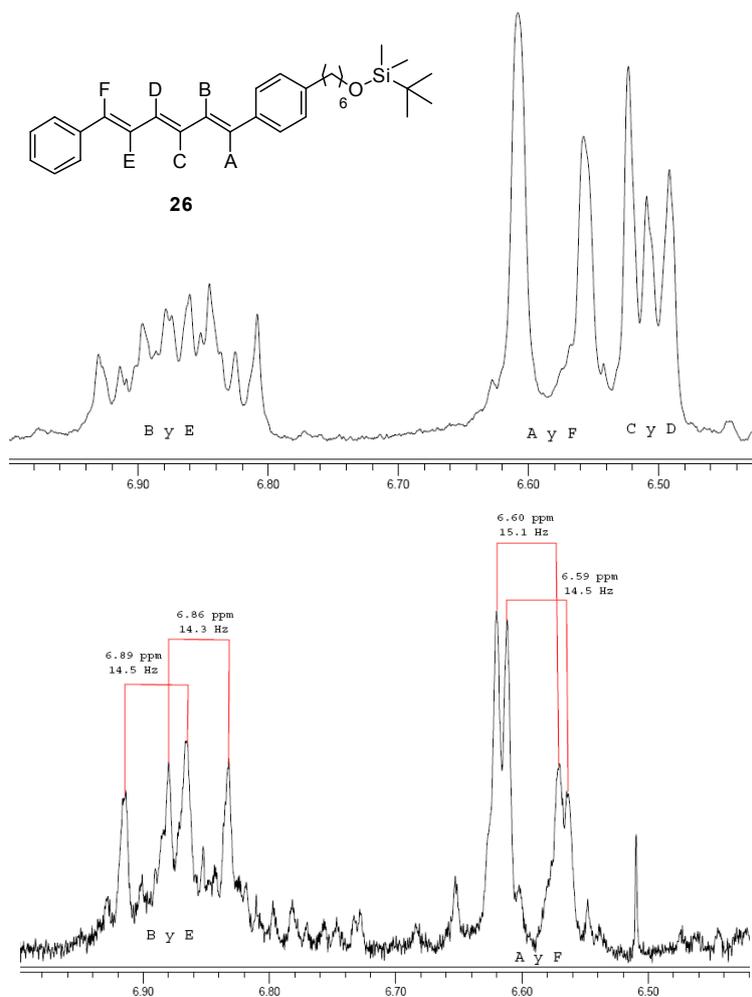


Figura 4.16. Zona olefínica del espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **26** (arriba) y de la misma zona irradiando selectivamente la señal a 6.51 ppm ( $\text{CH}_\text{C}=\text{CH}_\text{D}$ ).

El valor de estas constantes de acoplamiento ( $J_{\text{HA-HB}}$  y  $J_{\text{HE-HF}} \sim 15$ ), muestra que la estereoquímica de los dos dobles enlaces en los extremos del sistema olefínico (y por tanto la del nuevo doble enlace formado,  $\text{CH}_\text{A}=\text{CH}_\text{B}$ ) es (*E*). Además, como la geometría de los dobles enlaces en el fosfonato precursor **4** es (*E*), se puede afirmar que la estereoquímica del doble enlace central ( $\text{CH}_\text{C}=\text{CH}_\text{D}$ ) en los compuestos **26** y **27** también es (*E*).

No obstante, se comparó el espectro completo del compuesto **26** con el obtenido mediante simulación (Mestrec<sup>®</sup> 4.9.9.6.) para un sistema acoplado y simétrico de seis

espines (Figura 4.17, abajo). El desplazamiento químico de cada pareja de protones simétricos en este sistema se determinó tomando el punto medio de los correspondientes multipletes del sistema olefínico en el compuesto **26**. Para las constantes de acoplamiento de los protones de los dobles enlaces en los extremos del sistema olefínico ( $\text{CH}_A=\text{CH}_B$  y  $\text{CH}_E=\text{CH}_F$ ), se utilizaron los valores obtenidos del espectro con irradiación. La constante de acoplamiento de los protones del doble enlace central ( $\text{CH}_C=\text{CH}_D$ ) se supuso cercana a 15.2 Hz. Los valores de las constantes de acoplamiento entre protones en carbonos situados entre dos dobles enlaces se dedujeron del multiplete situado a campo más alto en el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **26** (9.5 Hz). Para simplificar el modelo, sólo se tuvieron en cuenta las constantes de acoplamiento vecinales.

La similitud entre el espectro real, obtenido para el análogo **26**, y el espectro simulado apoya que la estereoquímica de todos los dobles enlaces es (*E*), descartando así cualquier tipo de isomerización del doble enlace central, cuya estereoquímica no había sido definida anteriormente.

Heissler y col.<sup>16</sup> realizaron un análisis simulado, utilizando el programa PANIC, para otro difenilhexatrieno sintetizado (cuyo espectro  $^1\text{H}$ -RMN coincide prácticamente en la zona etilénica con el espectro obtenido para los compuestos **26** y **27**), y concluyeron que la estereoquímica de los tres dobles enlaces era (*E*). Las constantes de acoplamiento utilizadas fueron:  $J_{A,B} = 15.6$  Hz,  $J_{C,D} = 14.7$  Hz,  $J_{E,F} = 15.4$  Hz.

Por tanto, como ocurría en el caso del compuesto todo-(*E*)-**9**, el tamaño de las dos moléculas que intervienen en la síntesis de **26** ó **27** aparentemente favorece la estereoselectividad hacia la formación del doble enlace de geometría (*E*), ya que en la formación del oxafosfetano intermedio existe un control estérico que determina finalmente la geometría del producto final (Esquema 4.22).<sup>14</sup>

Los espectros de masas de los derivados (EI), con señales a  $m/z$  418 (**26**) y a  $m/z$  446 (**27**), confirmaron las estructuras.

Los compuestos **26** y **27** se desprotegeron con TBAF en THF para dar los alcoholes correspondientes de modo prácticamente cuantitativo, si bien fue necesaria la adición de más de dos equivalentes para llevar a término la reacción (Esquema 4.23).

Los espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN de los nuevos alcoholes **28** y **29** son similares a los obtenidos para los compuestos protegidos **26** y **27**, aunque, obviamente, sin la presencia de las señales correspondientes al grupo protector TBDMS. El espectro de masas confirmó las estructuras de ambos compuestos.

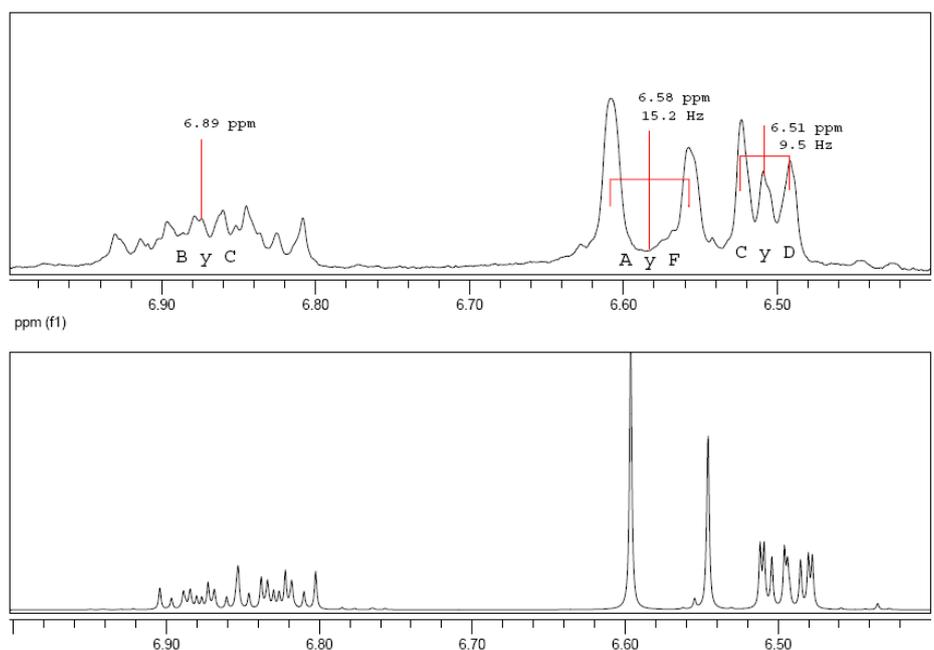
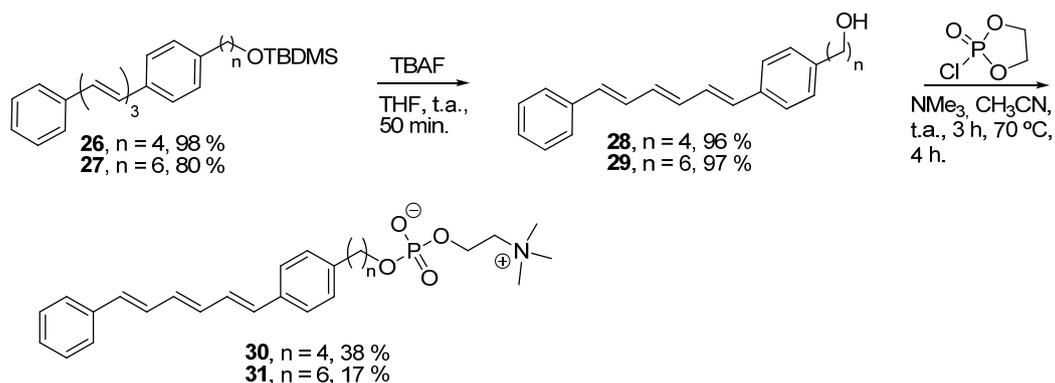


Figura 4.17. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de la zona olefínica del compuesto **26** (arriba) y simulación del espectro  $^1\text{H}$ -RMN de un sistema de seis espines (abajo).

La obtención de los análogos de Miltefosina **30** y **31** se llevó a cabo por introducción del resto de fosfatidilcolina, del mismo modo que en la obtención del análogo **11**, con rendimientos del 38 y 17 % respectivamente (Esquema 4.23).

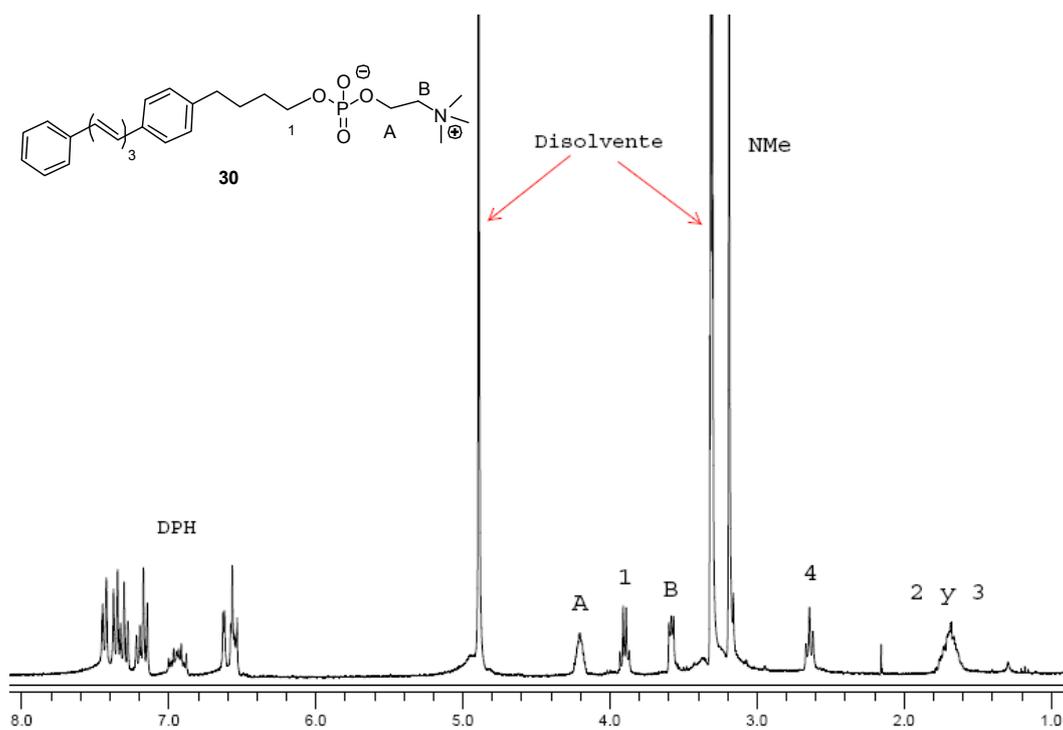
La estructura de los análogos, se confirmó mediante sus datos espectroscópicos. En el espectro  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CD}_3\text{OD}$  de **30** y **31** aparecen las señales correspondientes al cromóforo todo-(*E*)-1,6-difenilhexatrieno, a la cadena polimetilénica, y al resto de fosfatidilcolina (Figura 4.18). Las señales de los protones de los metilenos en el resto de fosfolina aparecen como dos multipletes debido a que se acoplan entre si y con el átomo de fósforo. Los protones en posición 1 de la cadena polimetilénica aparecen como un cuadruplete, debido a este acoplamiento. Los protones del grupo todo-(*E*)-difenilhexatrieno en ambos compuestos presentan el mismo patrón que se muestra en las Figuras 4.16 y 4.17, para el compuesto **26**, confirmando que durante la introducción del resto de fosfolina no se ha producido isomerización del sistema poliénico.



Esquema 4.23. Etapas finales en la síntesis de los análogos de Miltefosina **30** y **31**

En el espectro <sup>13</sup>C-RMN de los análogos **30** y **31** aparecen las señales asignables al cromóforo todo-(*E*)-difenilhexatrieno conjugado, a la cadena polimetilénica, y al resto de fosfatidilcolina. Entre ellas cabe destacar las señales de los carbonos situados a dos o tres enlaces del átomo de fósforo, que aparecen, como era de esperar, acopladas con este último. El espectro FT-IR del análogo **31** muestra las bandas de absorción características de la cadena polimetilénica a 2924 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>C-H</sub>) y a 1446 cm<sup>-1</sup> (δ<sub>C-H</sub>). Las bandas correspondientes al grupo fosfatidilcolina aparecen a 1220 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>P=O</sub>), 1085 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>C-O-P</sub>) y 968 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>N-C</sub>). Los espectros de masas (ESI<sup>+</sup>) confirmaron las estructuras de ambos análogos. La pureza de los compuestos se comprobó por <sup>1</sup>H-RMN, HPLC, análisis elemental y análisis de fósforo. Su fórmula molecular inequívoca se confirmó por espectrometría de masas de alta resolución.

En conclusión, el método de síntesis elegido es fácilmente escalable y versátil, permite la regulación de la longitud de la cadena espaciadora y la modificación de la cabeza polar, así como la incorporación de sustituyentes en el anillo aromático.

Figura 4.18. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del análogo **30**

#### 4.1.3 Propiedades espectroscópicas y estabilidad térmica y fotoquímica

Se llevó a cabo un estudio detallado de las propiedades espectroscópicas de los análogos fluorescentes de MT, que son importantes para la posterior aplicación de dichos análogos en estudios biológicos. En concreto, se determinaron los espectros y los coeficientes de absorción, los espectros de excitación y emisión, los rendimientos cuánticos de emisión y la estabilidad fotoquímica. Este estudio se realizó en diferentes disolventes a temperatura ambiente, según los métodos descritos en la parte experimental. Los datos de absorción para los cinco análogos y sus alcoholes precursores se recogen en la tabla 4.3. En esta tabla se muestran, además, los valores correspondientes al análogo MT-5C-PTE, como comparación. En la Figura 4.19 se muestran ejemplos de los espectros de absorción y emisión.

Como se observa en esta tabla, todos los compuestos estudiados muestran el máximo de la mayor absorción en el entorno 338-361 nm, dependiendo del tipo de polieno, con valores del coeficiente de absorción en este máximo superiores a  $45000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Independientemente de la naturaleza del grupo polar terminal (alcohol o fosfatidilcolina), el comportamiento espectroscópico en disolución es muy similar, lo que indica la ausencia de interacciones electrónicas entre el cromóforo y el grupo polar en estas moléculas. Tampoco ejerce ningún efecto apreciable la diferente longitud de la cadena espaciadora polimetilénica. En cambio, la naturaleza del grupo polar terminal (alcohol o fosfatidilcolina) sí modifica sustancialmente la polaridad de la molécula y, por tanto, su solubilidad relativa, como era de esperar. Así, los alcoholes precursores son bastante solubles (aproximadamente  $> 10^{-3} \text{ M}$ ) en disolventes clorados (cloroformo, diclorometano), éteres (dietil éter, THF), acetato de etilo o acetonitrilo, mientras que los análogos de MT con grupo fosfocolina sólo son solubles en disolventes polares, como los alcoholes MeOH y EtOH, DMSO o DMF.

En la Tabla 4.3 se observa que el primer máximo de absorción del análogo **17** (MT-5C-OMePTRI) aparece desplazado al rojo  $\sim 750 \text{ cm}^{-1}$  respecto del compuesto MT-5C-PTRI, sin grupo *p*-metoxilo. Este desplazamiento se suele explicar<sup>47</sup> como consecuencia de la transferencia de carga desde el grupo donante en posición *para* (OCH<sub>3</sub>) al estado excitado  $1^1\text{B}$ . Esta transferencia no ocurre en el caso del estado fundamental ni en el primer estado excitado, ambos de simetría  $1^1\text{A}$ .

---

<sup>47</sup> Kohler, B. E., Spangler, C. N., Westerfield, C. J. *J. Chem. Phys.* **1991**, *94*, 908-917.

En los compuestos con el cromóforo 1,6-difenilhexatrieno, el principal máximo de absorción se encuentra desplazado al rojo respecto a los que poseen el grupo feniltrienino, como era de esperar por la presencia del grupo fenilo adicional.<sup>48</sup>

Tabla 4.3. Máximos de absorción ( $\lambda_{ab}$ ), coeficientes de absorción molar ( $\epsilon$ ) y fotoestabilidad relativa de los análogos fluorescentes de Miltefosina y de sus alcoholes precursores. Los datos mostrados han sido determinados principalmente por la Dra. L. Tormo, en el grupo del Dr. A. U. Acuña, en el Instituto de Química Física Rocasolano.

Análogo	Disolvente	$\lambda_{ab}/nm$ ( $\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$ )			fotoestabilidad <sup>a</sup>
MT-5C-PTE	DMF	332	346	366	
	MeOH	325 (50000)	340 (71100)	359 (58700)	
	DMSO	333 (41500)	349 (53100)	368 (41400)	
MT-5C-PTRI	DMF	326 (40000)	342 (49000)	360 (36000)	++
	Hanks <sup>b</sup>	323 (43000)	338 (58000)	355 (47500)	+
	MeOH	321 (43200)	355 (58000)	353 (52000)	+
	DMSO	329 (43400)	345 (62100)	363 (51300)	++
	THF	326	341	358	-
	AcOEt	323	338	355	-
	acetonitrilo	322	337	354	-
	<i>n</i> -butanol	324	339	356	-
MT-6C-PTRI ( <b>11</b> )	DMF	326 (38000)	342 (54000)	360 (44000)	++
OH-6C-PTRI ( <b>10</b> )	DMF	326 (42000)	342 (63000)	360 (52000)	
MT-5C-OMePTRI ( <b>17</b> )	DMF	336 (44000)	351 (62000)	370 (52000)	+
MT-4C-DPH ( <b>30</b> )	DMF	344 (40000)	361 (55000)	382 (43000)	+
	EtOH	340 (47100)	356 (60100)	375 (43400)	
OH-4C-DPH ( <b>28</b> )	DMF	344 (35000)	361 (45000)	382 (33000)	+
MT-6C-DPH ( <b>31</b> )	DMF	345 (53400)	361 (75885)	381 (61234)	+
OH-6C-DPH ( <b>29</b> )	DMF	345 (56200)	361 (78810)	381 (62000)	+

<sup>a</sup> ++: fotoestable más de 24 h; +: fotoestable al menos 24 h; -: fotoquímicamente inestable. Para determinar la fotoestabilidad, se midió la variación con el tiempo de la intensidad de la fluorescencia de una disolución agitada y aireada de cada análogo en cada disolvente, utilizando un fluorímetro. <sup>b</sup> Tampón utilizado (pH = 7.2) para mantener parásitos en suspensión unas pocas horas (ver parte experimental).

Los análogos de Miltefosina con el grupo todo-(*E*)-feniltrienino y todo-(*E*)-*p*-metoxifeniltrienino han demostrado ser estables durante meses en ausencia de luz y en disolución en DMF o DMSO, incluso a temperatura ambiente. Esta estabilidad junto con

<sup>48</sup> Cundall, R. B., Johnson, I., Jones, M. W., Thomas, E. W., Munro, I. H. *Chem. Phys. Lett.* **1979**, *64*, 39-42.

su alto coeficiente de absorción molar, hacen a estos compuestos idóneos para la aplicación biológica. Por otra parte, los análogos **30** y **31**, que contienen el grupo todo-(*E*)-difenilhexatrieno, demostraron ser aún más estables, ya que pueden almacenarse en forma sólida a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante años. Además, los cinco nuevos análogos demostraron ser fotoestables (Tabla 4.3) en DMF, DMSO o MeOH, no observándose variaciones importantes en la intensidad de la fluorescencia después de varias horas de irradiación. En el resto de los disolventes ensayados se observó una fotodescomposición parcial, con una disminución de la intensidad de fluorescencia de  $\sim 10\text{-}20\%$ , incluso tras menos de 30 minutos de irradiación.

A modo de muestra, en la Figura 4.19 se representan los espectros de absorción y de fluorescencia de los análogos MT-6C-PTRI (**11**), MT-5C-OMePTRI (**17**) y MT-4C-DPH (**30**) en DMF.

Se observa que, en los tres cromóforos, la emisión presenta un gran desplazamiento de Stokes, consistente con una diferencia importante entre las propiedades de los estados electrónicos implicados en la absorción y la emisión.

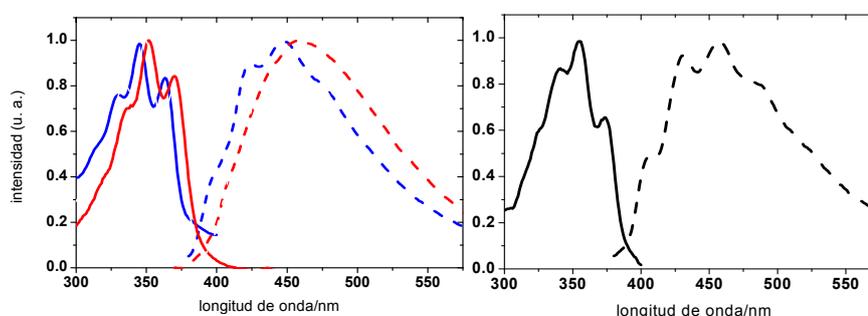


Figura 4.19. Espectros de absorción normalizados (línea continua) y de fluorescencia corregidos y normalizados (línea discontinua) de los análogos MT-6C-PTRI (**11**) (azul), MT-5C-OMePTRI (**17**) (rojo), y MT-4C-DPH (**30**) (negro), en DMF y a temperatura ambiente.

En general, en polienos lineales simétricos con 3-8 dobles enlaces conjugados se observa<sup>49</sup> que el primer estado excitado singlete ( $S_1$ ) es de tipo  $2^1A_g$ , mientras que el estado  $S_2$  es del tipo  $1^1B_u$ . En esta situación, la transición de absorción observable más intensa corresponde a  $S_0 \rightarrow S_2$ , ya que la  $S_0 \rightarrow S_1$  está prohibida por simetría. Sin embargo, la emisión tiene lugar desde el estado  $S_1$ . Posiblemente esta misma situación se da en el

<sup>49</sup> Hudson, B. S., Kohler, B. E., Schulten, K. *Excited States*, Lim, E. C., Ed., Academic Press, Nueva York, **1982**, Vol. 6, pp. 1-95.

grupo feniltrienino conjugado, lo que explicaría el elevado desplazamiento de Stokes y la forma diferente de los espectros de absorción y de emisión en estos compuestos. La asignación de las transiciones electrónicas indicada es consistente, también, con la diferente sensibilidad de los espectros de absorción y emisión a la polaridad del medio, ya que la distribución de carga en los estados  $S_1$  y  $S_2$  es diferente.<sup>50</sup> Para poder determinar con más exactitud la naturaleza electrónica de los estados implicados en los procesos de absorción y emisión de los grupos feniltrienino y *p*-metoxifeniltrienino serían necesarios estudios espectroscópicos de alta resolución, algo que se aleja de nuestro propósito en este trabajo.

En la tabla 4.4 se muestran los máximos de emisión y los valores del rendimiento cuántico de fluorescencia obtenidos cuando se irradió en la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción para cada compuesto.

Tabla 4.4. Máximos de fluorescencia y valores del rendimiento cuántico de los análogos fluorescentes de Miltefosina y de sus alcoholes precursores.

Análogo	disolvente	$\lambda_{em}/nm^a$	$\Phi_F$
MT-5C-PTRI	DMF	400, 421, <u>446</u> , 470	0.1
	Hanks	398, 422, <u>446</u> , 470	0.0025
	MeOH	396, 418, <u>443</u> , 470	-
	DMSO	400, 425, <u>447</u> , 475	-
MT-6C-PTRI (11)	DMF	400, 422, <u>444</u> , 472	0.06
OH-6C-PTRI (10)	DMF	400, 421, <u>446</u> , 471	0.07
MT-5C-OMePTRI (17)	DMF	<u>460</u>	0.006
MT-4C-DPH (30)	DMF	410, 434, <u>460</u> , 488	0.16
	EtOH	407, 431, <u>456</u> , 485	0.22
OH-4C-DPH (28)	DMF	409, 433, <u>458</u> , 487	0.21
MT-6C-DPH (31)	DMF	434, <u>458</u> ,	0.17
OH-6C-DPH (29)	DMF	410, 434, <u>460</u> , 488	0.16
	EtOH	407, 431, <u>456</u> , 485	0.22

<sup>a</sup>El máximo de emisión se encuentra subrayado y se determinó en el espectro de fluorescencia corregido.

El rendimiento cuántico de fluorescencia de los anteriores análogos es moderado. Sin embargo, se ha observado<sup>50</sup> que estos valores pueden llegar a duplicarse si los análogos se incorporan a vesículas esféricas lipídicas de DMPC, que simularían el

<sup>50</sup> Reyes Mateo, C., Souto, A. A., Amat-Guerri, F., Acuña, A. U. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2177-2191.

entorno del cromóforo en una membrana celular. Este aumento en el rendimiento cuántico se atribuye a la suma de varios factores. En primer lugar, el entorno rígido de la bicapa dificulta los procesos no radiantes que dependen de cambios conformacionales del grupo emisor. Además, la bicapa ofrece una protección eficaz del cromóforo excitado frente a colisiones desactivantes con oxígeno y otros compuestos presentes.

La Figura 4.20 muestra el espectro de fluorescencia del análogo MT-5C-PTRI unido específicamente a promastigotes de *L. donovani* vivos, en una suspensión de medio Hanks.<sup>51</sup> En estas condiciones el rendimiento cuántico estimado del análogo es 0.1–0.2. Este análogo no es fluorescente en disolución en este medio.

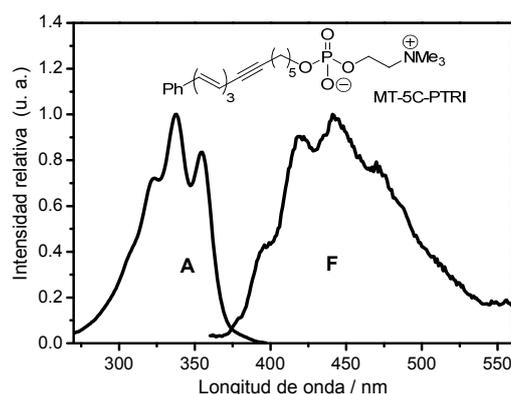


Figura 4.20. Espectros de absorción (A) en medio Hanks (pH 7.2) y de emisión de fluorescencia corregida (F) de MT-5C-PTRI unido específicamente a promastigotes de *Leishmania donovani* suspendidos en el mismo medio. [MT-5C-PTRI] = 10  $\mu\text{M}$ ,  $1.5 \times 10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ , 26 °C,  $\lambda_{\text{exc}}$  335 nm.

A la vista de los resultados mostrados más arriba, se puede concluir que los derivados de Miltefosina conteniendo grupos emisores PTRI (feniltrienino) y DPH (difenilhexatrieno) presentan propiedades de absorción, emisión y estabilidad fotoquímica convenientes para su utilización como análogos emisivos del fármaco. El análogo conteniendo el grupo *p*-metoxifenilo (**17**) tiene un rendimiento cuántico de emisión demasiado bajo para esta aplicación. La estabilidad fotoquímica de varios de estos compuestos es limitada, lo que puede ser un obstáculo para su utilización en la obtención de imágenes de microscopía que requieren excitación con láseres continuos de elevada intensidad (> 10 mW).

<sup>51</sup> Tormo, L., Hornillos, V., Amat-Guerri, F., Acuña, A. U. (en preparación).

Es importante resaltar que el rendimiento cuántico modesto de estos compuestos se compensa con el elevado valor del coeficiente de absorción molar, que facilita su utilización en la zona de concentraciones terapéuticas ( $\sim 10^{-6}$  M).

Finalmente, varios de los análogos fluorescentes obtenidos en este trabajo también tienen potenciales aplicaciones en el estudio de las propiedades físicas de bicapas lipídicas, tales como los cambios de orden y movilidad asociados a las diferentes fases de la bicapa que ocurren al cambiar la temperatura, como se ha visto anteriormente con cromóforos similares con diferente grupo polar.<sup>39</sup>

#### 4.1.4 Evaluación biológica.

##### 4.1.4.1 Actividad leishmanicida

Para determinar las propiedades parasiticidas de los análogos de MT se cuantificó la inhibición de la proliferación de promastigotes de *L. donovani* (la forma flagelada) y amastigotes de *L. pifanoi* (forma no flagelada intracelular) utilizando los análogos con grupos fenilpolienino y difenilhexatrieno descritos más arriba, con excepción del análogo MT-5C-OMePTRI (**17**), que no se empleó en estos experimentos debido a su bajo rendimiento de fluorescencia. Estos experimentos se han realizado en el grupo de investigación dirigido por el Dr. L. Rivas, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC) de Madrid, con el que colaboramos en este trabajo.

La Tabla 4.5 muestra los resultados obtenidos con los análogos citados, expresados como concentración de análogo que produce una inhibición del 50 % en el crecimiento del parásito. Las medidas de proliferación se realizaron 4 h (ED<sub>50</sub>) y 48 h ó 72 h (LD<sub>50</sub>) después de la adición del análogo. En este estudio se incluyó también una cepa de *L. donovani* resistente a Miltefosina. En la Tabla 4.5 se incluyen también, como comparación, los valores correspondientes a los análogos MT-5C-PTE y MT-5C-PTRI, obtenidos previamente.

Tabla 4.5. Actividad leishmanicida *in vitro* de MT y sus análogos fluorescentes con grupos fenilpolienino.

compuesto	Promastigotes <sup>a</sup>			Amastigotes <sup>b</sup>	
	WT <sup>c</sup>		R40 <sup>d</sup>	WT <sup>c</sup>	
	ED <sub>50</sub> <sup>4h</sup> (μM)	LD <sub>50</sub> <sup>48h</sup> (μM)	LD <sub>50</sub> <sup>48h</sup> (μM)	ED <sub>50</sub> <sup>4h</sup> (μM)	LD <sub>50</sub> <sup>72h</sup> (μM)
MT	4.5	12.5	inactivo	6.7	26.3
MT-5C-PTE	19.5	28.6	inactivo	19.8	26.0
MT-5C-PTRI	19.5	29.6	inactivo	16.9	26.5
MT-6C-PTRI ( <b>11</b> )	inactivo	inactivo	---	inactivo	inactivo
OH-5C-PTRI	inactivo	inactivo	inactivo	inactivo	inactivo
MT-4C-DPH ( <b>30</b> )	inactivo	15.5	inactivo	inactivo	19.8
MT-6C-DPH ( <b>31</b> )	inactivo	inactivo	---	inactivo	inactivo

<sup>a</sup>Ensayos a 26 °C en medio Hanks. <sup>b</sup>Ensayos a 32 °C en medio Hanks + 10 % de albúmina de suero (BSA). <sup>c</sup>Cepa silvestre. <sup>d</sup>Cepa resistente a Miltefosina. Inactivo: valores de ED<sub>50</sub> y LD<sub>50</sub> superiores a 60 μM.

El valor de ED<sub>50</sub> a 4 h da una idea de la cantidad de muerte celular generada en la muestra tratada, y el valor de LD<sub>50</sub> a 48 h/72 h representa la capacidad de inhibición de los análogos fluorescentes sobre la proliferación de los parásitos.

En estas condiciones experimentales, MT-5C-PTE, MT-5C-PTRI y MT-4C-DPH (**30**) mostraron una gran actividad leishmanicida dependiente de la concentración, en la zona 10<sup>-6</sup> M (Tabla 4.5). MT-4C-DPH (**30**) fue inactivo en experimentos a tiempos cortos, aunque mostró mayor actividad leishmanicida que los anteriores análogos en experimentos a tiempos largos (48 y 72 h). MT-6C-DPH (**31**) y MT-6C-PTRI (**11**) fueron inactivos. Es importante resaltar que el alcohol OH-5C-PTRI, que carece del resto polar de fosfocolina, es inactivo, confirmando así que la actividad antiparasitaria no viene dada por la presencia del nuevo cromóforo y que dicho alcohol se puede utilizar como control en los experimentos mecanísticos de mayor complejidad (transporte, metabolismo, etc.).

En general los valores de LD<sub>50</sub> de los análogos fluorescentes de MT en amastigotes de *L. pifanoi* son similares a los de MT, mientras que en promastigotes de *L. donovani* esta actividad es inferior en un factor de 2, excepto para MT-4C-DPH (**30**) que mostró una actividad similar. Otra observación importante es la actividad leishmanicida de los análogos sobre la cepa de parásitos R40, que es resistente a Miltefosina por carecer de un transportador específico de lípidos.<sup>52</sup> Como se puede apreciar, todos los análogos emisores fueron inactivos frente a esta cepa. Estos resultados indican que MT-5C-PTE, MT-5C-PTRI y MT-4C-DPH (**30**) son también reconocidos por el citado transportador lipídico y que, por tanto, son análogos funcionales de MT, garantizando así su utilidad para el estudio de los mecanismos biológicos de acción del fármaco.

#### 4.1.4.2 Experimentos de competición

Para que un derivado de un fármaco pueda considerarse un análogo válido de éste, es necesario demostrar que ambos, el fármaco original y el derivado emisivo, actúan en el organismo celular a través de un mecanismo idéntico. Esta información se obtiene a partir de experimentos de competición, en los que se estudia si el derivado y el fármaco original compiten por el mismo canal reactivo. En el caso de los análogos fluorescentes, estos experimentos son relativamente simples, ya que la emisión del análogo permite detectar su presencia en el organismo en estudio. Así, en el caso de *Leishmania*, en ausencia del fármaco MT se observa que el análogo fluorescente se incorpora rápidamente al parásito. Si se repite el experimento de incorporación en

---

<sup>52</sup> Croft, S. L., Seifert, K., Duchene, M. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, 126, 165-172.

presencia de cantidades crecientes de MT, se observa que disminuye gradualmente la tinción fluorescente de los parásitos, ya que el fármaco compite efectivamente con el análogo por el mismo sistema de translocación intracelular. La Figura 4.21 muestra un experimento ilustrativo de competición entre Miltefosina y el análogo MT-5C-PTRI. En dicho experimento se observa que cuando se alcanzan en el medio valores terapéuticos del fármaco ( $\sim 7.5 \mu\text{M}$ ), su análogo fluorescente ya no es transportado al interior celular. En resumen, estos experimentos indican que los análogos aquí obtenidos muy probablemente se internalizan en promastigotes de *L. donovani* a través del mismo mecanismo que interviene en la internalización de MT.

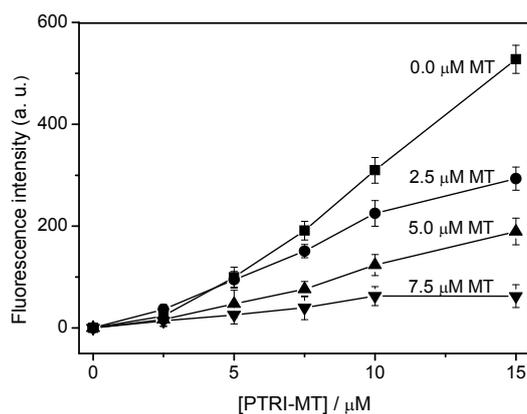


Figura 4.21. Inhibición de la incorporación del análogo MT-5C-PTRI por MT en promastigotes de *L. donovani*. Los parásitos se incubaron con MT-5C-PTRI en presencia de concentraciones crecientes de MT, durante 1 h. Tras eliminar por lavado el análogo fluorescente unido inespecíficamente a los parásitos, se estimó el grado de incorporación mediante la fluorescencia asociada a los mismos.  $\lambda_{\text{exc}} = 351 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ .

A continuación se presentan brevemente algunos ejemplos preliminares de la utilización de los análogos fluorescentes de MT sintetizados en este trabajo para obtener información sobre el mecanismo parasiticida del fármaco. Estos experimentos se realizaron conjuntamente con el Dr. L. Rivas (CIB), como se indicó en otro lugar.

#### 4.1.4.3 Concentración intracelular de MT-5C-PTRI

Utilizando el espectro y los coeficientes de absorción molar de los análogos fluorescentes, se pudo determinar la concentración intracelular de los mismos. La menor sensibilidad de las medidas basadas en el coeficiente de absorción, con respecto a las basadas en la emisión de fluorescencia, se ve compensada en este caso por los valores elevados de dicho coeficiente, con la ventaja adicional de que el espectro de absorción se afecta por el medio menos que el de emisión. Para llevar a cabo estas medidas se incubaron promastigotes de *L. donovani* con el análogo MT-5C-PTRI (15  $\mu\text{M}$ ) durante 2 h, un tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio de acumulación intracelular. Los análogos se extrajeron con una mezcla  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  y se midió la concentración de los mismos en el extracto mediante HPLC, por comparación con una recta de calibrado. En estas condiciones, se obtuvo un valor de  $7.6 \pm 0.8$  nmol de MT-5C-PTRI/mg de proteína, un valor similar al descrito previamente mediante el uso de análogos radioactivos.<sup>53</sup> Utilizando un valor de  $4.3 \times 10^{-6}$   $\mu\text{L mg}^{-1}$  de proteína para el volumen intracelular en promastigotes de *L. donovani*,<sup>54</sup> se obtuvo así que la concentración de MT-5C-PTRI en el interior del promastigote es próxima a 1.7 mM, un valor unas 100 veces mayor que la concentración exterior inicial (15  $\mu\text{M}$ ). Cuando la concentración exterior se redujo a la mitad (7.5  $\mu\text{M}$ ), se observó una reducción similar en la concentración intracelular, con un valor cercano a 0.7 mM.

Estos resultados, así como la falta de incorporación de los análogos por los parásitos resistentes a MT, parecen indicar que estos análogos fluorescentes y MT comparten el mismo transportador de membrana en promastigotes de *L. donovani*. Además, los altos valores de la concentración intracelular permiten explicar las varias interacciones de MT con diferentes receptores, descritas con anterioridad. Estos experimentos indican que es muy probable que el mecanismo parasiticida de Miltefosina implique a varias dianas diferentes. Esta situación sería muy ventajosa desde el punto de vista clínico, ya que la inactivación de alguna de las dianas no sería en principio la causa de la aparición de resistencias a MT. De hecho, hasta ahora, los únicos casos conocidos de resistencia a MT se producen por la ausencia de acumulación del fármaco en el interior del parásito.<sup>55</sup>

---

<sup>53</sup> Pérez-Victoria, F. J., Castanys, S., Gamarro, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2397-2403.

<sup>54</sup> Zilberstein, D., Dwyer, D. M. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 1716-1720.

<sup>55</sup> Pérez-Victoria, F. J., Sánchez-Canete, M. P., Seifert, K., Croft, S. L., Sundar, S., Castanys, S., Gamarro, F. *Drug Resist. Update* **2006**, *9*, 26-39.

#### 4.1.4.4 Distribución intracelular en parásitos de Leishmania

Una aplicación importante de los análogos emisivos de MT consiste en determinar la distribución del fármaco en el parásito. Se utilizaron con este propósito los compuestos MT-5C-PTRI y MT-4C-DPH (**30**), en promastigotes de *L. donovani* y en macrófagos infectados con *L. pifanoi*. Mediante técnicas de microscopía confocal de fluorescencia se observó que los análogos presentaron una distribución intracelular homogénea, sin acumulación privilegiada de los mismos en ningún orgánulo ni en la membrana plasmática (Figura 4.22).

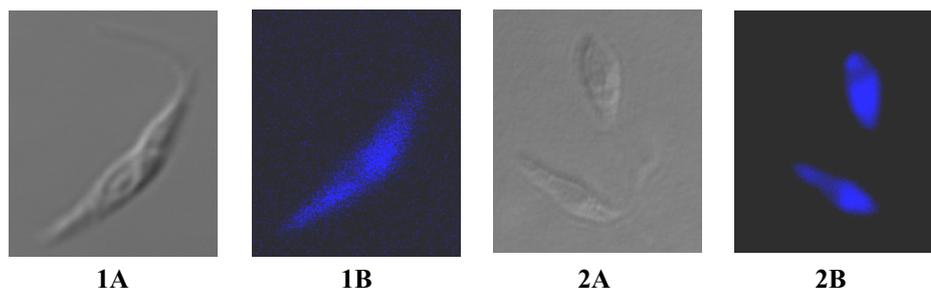


Figura 4.22. Distribución intracelular de los análogos fluorescentes MT-5C-PTRI (**1A** y **1B**) y MT-4C-DPH (**30**) (**2A** y **2B**) en promastigotes de *L. donovani*. **A**: imágenes de los parásitos en microscopía de transmisión; **B**: imágenes en microscopía de fluorescencia. Los parásitos se incubaron con el correspondiente análogo (7.5  $\mu$ M) durante 4 h a 26 °C.  $\lambda_{exc}$  = 351 nm,  $\lambda_{em}$  = 460 nm.

La ausencia de acumulación privilegiada de estos análogos en orgánulos intracelulares del parásito se confirmó mediante experimentos de marcado secuencial, utilizando primero un marcador específico de mitocondria (Mitotracker Red), por ser ésta una de las posibles dianas de MT,<sup>56</sup> y seguidamente el análogo más activo, MT-5C-PTRI. Como se observa en la Figura 4.23, el patrón de incorporación para cada marcador es muy diferente. Mientras Mitotracker Red se localiza en las regiones mitocondriales, el análogo fluorescente de MT aparece homogéneamente distribuido a través de todo el parásito, como se observó anteriormente. De estos experimentos se deduce que el posible daño ocasionado por Miltefosina en la mitocondria<sup>56</sup> no viene dado por una acumulación privilegiada del fármaco en el interior de la misma.

<sup>56</sup> De Castro, S. L., Santa-Rita, R. M., Urbina, J. A., Croft, S. L. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 141-151.

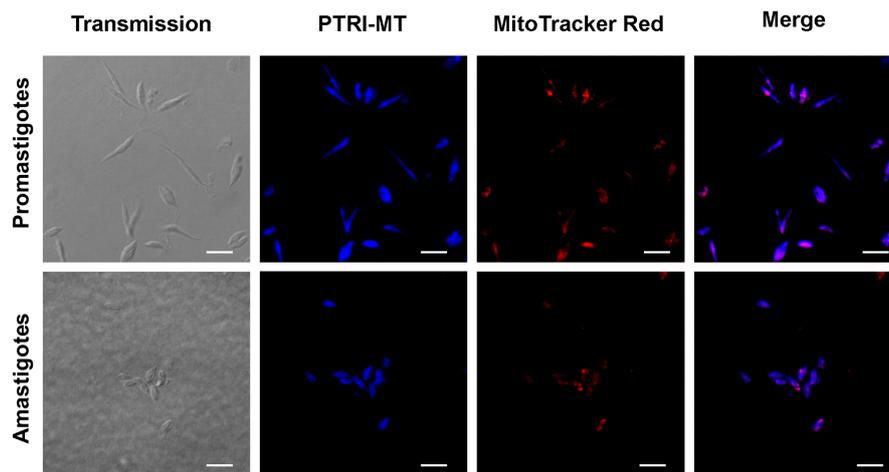


Figura 4.23. Doble marcado fluorescente secuencial de promastigotes de *L. donovani* (arriba) y amastigotes de *L. pifanoi* (abajo). Ambos se incubaron sucesivamente con 0.1  $\mu\text{M}$  Mitotracker Red (15 min) y 7.5  $\mu\text{M}$  MT-5C-PTRI (4 h). MT-5C-PTRI:  $\lambda_{\text{exc}} = 351 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ ; Mitotracker Red:  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 599 \text{ nm}$ . Barra: 8  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.4.5 Estabilidad metabólica de los análogos fluorescentes

Las imágenes de fluorescencia mostradas antes podrían ser malinterpretadas si la fluorescencia emitida desde el interior del parásito no proviniese de los análogos fluorescentes de MT, sino de sus productos de degradación, principalmente por vía metabólica. Para aclarar este aspecto se trataron, en primer lugar, los parásitos con cantidades subletales de estos análogos (incubando durante 4 h); a continuación se realizó una extracción de los cultivos celulares secos con una mezcla  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ , y el extracto obtenido se analizó mediante TLC. Como se muestra en la Figura 4.23, no se detectaron productos de degradación, ya que las manchas detectadas (4–9) coinciden con las de muestras de referencia conteniendo los análogos correspondientes (manchas 1–3, Figura 4.23). Además, en la misma placa de TLC se introdujeron como referencia dos de los alcoholes precursores de estos análogos, por ser los productos de degradación metabólica más probables (manchas 10 y 11). Como se muestra en la misma Figura, no se detectó ninguno de estos posibles metabolitos en los extractos celulares. De estos experimentos se concluye que los análogos fluorescentes de MT son metabólicamente estables, tanto en promastigotes de *L. donovani* como en amastigotes de *L. pifanoi*,

certificando así que las imágenes de microscopía de fluorescencia proceden exclusivamente de las moléculas originales de estos análogos.

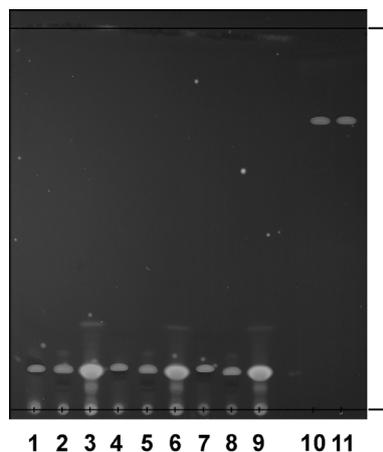


Figura 4.24. Estabilidad metabólica de los análogos fluorescentes de MT, incorporados en el interior de promastigotes y amastigotes de *Leishmania*. Los parásitos se trataron con los análogos ( $7.5 \mu\text{M}$ ) durante 2 h, se lavaron para separar el análogo unido inespecíficamente y se incubaron durante 4 h. Los análogos se extrajeron con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 2:1 y los extractos se analizaron por TLC. Muestras originales de referencia: 1) MT-4C-DPH (**30**), 2) MT-PTE, 3) MT-5C-PTRI. Extracto procedente de promastigotes de *L. donovani* tratados con: 4) MT-4C-DPH (**30**), 5) MT-PTE, 6) MT-5C-PTRI. Extracto procedente de amastigotes de *L. pifanoi* tratados con: 7) MT-4C-DPH (**30**), 8) MT-PTE, 9) MT-5C-PTRI. Alcoholes precursores: 10) OH-PTE, 11) OH-5C-PTRI.



## 4.2 Análogos fluorescentes de Miltefosina con grupo BODIPY

### 4.2.1 Diseño

Como se mostró en el apartado anterior, los análogos fluorescentes de MT con grupos fenilpolieno, fenilpolienino y difenilhexatrieno son de gran utilidad para obtener información mecánica sobre los efectos antiparasitarios del fármaco MT, a pesar de que las propiedades espectroscópicas (excitación en el UV y bajo rendimiento cuántico de fluorescencia) y la estabilidad de estos fluoróforos tienen limitaciones importantes. Sin embargo, para aplicaciones que requieren la utilización de la microscopía confocal y la obtención de imágenes con elevada resolución lateral y con largos tiempos de observación, es necesario mejorar las propiedades espectroscópicas y fotoquímicas del fluoróforo unido al fármaco. En concreto, es imprescindible aumentar el brillo (coeficiente de absorción  $\times$  rendimiento cuántico de emisión) y la estabilidad fotoquímica. Por otra parte, para minimizar la contribución del fondo debido a la emisión de autofluorescencia, es muy conveniente utilizar fluoróforos cuyo espectro de excitación esté lo más cercano posible del extremo rojo de las longitudes de onda, ya que, en general, la fluorescencia intrínseca de la célula es menor en dicha zona espectral.<sup>57</sup> Además, es necesario utilizar grupos fluorescentes cuyo espectro de excitación coincida con las longitudes de onda de los láseres utilizados habitualmente en microscopía confocal. Finalmente, conviene prever la posibilidad de disponer de fluoróforos con distintas longitudes de onda de emisión, para hacer posible la utilización simultánea del análogo y de otros tipos de sondas moleculares fluorescentes.

Teniendo en cuenta los argumentos expuestos anteriormente (apartado *Diseño de los análogos de MT*), el nuevo fluoróforo de elección debería ser lipófilo y tener un tamaño relativamente pequeño. Además, para evitar en lo posible cambios en la bioactividad, este fluoróforo debería estar en línea con la cadena alifática de MT, y en su posición terminal, minimizando así la rigidez introducida por el sustituyente. El anclaje entre ambos debería ser a través de enlaces C-C, evitando la introducción de grupos polares como amidas, ésteres, éteres, etc., generalmente formados al unir etiquetas fluorescentes (Figura 4.25).

---

<sup>57</sup> Koenig, K., Schneckenburger, H. *J. Fluoresc.* **1994**, *4*, 17-39.

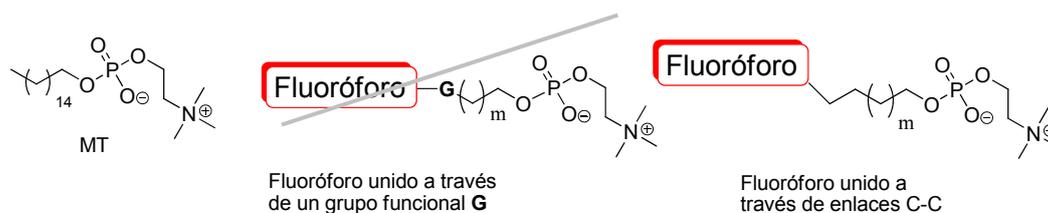


Figura 4.25. Unión covalente de un fluoróforo a MT mediante un grupo funcional G o mediante un enlace C-C.

El fluoróforo lipófilo BODIPY, ampliamente usado hoy día en la investigación en bioquímica y biología molecular, se caracteriza por una intensa absorción en la zona visible del espectro y por una alta fotoestabilidad, muy superior a la de los grupos polieno antes descritos. Por tanto, seleccionamos este fluoróforo para mimetizar una fracción de la cadena alquílica presente en el lípido original. Se decidió trabajar con un derivado tetrametilado de BODIPY, por su pequeño tamaño y porque los derivados no sustituidos son inestables. Además, los grupos metilo desplazan la banda de absorción hacia el rojo.

Como ya se hizo con los análogos de MT con grupos polieno, se seleccionó una estrategia consistente en la construcción del grupo fluoróforo sobre una molécula adecuadamente sustituida, mediante síntesis completa de los nuevos análogos fluorescentes conteniendo el grupo BODIPY. Esta aproximación permite un control más preciso de la sustitución y las propiedades del producto resultante.

Además, para alinear el grupo BODIPY con la cadena alifática de MT y preservar la conformación aproximadamente lineal del compuesto original, la unión del fluoróforo debería realizarse a través de la posición 2 (Figura 4.26).

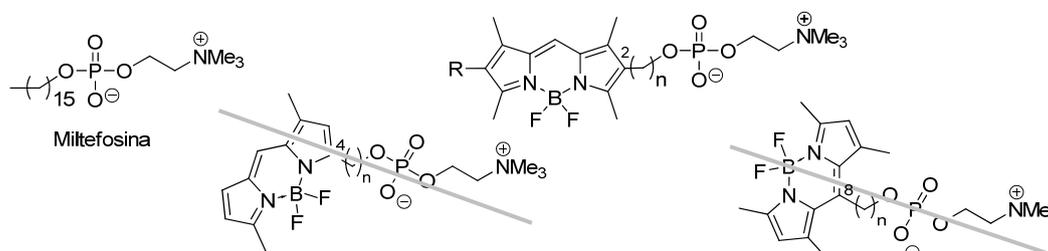


Figura 4.26. Análogos de MT con grupos BODIPY unido a través de diferentes posiciones del anillo

Para estimar las dimensiones moleculares de los posibles análogos fluorescentes, se representaron gráficamente modelos moleculares de hexadecanol (el alcohol precursor de MT) y de los alcoholes precursores de los nuevos análogos (programa Hyperchem™

6.03), de forma que el conjunto fluoróforo-espaciador preservase aproximadamente la longitud de la cadena C16 de MT (Figura 4.27).

Si el grupo BODIPY se incluye en posición terminal de la cadena de MT, la distancia entre el átomo de oxígeno del grupo OH terminal y el átomo de carbono en posición 6 del cromóforo, con toda la molécula en extensión máxima, se puede variar mediante la inserción de  $n$  grupos metileno. Las distancias correspondientes se muestran en la tabla 4.6.

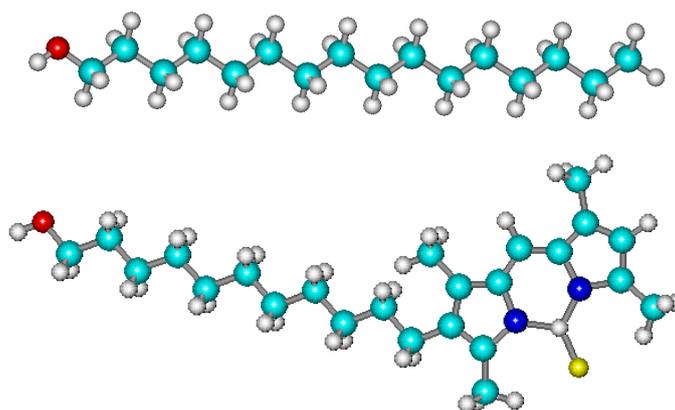


Figura 4.27. Modelos moleculares del hexadecan-1-ol (arriba) y de su análogo con un grupo BODIPY y una cadena saturada con 11 grupos metilenos, ambos en extensión máxima (Hyperchem™ 6.03).

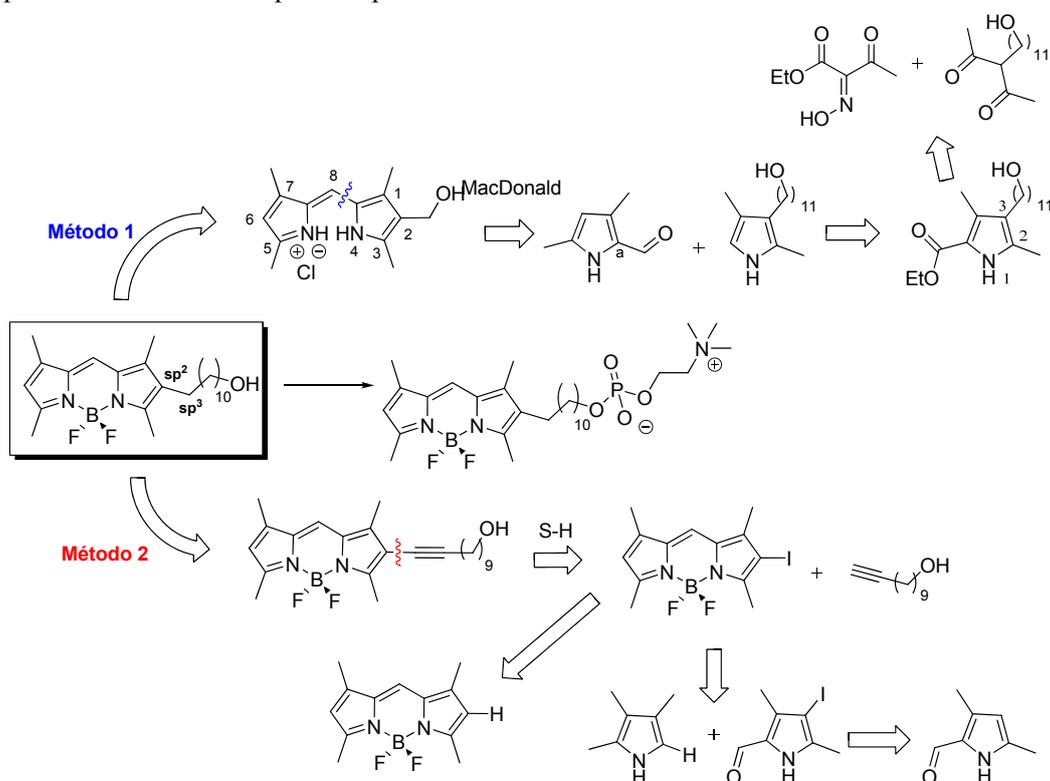
Tabla 4.6. Distancia (Å) entre el átomo de oxígeno del grupo OH y el átomo de carbono en posición 6 del grupo BODIPY en derivados hidroxialquil-BODIPYs

Compuesto	Distancia C <sub>6</sub> (BODIPY)-O (Å)
OH-10C-BODIPY	18.3
OH-11C-BODIPY	20.7
OH-12C-BODIPY	22.6
hexadecanol	20.2

De los datos en la tabla 4.6 se concluye que la estructura OH-11C-BODIPY es la más próxima en longitud molecular a la de hexadecanol, el alcohol precursor de MT. Teniendo en cuenta las relaciones SAR para Miltefosina, es de esperar que un valor menor de  $n$  traiga como consecuencia una disminución de la bioactividad, mientras que una cadena más larga posiblemente aumentaría las propiedades detergentes del análogo, dando lugar a interacciones inespecíficas con el parásito.

### 4.2.2 Síntesis

La síntesis de estos análogos fluorescentes de Miltefosina con el grupo BODIPY hace necesaria la creación de un enlace  $Csp^2-Csp^3$  entre la posición 2 del fluoróforo y la cadena hidrocarbonada del resto de la molécula. Los métodos que en principio parecen más adecuados para esta sustitución son: 1) preparación del dipirrometeno intermedio sustituido en la posición 2 mediante la condensación de MacDonald<sup>58</sup> entre un  $\alpha$ -H pirrol adecuadamente sustituido en su posición 3 y un  $\alpha$ -ceto o  $\alpha$ -formilpirrol (método 1, Esquema 4.24); 2) funcionalización de la posición 2 de un 2-halo-BODIPY mediante acoplamiento con un alquino terminal catalizando con paladio (acoplamiento de Sonogashira-Hagihara) e hidrogenación posterior del nuevo alquino generado (método 2, Esquema 4.24). El halógeno puede introducirse en el esqueleto de un 2H-BODIPY mediante reacciones de sustitución electrófila (yodación o bromación) o en la adecuada posición de uno de los pirroles precursores.



Esquema 4.24. Análisis retrosintético de los posibles métodos de obtención de análogos de MT con grupo 1,3,5,7-tetrametil-BODIPY unido covalentemente por su posición 2.

<sup>58</sup> Arsenault, G. P., Bullock, E., MacDonald, S. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4384-4396.

Ambos métodos se pueden aplicar a la obtención de otros análogos con el grupo BODIPY diferentemente sustituido, siendo además posible regular la longitud de la cadena espaciadora y la naturaleza del extremo polar. Además, como se verá, los productos de partida son de fácil acceso, las condiciones experimentales de los pasos de síntesis no implican mucha complejidad, y existe abundante bibliografía sobre cada transformación.

Basándonos en ambos métodos, decidimos sintetizar tres análogos con ciertas diferencias estructurales, en los que, en principio, cabe esperar diferentes propiedades parasitocidas y espectroscópicas. Se propuso la síntesis del análogo mostrado en el análisis retrosintético del Esquema 4.24, del mismo análogo con un resto etilo en posición 6 del grupo BODIPY, y de un análogo con un triple enlace, obtenido por el método 2. Las estructuras de los análogos seleccionados se muestran en la Figura 4.28.

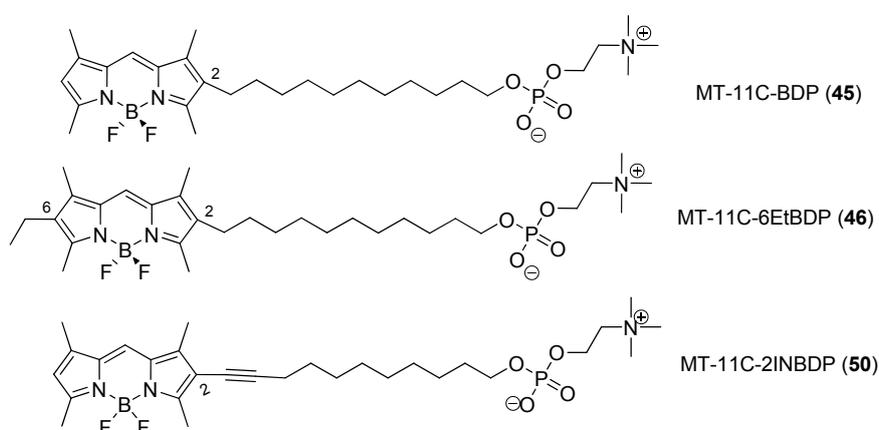
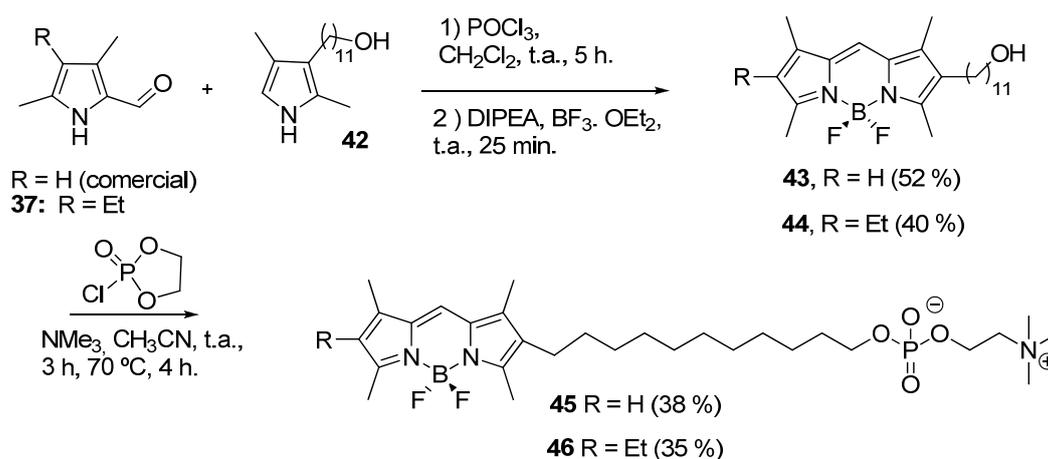


Figura 4.28. Análogos fluorescentes de Miltefosina con grupos BODIPY

#### 4.2.2.1 Síntesis de MT-11C-BDP (45) y MT-11C-6EtBDP (46)

Los análogos **45** y **46** se sintetizaron en dos pasos (Esquema 4.25): 1) condensación asimétrica de MacDonal entre el pirrol **42** y 3,5-dimetil-2-formilpirrol o 3,5-dimetil-4-etil-2-formilpirrol (**37**), en presencia de cantidades estequiométricas de POCl<sub>3</sub> como catalizador; el dipirrometeno intermedio generado se convirtió *in situ* en el correspondiente BODIPY **43** o **44** por reacción con eterato de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub>) en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA). 2) Introducción del resto de fosfocolina para dar los correspondientes análogos de MT, mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente en la obtención de análogos poliénicos de MT.



Esquema 4.25. Síntesis de análogos fluorescentes de MT con grupos BODIPY. Método 1

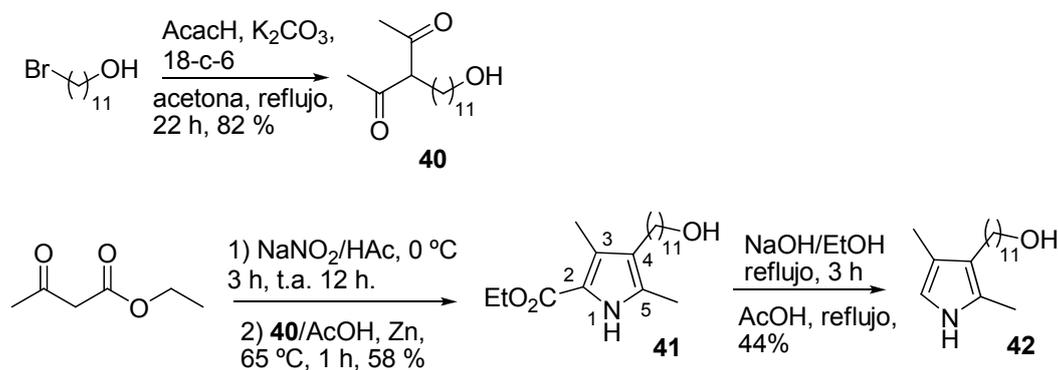
##### 4.2.2.1.1 Síntesis del pirrol precursor **42**

El pirrol precursor **42** se sintetizó en tres etapas a partir de acetilacetona, 11-bromoundecanol y acetilacetato de etilo, con un rendimiento global del 21 % (Esquema 4.26). La primera etapa consistió en la monoalquilación de acetilacetona con 11-bromoundecanol en presencia de carbonato potásico como base, 18-corona-6 como catalizador y acetona como disolvente.<sup>59,60</sup> Para evitar la desacetilación del dicetoalcohol **40**, por reacción de retro-Claisen, es necesaria la utilización de una base débil, como carbonato potásico, y un disolvente no nucleófilo, como acetona. Además, el uso del éter

<sup>59</sup> Mori, M., Washioka, Y., Urayama, T., Yoshiura, K., Chiba, K., Ban, Y. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4058.

<sup>60</sup> Puzicha, G., Shrout, D. P., Lightner, D. A. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27*, 2117.

corona 18-c-6 aumenta el rendimiento de producto C-alkilado, respecto a la utilización de  $K_2CO_3$  únicamente.<sup>61</sup>



Esquema 4.26. Síntesis de los pirroles **41** y **42**

En los espectros  $^1H$ -RMN y  $^{13}C$ -RMN de **40**, aparecen las señales esperadas. El porcentaje de enol presente en la muestra a temperatura ambiente en  $CDCl_3$  es menor del 1 %, como se deduce del espectro  $^1H$ -RMN en este disolvente. En el espectro de masas ( $ESI^+$ ) se observan las señales correspondientes a la masa molecular más un protón y a la misma masa más un catión sodio, a  $m/z$  271 y 293, respectivamente.

La síntesis del pirrol **41** se llevó a cabo por condensación de Johnson-Knorr,<sup>62,63</sup> por ser ésta la reacción que parece más adecuada para la obtención de 3,5-dimetilpirroles-2,4-disustituídos, como se comentó en los Antecedentes bibliográficos. En esta reacción se incorporan los grupos funcionales antes de la ciclación a pirrol, y las etapas de reacción se llevan a cabo de manera consecutiva y en el mismo matraz (*in situ*), facilitando el escalado y la purificación del pirrol final. Así, la condensación entre la  $\beta$ -dicetona **40** y el éster etílico del ácido  $\alpha$ -hidroxiiminoacetoacético (formado a partir de acetoacetato de etilo y nitrito sódico en medio ácido), en ácido acético y en presencia de Zn como reductor, condujo al correspondiente pirrol tetrasustituído **41** con rendimiento moderado (58 %) (Esquema 4.27).

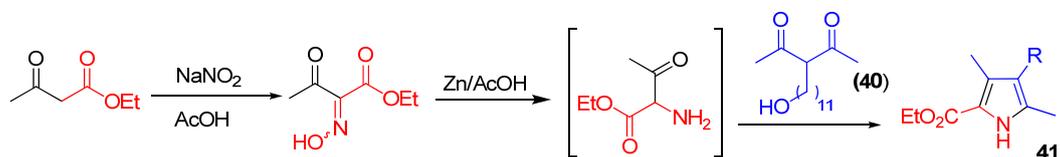
En el espectro  $^1H$ -RMN del pirrol **41** aparecen las señales esperadas: grupos metilo (a 2.12 y 2.16 ppm), grupo etilo, cadena hidroxialquílica, y una señal ancha, a 9.4 ppm, correspondiente al  $NH$  del anillo de pirrol. En el espectro  $^{13}C$ -RMN, los carbonos

<sup>61</sup> Liotta, C. L., Berknerin, J. "18-Crown-6", en Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis (Ed: L. Paquette) **2004**, J. Wiley & Sons, New York.

<sup>62</sup> Bullock, E., Johnson, A. W., Markham, E., Shaw, K. B. *J. Chem. Soc.* **1958**, 1430.

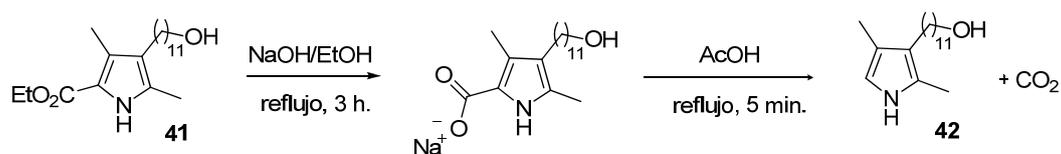
<sup>63</sup> Harbuck, J. W., Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 853.

de este anillo producen señales en torno a 118–129 ppm, como era de esperar. En el espectro de masas (EI) se observa el ión molecular a  $m/z$  337. Una característica común a todos los pirroles sustituidos en posición 4 por una cadena alifática es la presencia en el espectro de masas de una señal que corresponde al catión radical *pseudobencílico*, debido a la ruptura de dicha cadena. En el pirrol **41** esta señal aparece a  $m/z$  180.



Esquema 4.27. Síntesis del pirrol **41** por reacción de Johnson-Knorr

Se puede abordar la síntesis asimétrica de dipirrometenos mediante reacción de dos pirroles, uno funcionalizado con un grupo formilo o alquilcarbonilo en posición 2 y otro con una posición  $\alpha$  libre. Por tanto, aprovechando la conocida descarboxilación de pirroles con grupo carboxilo en  $\alpha$ , se llevó a cabo la hidrólisis básica de **41** (con hidróxido sódico en etanol) y a continuación se calentó el 2-carboxipirrol obtenido (sal sódica) en presencia de ácido acético, obteniéndose el pirrol **42**, con la posición  $\alpha$  libre (Esquema 4.28).

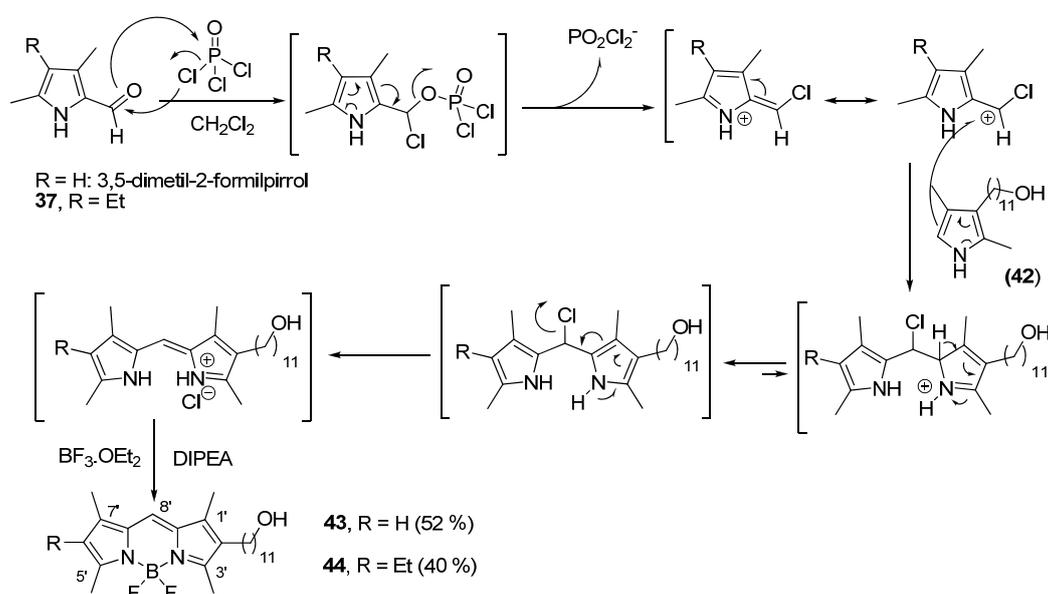


Esquema 4.28. Hidrólisis y descarboxilación del pirrol **41**

La presencia en el espectro  $^1\text{H-RMN}$  de un singlete a 6.38 ppm, correspondiente al protón en posición  $\alpha$  de **42**, y la desaparición de las señales del grupo etilo, con respecto al espectro del pirrol **41**, confirmaron la estructura. El carbono CH en  $\alpha$  aparece en  $^{13}\text{C-RMN}$  a 112.6 ppm y con mayor intensidad, con respecto al carbono de la misma posición en el pirrol precursor **41**. El espectro de masas confirmó la masa relativa de **42**.

#### 4.2.2.1.2 Síntesis de los análogos de MT con un grupo BODIPY

La condensación a temperatura ambiente del pirrol **42**, obtenido antes, con 3,5-dimetil-2-formil-1*H*-pirrol (producto comercial) o 3,5-dimetil-4-etil-2-formil-1*H*-pirrol (**37**), en presencia de oxiclورو de fósforo como catalizador y diclorometano como disolvente, condujo a un dipirrometeno intermedio (en forma de hidrocloruro) que se transformó *in situ* en el correspondiente BODIPY mediante reacción con eterato de trifluoruro de boro ( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ) en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA). Para consumir completamente el dipirrometeno intermedio es necesario un gran exceso de ambos reactivos (10 equivalentes), adicionados en dos etapas de 5 equivalentes cada una. En el Esquema 4.29, se muestra un probable mecanismo para esta reacción, basado en lo aceptado para la reacción de Vilsmeier-Haack.



Esquema 4.29. Probable mecanismo de formación de los BODIPYs asimétricos **43** y **44** por el método de MacDonald.

Inicialmente, el oxiclورو de fósforo activa el grupo carbonilo del primer pirrol, que es atacado seguidamente, mediante sustitución electrófila, por el pirrol con las posición  $\alpha$  libre (**42**). El intermedio *meso*-clorodipirrometano obtenido elimina HCl rápidamente, generando un hidrocloruro de dipirrometeno que, por adición de  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  en medio básico, conduce al BODIPY esperado.

La principal causa del bajo rendimiento de esta reacción, muy frecuente en estas condensaciones, es probablemente la facilidad que tienen los pirroles con la posición  $\alpha$  libre, como **42**, para polimerizar en el medio de reacción. A fin de minimizar los procesos de polimerización, es conveniente trabajar a bajas concentraciones (1 mmol/200 mL).

El disolvente aparentemente más adecuado para esta reacción es  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . En otros disolventes, los rendimientos en producto disminuyen.

En el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del alcohol-BODIPY **43**, con el grupo BODIPY sin sustituir en posición 6', aparecen los protones de los grupos metilo en posiciones 1',7' y 3',5' como dos pares de señales en torno a 2.22 y 2.44 ppm, respectivamente, debido a la asimetría que induce la cadena hidroxialquílica en posición 2'. En el compuesto **44**, más simétrico debido al grupo etilo en posición 6', estas parejas de señales aparecen más próximas, con los metilos en posiciones 3' y 5' dando una única señal. Las señales de los protones en posiciones 6' y 8' del anillo indacénico aparecen como dos singletes a 6.00 y 6.98 ppm respectivamente. El compuesto **44** sólo presenta una única señal en la zona de los protones aromáticos, a 6.93 ppm, debido al protón en posición 8'. Esta circunstancia permitió asignar las señales de los protones 6' y 8' en el compuesto **43**. La cadena hidroxipolimetilénica en posición 2' de ambos compuestos, y el grupo etilo en posición 6' en el compuesto **44**, dan las señales esperadas. Los demás protones aparecen también donde era de esperar.

En el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de **43** aparecen todas las señales de los carbonos del núcleo indacénico y de los metilos de las posiciones 1', 3', 5' y 7', éstas como señales distintas debido a la asimetría de la molécula. Nuevamente, estas diferencias son menores para el caso del alcohol **44**, más simétrico, donde se pueden observar dos pares de señales en torno a 10.0 y 13.5 ppm para los metilos en posiciones 1',7' y 3',5', respectivamente. Los carbonos del núcleo indacénico se localizan entre 118 y 140 ppm.

La asignación de los protones y los carbonos en estas dos moléculas se ha basado en experimentos bidimensionales COSY, HSQC y HMBC. En la Figura 4.29 se muestra a modo de ejemplo el espectro HMBC en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto **43**. En este espectro se observa la ausencia de correlación del H-8' del anillo indacénico con las señales a 155.0 y 156.7 ppm, mientras que sí existe correlación con el resto de las señales de los carbonos del núcleo de BODIPY 1', 7', 7a', 8a', 2', de modo que estas señales se asignan a los carbonos en posiciones 3' y 5', por estar más alejados de dicho protón. Estos dos carbonos presentan una fuerte correlación con las señales a 2.50 y 2.51 ppm en el espectro  $^1\text{H}$ -RMN, de modo que estas últimas señales se asignan a los protones de los

metilos en esas posiciones. Conociendo la identidad de los protones de los grupos metilo, se pudieron asignar fácilmente sus carbonos a través del espectro HSQC.

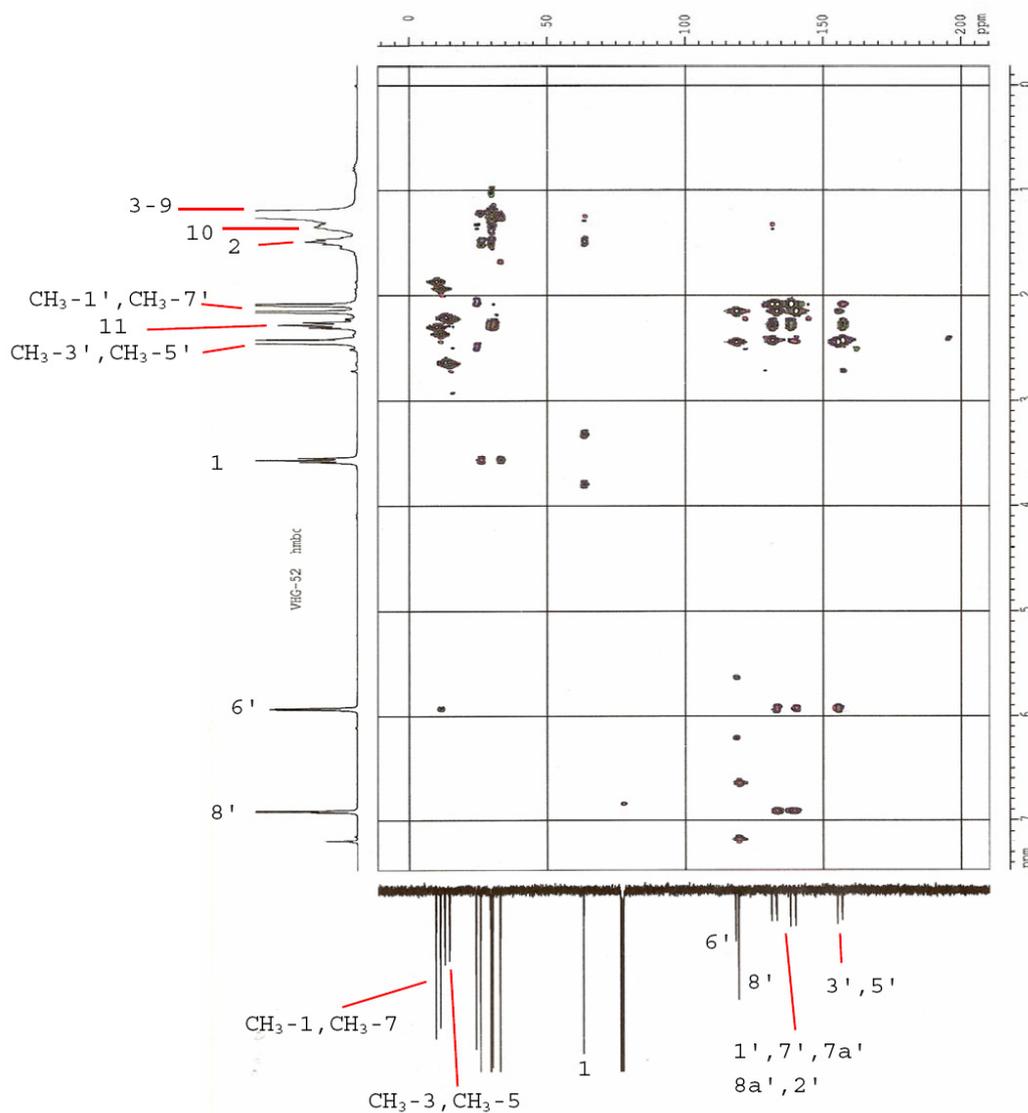
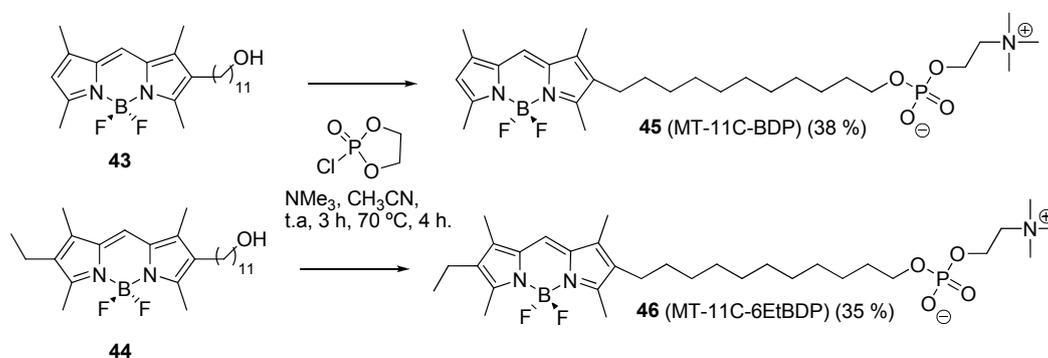


Figura 4.29. Espectro HMBC del alcohol **43** en  $\text{CDCl}_3$

Los espectro IR tienen un perfil común, con dos bandas intensas a 1614 y 1236  $\text{cm}^{-1}$  atribuibles a las tensiones de enlace B-N y B-F, respectivamente. Los espectros de masas (EI) de los dos compuestos **43** y **44** muestran el ión molecular, así como la señal correspondiente a la pérdida de una molécula de HF. El análisis HPLC, junto a los

espectros  $^1\text{H-RMN}$ , mostraron que ambos compuestos se aislaron con una pureza cercana al 100 %.

Finalmente, la obtención de los análogos **45** y **46** se llevó a cabo por introducción del resto de fosfatidilcolina, del mismo modo que se hizo en los análogos poliénicos (Esquema 4.30).



Esquema 4.30. Introducción del resto de fosfatidilcolina en los alcoholes **43** y **44**

La estructura de los análogos se confirmó por sus datos espectroscópicos. En el espectro  $^1\text{H-RMN}$  de **45** y **46** aparecen las señales correspondientes a la cadena polimetilénica, al resto de fosfatidilcolina, a los metilos del grupo BODIPY y al protón en posición 8' en **46** o en posiciones 6' y 8' en **45**. En la Figura 4.30 se muestra a modo de ejemplo el espectro en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del análogo **45**. Las señales de los protones de los metilenos en el resto de fosfocolina aparecen como dos multipletes debido a que se acoplan entre sí y con el átomo de fósforo.

En el espectro  $^{13}\text{C-RMN}$  de **45** y **46** aparecen todas las señales asignables al cromóforo BODIPY, a la cadena polimetilénica y al resto de fosfatidilcolina. Entre ellas caben destacar las resonancias de los carbonos situados a dos o tres enlaces del átomo de fósforo, que aparecen acopladas con este último. La asignación de los carbonos del grupo BODIPY se llevó a cabo por experimentos COSY, HSQC y HMBC, de manera análoga a como se hizo con los alcoholes precursores **43** y **44**.

El espectro FT-IR de los análogos muestra las bandas de absorción características de la cadena polimetilénica a  $2924\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ ) y en torno a  $1472\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{C-H}}$ ). Las bandas correspondientes al grupo fosfatidilcolina aparecen alrededor de  $1233\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{P=O}}$ ),  $1077\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-O-P}}$ ) y  $971\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{N-C}}$ ). El espectro de masas de ambos análogos ( $\text{ESI}^+$ ) presenta las señales correspondientes a la masa molecular más un protón, junto a los dímeros con un protón o con sodio. La pureza de los compuestos se

comprobó por sus espectros  $^1\text{H}$ -RMN, HPLC y análisis elemental. Las masas de alta resolución confirmaron la fórmula molecular.

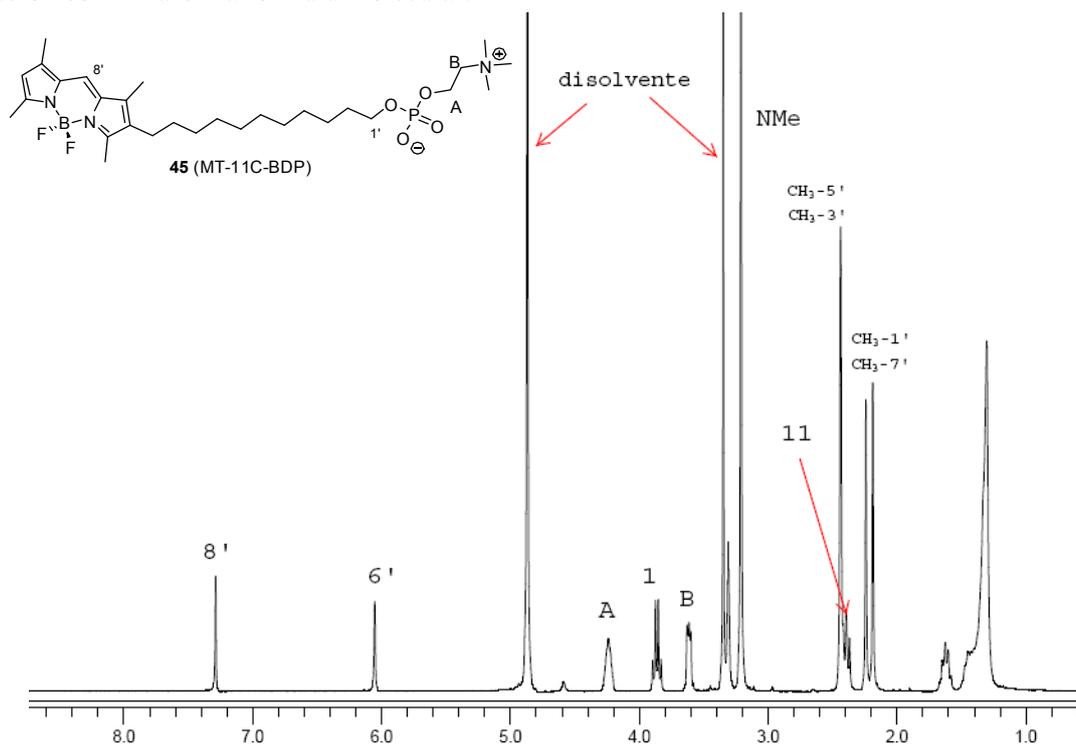
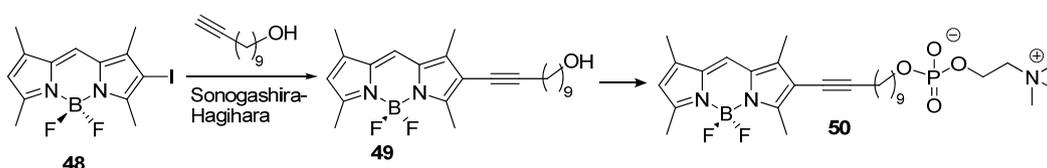


Figura 4.30. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del análogo 45

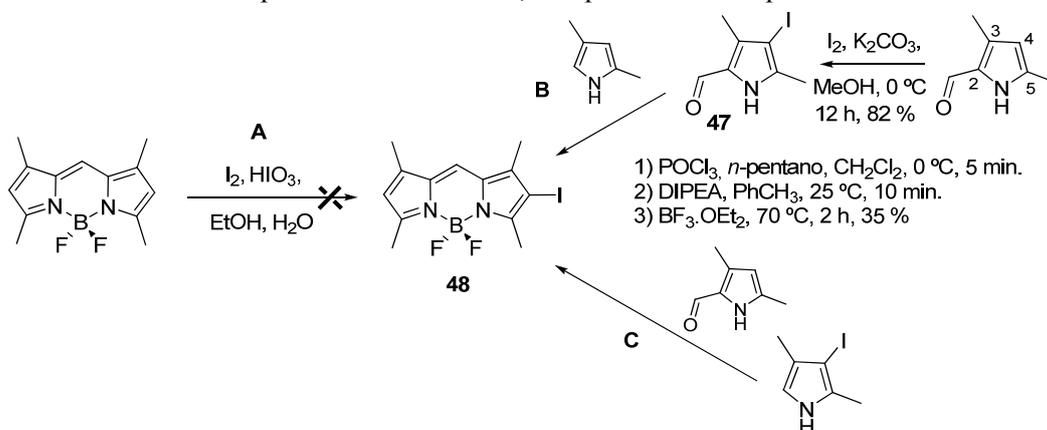
#### 4.2.2.2 Síntesis de MT-11C-2INBDP (50)

La síntesis de este análogo tiene como etapa clave un acoplamiento  $sp-sp^2$  (Sonogashira-Hagihara) entre undec-10-in-1-ol y 2-yodo-tetraMe-BDP (48), que dará lugar al correspondiente alcohol precursor 49, con el grupo BODIPY conjugado con un triple enlace. La introducción del grupo fosfocolina sobre 49 producirá el análogo buscado 50 (Esquema 4.31).



Esquema 4.31. Obtención del análogo 50

Para llegar a 48 sería necesario monoyodar 1,3,5,7-tetrametil-BODIPY en 2, y no en 2 y 6, por lo que se descartó la yodación directa del BODIPY con las posiciones 2 y 6 libres, ya que ambas posiciones son muy reactivas (Esquema 4.32, A). Por tanto, parece más conveniente sintetizar dicho BODIPY mediante una condensación de MacDonald asimétrica en donde uno de los dos pirroles precusores incorpore el átomo de yodo en la posición correcta, la que luego se convertirá en posición 2 en el nuevo BODIPY (Esquema 4.32, B y C). Este átomo de yodo puede introducirse con facilidad en el pirrol con grupo formilo en posición 2 y con su posición 4 libre (Esquema 4.32, B). El camino C también permitiría alcanzar 48, aunque con más etapas de reacción.



Esquema 4.32. Posibles métodos de síntesis de 48

#### 4.2.2.2.1 Síntesis del BODIPY yodado 48

La síntesis de **48** se llevó a cabo siguiendo un procedimiento descrito, y transcurrió con un rendimiento global del 29 %. En primer lugar, se yodó el compuesto comercial 3,5-dimetilpirrol-2-carbaldehído con yodo en medio básico (Esquema 4.32, camino B). La desaparición en el espectro  $^1\text{H-RMN}$  de la señal del protón en posición 4, en el producto de partida confirmó la transformación. A continuación se hizo reaccionar el nuevo yodopirrol **47** con 2,4-dimetilpirrol en presencia de oxiclóruo de fósforo como catalizador, de modo similar a como se hizo en la obtención de los alcoholes **43** y **44**. El dipirrometeno así obtenido se transformó *in situ* en el correspondiente BODIPY mediante la adición de exceso de eterato de trifluoruro de boro ( $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ ) y de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA).

La estructura de **48** se confirmó por su espectro  $^1\text{H-RMN}$ , donde aparecen cuatro singletes correspondientes a los protones de los cuatro grupos metilos, y dos señales a 6.09 y 7.04 ppm, de los protones en posiciones 6 y 8, respectivamente. En el espectro  $^{13}\text{C-RMN}$  aparecen las señales esperadas.

#### 4.2.2.2.2 Síntesis del alcohol 49 y del fosfolípido 50

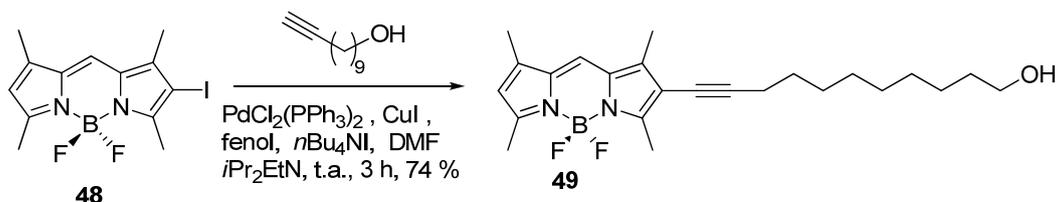
El alcohol precursor **49** se obtuvo por acoplamiento de Sonogashira-Hagihara entre undec-10-in-1-ol y **48**, siguiendo condiciones experimentales descritas<sup>64</sup> para productos similares, alcanzando buenos rendimientos en producto aislado (74 %) (Esquema 4.33). Se utilizó como catalizador  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ , que proporciona mejores rendimientos que  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , usado en el método descrito.

En el espectro  $^1\text{H-RMN}$  de **48** aparecen los protones de los metilos en posiciones 1', 7' y 3', 5' como dos pares de señales distintas hacia 2.22 y 2.53 ppm, respectivamente, debido a la asimetría de la molécula. Los protones en posiciones 6' y 8' aparecen como dos singletes a 6.03 y 6.99 ppm, respectivamente. Los metilenos de la cadena hidroxialquínica dan las señales esperadas.

En el espectro  $^{13}\text{C-RMN}$  de **49** aparecen las señales de los carbonos de los metilos de las posiciones 1', 3', 5' y 7' como señales distintas. Las señales de los carbonos del núcleo indacénico se localizan entre 115 y 158 ppm. También aparecen las señales correspondientes a los carbonos del triple enlace, a 72.4 y 96.6 ppm.

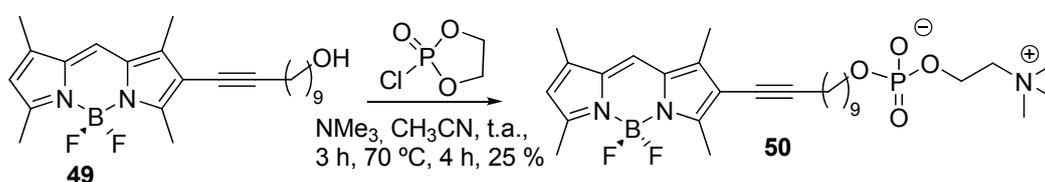
---

<sup>64</sup> Wan, C., Burghart, A., Chen, J., Bergström, F., Johansson, L. B., Wolford, M. F., Kim, T. G., Topp, M. R., Hochstrasser, R. M., Burgess, K. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4430-4441.

Esquema 4.33. Síntesis del alcohol **49** por acoplamiento de Sonogashira

La pureza de este compuesto se comprobó por  $^1\text{H}$ -RMN, HPLC (100 % de pureza midiendo a 280, 375, 529 nm) y análisis elemental.

La introducción del grupo fosfatidilcolina sobre el alcohol **49** se llevó a cabo siguiendo el mismo método que en la obtención de los análogos anteriores (Esquema 4.34).

Esquema 4.34. Introducción del resto de fosfatidilcolina para obtener **50**

La estructura del análogo **50** se confirmó por su espectro  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 4.31), donde aparecen las señales correspondientes a los protones de la cadena polimetilénica, a los del resto de fosfatidilcolina, a los metilos del grupo BODIPY y a los protones en posiciones 6' y 8' del mismo grupo. Las señales de los protones de los metilenos en el resto de fosfatidilcolina aparecen, como en análogos anteriores, como dos multipletes, debido a que se acoplan entre sí y con el átomo de fósforo. Los protones en posición 1 de la cadena polimetilénica aparecen como un cuadruplete, debido a este mismo acoplamiento.

En el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN aparecen las señales asignables al grupo BODIPY, a la cadena polimetilénica y al resto de fosfatidilcolina. Las señales de los carbonos situados a dos o tres enlaces del átomo de fósforo aparecen acopladas con este último. Las señales de los carbonos del triple enlace aparecen a 73.4 y 97.5 ppm.

El espectro FT-IR de **50** muestra las bandas de absorción características de la cadena polimetilénica a  $2926\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ ) y a  $1474\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{C-H}}$ ). Las bandas correspondientes al grupo fosfatidilcolina aparecen a  $1246\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{P=O}}$ ),  $1085\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-O-P}}$ ) y  $971\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{N-C}}$ ). En el espectro de masas ( $\text{ESI}^+$ ) se observan las señales correspondientes a la masa molecular más un protón y más un catión sodio, así como el

dímero 2M con un protón. La pureza se comprobó por  $^1\text{H}$ -RMN, HPLC (97 % de pureza midiendo a 280, 375 y 529 nm) y análisis elemental.

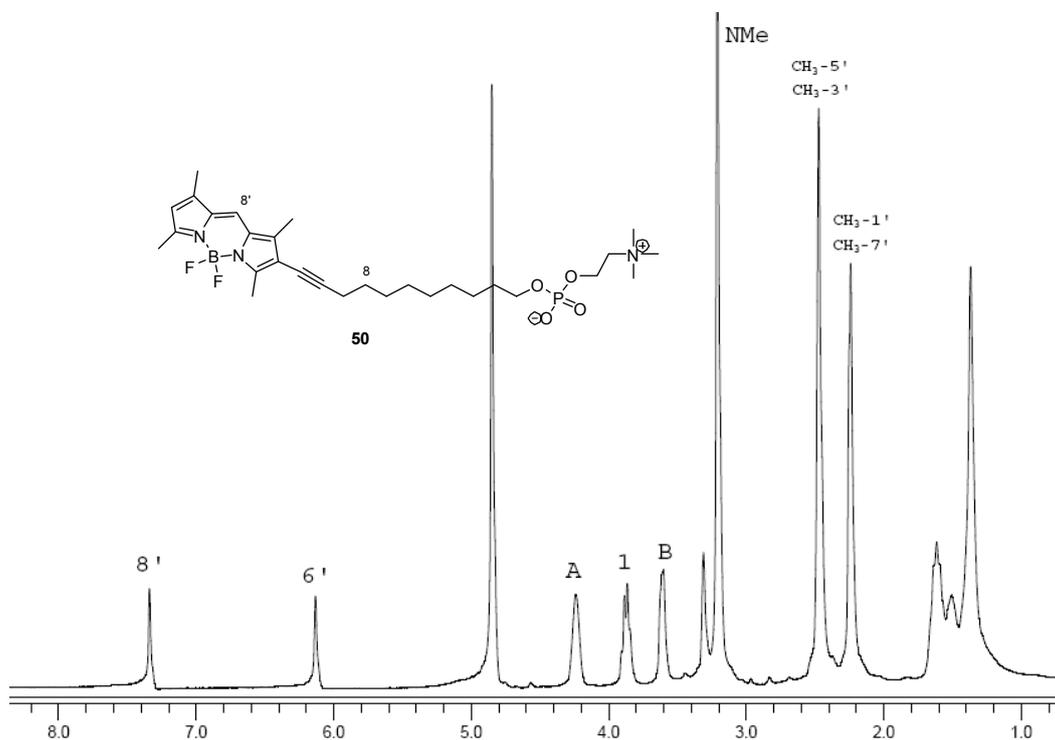


Figura 4.31. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del análogo **50**

La aplicación de los dos métodos aquí descritos en la síntesis de análogos fluorescentes de moléculas bioactivas, lipídicas y anfipáticas, como MT, presenta como características principales:

- La incorporación del fluoróforo en la molécula se realiza únicamente a través de enlaces C-C, evitando la introducción de grupos polares como amidas, éteres, ésteres, generalmente utilizados para unir etiquetas fluorescentes. Esto es de vital importancia en el marcado fluorescente de moléculas pequeñas y anfipáticas, ya que estos grupos podrían alterar el balance hidrófilo-lipófilo y, por tanto, su bioactividad.
- Los análogos se obtienen con una conformación similar a la conformación lineal de la cadena apolar original de Miltefosina, con lo que se minimiza la perturbación de la actividad biológica debida a la incorporación del fluoróforo.

- Ambos métodos de síntesis son fácilmente escalables y versátiles, al permitir la regulación de la longitud de la cadena espaciadora, la introducción del grupo BODIPY en diferentes posiciones a lo largo de dicha cadena, y la modificación de la cabeza polar.

### 4.2.3 Propiedades fotofísicas de los análogos 45, 46 y 50

El estudio de las propiedades fotofísicas de los tres nuevos análogos de MT con grupo BODIPY se llevó a cabo mediante espectroscopia UV-Visible y de fluorescencia a temperatura ambiente, siguiendo el protocolo descrito en la parte experimental (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Máximo de absorción ( $\lambda_{ab}$ ), coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ), máximo de la emisión de fluorescencia ( $\lambda_{emis}$ ) y rendimiento cuántico de emisión ( $\Phi_F$ ) de los análogos de Miltefosina con grupo BODIPY.

Compuesto	Disolvente	$\lambda_{ab}/nm^a$	$(\epsilon_{max}/M^{-1}cm^{-1})$	$\lambda_{emis}$ (nm)	$\Phi_F^b$
<b>45</b>	EtOH	517	-	525 <sup>c</sup>	-
	DMSO	517	71100	526 <sup>c,d</sup>	0.93 <sup>c,d</sup>
<b>46</b>	MeOH	527	82200	536 <sup>c</sup>	0.94 <sup>e</sup>
	EtOH	529	79000	-	-
	DMSO	529	79000	-	-
<b>50</b>	EtOH	533	61300	553 <sup>c</sup>	0.51 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>  $\pm 1$  nm. <sup>b</sup>  $\pm 10\%$ . <sup>c</sup>  $\lambda_{exc} = 490$  nm. <sup>d</sup> En MeOH. <sup>e</sup>  $\lambda_{exc} = 502$  nm.

Como se observa en esta tabla, los análogos fluorescentes de MT con grupos BODIPY presentan altos coeficientes de absorción, en el entorno 61300–82200  $M^{-1}cm^{-1}$ , con máximos de absorción centrados en el entorno 517–533, que los hace apropiados para su uso en los diversos métodos de detección de fluorescencia utilizados en el estudio de sistemas de interés biológico. Estos análogos presentan una intensa emisión de fluorescencia, que aparece de color verde para el análogo **45**, amarillo para **46** y naranja para **50** (Figura 4.32), con altos valores del rendimiento cuántico. Las propiedades espectroscópicas de estos análogos no presentan variaciones significativas respecto de las de sus alcoholes precursores **43**, **44** y **49**, respectivamente, lo que indica la ausencia de interacciones electrónicas entre el cromóforo y el grupo polar en estas moléculas. El espectro de absorción de los análogos **45** y **46**, sin triple enlace conjugado, muestra una banda principal, correspondiente a las transiciones al primer estado excitado ( $S_0$ - $S_1$ ), y una segunda banda, a menor longitud de onda, asociada a la transición ( $S_0$ - $S_2$ ). Independientemente de que se excite al estado  $S_1$  o  $S_2$ , el proceso de emisión de fluorescencia tiene lugar desde el estado  $S_1$ . Los espectros de emisión de ambos compuestos son muy similares a los respectivos espectros de absorción, lo que indica que la conformación del grupo BODIPY en el estado excitado es también muy similar a la del estado electrónico fundamental. Además, como se deduce de los elevados valores del

rendimiento cuántico de emisión, ambos compuestos presentan una notable estabilidad fotoquímica.

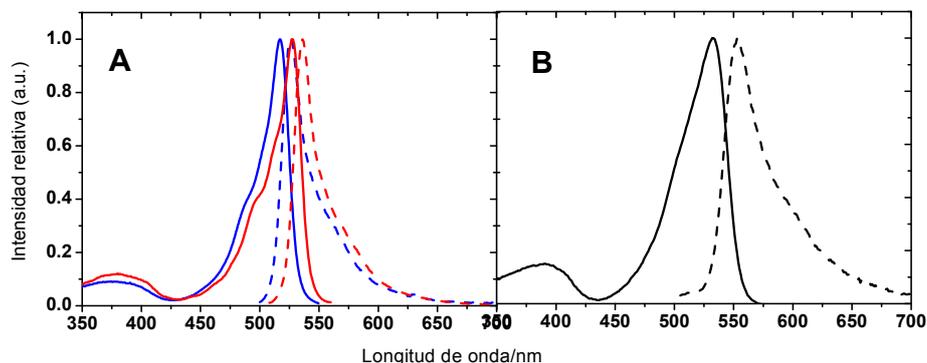


Figura 4.32. Espectros de absorción normalizados (línea continua) y de fluorescencia corregido y normalizado (línea discontinua) de MT-11C-BDP (**45**) (azul) y MT-11C-6EtBDP (**46**) (rojo) en DMSO (Panel A), y de MT-11C-2INBDP (**50**) (Panel B) en EtOH. Concentración:  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  M. T = 22 °C.

La presencia de un grupo etilo en la posición 6 del grupo BODIPY en el análogo **46** desplaza  $438\text{ cm}^{-1}$  (12 nm) hacia el rojo la longitud de onda del máximo de la absorción, y cerca de  $391\text{ cm}^{-1}$  (10 nm) la de la emisión, respecto del análogo **45**, sin etilo. Esta diferencia es aún más acusada en el caso del análogo **50**, con un triple enlace conjugado con el grupo BODIPY, donde su absorción y su emisión de fluorescencia aparecen desplazadas  $581\text{ cm}^{-1}$  (16 nm) y  $965\text{ cm}^{-1}$  (28 nm), respectivamente, respecto de las de **45**. La presencia del triple enlace en **50** no disminuye la fotoestabilidad del conjunto, aunque cambia apreciablemente algunas de sus propiedades espectroscópicas. Así, las bandas de absorción y de emisión de fluorescencia son más anchas que en los análogos sin triple enlace y el valor del rendimiento cuántico disminuye casi a la mitad (0.51).

La Figura 4.33 muestra la variación de colores de fluorescencia que caracteriza a los nuevos análogos de MT **45**, **46** y **50**. A modo de comparación, también se muestra el análogo de MT con el grupo todo-(*E*)-difenilhexatrieno (**30**), cuya emisión de fluorescencia se encuentra en el azul.

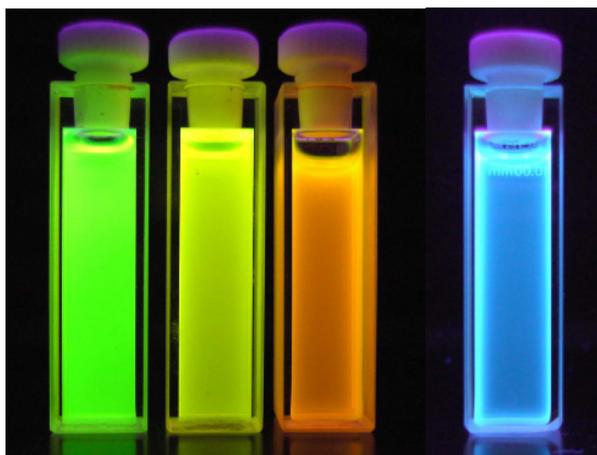


Figura 4.33. Análogos fluorescentes de MT irradiados con luz de 365 nm. De izquierda a derecha: análogos **45**, **46**, **50** y **30**.

#### 4.2.4 Propiedades parasiticidas de los análogos 45 y 46

A continuación se resumen los resultados preeliminares del estudio de las propiedades parasiticidas de **45** y **46**, un trabajo realizado por el grupo del Dr. L. Rivas (CIB, CSIC) en colaboración con nuestro laboratorio.

##### 4.2.4.1 Actividad leishmanicida

Se evaluó la actividad leishmanicida de los análogos **45** y **46** frente a promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*, sensibles a Miltefosina. Además, se estudió la inhibición sobre la proliferación de la cepa R40 de *L. donovani*, que es resistente a Miltefosina. En la tabla 4.8 se muestran los valores de LD<sub>50</sub> obtenidos con los diferentes análogos en los ensayos a 48 h (para promastigotes de *L. donovani*) ó a 72 h (para amastigotes de *L. pifanoi*).

Como ya se explicó en el apartado sobre la actividad leishmanicida de los análogos de MT con grupo polieno, el ensayo a 48 h mide la dosis letal (LD<sub>50</sub>, expresado como concentración) y representa la capacidad de inhibición de los análogos fluorescentes sobre la proliferación de las células, es decir, sobre su capacidad de reproducción. En amastigotes, los ensayos se realizan a 32 °C y 72 h, ya que se necesita más tiempo para la proliferación celular de esta forma del parásito.

Tabla 4.8. Actividad antileishmania *in vitro* de MT y sus análogos fluorescentes con grupos BODIPY.

Compuesto	LD <sub>50</sub> (μM)		
	promastigotes <i>L. donovani</i> (48 h)		amastigotes de <i>L. pifanoi</i> (72 h)
	cepa sensible (WT)	cepa resistente (R40)	cepa sensible (WT)
MT	4.88±0.81	82.17±1.21	13.71±1.94
MT-11C-BDP ( <b>45</b> )	0.89±0.27	12.43±0.17	0.44±0.02
MT-11C-6EtBDP ( <b>46</b> )	0.63±0.03	7.93±0.12	0.28±0.02
OH-11C-BDP ( <b>43</b> )	> 150	> 150	> 150

Sorprendentemente, ambos análogos mostraron una actividad antileishmania unas 5-8 veces superior a la de MT en promastigotes de *L. donovani*, y más de 30-50 veces superior para amastigotes de *L. pifanoi*, siendo el más activo de los dos el análogo **46**, con grupo etilo en el cromóforo BODIPY. Para la cepa R40, los valores de LD<sub>50</sub> fueron muy superiores a los encontrados con la cepa WT. Por otro lado, se comprobó que

el compuesto de control OH-11C-BDP, que carece del resto polar de fosfocolina, es inactivo, indicando que la presencia del cromóforo BODIPY no contribuye al efecto leishmanicida de los análogos. Estos resultados muestran que, muy probablemente, **45** y **46** son análogos funcionales de MT, apoyando así un estudio más detallado de los mismos.

#### 4.2.4.2 Distribución intracelular en parásitos de *Leishmania*

Se estudió el patrón de incorporación a *Leishmania* de los análogos fluorescentes de MT **45** y **46** y del alcohol **43**, mediante técnicas de microscopía confocal, utilizando la cepa silvestre WT y la resistente R40 de promastigotes de *L. donovani* (Figura 4.34 y 4.35).

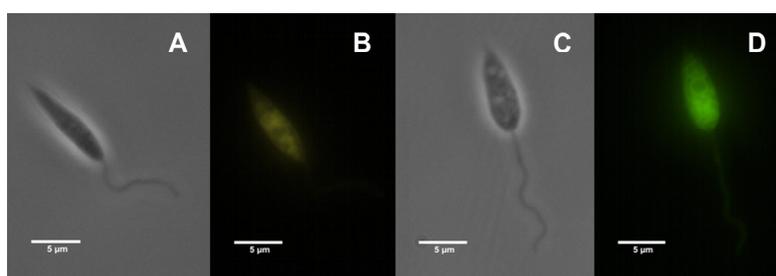


Figura 4.34. Incorporación específica y distribución intracelular de los análogos **45** y **46** a promastigotes de *L. donovani*. 7.5 µM, 4 h, 25 °C; barra: 5 µm.

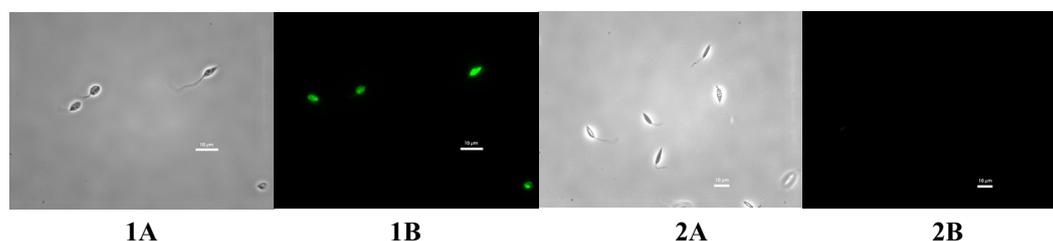


Figura 4.35. Incorporación específica y distribución intracelular del análogo **45** en promastigotes de *L. donovani*, de las cepas sensible (WT, **1A** y **1B**) y resistente (R40, **2A** y **2B**) a Miltefosina. **A**: Imágenes de microscopía de transmisión. **B**: Imágenes de fluorescencia. 10 µM, 4 h, 26 °C; barra: 10 µm.

Como ocurrió en el caso de los análogos de MT con grupos polieno, se observa que los análogos **45** y **46** se incorporan de forma específica al parásito y que se distribuyen en su interior de forma homogénea, no limitada a la membrana plasmática y sin acumulación privilegiada en ningún orgánulo.

Estos resultados parecen indicar que **45** y **46** comparten el mismo transportador de membrana que MT en el parásito, de forma análoga a lo que se demostró con los análogos poliénicos de MT. Como se había planificado, la presencia del grupo fluorescente BODIPY facilita considerablemente la adquisición de imágenes en los microscopios confocales, gracias a la posibilidad de excitar en la zona visible del espectro y a la notable fotoestabilidad del cromóforo.

### 4.3 Síntesis de un análogo fluorescente del ácido octadecanoico

La estructura de la molécula de Miltefosina sugiere que es muy probable que el fármaco interfiera con procesos relacionados con la síntesis, la modificación y el metabolismo lipídico del parásito. Esta posibilidad ha servido de estímulo a una larga serie de estudios de estos posibles efectos de MT, que se han revisado recientemente.<sup>65</sup> De estas investigaciones se concluye que, efectivamente, la presencia de MT interfiere en varios procesos relacionados con la biosíntesis de lípidos en diferentes parásitos. Sin embargo, no se ha podido demostrar una correlación inmediata entre este efecto y la citotoxicidad de MT. El estudio de algunos de estos efectos también se puede facilitar considerablemente utilizando análogos fluorescentes de ácidos grasos. Por esta razón se decidió obtener un análogo fluorescente del ácido saturado C<sub>18</sub> (esteárico) utilizando el grupo BODIPY. Se seleccionó esta estructura particular para poder disponer así de un ácido graso fluorescente que también fuera útil como sonda molecular de bicapas lipídicas.<sup>66</sup>

Como ya se hizo con los análogos de MT con grupos BODIPY, se seleccionó una estrategia consistente en la construcción del grupo fluoróforo sobre el ácido graso mediante síntesis completa de un nuevo análogo fluorescente conteniendo este grupo en su estructura. Además, como antes, la unión covalente se realizó a través de la posición 2 para alinear lo máximo posible el grupo BODIPY con la cadena alquílica y mimetizar así la conformación lineal del compuesto original.

Para diseñar la estructura del análogo del ácido octadecanoico se ha tenido en cuenta que el alcohol precursor del análogo de Miltefosina (**43**) tiene una longitud equivalente a la del ácido hexadecanoico. Como el grupo fluorescente utilizado en este caso posee un sustituyente CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> en posición 6, una estructura final conteniendo una cadena de 10 grupos metileno proporcionaría un análogo emisivo con una longitud total muy próxima a la del ácido esteárico (Figura 4.36).

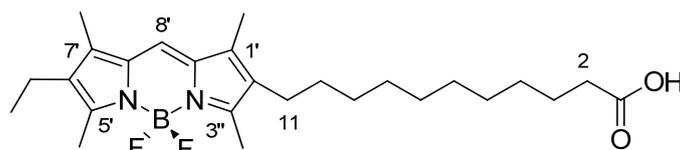
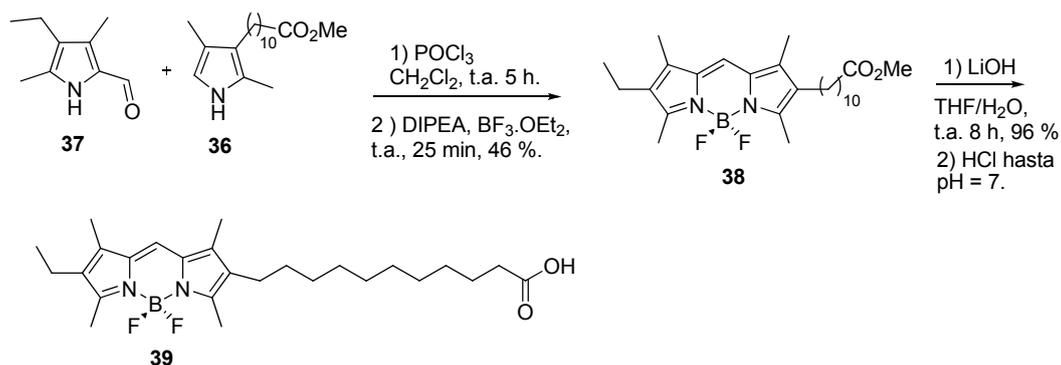


Figura 4.36. Estructura seleccionada para el análogo fluorescente del ácido octadecanoico

<sup>65</sup> Urbina, J. A. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *100S*, 59-516.

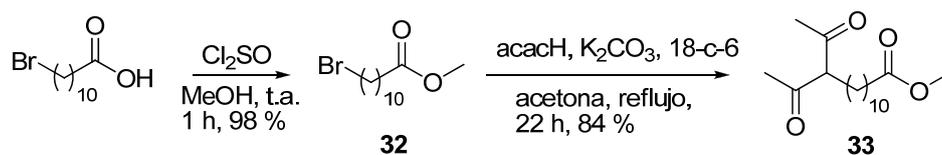
<sup>66</sup> Mateo, C. R., Acuña, A. U. Brochon, J. C. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 978-987

Este análogo se sintetizó siguiendo la misma ruta utilizada para el análogo de MT **45**, por condensación asimétrica de MacDonald entre el pirrol **36** y 3,5-dimetil-4-etil-2-formilpirrol (**37**), en presencia de cantidades estequiométricas de  $\text{POCl}_3$  como catalizador. El dipirrometeno intermedio generado se convirtió *in situ* en el correspondiente BODIPY por reacción con eterato de trifluoruro de boro ( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ) en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA). La hidrólisis en medio básico del grupo éster (utilizado como precursor del ácido durante todas las etapas de síntesis) condujo al compuesto buscado con un rendimiento global para estas dos etapas del 44 % (Esquema 4.35).



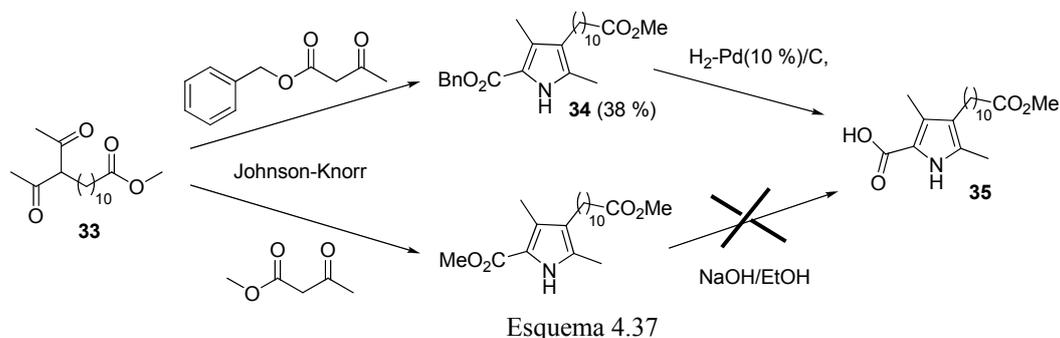
Esquema 4.35. Síntesis del análogo fluorescente COOH-10C-6EtBDP (**39**)

El pirrol precursor **36** se sintetizó en cuatro etapas con un rendimiento global del 31%. Para evitar reacciones secundarias, especialmente en la condensación de MacDonald, se decidió utilizar el grupo ácido en forma de éster metílico durante todos los pasos de reacción. Por tanto, en la primera etapa se trató el ácido 11-bromoundecanoico con  $\text{MeOH}/\text{SOCl}_2$ , obteniéndose el éster **32** con rendimientos prácticamente cuantitativos (Esquema 4.36). Del mismo modo que en la obtención de la dicetona **40**, la monoalquilación de acetilacetona con **32** en presencia de base condujo a la dicetona **33** con un 84% de rendimiento.



Esquema 4.36. Síntesis del la dicetona **33**

Para preparar el pirrol **36** es necesaria la presencia de un grupo éster en la posición 2, que se hidrolice en condiciones que no afecten al otro grupo éster, como por ejemplo un grupo éster bencílico, que se puede eliminar por hidrogenación catalítica en condiciones que no afectan a los grupos ésteres de alquilo (Esquema 4.37). Por tanto, la condensación de Johnson-Knorr se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el caso del pirrol **41**, pero utilizando la dicetona **33** y acetilacetato de bencilo, obteniéndose el pirrol **34** con un rendimiento del 38 %.

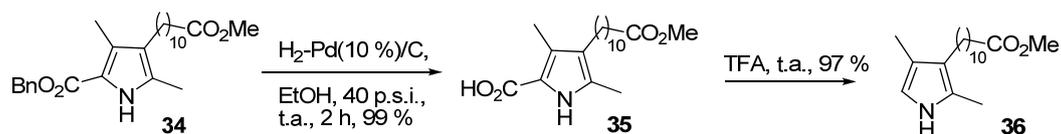


Esquema 4.37

En el espectro <sup>1</sup>H-RMN de **34** en CDCl<sub>3</sub> aparecen las señales de los protones de los grupos metilo en 3 y 5 a 2.17 y 2.27 ppm, las correspondientes a la cadena polimetilénica, al metilo del grupo éster a 3.66, y al grupo bencilo a 5.28 y 7.37 ppm. En el espectro <sup>13</sup>C-RMN, los carbonos del pirrol aparecen en el entorno 110-130 ppm, el carbono carbonílico del éster metílico aparece a 174.3 ppm, mientras el del éster bencílico lo hace a 190.9 ppm. En el espectro de masas (EI) se observó el ión molecular a m/z 427. También se observó la masa correspondiente al catión radical *pseudobencílico*, debido a la fragmentación de la cadena en posición 4.

A continuación, el grupo benciloxicarbonilo se eliminó por: 1) hidrogenación catalítica en presencia de paladio sobre carbon activado;<sup>67</sup> y 2) el ácido carboxílico originado **35** se descarboxiló con rendimiento prácticamente cuantitativo por tratamiento con ácido trifluoroacético, dando lugar al pirrol buscado **36** (Esquema 4.38).

<sup>67</sup> Mackman. R.L., Micklefield. J., Block. M. H., Leepe. F. J., Battersby. A.R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 2111.



Esquema 4.38. Síntesis de **36** por hidrogenolisis y descarboxilación de **34**

La condensación de **36** con 3,5-dimetil-4-etil-2-formil-1*H*-pirrol (**37**), en presencia de oxiclورو de fósforo como catalizador, condujo a un dipirrometeno intermedio que se transformó *in situ* en el correspondiente BODIPY (Esquema 4.35).

La hidrólisis del grupo éster metílico en **38** se llevó a cabo utilizando la base débil LiOH, lográndose un rendimiento del 98%. Se ha descrito la hidrólisis de productos similares en presencia de NaOH, KOH,<sup>68,69</sup> o HCl,<sup>70</sup> pero, debido a la conocida inestabilidad del grupo BODIPY frente a estos reactivos, los rendimientos descritos no superaron el 30%.

En el espectro <sup>1</sup>H-RMN del ácido **39** aparecen los protones de los grupos metilo en posiciones 1',7' y 3',5' como dos pares de señales hacia 2.15 y 2.48 ppm, respectivamente. La señal del protón en posición 8' del anillo indacénico aparece como un singlete a 6.94 ppm. El resto en posición 2' y el grupo etilo en 6' dan las señales esperadas (Figura 4.37).

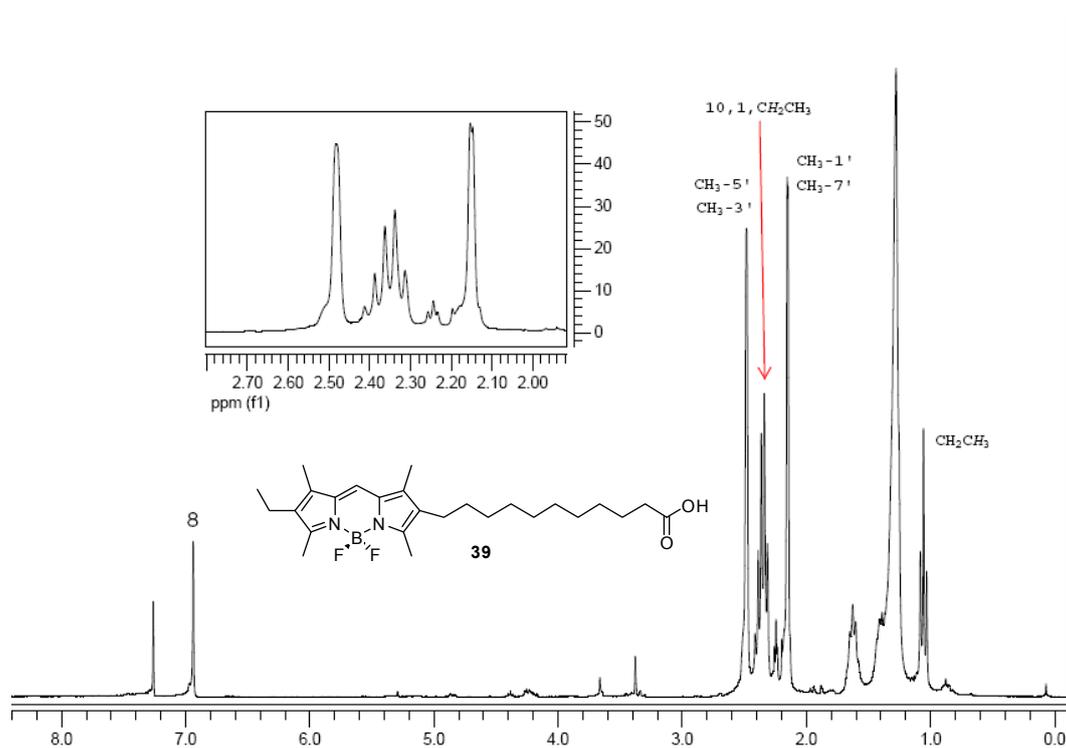
En el espectro <sup>13</sup>C-RMN de **39** aparecen las señales de los carbonos del núcleo indacénico entre 118 y 155 ppm. El carbono del grupo ácido carboxílico aparece a 179.3 ppm, como era de esperar. La pureza de este compuesto, medida por HPLC, se aproxima al 100%, midiendo a 362, 346 y 520 nm, y el análisis elemental está de acuerdo con este valor. Su fórmula molecular se confirmó por masas de alta resolución.

La posible utilidad de **39** como herramienta de estudios mecanísticos en *Leishmania* y como sonda de bicapas lipídicas está pendiente de evaluación.

<sup>68</sup> Boldyrev, I. A., Molotkovsky, J. G. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2006**, *32*, 78.

<sup>69</sup> Omel'kov, A. V., Pavlova, Y. B., Boldyrev, I. A., Molotkovsky, J. G. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2006**, *33*, 505.

<sup>70</sup> Meltola, N. J., Wahlroos, R., Soini, A. E. *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 635-647.

Figura 4.37. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  en  $\text{CDCl}_3$  del ácido **39**

#### 4.4 Análogos fluorescentes de Edelfosina con grupo BODIPY

##### 4.4.1 Diseño molecular

Para el diseño de análogos fluorescentes de Edelfosina hemos utilizado la escasa información disponible sobre la relación estructura-actividad *pro-apoptótica* de otros análogos. En general, la casi totalidad de los estudios de actividad antineoplásica de nuevos derivados y análogos de ET realizados hasta la fecha utilizan como indicador de la misma el efecto citotóxico en cultivos de células malignas.<sup>71</sup> Sin embargo, como las concentraciones farmacológicas de estos compuestos están muy próximas a su concentración micelar crítica (c.m.c), es difícil distinguir entre efectos citotóxicos específicos e inespecíficos (como por ejemplo la lisis de la membrana celular). Actualmente se considera que, para obtener este tipo de correlaciones estructura/actividad, es más fiable determinar la actividad *pro-apoptótica* de los compuestos en cuestión, aunque debido a las dificultades experimentales existe muy poca información obtenida de esta forma.<sup>72</sup> Se resumen a continuación los resultados más relevantes para nuestro trabajo (Figura 4.38).<sup>73</sup>

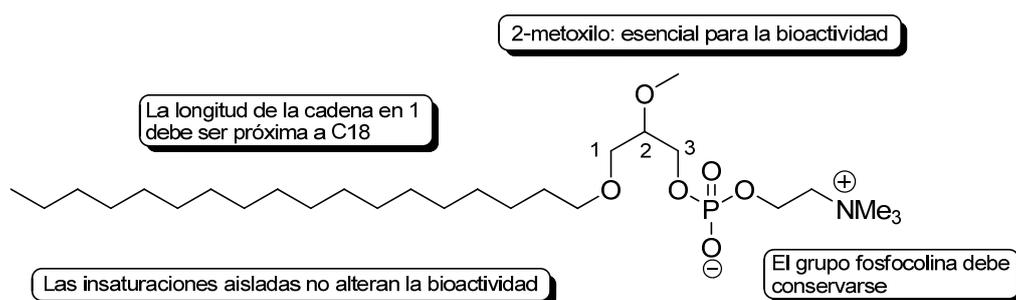


Figura 4.38. Relación estructura-actividad *pro-apoptosis* en análogos de Edelfosina.<sup>72,73</sup>

Un mínimo requerimiento estructural para que un éter lípido muestre actividad *pro-apoptótica* consiste en un resto alquilo de, al menos, 16-18 átomos de carbono en posición *sn-1* o *sn-3* (según la configuración absoluta del C-2), y un grupo fosfocolina en

<sup>71</sup> Brachwitz, H., Vollgraf, C. *Pharmacol. Ther.* **1995**, *66*, 39.

<sup>72</sup> Mollinedo, F., Fernández-Luna, J. L., Gajate, C., Martín-Martín, B., Benito, A., Martínez-Dalmau, R., Modolell, M. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1320-1328.

<sup>73</sup> Mollinedo, F., Gajate, C., Martín-Santamaria, S., Gago, F. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3163-3184.

posición *sn*-3 o *sn*-1, respectivamente.<sup>72</sup> La sustitución del grupo 2-metoxilo por H, OH o acetilo elimina dicha actividad, al igual que la sustitución del grupo colina por serina. Asimismo, se ha observado que no existe un efecto estereoespecífico en la inducción de apoptosis por Edelfosina, siendo igualmente activos los isómeros (*R*), (*S*), o la mezcla racémica.<sup>72</sup>

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de la relación entre estructura y actividad antitumoral, que indican que la longitud, la conformación (aproximadamente lineal) y la naturaleza lipófila de la cadena alifática en posición 1 deben mantenerse para no disminuir la actividad.<sup>74</sup> La presencia de uno o varios dobles enlaces no conjugados hacia el centro de la cadena alifática, incluso de estereoquímica (*Z*), o la presencia de un fenilo terminal, modifican poco la actividad citotóxica.<sup>75</sup> La sustitución del átomo de oxígeno en posición 1 por un átomo de azufre,<sup>74</sup> o la sustitución del resto 2-*O*-CH<sub>3</sub> por un resto 2-*O*-CH<sub>2</sub>-*O*-CH<sub>3</sub>,<sup>74</sup> se traduce en un significativo aumento de dicha actividad (Figura 4.39).

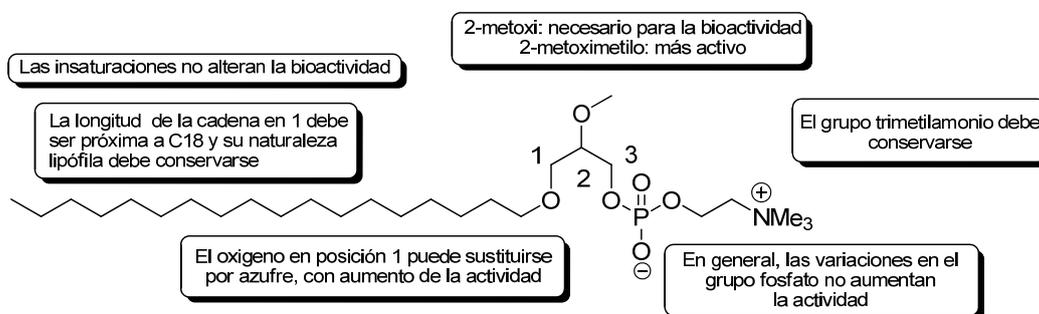


Figura 4.39. Relación estructura-actividad citotóxica o antiproliferativa de análogos de Edelfosina

En general, los cambios en el extremo polar de fosfocolina y en el grupo  $-OCH_3$  en posición 2 afectan negativamente a la bioactividad, por lo que la incorporación de un grupo fluoróforo debería llevarse a cabo en la cadena alifática en posición 1.

Por otro lado, como ya se comentó en el capítulo de *Antecedentes bibliográficos*, en nuestro grupo ya se habían sintetizado dos análogo fluorescentes de Edelfosina con los grupos emisivos  $\omega$ -feniltetraeno u  $\omega$ -feniltrienino, en la posición 1 del glicerol (Figura 4.40), comprobándose que inducían apoptosis en células humanas T-leucémicas, aunque en menor grado que el fármaco original ET. Sin embargo, como ya hemos

<sup>74</sup> Houlihan, W. J., Lohmeyer, M., Workman, P., Cheon, S. *Med. Res. Rev.* **1995**, *15*, 157-223.

<sup>75</sup> Fos, E., Suesa, N., Borrás, L., Lobato, C., Banfi, P., Gambetta, R. A., Zunino, F., Mauleón, D., Carganico, G. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1216-1228.

comentado para el caso de Miltefosina, algunas de las propiedades espectroscópicas del grupo fenilpolieno no son apropiadas para aplicaciones biológicas específicas. En concreto la necesidad de utilizar excitación en el UV próximo y la limitada estabilidad fotoquímica del cromóforo hacen necesaria la sustitución de este tipo de etiquetas por fluoróforos más convenientes.

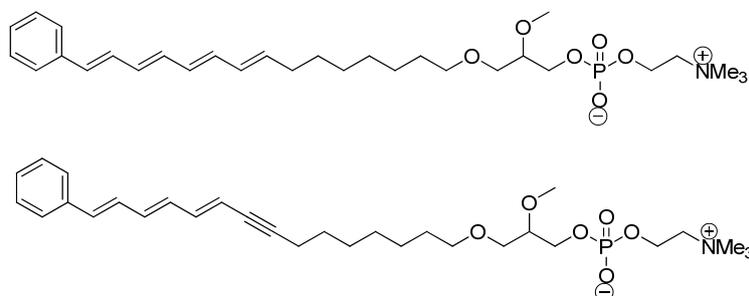


Figura 4.40. Análogos fluorescentes de Edelfosina con grupos feniltetraeno y feniltrienino, utilizados previamente.<sup>11</sup>

De acuerdo con los estudios sobre las relaciones estructura-actividad y con la experiencia adquirida por nuestro grupo de trabajo en la obtención de los análogos de ET con grupos polieno y análogos de MT con grupo BODIPY, comentados antes, se eligió el grupo BODIPY como cromóforo emisor, unido por su posición 2 mediante síntesis *de novo* de los nuevos análogos fluorescentes de Edelfosina conteniendo este grupo en su estructura.

De modo similar a como se hizo para los análogos de MT con grupos BODIPY, para alinear lo máximo posible el fluoróforo con la cadena alifática de ET y mimetizar así la conformación lineal del compuesto original, el anclaje debería realizarse a través de la posición 2 de este grupo (Figura 4.41).

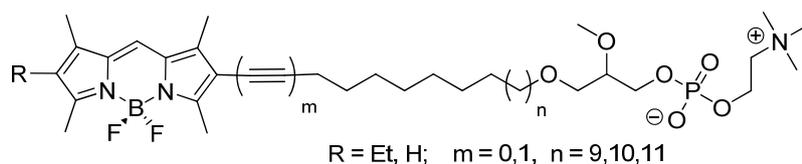


Figura 4.41. Estructuras objetivo para los nuevos análogos fluorescentes de ET

Siguiendo el mismo razonamiento que en el diseño de los análogos fluorescentes de MT, y teniendo en cuenta que la cadena alifática de Edelfosina (18 átomos de carbono) tiene 2 grupos metileno más que la de Miltefosina (16 átomos de carbono), los

espaciadores metilénicos habrán de tener también dos metilenos más. Por tanto, como el grupo BODIPY tiene una distancia equivalente a 5 metilenos, el resto de la cadena debería tener 13 grupos metileno. En este caso, decidimos que el grupo BODIPY se introdujese entre el carbono 11 y 17 de la cadena, por lo que entre el cromóforo y el resto de glicerol deben incluirse 11 metilenos más un resto etilo en la posición 6 del BODIPY (Figura 4.42, análogo **62**).

Como se hizo con los análogos de MT, también se proyectó obtener un análogo con un triple enlace conjugado en posición 2 del BODIPY, obtenido por acoplamiento de Sonogashira-Hagihara entre el correspondiente alquino terminal y el adecuado 2-yodo-1,3,5,7-tetrametil-BODIPY. En este caso, el espaciador polimetilénico debería tener un total de 13 carbonos (11 metilenos más dos carbonos del triple enlace) (Figura 4.42, análogo **65**).

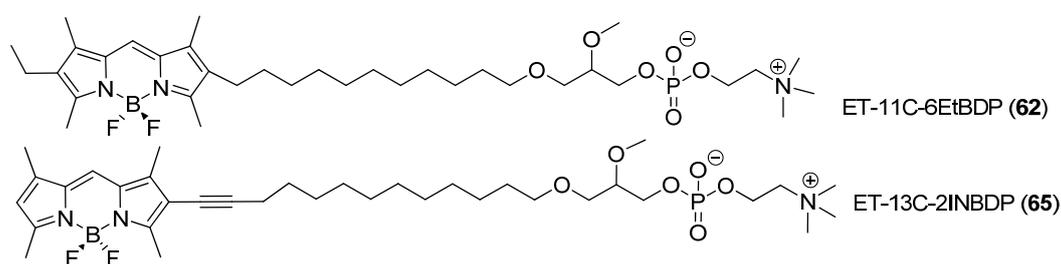


Figura 4.42. Análogos fluorescentes proyectados de Edelfosina con grupos BODIPY

#### 4.4.2 Síntesis

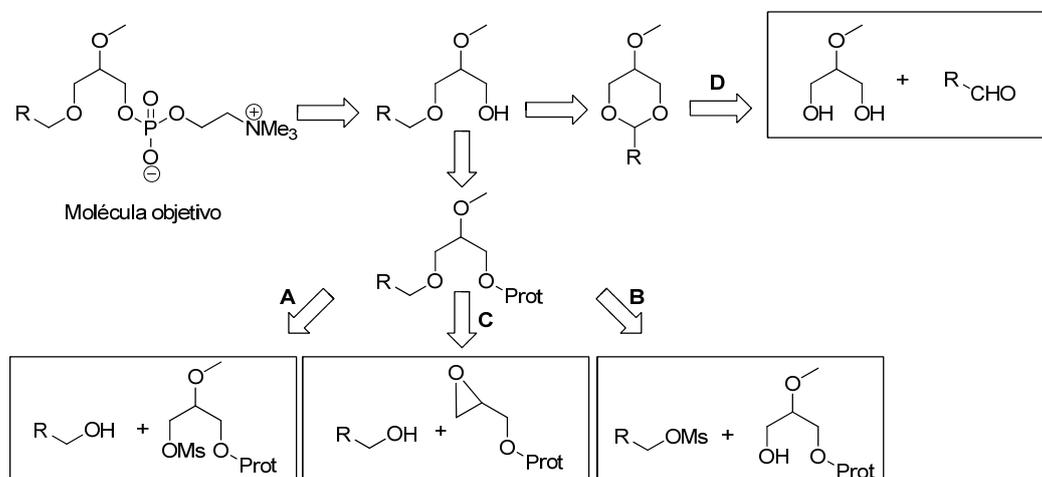
Para obtener estos análogos hay que realizar una sustitución asimétrica en uno de los dos grupos OH libres, en posiciones 1 y 3, en la molécula simétrica 2-*O*-metilglicerina. Los métodos que en principio aparecían como más adecuados para esta sustitución son (Esquema 4.39): **(A)** reacción entre el correspondiente alcohol con el grupo BODIPY, o alguno de sus precursores, en posición terminal y 1-*O*-mesilo-2-*O*-metil-3-*O*-(grupo protector)glicerina; **(B)** reacción entre el mismo alcohol pero mesilado, y 2-*O*-metil-3-*O*-(grupo protector)glicerina;<sup>76</sup> y **(C)** apertura nucleófila, mediada por un ácido de Lewis, del grupo epóxido de 1-*O*-(grupo protector)glicidol por el alcohol con el grupo BODIPY, o alguno de sus precursores, en posición terminal.<sup>77</sup> La posterior

<sup>76</sup> Surles, J. R., Wykle, R. L., O'Flaherty, J. T., Salzer, W. L., Thomas, M. J., Snyder, F., Piantadosi, C. *J. Med. Chem.* **1984**, *28*, 73-78.

<sup>77</sup> Cassel, S., Debaig, C., Benvegna, T., Chaimbault, P., Lafosse, M., Plusquellec, D., Rollin, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 875-896.

separación del grupo protector en el grupo OH en posición 3 permitiría introducir el resto de fosfocolina en dicha posición. Un último procedimiento (**D**) sería la reacción entre 2-*O*-metilglicerina y un aldehído, con el grupo BODIPY o alguno de sus compuestos precursores, con formación del correspondiente 1,3-acetal cíclico,<sup>78</sup> lo cual permitiría regenerar el esqueleto de 2-*O*-metilglicerina mediante apertura con DIBAL-H en condiciones experimentales suaves.

Los esquemas de síntesis basados en el ataque nucleófilo de un grupo hidroxilo sobre carbonos deficitarios en electrones necesitan que previamente se proteja el grupo OH en posición 3 de 2-*O*-metilglicerina (camino **A** y **B**) o el grupo OH de glicidol (camino **C**). Además, pueden aparecer reacciones secundarias debido a la sensibilidad del grupo BODIPY o de alguno de sus compuestos precursores en las condiciones básicas necesarias para la formación de los correspondientes alcóxidos. De todos modos, los caminos anteriores tendrían etapas de protección-desprotección que no están presentes el camino **D**.

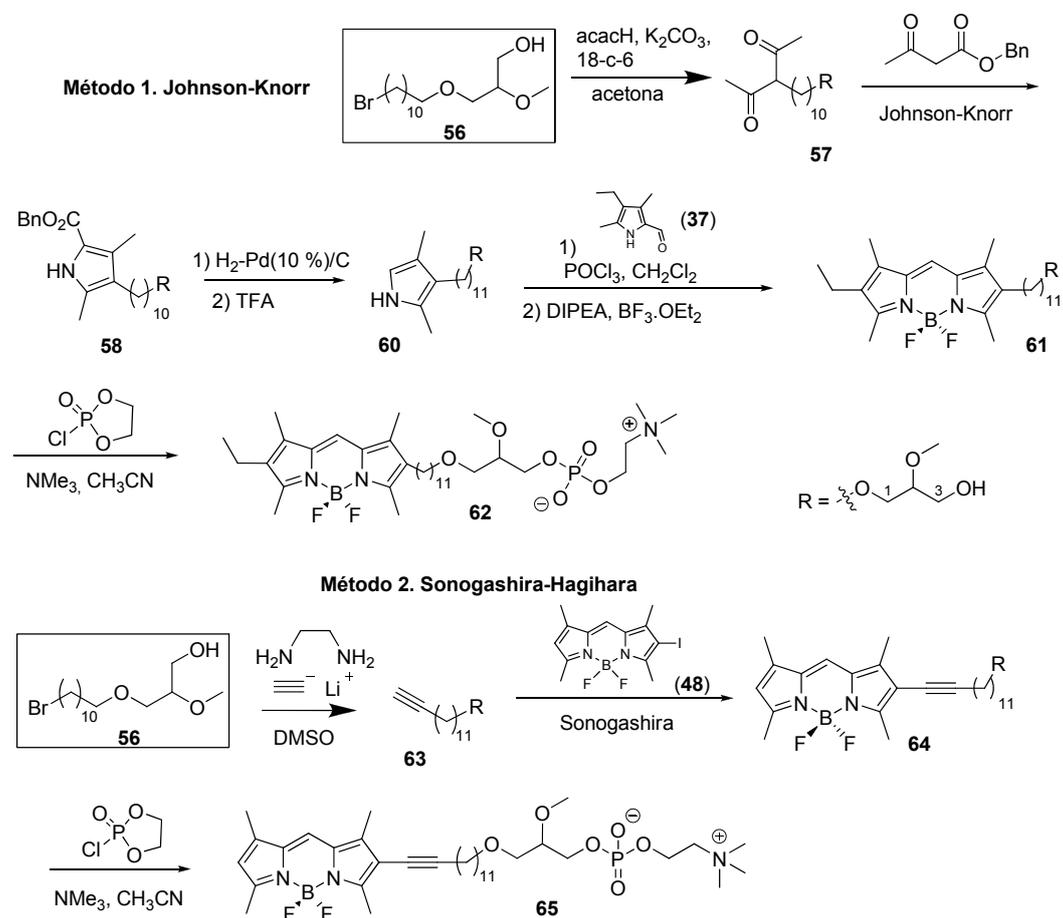


Esquema 4.39. Esquemas retrosintéticos para la obtención de 2-*O*-metilgliceras con sustitución asimétrica.

Por el camino **D**, para la introducción del grupo BODIPY en la cadena alifática en posición 1 de ET se siguieron las dos metodologías utilizadas en la obtención de los análogos de MT con el mismo grupo fluorescente (Esquema 4.40): método 1) preparación del dipirrometeno intermedio sustituido en 2 mediante la condensación de

<sup>78</sup> Murza, M. M., Safarov, M. G., Nazmukhanova, R. M. *J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1984**, *20*, 119-120.

MacDonald<sup>79</sup> entre el pirrol **60**, con un grupo terminal de glicerol en la cadena alquílica en posición 3, y 3,5-dimetil-4-etil-2-formil-1*H*-pirrol (**37**); método 2) acoplamiento de Sonogashira-Hagihara entre el correspondiente alquino terminal **63**, con el resto de glicerol, y 2-yodo-1,3,5,7-tetrametil-BODIPY (**48**). Dicho alquino se puede obtener fácilmente por introducción directa de acetiluro de litio sobre el bromuro **56**, precursor por tanto de las dos rutas sintéticas (Esquema 4.40).



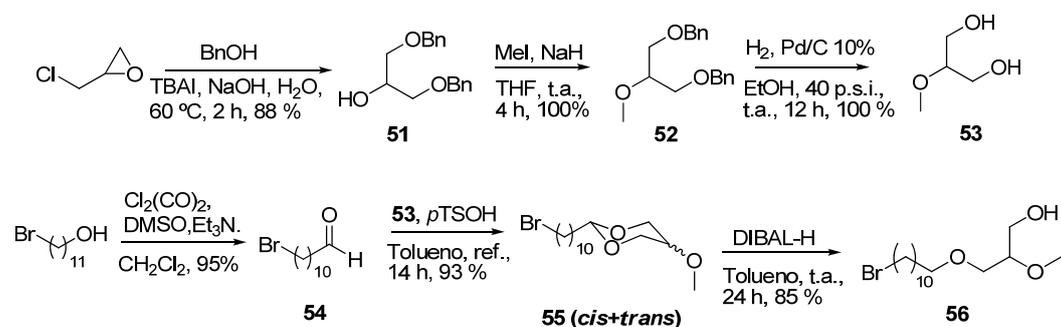
Esquema 4.40. Esquemas de síntesis propuestos para los análogos fluorescentes de ET **62** y **65**.

<sup>79</sup> Arsenault, G. P., Bullock, E., MacDonald, S. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4384-4396.

Dado que tanto el grupo BODIPY como sus intermedios de síntesis son sensibles al tratamiento con DIBAL-H, decidimos formar el resto de 2-*O*-metilglicerina por apertura del 1,3-acetal cíclico antes de sintetizar/introducir este fluoróforo.

#### 4.4.2.1 Síntesis de **56**

La síntesis del precursor **56** se llevó a cabo en 6 pasos a partir de epiclorhidrina racémica y 11-bromoundecanol (Esquema 4.41).



Esquema 4.41. Síntesis de **56**

2-*O*-Metilglicerina racémica (**53**) se obtuvo en tres pasos a partir de epiclorhidrina<sup>80,81,82</sup>: 1) la reacción en condiciones de transferencia de fase (NaOH acuosa/NBu<sub>4</sub>I) entre epiclorhidrina racémica y alcohol bencílico condujo a 1,3-di-(*O*-bencil)glicerina (**51**); 2) el grupo OH en posición 2 de **51** se metiló con MeI y NaH, en una reacción casi instantánea y cuantitativa; 3) la desprotección por hidrogenación catalítica de los grupos bencilo de **52** dio finalmente el diol **53** con rendimiento cuantitativo.

La síntesis del acetal **55** se logró con rendimientos excelentes por reacción entre el aldehído **54** (obtenido por oxidación de Swern de 11-bromoundecanol) y el dialcohol **53**, catalizando con ácido *p*-toluensulfónico en tolueno. Se obtuvo así una mezcla de isómeros *cis/trans*, de los sustituyentes en las posiciones 2 y 5 del anillo de 1,3-dioxano, en proporción aproximada 1:3. Estos isómeros se separaron fácilmente por cromatografía. La diferencia entre los valores de *R<sub>f</sub>* de ambos isómeros refleja, como es normal, diferencias entre la polaridad de los mismos. Esto se explica porque en los compuestos *cis* existe repulsión entre el dipolo del anillo de 1,3-dioxano y el del

<sup>80</sup> Nemoto, H., Wilson, J. G., Nakamura, H., Yamamoto, Y. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 435-435.

<sup>81</sup> Berecoechea, J., Anatol, J., Tréfouël, J. *C. R. Acad. Sci. C. Chim.* **1969**, *268*, 434-437.

<sup>82</sup> Padgett, H. C., Csendes, I. G., Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3492-3496.

sustituyente OMe, por lo que son más polares, repulsión que no existe en los isómeros *trans*, los cuales presentan en cambio una ligera interacción electrostática atractiva entre ambos dipolos (Figura 4.43). Por tanto, el isómero *cis* presenta siempre menor  $R_f$  que el isómero *trans* sobre gel de sílice. Cálculos mecano-cuánticos sobre productos similares han determinado que la conformación más favorable, tanto para el isómero *cis* como para el *trans*, es la que tiene el resto R en disposición ecuatorial.<sup>83</sup>

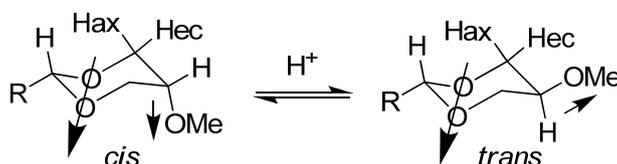


Figura 4.43. Equilibrio en medio ácido y contribuciones al momento dipolar en 5-metoxi-1,3-dioxanos

El acetal *cis*-**55** presenta en su espectro  $^1\text{H}$ -RMN un triplete a 4.53 ppm ( $J = 5.4$  Hz), característico del protón en posición 2, y un singlete a 3.42 ppm de los protones del grupo metilo. En el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN, el carbono en posición 2 resuena en la posición esperada: 102.4 ppm. Del mismo modo, *trans*-**55** presenta en su espectro  $^1\text{H}$ -RMN un triplete a 4.38 ppm ( $J = 5.1$  Hz) del protón en posición 2, y un singlete a 3.37 ppm de los protones del grupo metilo. En el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN, el carbono 2 resuena a 102.2 ppm.

Experimentos n.O.e. utilizando los acetales isómeros *cis*-**55** y *trans*-**55**, irradiando el protón acetálico en posición 2, han permitido identificar en los espectros  $^1\text{H}$ -RMN las señales de los protones axiales (n.O.e. 5-6%) y ecuatoriales (n.O.e. nulo) (Figura 4.44). El protón axial en posición 2 en *cis*-**55** aparece a 3.79 ppm, mientras que en *trans*-**55** aparece en el entorno 3.50-3.25 ppm. Las posiciones coinciden con las de productos similares descritos en la bibliografía.<sup>11</sup>

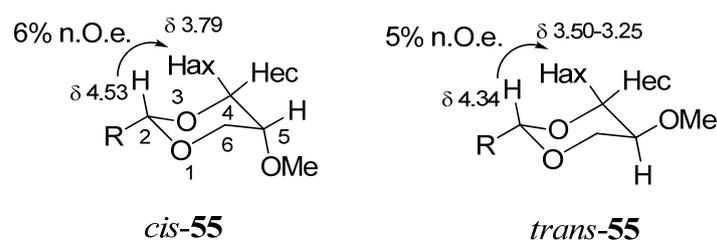
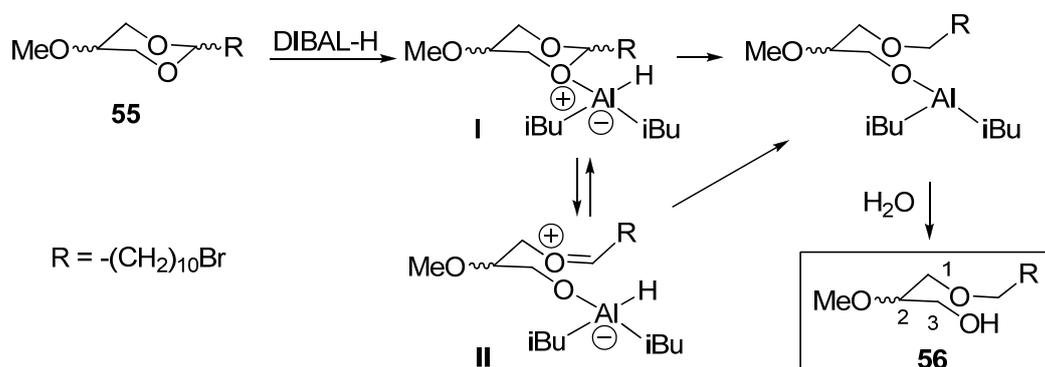


Figura 4.44. Efectos n.O.e. al irradiar el protón acetálico de los isómeros *cis*-**55** y *trans*-**55**

<sup>83</sup> Eliel, E. L., Hofer, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 8041.

La apertura reductiva del anillo de 1,3-dioxano con un exceso de DIBAL-H<sup>84,85</sup> en tolueno (Esquema 4.41), para dar el glicerol **56**, transcurrió con buenos rendimientos. En nuestro caso se utilizaron los correspondientes isómeros *cis* o *trans* puros, aunque podrían emplearse sus mezclas.

Esta apertura es muy sensible a interacciones estéricas intermoleculares y ocurre por coordinación del aluminio del reactivo DIBAL-H con los oxígenos del acetal, seguida de apertura posterior mediante dos vías: 1) transferencia de hidruro sobre el carbono acetálico a través del intermedio I (Esquema 4.42), y/o 2) transferencia sobre la forma abierta en equilibrio, II. En presencia de un gran exceso de DIBAL-H (20 eq.) se ha observado que el isómero *cis*-**55** se isomeriza inicialmente de modo parcial a *trans*-**55**, de mayor movilidad cromatográfica y termodinámicamente más estable.



Esquema 4.42. Mecanismo propuesto para la apertura de los 1,3-acetales cíclicos **55** con DIBAL

En el espectro <sup>1</sup>H-RMN de **56** aparecen dos multipletes a 3.64 y 3.74 ppm que se asignaron a cada uno de los protones del grupo 3-metileno. Esta diferenciación no es observable en los protones del metileno en posición 1, pese a que también son diastereotópicos. El resto de las señales aparecen en la zona esperada del espectro. En el espectro de masas, obtenido por ESI<sup>+</sup>, se observaron las señales correspondientes a la masa molecular más un protón y a la misma masa más un catión sodio, a m/z 339 y 361, respectivamente.

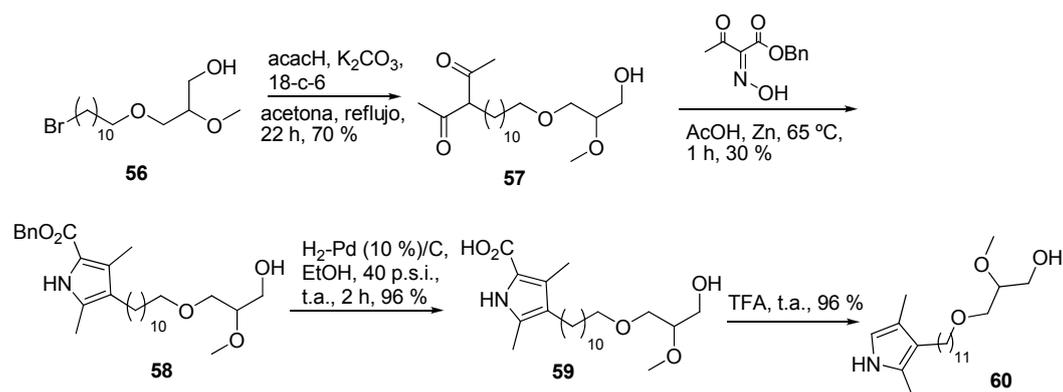
<sup>84</sup> Mittendorf, J., Hiemstra, H., Speckamp, W. N. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 4049-4062.

<sup>85</sup> Takano, S., Akiyama, M., Sato, S., Ogasawara, K. *Chem. Lett.* **1983**, 1593-1596.

#### 4.4.2.2 Síntesis de ET-11C-6EtBDP (62)

##### 4.4.2.2.1 Síntesis del pirrol precursor 60

El pirrol precursor **60** se sintetizó en tres etapas a partir de acetilacetona, el glicerol **56** y la  $\alpha$ -oxima de acetilacetato de bencilo, con un rendimiento global del 20 % (Esquema 4.43). La primera etapa consistió en la monoalquilación de acetilacetona con **56** en presencia de carbonato potásico como base, 18-corona-6 como catalizador y acetona como disolvente, dando **57**.<sup>59,60</sup>



Esquema 4.43. Síntesis del pirrol **60**

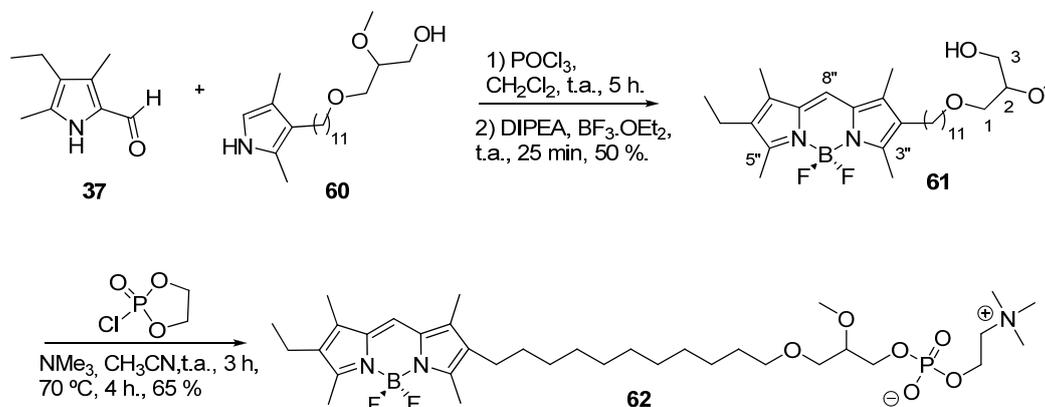
La síntesis del pirrol **58** se llevó a cabo por condensación de Johnson-Knorr, del mismo modo que se hizo en la preparación de los pirroles precursores de los análogos de MT con grupos BODIPY. Así, la condensación entre la dicetona **57** y el éster bencílico del ácido  $\alpha$ -hidroxiiminoacetoacético, en ácido acético y en presencia de Zn como reductor, condujo al correspondiente pirrol tetrasustituído **58** con rendimientos moderados (30 %). Para la obtención de  $\alpha$ -hidroxiiminoacetoacetato de bencilo se hizo reaccionar acetilacetato de etilo con nitrito sódico en medio ácido (Esquema 4.43).

En el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del pirrol **58** aparecen las señales de los protones de los grupos metilo a 2.16 y 2.26 ppm, las señales del grupo bencilo, las correspondientes a la cadena de 11 metilenos, y una señal ancha, a 8.84 ppm, correspondiente al NH del anillo de pirrol. El grupo glicerol da dos multipletes a 3.62 y 3.74 ppm, de los protones del grupo 3-metileno. En el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN, los carbonos del anillo de pirrol resuenan a 116-130 ppm, como era de esperar. En el espectro de masas ( $\text{ESI}^+$ ) se observan las señales correspondientes a la masa molecular más un protón y a la misma masa más un catión sodio, a  $m/z$  488 y 510, respectivamente.

A continuación, el grupo benciloxycarbonilo de **58** se eliminó por hidrogenación catalítica en presencia de paladio sobre carbón activado.<sup>86</sup> El ácido carboxílico originado **59** se descarboxiló con rendimiento prácticamente cuantitativo por tratamiento con ácido trifluoroacético, dando lugar al pirrol **60** (Esquema 4.43).

#### 4.4.2.2 Síntesis del grupo BODIPY e introducción del resto de fosfocolina

La condensación del pirrol **60** con 3,5-dimetil-4-etil-2-formil-1*H*-pirrol (**37**), condujo a un dipirrometeno intermedio que se transformó *in situ* en el correspondiente BODIPY **61** mediante reacción con eterato de trifluoruro de boro ( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ) en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) (Esquema 4.44). Como en otros casos, para consumir completamente el dipirrometeno intermedio es necesario un gran exceso de ambos reactivos, adicionados paso a paso ( $2 \times 5$  equivalentes). Además para minimizar los procesos de polimerización, es necesario trabajar en condiciones de alta dilución (aprox. 1 mmol/200 mL).



Esquema 4.44. Etapas finales en la obtención del análogo ET-11C-6EtBDP (**62**)

En el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del glicerol **61** en  $\text{CDCl}_3$ , los protones de los sustituyentes metilo en posiciones 1'' y 7'' aparecen como dos señales a 2.14 y 2.15 ppm, mientras que los de los metilos en posición 3'' y 5'' aparecen a 2.47 ppm como una única señal. El protón en posición 8'' del anillo indacénico, la cadena alquílica en posición 2'' y el grupo etilo en posición 6'' dan las señales esperadas. A 3.63 y 3.74 ppm aparecen dos multipletes que se asignaron a los protones del grupo metileno unido al grupo hidroxilo en posición 3 del glicerol. Esta diferenciación no es observable para los

<sup>86</sup> Mackman, R.L., Micklefield, J., Block, M. H., Leepe, F. J., Battersby, A.R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 2111.

protones del metileno en posición 1, pese a que también son diastereotópicos (Figura 4.45).

En el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de **61** se observan dos pares de señales centradas a 9.4 y 12.5 ppm, correspondientes a los carbonos de las dos parejas de metilos unidos al núcleo del cromóforo. Las señales de la cadena polimetilénica se localizan entre 24 y 31 ppm y las del resto de glicerol a 62.6, 70.5 y 79.8 ppm. Los carbonos del núcleo indacénico dan nueve señales, dada su asimetría, con el carbono C-8'' a campo más alto (118.5 ppm).

En la Figura 4.45 se muestra el espectro HMBC en  $\text{CHCl}_3$ . En este espectro se observa la ausencia de correlación del protón en posición 8'' del anillo indacénico con las señales de los carbonos a 154.5 y 154.9 ppm, mientras que sí existe correlación con el resto de las señales de los carbonos de los anillos, de modo que estas dos señales se asignaron a los carbonos en posiciones 3'' y 5'', por estar más alejados de la posición 8''. Estos carbonos presentan una fuerte correlación con los protones que aparecen como un singlete a 2.47 ppm, de modo que estos protones se asignaron a los metilos en 3'' y 5''. Conociendo la posición de los protones de los grupos metilo, se pudieron asignar fácilmente sus carbonos a través del espectro HSQC. De este modo, también se identificó la señal del carbono en posición 8''.

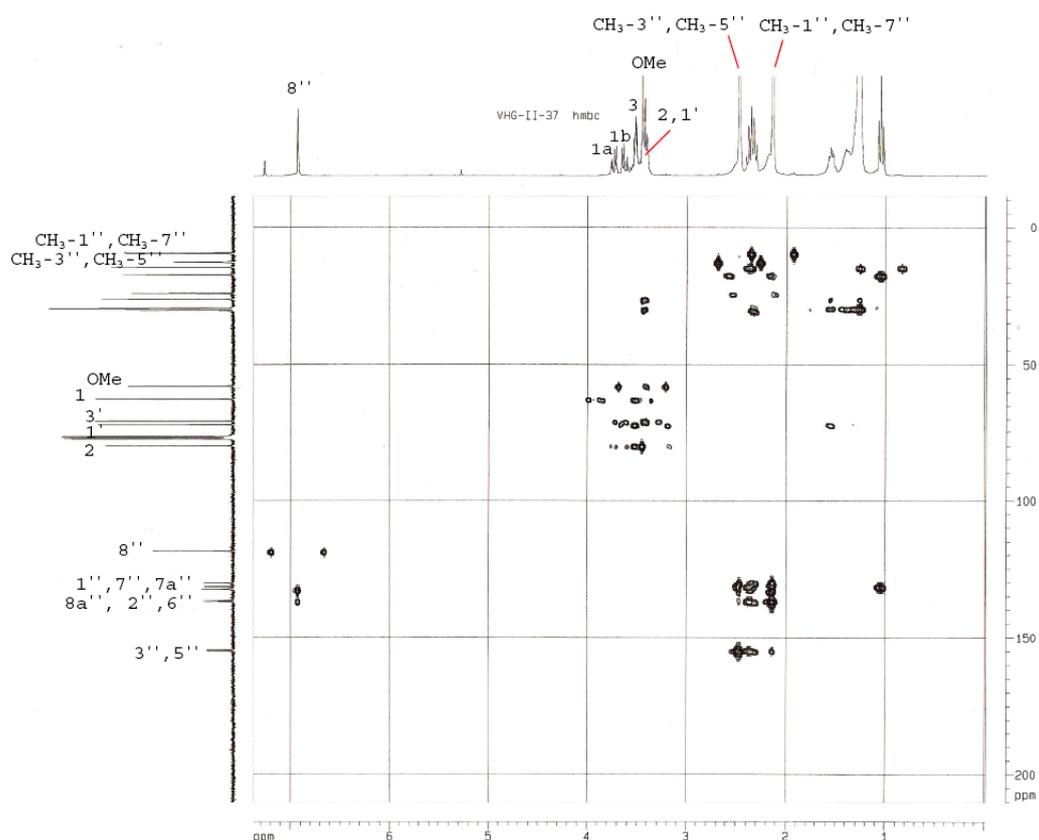


Figura 4.45. Espectro HMBC del glicerol **61**

El espectro IR mostró dos bandas características, de fuerte intensidad, a 1604 y 1226  $\text{cm}^{-1}$  atribuibles a las tensiones B-N y B-F, respectivamente. En el espectro de masas ( $\text{ESI}^+$ ) se observaron señales correspondientes a la pérdida de un anión fluoruro, a  $m/z$  515, y a la pérdida de una molécula de HF más un anión fluoruro, a  $m/z$  495. El análisis HPLC midiendo a 375 y 529 nm mostró una pureza cercana al 100 %.

La introducción del grupo polar de fosfocolina sobre el glicerol **61** para dar **62** (Esquema 4.44) se llevó a cabo por el mismo procedimiento utilizado para la obtención de los análogos de Miltefosina, obteniéndose **62** con un rendimiento del 65 %, el más alto de todos los obtenidos en este trabajo para esta reacción.

La estructura de **62** se confirmó por sus datos espectroscópicos. En el espectro  $^1\text{H}$ -RMN aparecen todas las señales esperadas (Figura 4.46).

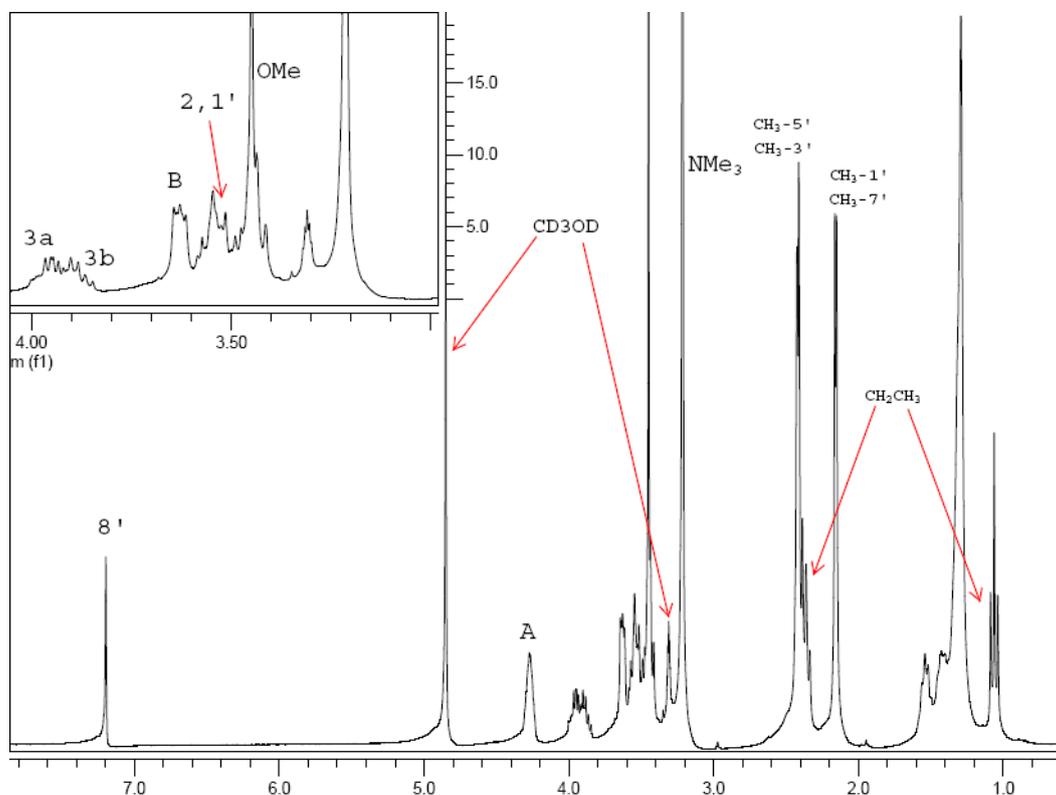
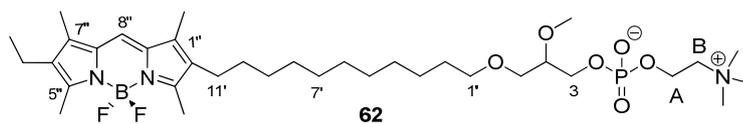


Figura 4.46. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de ET-11C-2EtBDP (**62**)

Como era de esperar, en el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN los carbonos situados a dos o tres enlaces del átomo de fósforo aparecen acoplados (Figura 4.47).

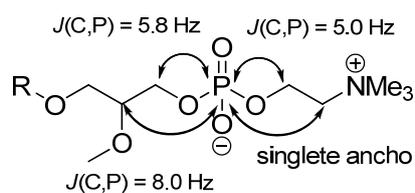
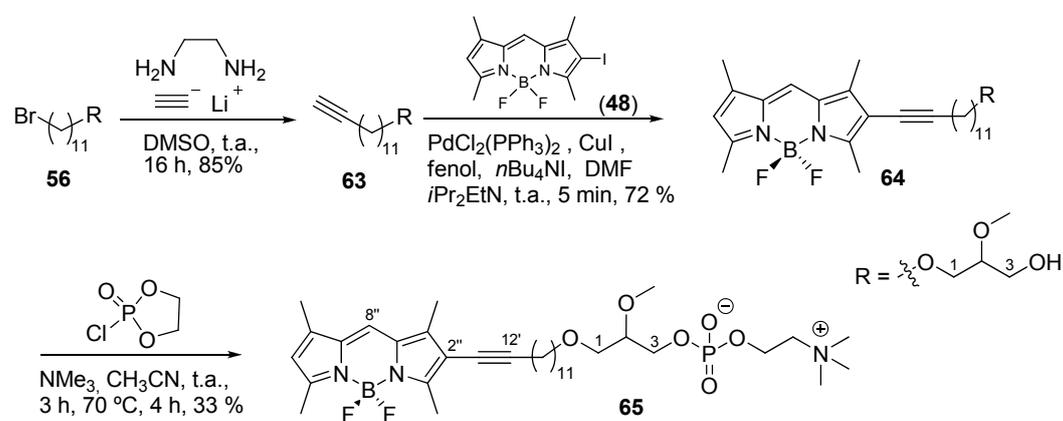


Figura 4.47. Acoplamiento C,P observable en el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de **62**

En el espectro FT-IR se muestran las bandas de absorción características de la cadena polimetilénica a  $2922\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ ) y a  $1469\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{C-H}}$ ). Las bandas correspondientes al grupo fosfatidilcolina aparecen hacia  $1226\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{P=O}}$ ),  $1065\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-O-P}}$ ) y  $975\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{NMe}_3}$ ). El espectro de masas (ESI<sup>+</sup>) mostró la señal correspondiente a la masa molecular más un protón, a  $m/z$  700, y al dímero más un protón, a  $m/z$  1399. Su pureza se comprobó por <sup>1</sup>H-RMN, HPLC y análisis elemental.

#### 4.4.2.3 Síntesis de ET-13C-2INBDP (**65**)

La síntesis de este análogo tiene como paso clave un acoplamiento sp-sp<sup>2</sup> (Sonogashira-Hagihara) entre el alquino terminal **63** y 2-yodo-tetrametil-BDP (**48**), que daría lugar al correspondiente glicerol **64**, conteniendo un grupo BODIPY conjugado con un triple enlace. La introducción del grupo fosfocolina produciría el análogo buscado **65**. (Esquema 4.45).



Esquema 4.45. Obtención de ET-13C-2INBDP

El alquino terminal **63**, necesario para el acoplamiento de Sonogashira-Hagihara, se obtuvo por reacción entre el bromoglicerol **56** y el complejo etilendiamina-acetiluro de litio en DMSO (Esquema 4.45). Para el desplazamiento de haluros de alquilo con el anión acetiluro es necesario el uso de disolventes polares apróticos como HMPA o DMPU (1,3-dimetilhexahidro-2-pirimidona).<sup>87</sup> Sin embargo, utilizando el citado complejo es posible realizar la reacción en DMSO, evitando así el uso de disolventes

<sup>87</sup> Trost, B. M., Matsubara, S., Caringi, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8745-8746.

más tóxicos.<sup>88</sup> A fin de evitar la protección del hidroxilo en el glicerol, se añadió algo más de dos equivalentes de acetiluro de litio, consumiéndose un equivalente en la desprotonación del OH, y el resto en el desplazamiento del bromuro.

Para el acoplamiento de Sonogashira-Hagihara entre **63** y **48** se siguieron las condiciones experimentales descritas<sup>64</sup> para productos similares, alcanzando así buenos rendimientos en producto aislado (72 %). Como en la obtención del análogo de MT **50**, se utilizó como catalizador Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> por obtenerse mejores rendimientos que con Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> o Pd(dba)<sub>2</sub>.

El espectro <sup>1</sup>H-RMN del glicerol **64** es parecido al obtenido para el glicerol **61**, con señales dobles de los protones de los sustituyentes metilo 1'',7'' y 3'',5'' hacia 2.22 y 2.53 ppm respectivamente, debido a la asimetría de la molécula. Las señales de los protones en posiciones 6'' y 8'' del anillo indacénico aparecen como dos singletes a 6.01 y 6.98 ppm, respectivamente. Los protones de los metilenos de la cadena hidroxialquínica dan las señales esperadas.

En el espectro <sup>13</sup>C-RMN de **64**, las señales de los carbonos del triple enlace aparecen a 72.3 y 96.5 ppm. El resto de las señales aparecen donde es de esperar. El espectro de masas confirmó la masa molecular esperada. La pureza de este compuesto se comprobó por sus espectros <sup>1</sup>H-RMN, HPLC (100 % de pureza leyendo a 280, 375 y 529 nm) y análisis elemental.

La introducción del grupo polar de fosfocolina sobre el glicerol **64** para dar **65** se llevó a cabo siguiendo el mismo método que en la obtención de los análogos anteriores (Esquema 4.45).

Los datos espectroscópicos confirmaron la estructura del análogo **65**. En el espectro <sup>1</sup>H-RMN en CD<sub>3</sub>OD (Figura 4.48) aparecen las señales correspondientes a la cadena polimetilénica, al resto de fosfatidilcolina, a los metilos del grupo BODIPY y a los protones en posición 6' y 8' del mismo. En el espectro <sup>13</sup>C-RMN aparecen las señales asignables al cromóforo BODIPY, a la cadena polimetilénica, y al resto de fosfatidilcolina. Las señales correspondientes a los carbonos del triple enlace aparecen a 73.4 y 97.5 ppm. El espectro FT-IR de **65** muestra las bandas de absorción características de la cadena polimetilénica a 2927 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>C-H</sub>) y a 1472 cm<sup>-1</sup> (δ<sub>C-H</sub>). Las bandas correspondientes al grupo fosfatidilcolina aparecen a 1247 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>P=O</sub>), 1068 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>C-O-P</sub>) y 974 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>NMe3</sub>). En el espectro de masas (ESI<sup>+</sup>) se observan las señales correspondientes a la masa molecular más un protón, a m/z 696.3, y al dímero más un

---

<sup>88</sup> Oppolzer, W., Radinov, R.N., El-Sayed, E. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4766-4770.

protón, a  $m/z$  1391.7. La pureza de los compuestos se comprobó por sus espectros  $^1\text{H}$ -RMN, HPLC (100 % de pureza leyendo a 280, 375 y 529 nm) y análisis elemental.

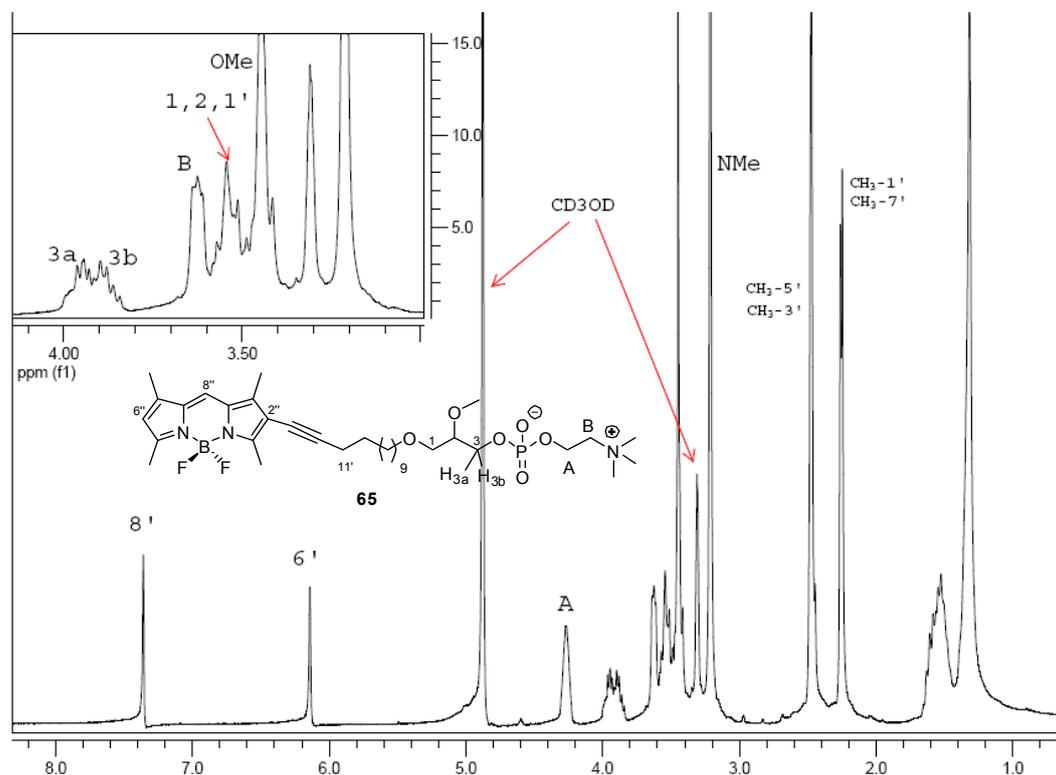


Figura 4.48. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del análogo **65**

Como ocurrió en la obtención de los análogos de MT con grupos BODIPY, las dos síntesis descritas aquí para la obtención de los análogos fluorescentes de Edelfosina permiten:

- La incorporación del fluoróforo en la molécula mediante enlaces C-C, evitando la introducción de grupos polares como amidas, éteres, ésteres.
- Preservar en los dos análogos la conformación más o menos lineal de la cadena apolar de Edelfosina.
- Modificar la longitud de la cadena espaciadora, introducir el grupo BODIPY en diferentes posiciones a lo largo de dicha cadena, y modificar la naturaleza de la cabeza polar.

#### 4.4.3 Propiedades espectroscópicas de los análogos **62** y **65**

El estudio de estas propiedades de los análogos de Edelfosina con grupo BODIPY se llevó a cabo mediante espectroscopías UV-Visible y de fluorescencia a temperatura ambiente, siguiendo el protocolo descrito en la parte experimental. Los datos de absorción y emisión de los dos análogos, se recogen en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9. Máximo de la absorción ( $\lambda_{\text{max}}$ ), coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ), máximo de la emisión de fluorescencia ( $\lambda_{\text{em}}$ ) y rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\Phi_{\text{F}}$ ) de los análogos de Edelfosina con grupo BODIPY.

Compuesto	Disolvente	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{a}}/\text{nm}$	$\epsilon_{\text{máx}}/M^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\Phi_{\text{F}}^{\text{b}}$
<b>62</b>	EtOH	529	79000	537 <sup>c</sup>	0.60 <sup>c</sup>
	DMSO	529	79000		
<b>65</b>	EtOH	533	56620	553 <sup>c</sup>	0.50 <sup>d</sup>
	DMSO	530	42255		

<sup>a</sup>  $\pm 1$  nm. <sup>b</sup>  $\pm 10\%$ . <sup>c</sup>  $\lambda_{\text{exc}} = 490$  nm. <sup>d</sup>  $\lambda_{\text{exc}} = 502$  nm.

Como se observa en esta tabla, el análogo **62** presenta su máximo de absorción a 529 nm, con un coeficiente de absorción de  $79000 M^{-1}\text{cm}^{-1}$  que, junto a su intensa emisión de fluorescencia, de color amarillo, lo hace apropiado para su uso en los diversos métodos de detección de fluorescencia utilizados en el estudio de sistemas de interés biológico.

El análogo **65**, con el triple enlace conjugado en posición 2'' del grupo BODIPY y sin el grupo etilo en 6'', desplaza hacia el rojo 4 nm la longitud de onda de la absorción, y 16 nm la de la emisión, respecto del análogo **62**, sin triple enlace. La presencia del triple enlace no disminuye la fotoestabilidad del análogo, aunque cambia apreciablemente alguna de sus propiedades espectroscópicas. Así, las bandas de absorción y de emisión de fluorescencia de **65** son más anchas que las de **62**, y la emisión se desplaza hasta la zona naranja del espectro (Figura 4.49). Su rendimiento cuántico de fluorescencia también es moderado (0.5).

Como ocurría con los análogos fluorescentes de Miltefosina, las propiedades espectroscópicas de estos análogos no presentan variaciones significativas respecto de las propiedades de los glicerolos precursores **61** y **64**, respectivamente, lo que indica la ausencia de interacciones electrónicas entre el cromóforo y el grupo polar en estas moléculas. Además, si comparamos los datos obtenidos para **62** y **65** con los obtenidos para los análogos fluorescentes de MT **46** y **50**, cuyas sustituciones respectivas en el

grupo BODIPY son similares, también se observa un comportamiento espectroscópico similar, con valores para el máximo de absorción, coeficiente de absorción, máximo de emisión de fluorescencia y rendimiento cuántico de fluorescencia también similares, lo que indica la ausencia de interacciones electrónicas debidas al resto de glicerol. Tampoco ejerce ningún efecto apreciable la mayor longitud de la cadena espaciadora en los análogos de ET respecto a los de MT.

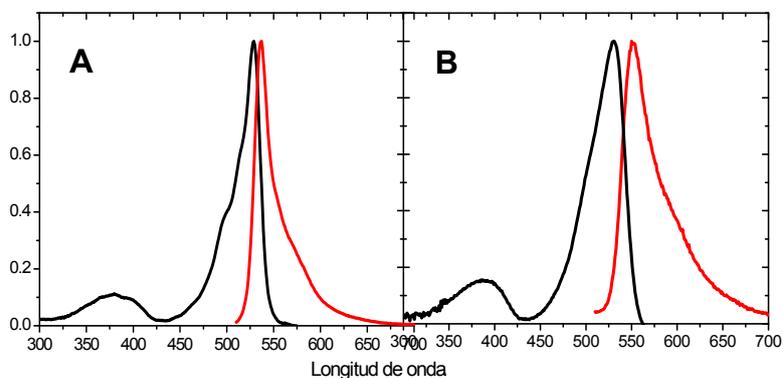


Figura 4.49. Espectros de absorción normalizados (negro) y de fluorescencia corregidos y normalizados (rojo) de los análogos ET-11C-2EtBDP (**62**) (Panel A) y ET-11C-2INBDP (**65**) (Panel B) en EtOH. Concentración:  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  M. T = 22 °C.

#### 4.4.4 Bioactividad de los análogos

En los experimentos realizados hasta ahora por el grupo dirigido por el Dr. F. Mollinedo (Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Universidad de Salamanca-C.S.I.C.), en colaboración con nuestros laboratorios, se ha observado que los análogos **62** y **65** conservan una actividad pro-apoptótica selectiva no muy diferente de la del fármaco original (~70%), frente a células malignas procedentes de varios tipos de leucemias humanas. Esta actividad, y las favorables propiedades espectroscópicas de dichos análogos ya comentadas, están permitiendo llevar a cabo la investigación de las dianas celulares de Edelfosina utilizando un extenso conjunto (~4500) de cepas de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) genéticamente modificadas. La disponibilidad de dichos análogos emisivos hace posible que una investigación de esta magnitud se pueda realizar en un tiempo razonable. Las conclusiones preliminares de dicho estudio indican que el lípido antineoplásico Edelfosina interacciona preferentemente con el retículo endoplásmico y el sistema mitocondrial, a diferencia de lo que se observa para Miltefosina en dicho organismo modelo.

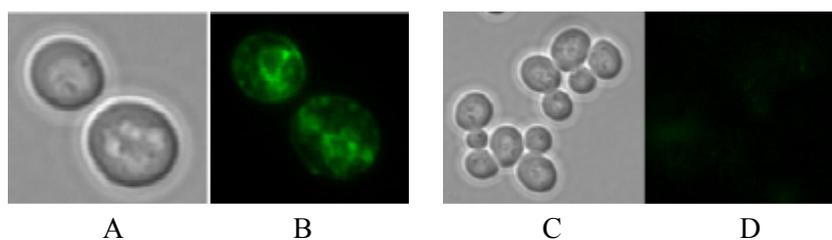


Figura 4.50. Distribución intracelular del análogo fluorescente de Edelfosina **62** (5  $\mu$ M, 1 h) en células de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. A y C: contraste interferencial de las células; B y D: microscopía de fluorescencia, en donde se muestra la interacción específica del análogo con el retículo endoplásmico, así como un marcado residual de la membrana plasmática. El compuesto inactivo de control (**61**) no interacciona con el organismo.



## 4.5 Análogos de Miltefosina con grupo tiol

### 4.5.1 Síntesis del tiol 72 para cromatografía de afinidad

La disponibilidad de análogos reactivos de Miltefosina con un grupo tiol en su estructura sería de gran utilidad en el estudio del mecanismo de acción del compuesto original MT. En primer lugar, mediante estos análogos es posible, en principio, el aislamiento de receptores y dianas de MT en parásitos mediante métodos de cromatografía de afinidad.<sup>89</sup> En estos métodos, la separación de los componentes del analito se lleva a cabo a partir de su afinidad, o capacidad de unión, a un determinado ligando. En nuestro caso, el analito estaría formado por los diversos componentes del parásito y el ligando sería el análogo de MT anclado a un soporte sólido a través del grupo tiol. Las proteínas retenidas en la columna serán las que, muy probablemente, se unan específicamente en el parásito a MT. Estas proteínas se eluyen posteriormente con una disolución que libere el ligando, o que anule la interacción entre MT y la proteína (Figura 4.51). La técnica ofrece alta selectividad, gran resolución y, además, la eficiencia del paso de purificación del material activo es generalmente alta.<sup>90</sup>

Otra posible aplicación de un derivado tiolado de MT consiste en la obtención de monocapas del fármaco mediante la deposición del análogo reactivo sobre una superficie de oro.<sup>91</sup> El grupo tiol tiene una gran afinidad por el oro, con el que forma enlaces superficiales con energías en el intervalo 20-35 kcal mol<sup>-1</sup>. Por tanto, como el análogo se incorpora a la superficie del oro a través del grupo tiol, adopta una disposición perpendicular a la superficie. El sistema final obtenido probablemente podría ser utilizado como sensor específico de las proteínas de *Leishmania*, que se enlazarían a través del resto de fosfatidilcolina de la molécula. Finalmente, también sería posible incorporar de modo covalente una gran variedad de sondas (como biotina) o péptidos penetrantes de membrana, lo cual sería útil en el estudio de los diversos mecanismos biológicos del fármaco.<sup>92</sup>

---

<sup>89</sup> Carlsson, J., Janson, J. C., Sparrman, M., en *Protein Purification. Principles, High-Resolution Methods and Applications*. Janson, J. C., Rydén, L., Eds.; Wiley: Nueva York, 1998, 275-329.

<sup>90</sup> Burdine, L., Kodadek, T. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 593-597.

<sup>91</sup> Prime, K. L., Whitesides, G. M. *Science* **1991**, *252*, 1164.

<sup>92</sup> Reshetnyak, Y. K., Andreev, O. A., Lehnert, U., Engelman, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 6460.

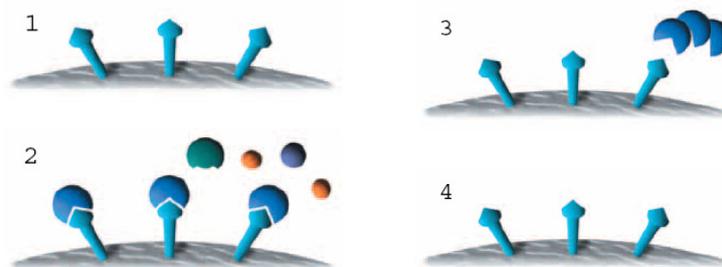


Figura 4.51. 1) Análogo de MT anclado sobre la superficie del soporte sólido. 2) Las proteínas que interaccionan con MT se retienen en el soporte. 3) La proteína retenida por afinidad se eluye usando, p. ej., una disolución concentrada de MT. 4) El análogo anclado puede ser usado de nuevo.

Con todos estos objetivos en mente, nos propusimos la síntesis y el estudio de la actividad biológica de 16-mercaptohexadecilfosfolina (**72**, MT-16C-SH), un análogo de Miltefosina con el grupo reactivo de lipofilia moderada SH al final de la cadena alquílica (Figura 4.52).

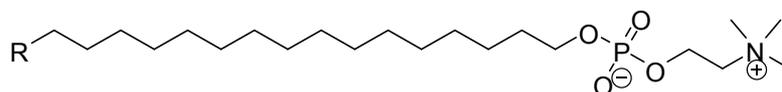
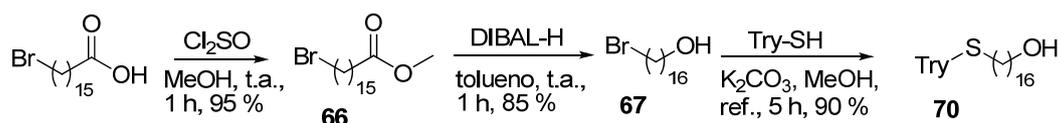


Figura 4.52. Miltefosina (MT): R = H. MT-16C-SH (**72**): R = SH

#### 4.5.1.1 Síntesis y propiedades de **72**<sup>93</sup>

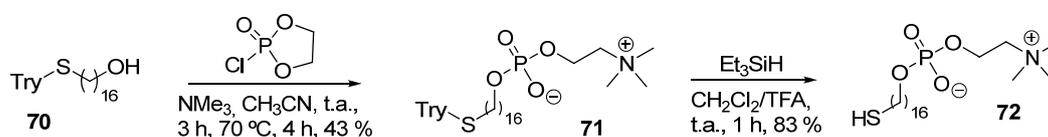
En la obtención del análogo **72**, el grupo tiol no debe interferir en la introducción del resto de fosfolina. Por tanto, se proyectó introducir este grupo, de forma protegida, en alguna etapa anterior. Aprovechando que uno de los procedimientos más comunes para la introducción de grupos tiol en una molécula dada es la sustitución de un grupo saliente (por ej. bromuro) en dicha molécula con un tiol orgánico, decidimos incorporar este grupo por reacción entre 16-bromohexadecanol y sulfuro de tritilo en medio básico.

<sup>93</sup> Hornillos, V., Saugar, J. M., De la Torre, B. G., Andreu, D., Rivas, L., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5190-5193.

Esquema 4.46 Síntesis de 16-tritiliohexadecanol (**70**)

Para obtener 16-bromohexadecanol (**67**) se esterificó el ácido 16-bromohexadecanoico (Esquema 4.46). El éster **66** se redujo a continuación al correspondiente alcohol **67**. Finalmente, el alcohol **70**, con el grupo tiol protegido en el otro extremo de la cadena, se obtuvo por reacción entre **67** y trifenilmetanotiol en presencia de base. Rendimiento global de la síntesis: 75 %

La introducción del resto de fosfocolina en **70** se llevó a cabo por el mismo procedimiento que se utilizó para la obtención de los análogos fluorescentes, alcanzándose rendimientos similares a los obtenidos entonces (43 %) (Esquema 4.47).

Esquema 4.47. Obtención de MT-16C-SH (**72**)

Finalmente el grupo tritilo se separó utilizando condiciones estándar (triethylsilano/ácido trifluoroacético),<sup>94</sup> conduciendo al análogo esperado con un 83 % de rendimiento.

La estructura del análogo **72** se confirmó por sus datos espectroscópicos. En el espectro <sup>1</sup>H-RMN (Figura 4.53) aparecen las señales correspondientes a los protones de la cadena polimetilénica, al resto de fosfatidilcolina y al protón del grupo tiol. El protón de este último se muestra como un triplete a 2.22 ppm ( $J = 7.6$  Hz). Acoplado a éste y a los protones del metileno vecino aparecen a 2.46 ppm los protones del carbono unido directamente al azufre. En general todas las señales del espectro <sup>1</sup>H-RMN son agudas, no apreciándose señales anchas ni mal definidas, por lo que se puede afirmar que, en DMSO, el compuesto **72** está en forma monomérica.

<sup>94</sup> Pearson, D.A., Blanchette, M., Baker, M. L., Guindon, C. A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2739.

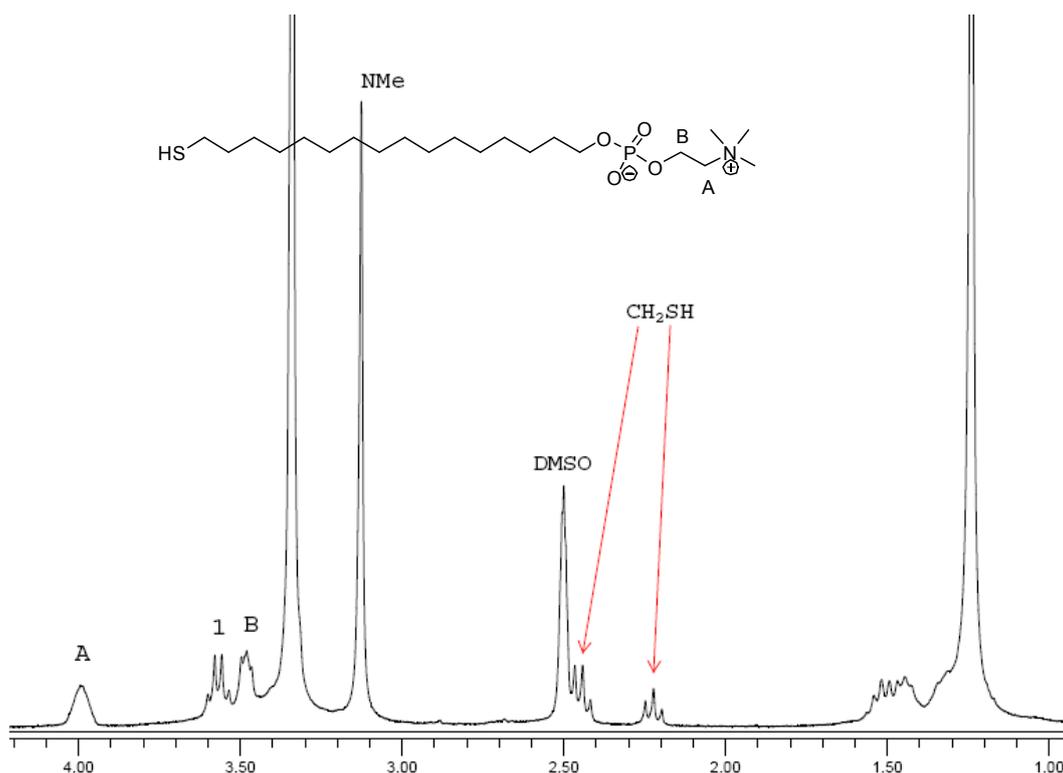


Figura 4.53. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de MT-16C-SH (**72**) en DMSO

El espectro IR muestra las bandas de absorción características de la cadena polimetilénica a  $2917\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ ) y a  $1483\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{C-H}}$ ). Las bandas correspondientes al grupo fosfatidilcolina aparecen a  $1243\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{P=O}}$ ),  $1079\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-O-P}}$ ) y  $968$  ( $\nu_{\text{N-C}}$ ). A  $2551\text{ cm}^{-1}$  aparece la absorción correspondiente a la vibración del enlace S-H. El espectro de masas (ESI<sup>+</sup>) mostró las señales correspondientes a la masa molecular más un protón, al dímero más un protón y al trímero más un protón. Las masas de alta resolución confirmaron la fórmula de **72**. En la cuantificación del grupo tiol libre de **72**, utilizando el reactivo de Ellman,<sup>95</sup> se han observado en general valores aprox. 10 % inferiores a lo esperado. Este resultado podría deberse a que el reactivo no accede a todos los grupos SH presentes, si algunos se encuentran en el interior de micelas formadas por el propio compuesto anfifílico **72**.

El alcohol precursor **70** también se obtuvo a partir del ácido 16-mercaptohexadecanoico, aunque con menor rendimiento (50 %). Para ello, se protegió el

<sup>95</sup> Ellman, G. L. *Archiv. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70.

grupo tiol con cloruro de tritilo, obteniéndose el ácido **68** con un 60 % de rendimiento.<sup>96</sup> A continuación, de modo análogo a la obtención de 16-bromohexadecanol, se esterificó el ácido, y el éster **69** obtenido se redujo al correspondiente alcohol **70** con DIBAL-H (Esquema 4.48).



Esquema 4.48. Síntesis alternativa del alcohol **70**

El análogo MT-16C-SH (**72**) es estable en forma sólida durante semanas y, tal vez, meses, si se conserva a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En disolución metanólica en frío el compuesto es estable durante períodos similares, aunque a temperatura ambiente se detecta la formación de disulfuro (aprox. 5%) al cabo de una semana. Por ello, debe conservarse, tanto sólido como en disolución, a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a ser posible en atmósfera inerte. Como en todos los tioles, la oxidación a disulfuro en presencia de oxígeno del aire es relativamente fácil.<sup>97</sup> Aparentemente, el disolvente que minimiza la velocidad de oxidación es el metanol.

<sup>96</sup> Halter, M., Nogata, Y., Dannenberger, O., Sasaki, T., Vogel, V. *Langmuir* **2004**, *20*, 2416.

<sup>97</sup> Capozzi, G., Modena, G. Oxidation of Thiols. En: *The Chemistry of the Thiol Group*; Patai, S., Ed.; Wiley: Nueva York, 1974; Vol. 18, p. 785

#### 4.5.1.2 Actividad leishmanicida de 72

Para comprobar que el nuevo compuesto **72** es un análogo funcional de Miltefosina, se midió su actividad leishmanicida siguiendo los protocolos descritos en la parte experimental.<sup>98</sup> Este trabajo se realizó por el grupo de investigación dirigido por el Dr. L. Rivas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC) de Madrid. Se encontró que MT-16C-SH inhibe la proliferación de promastigotes de *L. donovani* y, lo que es más importante, de amastigotes de *L. pifanoi*, la forma patológica, para concentraciones idénticas a las del fármaco original (Figura 4.54).

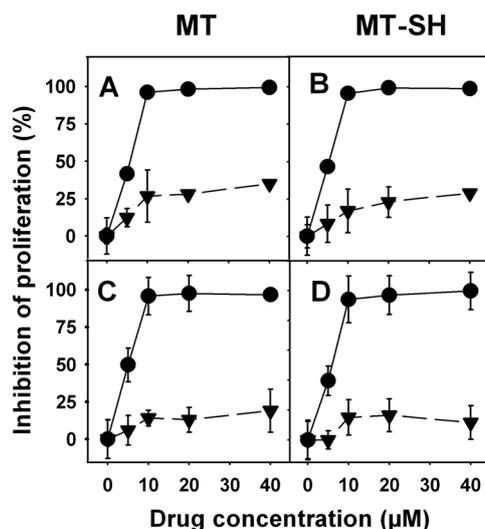


Figura 4.54. Actividad leishmanicida de Miltefosina (MT) (A y C) y de 16-mercaptohexadecilfosfocolina (MT-SH, **72**) (B y D), expresada como porcentaje de inhibición de la proliferación. Promastigotes de *L. donovani* (A y B) y amastigotes de *L. pifanoi* (C y D). (●) parásitos susceptibles a MT; (▼) parásitos resistentes a MT.

Los datos de la Figura 4.54 también muestran que el análogo **72** no inhibe apreciablemente la proliferación de la cepa resistente a MT. Además, la dependencia con la concentración de la actividad leishmanicida es similar, independientemente de la etapa del ciclo vital en la que se encuentre el parásito. De hecho, la diferencia entre los respectivos valores de LD<sub>50</sub> (Tabla 4.10) no presenta diferencias estadísticamente significativas.

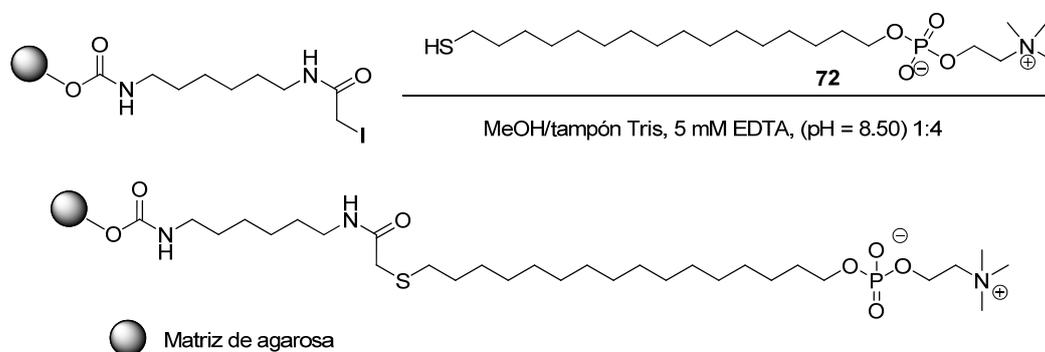
<sup>98</sup> Chicharro, C., Granata, C., Lozano, R., Andreu, D., Rivas, L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2441.

Tabla 4.10. Actividad antileishmania *in vitro* de MT y de su análogo 16-mercaptohexadecilfosfocolina (MT-16C-SH, **72**). LD<sub>50</sub>: concentración necesaria de compuesto para inhibir la proliferación de los parásitos en un 50 %; la desviación estándar aparece entre paréntesis.

Parásito	LD <sub>50</sub> (μM)	
	MT	MT-16C-SH
Promastigotes de <i>L. donovani</i>	5.3 (±0.5)	5.1 (±0.1)
Promastigotes de <i>L. donovani</i> resistentes a MT	>50	>50
Amastigotes axénicos de <i>L. pifanoi</i>	5.0 (±0.2)	5.5 (±0.1)
Amastigotes axénicos de <i>L. pifanoi</i> resistentes a MT	>50	>50

#### 4.5.1.3 Inmovilización de **72**

Como se comentó antes, la reactividad del grupo tiol proporciona la base para investigar el mecanismo leishmanicida de MT mediante técnicas de cromatografía de afinidad. En este sentido, en colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Dr. D. Andreu, del Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad Pompeu Fabra de Barcelona, se ha preparado una forma inmovilizada de Miltefosina por reacción entre el análogo **72** y los grupos yodoacetilo anclados a una matriz de agarosa (Figura 4.49), para su utilización como relleno de una columna de afinidad. Este soporte contiene un espaciador de 6 átomos de carbono que facilita la accesibilidad de los ligandos a MT. El enlace generado entre **72** y el grupo yodoacetilo es muy estable y específico de grupos tiol libres.



Esquema 4.49. Anclaje de MT-16C-SH (**72**) al gel de agarosa con grupos yodoacetilo (SulfoLink Coupling Gel, Pierce, Rockford, IL).

Este material se está utilizando actualmente como columna de afinidad en la búsqueda y aislamiento de las proteínas diana de MT en lisados de parásitos de *Leishmania*.

#### 4.5.2 Síntesis del tiol 84, para su conjugación con péptidos lanzadera

Con el objetivo de llevar a cabo estudios mecanísticos sobre la actividad leishmanicida de MT, es conveniente introducir el fármaco en el interior celular sin recurrir a los mecanismos intrínsecos del parásito. Existen varios métodos para introducir un compuesto específico en el interior celular: microinyección, electroporación, con liposomas o vectores virales, etc. Cada uno de estos métodos tiene ventajas e inconvenientes, como era de esperar. En el caso de *Leishmania* se decidió recurrir a una técnica molecular que consiste en utilizar péptidos translocadores de membrana CPPs (*cell-penetrating-peptides*). Para utilizar estos péptidos, en el caso particular de MT, se puede recurrir a la formación de un enlace disulfuro. Como el interior celular es reductor, una vez internalizado el conjunto péptido-MT, el fármaco se libera en forma de tiol. Como ya se dijo en otro lugar, la utilización de un análogo fluorescente de MT permite recurrir a métodos ópticos para determinar la distribución del fármaco. En conclusión, para esta aplicación específica es necesario construir un análogo bifuncional, fluorescente y con grupo tiol, de MT. El grupo fluorescente elegido es el BODIPY, ya utilizado en la obtención de análogos fluorescentes de MT y ET. El grupo SH, forma el correspondiente enlace disulfuro con una molécula de cisteína terminal del péptido lanzadera. En principio, este grupo no se esperaba que alterase la actividad leishmanicida del análogo, como se observó en el análogo reactivo MT-16C-SH (72).<sup>93</sup> La estructura general de dicho análogo se muestra en la Figura 4.55. En la posición 6 del grupo BODIPY se introduce el grupo tiol unido a través de un espaciador saturado, para no alterar las propiedades anfipáticas del compuesto.

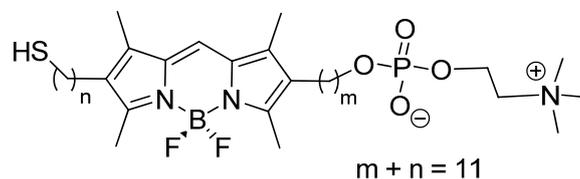


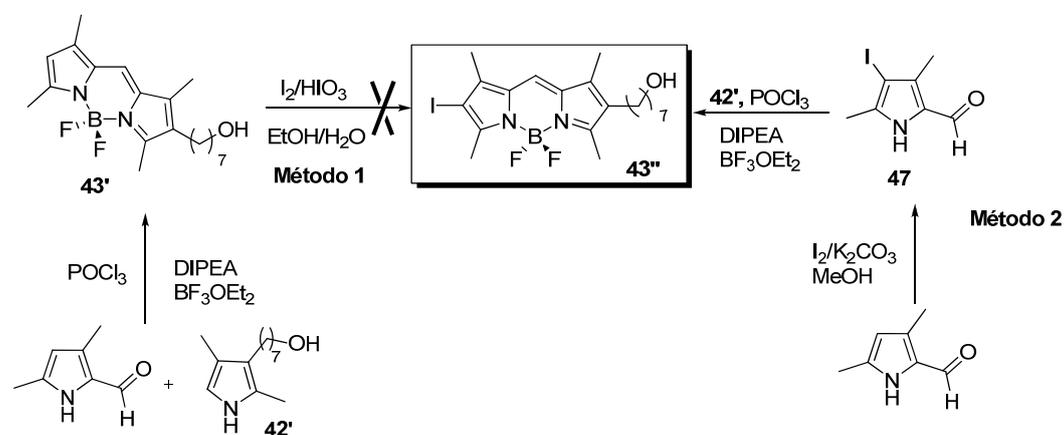
Figura 4.55. Estructura general propuesta para análogos fluorescentes y reactivos de MT

Por otro lado, el nuevo análogo deberá tener dimensiones moleculares no muy diferentes a las de Miltefosina. Por tanto, teniendo en cuenta las consideraciones generales descritas en otro lugar, la suma del número de grupos metileno entre el grupo fosfocolina y el grupo BODIPY (m, Figura 4.55) y entre el grupo tiol y el grupo BODIPY (n) debe ser 11 ( $m+n = 11$ ).

### 4.5.2.1 Síntesis

Inicialmente se ensayó la obtención de un homólogo del alcohol precursor OH-11C-BDP (**43**) con la cadena polimetilénica más corta (7 metilenos) y con un átomo de yodo en la posición 6 del BODIPY (**43''**), para posteriormente introducir el resto de la cadena conteniendo el grupo tiol protegido, mediante acoplamiento de Sonogashira-Hagihara (Esquema 4.50). Tras la introducción del resto de fosfocolina en el hidroxilo terminal, se llevaría a cabo la desprotección del grupo tiol, generando así el análogo buscado.

Aunque hay antecedentes de la yodación de la posición 6 en BODIPYs (ver, *Antecedentes bibliográficos*), en nuestro caso todos los intentos de yodación de **43'** para llegar a **43''** condujeron a la descomposición del producto de partida (método 1, Esquema 4.50). Este resultado hizo que se considerara otra opción: introducir el átomo de yodo en el pirrol precursor del dipirrometeno, como se hizo en la obtención de 2-yodo-tetrametil-BDP (**48**) (método 2, Esquema 4.50).



Esquema 4.50. Primeras aproximaciones a la síntesis de un precursor bifuncional (**43''**) del análogo **84**.

Por otro lado, el fluoróforo BODIPY debe ser estable en las condiciones de desprotección del grupo tiol. Los grupos protectores más comúnmente utilizados para el grupo tiol incluyen tioéteres (bencílicos o *terc*butílicos), tioésteres y disulfuros.<sup>99,100</sup> Para su desprotección se emplean ácidos próticos fuertes, como HCl, HBr y TFA, o ácidos de

<sup>99</sup> Greene, T. W., Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2<sup>a</sup> ed.; Wiley: Nueva York, 1991

<sup>100</sup> Kociński, P. J. *Protecting Group*, 3<sup>a</sup> ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2005.

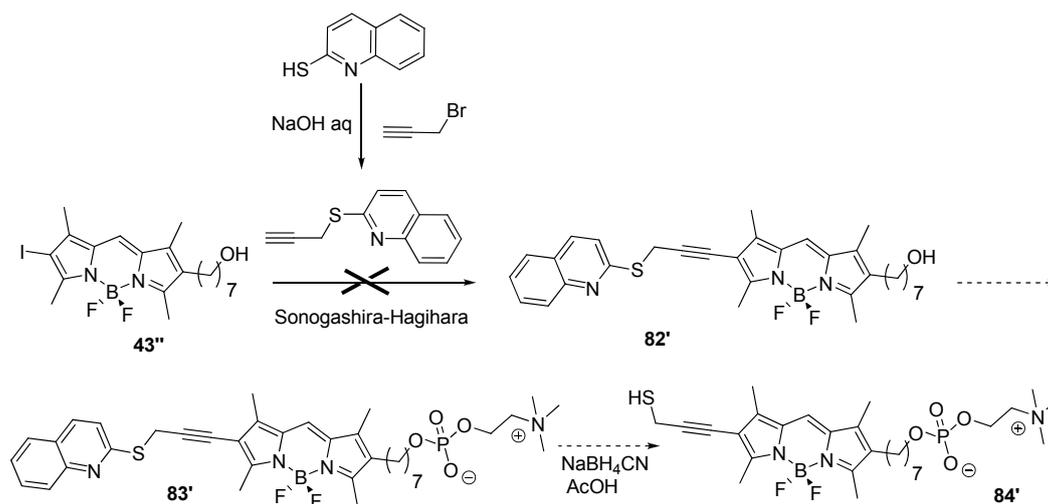
Lewis, como tribromuro de aluminio. En otros casos se emplean condiciones oxidantes, como yodo en metanol. Debido a la afinidad del grupo tiol por los metales pesados como el mercurio(II) y la plata(I), muchos de estos protectores se pueden separar utilizando las sales de estos metales a temperatura ambiente. Sin embargo, el fluoróforo BODIPY, es inestable frente a ácidos y bases fuertes, al hidrógeno en presencia de cantidades catalíticas de paladio, y a muchos oxidantes y reductores empleados en síntesis orgánica. Además, podría intercambiar el átomo de boro por Hg(II) o Ag(I), en presencia de alguna de sus sales.<sup>101</sup> Por tanto, es necesaria la utilización de un grupo protector que se libere en condiciones suaves de reacción que no afecten al fluoróforo BODIPY. Quinoleína-2-tiol es un compuesto comercial que puede ser utilizado para la síntesis de sulfuros mediante reacciones de sustitución S<sub>n</sub>2. Este grupo se reduce fácilmente con NaBH<sub>4</sub>CN en condiciones ácidas débiles, tales como en presencia de ácido acético, condiciones a las que sí es estable el fluoróforo BODIPY.<sup>102</sup> Los sulfuros de 2-mercaptoquinoleína son estables a los nucleófilos, a NH<sub>4</sub>OH concentrado, a NaOH 1 N y a HCl 2 N. Por tanto, decidimos sintetizar el sulfuro de propargilo y 2-quinolilo (por reacción entre quinoleína-2-tiol y bromuro de propargilo en presencia de hidróxido sódico acuoso),<sup>103</sup> para hacerlo reaccionar con el alcohol **43'** mediante un acoplamiento de Sonogashira-Hagihara (Esquema 4.51). Además de yoduro de cobre, se utilizaron como catalizadores Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>. Como disolventes se utilizaron mezclas de DMF o THF con las aminas DIPEA, Et<sub>3</sub>N o Et<sub>2</sub>NH. También se utilizaron diferentes temperaturas (desde t. a. hasta 90 °C) y tiempos de reacción de hasta 5 días. Sin embargo, bajo ninguna de estas condiciones se obtuvo el compuesto **82'**. Esto podría deberse a que el grupo mercaptoquinolinio desactiva el paladio por coordinación a través de los átomos de N y S.

A la vista de estos resultados, y teniendo en cuenta la asimetría del análogo, decidimos utilizar la condensación de MacDonald entre un  $\alpha$ -H-pirrol como **B** y un  $\alpha$ -formilpirrol como **A**, ambos sustituidos en sus posiciones 4 con restos  $\omega$ -hidroxialquilo y  $\omega$ -bromoalquilo, respectivamente. Estos sustituyentes aparecerán en las posiciones 2 y 6, respectivamente, del nuevo BODIPY (Esquema 4.52). El grupo tiol puede introducirse fácilmente por reacción entre quinoleína-2-tiol y el correspondiente  $\omega$ -bromoalquil-BODIPY. La síntesis de ambos pirroles se llevó a cabo por reacción de Johnson-Knorr, como ya se hizo en la síntesis otros análogos de MT y ET.

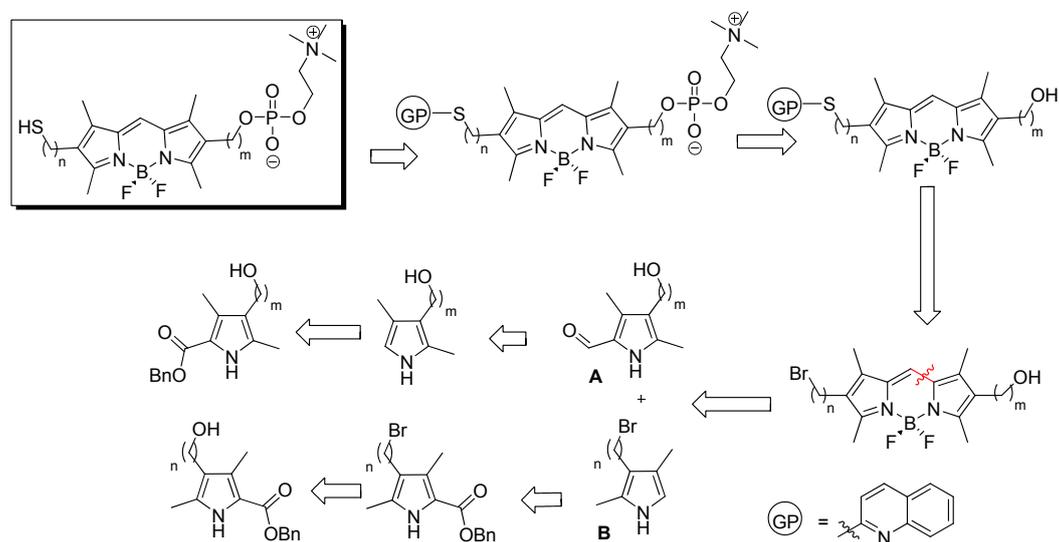
<sup>101</sup> Wood, T. E., Thompson, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1831-1861.

<sup>102</sup> Zhang, J., Matteucci, M. D. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1467-1470.

<sup>103</sup> Riyadh, S. M., Ishii, H., Fuchigami, T. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 8817-8221.



Esquema 4.51. Aproximación a la síntesis de un análogo fluorescente y reactivo de MT.



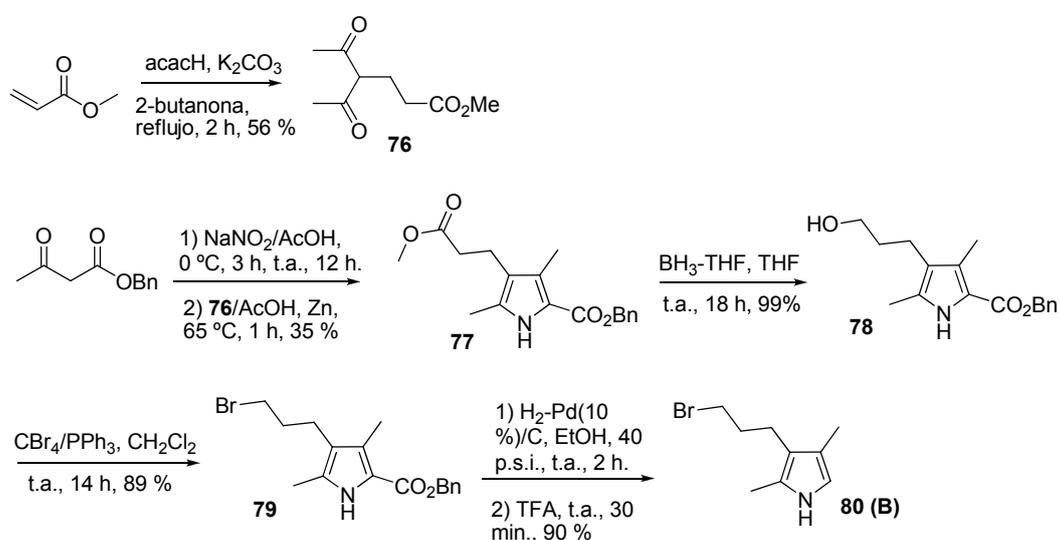
Esquema 4.52. Análisis retrosintético para la síntesis de un análogo bifuncional de MT

#### 4.5.2.1.1 Síntesis del bromoalquilpirrol B (80)

Se decidió utilizar una cadena espaciadora de tres metilenos ( $n = 3$ ) entre el bromo y el núcleo de BODIPY, para evitar el manejo y purificación de bromuros *pseudobencílicos* o *pseudohomobencílicos*, compuestos inestables en muchas condiciones de reacción. Además, este espaciador aliviará el posible impedimento

estérico durante la reacción de acoplamiento entre el análogo de MT y el resto de cisteína terminal del péptido “lanzadera”.

La síntesis del pirrol **80** se inició con la obtención de 4-acetil-5-oxohexanoato de metilo (**76**) mediante adición de Michael, a partir de acetilacetona y acrilato de metilo, utilizando carbonato potásico como base y 2-butanona como disolvente, alcanzándose **76** con un rendimiento del 56 % (Esquema 4.53). La posterior condensación entre **76** y el éster bencílico del ácido  $\alpha$ -hidroxiiminoacetoacético, obtenido *in situ*, condujo al correspondiente pirrol tetrasustituido **77** con rendimientos moderados (35%).<sup>104</sup> En el espectro  $^1\text{H-RMN}$  de **77** aparecen las señales de los protones de los dos grupos metilo a 2.22 y 2.30 ppm, las señales de los protones de los metilenos aparecen a 2.44 y 2.72 ppm, las del metilo del grupo éster a 3.67 y las del bencilo a 5.30 ( $\text{CH}_2$ ) y 7.37 ( $\text{HAr}$ ) ppm, como era de esperar.



Esquema 4.53. Síntesis del pirrol precursor B (**80**)

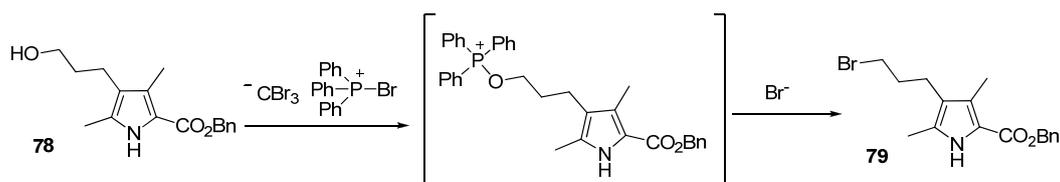
La reducción selectiva del grupo metoxicarbonilo en **77** para llegar al alcohol **78** se llevó a cabo utilizando el complejo  $\text{BH}_3\text{-THF}$  en THF a temperatura ambiente, con un rendimiento prácticamente cuantitativo, sin afectarse en estas condiciones el grupo éster bencílico en posición 2 del pirrol, por estar desactivado.<sup>105</sup> El espectro  $^1\text{H-RMN}$  es parecido al de **77**, aunque sin la señal del metilo del grupo éster y con la del nuevo metileno generado. Las señales correspondientes a los protones de la cadena alquílica

<sup>104</sup> Johnson, A. W., Markham, E., Price, R., Shaw, K. B. *J. Chem. Soc.* **1958**, 4254.

<sup>105</sup> Smith, K. M., Fujinari, E. M., Pandey, R. K., Tappa, H. D. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 4667-4676.

aparecen desplazadas a campos más altos con respecto a los de **77**, debido a la desaparición del efecto de desapantallamiento que el grupo carbonilo ejercía sobre ellos.

La sustitución por Br del OH del alcohol **78** se llevó a cabo por reacción de Appel,<sup>106,107</sup> empleando un ligero exceso de CBr<sub>4</sub> en presencia de trifenilfosfina y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como disolvente (89 % de rendimiento). Esta reacción se explica a través de la activación de tetrabromuro de carbono con trifenilfosfina, seguida del ataque del alcohol al átomo de fósforo, generándose así un intermedio oxofosfonio. Este grupo es desplazado por un bromuro del medio (reacción S<sub>N</sub>2) (Esquema 4.54). El espectro <sup>1</sup>H-RMN del bromuro **79** es similar al descrito para su alcohol precursor **78**, aunque los protones del grupo BrCH<sub>2</sub> aparecen más apantallados.



Esquema 4.54. Obtención del bromoalquilpirrol **79**

Finalmente, el grupo benciloxycarbonilo se eliminó por hidrogenación catalítica en presencia de paladio sobre carbón activo,<sup>108</sup> y el ácido carboxílico originado se descarboxiló, con rendimiento prácticamente cuantitativo, por tratamiento con ácido trifluoroacético, dando lugar al pirrol **B** (**80**) con buen rendimiento (90 %) (Esquema 4.53).

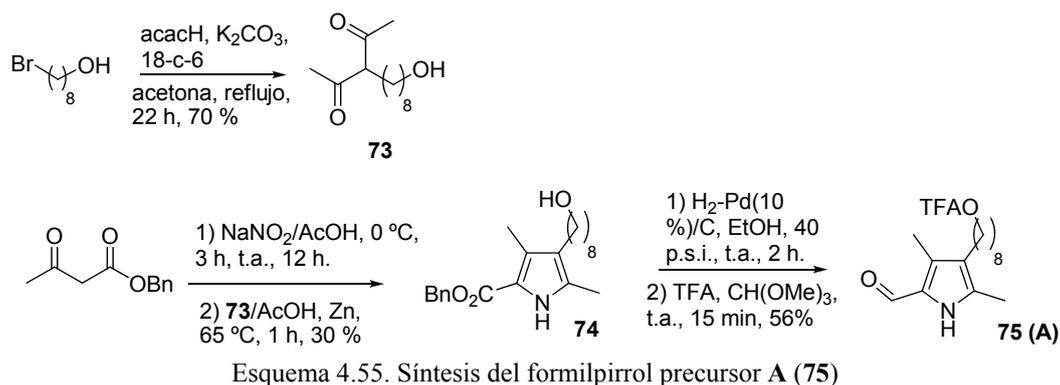
#### 4.5.2.1.2 Síntesis del formilpirrol A (**75**)

El pirrol **75** se sintetizó en tres etapas con un rendimiento global del 12 % (Esquema 4.55). La alquilación de acetilacetona y la condensación de Johnson-Knorr para obtener el pirrol **74** se realizó en las mismas condiciones que en el caso del pirrol **77**. La desbencilación de **74** se llevó a cabo mediante hidrogenólisis en etanol usando Pd/C (10%) como catalizador.

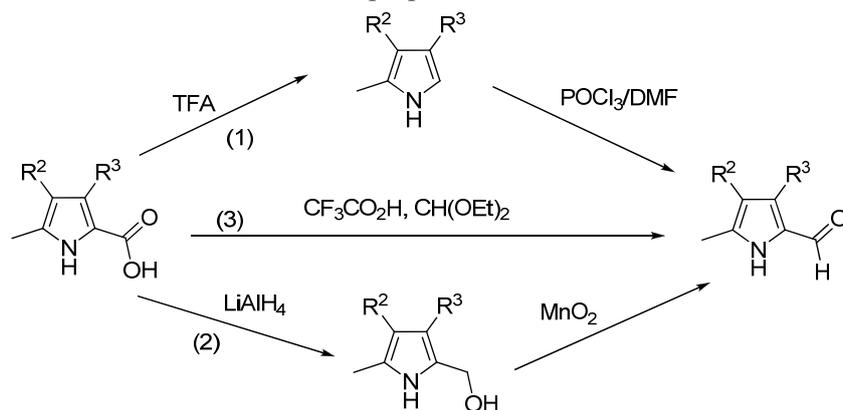
<sup>106</sup> Appel, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 801.

<sup>107</sup> Baughman, T. W., Sworen, J. C., Wagener, K. B. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10943-10948.

<sup>108</sup> Mackman, R. L., Micklefield, J., Block, M. H., Leepe, F. J., Battersby, A. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 2111.



En el Esquema 4.56 se muestran tres posibles rutas para transformar 2-carboxipirroles en 2-formilpirroles.<sup>109</sup> Vía 1: se puede llevar a cabo la descarboxilación en medio ácido, generando un pirrol con la posición  $\alpha$ -libre, que puede ser posteriormente formilado en esta posición mediante la reacción de Vilsmeier-Haak ( $\text{POCl}_3/\text{DMF}$ ). Vía 2: los 2-formilpirroles también pueden obtenerse mediante la reducción con  $\text{H}_4\text{LiAl}$  del ácido, para dar el correspondiente alcohol, seguida de la oxidación de éste a aldehído con óxido de manganeso. Vía 3: esta conversión también puede realizarse en un solo paso por descarboxilación del pirrol con ácido trifluoroacético y formilación tipo Clezy,<sup>110</sup> en la que el agente formilante se obtiene por hidrólisis de ortoformiato de etilo en el propio ácido trifluoroacético.



Esquema 4.56. Métodos para transformar 2-carboxipirroles en 2-formilpirroles.

<sup>109</sup> Lin, N-H., Xia, P., Kovar, P., Park, C., Chen, Z., Zhang, H., Rosenberg, S. H., Sham, H. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 421-426.

<sup>110</sup> Clezy, P. S., Fookes, C. J. R., Liepa, A. J. *Aust. J. Chem.* **1972**, *25*, 1979-1990.

En general, los tres métodos transcurren con rendimientos moderados. Sin embargo, en la vía 3 las condiciones experimentales son más sencillas y, además, ambos pasos, descarboxilación y formilación, suceden en una sola etapa. Por lo tanto, el ácido resultado de la desbencilación de **74**, se trató con TFA y, seguidamente, se añadió ortoformiato de trimetilo, generándose así el  $\alpha$ -formilpirrol correspondiente. Por otro lado, las condiciones de reacción empleadas en ambas etapas provocaron que el grupo hidroxilo terminal en posición 4 se esterificase con el ácido trifluoroacético, generándose así el pirrol **75**. El rendimiento global para los 4 procesos (desbencilación hidrogenolítica, descarboxilación, formilación y trifluoroacetilación) fue del 56 %.

#### 4.5.2.1.3 Etapas finales

La condensación de los pirroles **75 (A)** y **80 (B)** en presencia de oxiclورو de fósforo condujo a un dipirrometeno intermedio que se transformó *in situ* en el correspondiente BODIPY **81** mediante la adición de eterato de trifluoruro de boro ( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ) en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) (Esquema 4.57).

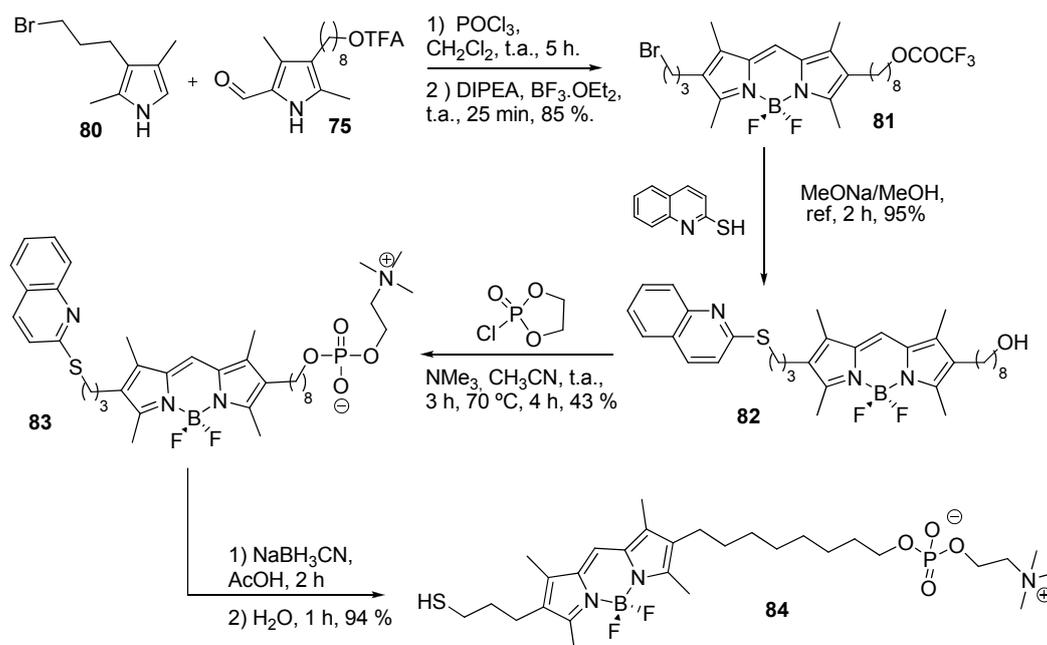
El bromuro **81** presenta en sus espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN las señales asignables al grupo BODIPY y a los metilenos unidos a las posiciones 2 y 6 del mismo. Su espectro IR muestra la señal característica de la vibración de tensión del grupo  $\text{C}=\text{O}_{\text{éster}}$  a  $1785 \text{ cm}^{-1}$ .

A continuación, se introdujo el grupo tiol en forma protegida<sup>111</sup> por reacción entre la sal sódica (generada con metóxido sódico) de quinoleína-2-tiol y el bromuro **81**, llegando finalmente al sulfuro **82** con un 95 % de rendimiento. La utilización de un exceso de quinoleína-2-tiol garantiza la completa sustitución del átomo de bromo en **81** y, a la vez, la hidrólisis del grupo trifluoroacetilo (Esquema 4.57). En los espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN de **82** aparecen las señales esperadas. El espectro de masas (EI) muestra la señal correspondiente al ión molecular, así como señales correspondientes a la pérdida de una y de dos moléculas de HF.

La introducción del grupo fosfocolina sobre el alcohol **82** se llevó a cabo siguiendo el procedimiento utilizado en la obtención de otros fosfolípidos en este trabajo, alcanzándose un rendimiento similar a los obtenido entonces (43 %). El grupo quinoleína-2-tiol se mostró estable a las condiciones de reacción, así como a las posteriores etapas de purificación.

---

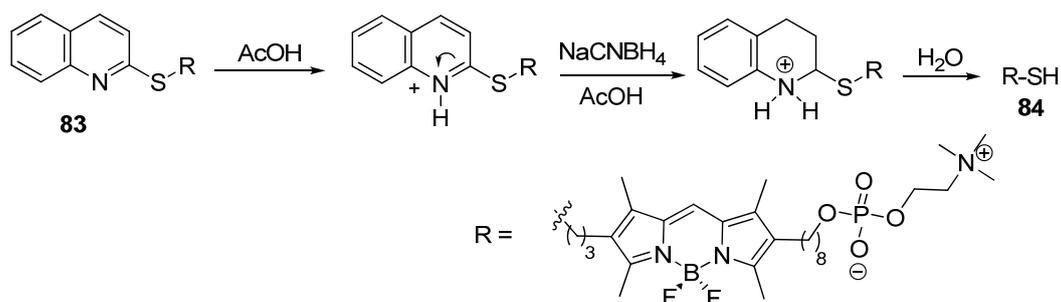
<sup>111</sup> Imahori, H., Norieda, H., Yamada, H., Nishimura, Y., Yamazaki, I., Sakata, Y., Fukuzumi S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 100-110.

Esquema 4.57. Síntesis del análogo **84**

Finalmente, la desprotección del grupo tiol, utilizando 5 equivalentes de cianoborohidruro sódico en ácido acético, seguido de hidrólisis con agua (Esquema 4.57), transcurrió de modo prácticamente cuantitativo (HPLC).<sup>102,112</sup> En el producto aislado no se observaron por  $^1\text{H}$ -RMN restos del producto de partida ni del disulfuro correspondiente, probable producto de oxidación del tiol. La separación del grupo tioquinoleína con cianoborohidruro sódico en medio ácido pasa por la formación de un tioaminal intermedio que se hidroliza rápidamente en presencia de agua, generando el grupo tiol libre (Esquema 4.58).

La estructura del análogo **84** se confirmó mediante sus datos espectroscópicos. En el espectro  $^1\text{H}$ -RMN aparecen las señales correspondientes a las dos cadenas polimetilénicas, al resto de fosfatidilcolina, a los metilos del grupo BODIPY y al protón en posición 8' del mismo. La señal de los protones del metileno en posición  $\alpha$  respecto al átomo de azufre aparece a 2.50 ppm, solapada con la señal de los protones del metileno en  $\gamma$ . Las señales de los metilenos contiguos al resto de fosfato aparecen como dos multipletes, debido a que se acoplan entre sí y con el átomo de fósforo (Figura 4.56). La asignación de los protones del análogo **84** se llevó a cabo mediante el espectro bidimensional COSY.

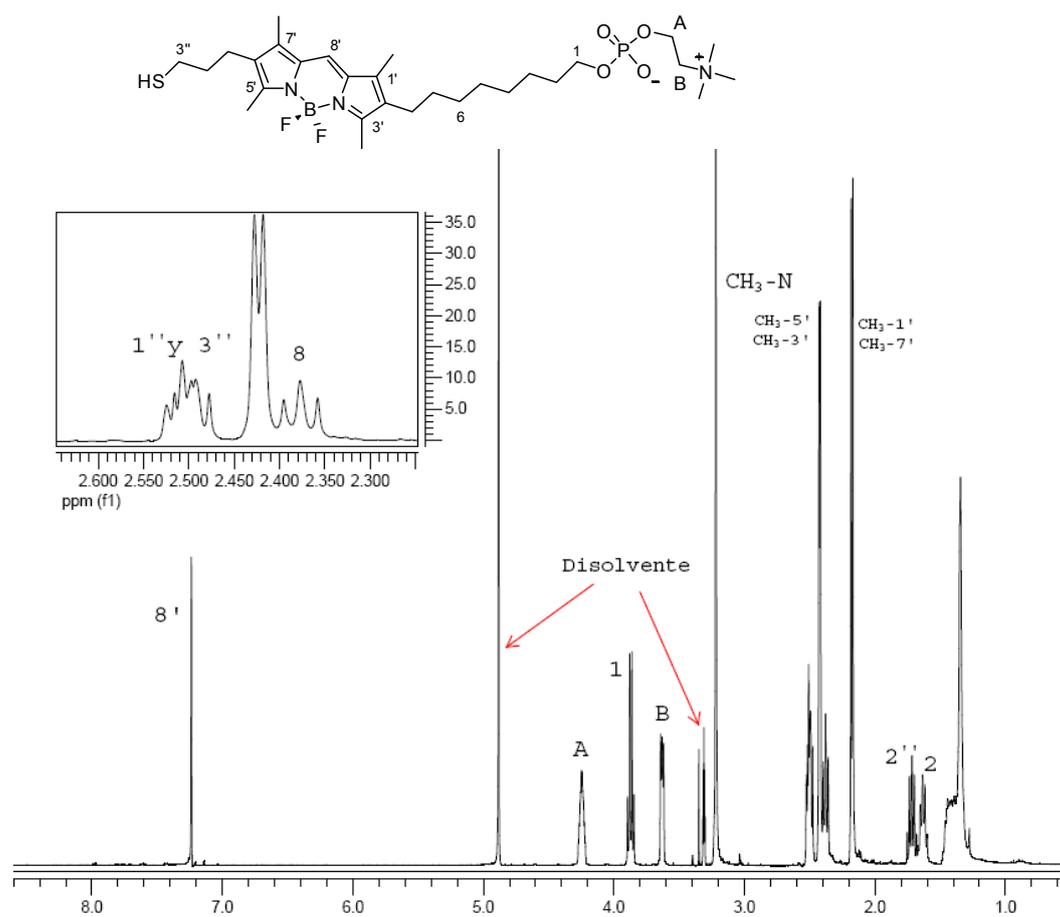
<sup>112</sup> Nakamura, S., Furutani, A., Toru, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1690-1695.



Esquema 4.58. Desprotección del grupo 2-mercaptoquinoleina en **83** para dar **84**

En el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de **84** aparecen las señales asignables al cromóforo BODIPY, a las dos cadenas polimetilénicas y al resto de fosfatidilcolina. Entre ellas cabe destacar las señales de los carbonos situados a dos o tres enlaces del átomo de fósforo, que aparecen, como era de esperar, acopladas con este último. La asignación de los carbonos del grupo BODIPY se llevó a cabo con la ayuda de los espectros HSQC y HMBC. El espectro FT-IR muestra las bandas de absorción características de las cadenas polimetilénicas a  $2927\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ ) y a  $1474\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{C-H}}$ ). Las bandas correspondientes al grupo fosfatidilcolina aparecen a  $1228\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{P=O}}$ ),  $1069\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-O-P}}$ ) y  $969\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{N-C}}$ ). El espectro de masas ( $\text{ESI}^+$ ) del análogo confirmó la estructura. Su fórmula molecular se confirmó por masas de alta resolución.

El análogo MT-8C-SHBDP (**84**) es estable en forma sólida durante semanas y, tal vez, meses, si se conserva a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . En disolución etanólica en frío el compuesto es estable durante períodos similares, aunque a temperatura ambiente se podría formar el correspondiente disulfuro. Por tanto, debe conservarse, tanto sólido como en disolución, a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  y en atmósfera inerte.

Figura 4.56. Espectro <sup>1</sup>H-RMN en CD<sub>3</sub>OD del análogo 84.

#### 4.5.2.2 Propiedades espectroscópicas de **84**

El estudio de las propiedades ópticas del análogo de Miltefosina con grupos fluorescente (BODIPY) y reactivo (-SH) se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en la parte experimental. MT-8C-SHBDP (**84**) presenta su máximo de absorción en EtOH a 529 nm, con un coeficiente de absorción molar de  $82000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  en este máximo, lo cual, junto a su intensa emisión de fluorescencia ( $\Phi_F = 0.7$ ) de color amarillo ( $\lambda_{em} = 538 \text{ nm}$ ), le hace apropiado para su uso en los diversos métodos de detección de fluorescencia utilizados en el estudio de sistemas de interés biológico (Figura 4.57).

Si se comparan estos datos con los obtenidos para el análogo fluorescente de MT **46**, que tiene un grupo BODIPY sustituido también en las posiciones 2 y 6, se observa un comportamiento espectroscópico similar, con valores para el máximo de absorción, coeficiente de absorción molar y máximo de emisión de fluorescencia similares, lo que indica la ausencia de interacciones electrónicas entre el cromóforo y el grupo tiol. El valor para el rendimiento cuántico de fluorescencia fue algo menor. Tampoco ejerce ningún efecto apreciable la diferente longitud de la cadena espaciadora polimetilénica.

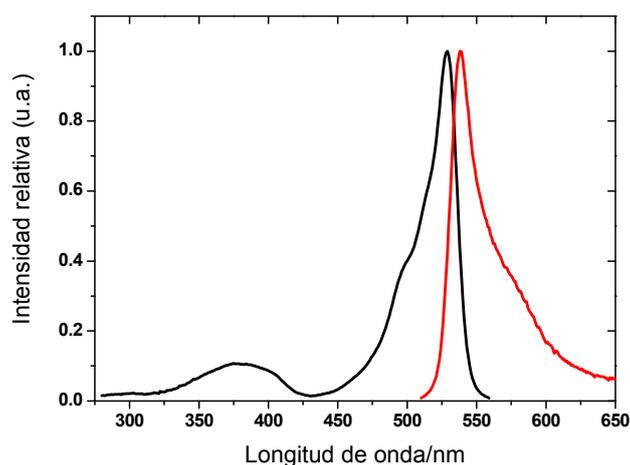


Figura 4.57 Espectro de absorción normalizado (negro) y de fluorescencia corregido y normalizado (rojo) del análogo MT-8C-SHBDP (**84**) en EtOH. Concentración:  $10^{-6} \text{ M}$ . T = 22 °C.

#### 4.5.2.3 Actividad leishmanicida de **84**

Se evaluó la actividad de MT-8C-SHBDP (**84**) frente a promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*, trabajo realizado por el grupo del Dr. L. Rivas (CIB, CSIC) en colaboración con nuestro laboratorio. Para el caso de los promastigotes de *L. donovani* se utilizaron la cepa silvestre WT y la cepa R40, resistente a Miltefosina. En la Tabla 4.11 se muestran los valores correspondientes de LD<sub>50</sub>

Tabla 4.11. Actividad antileishmania *in vitro* de MT-8C-SHBDP (**84**).

Compuesto	LD <sub>50</sub> (μM)		
	promastigotes <i>L. donovani</i> /48h		amastigotes de <i>L. pifanoi</i> /72h
	cepa sensible (WT)	cepa resistente (R40)	cepa sensible (WT)
MT	4.9±0.8	82.2±1.2	13.7±2.0
MT-8C-SHBDP ( <b>84</b> )	15.7±1.1	> 80	8.60±0.7

En promastigotes de *L. donovani*, MT-8C-SHBDP (**84**) presentó una actividad antileishmania tres veces menor que la de MT, y en amastigotes de *L. pifanoi* más de una vez y media superior. Por otro lado, el nuevo análogo se mostró inactivo contra la cepa de promastigotes resistente a Miltefosina (R40). Estos resultados, unidos a las favorables propiedades espectroscópicas de **84**, permiten concluir que dicho compuesto va a ser de utilidad para los fines biológicos buscados. En los experimentos preliminares realizados utilizando un péptido penetrante (TAT) unido al análogo **84** a través de un enlace S-S, se ha observado que el análogo se internaliza rápidamente en parásitos de *Leishmania* de la cepa resistente a Miltefosina R40.



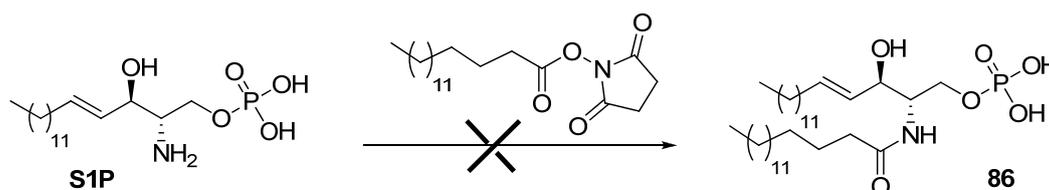
#### 4.6 Synthesis of ceramide-1-phosphates

The following work has been carried out by VHGR in the laboratories of Dr. P. Nussbaumer (Novartis-Vienna).

Ceramide-1-phosphates (C1Ps) with different, well defined *N*-acyl side chains (only few are commercially available) are required as analytical standards. Likewise, labeled C1P analogues are also required as tool and reference compounds for further biological investigations such as metabolism and interaction studies, as well as for measuring C1P concentrations in cells and tissues (sphingolipidomics).

The aim of the present work was to find a practical method for the synthesis of C1Ps in just one or a few steps from commercially available starting materials. Accordingly, we envisaged a fast and flexible method starting from sphingosine 1-phosphate (S1P) which should provide C1Ps with defined *N*-acyl substituents. It should be taken into account that S1P has become commercially available in 100 mg batches at a reasonable price.

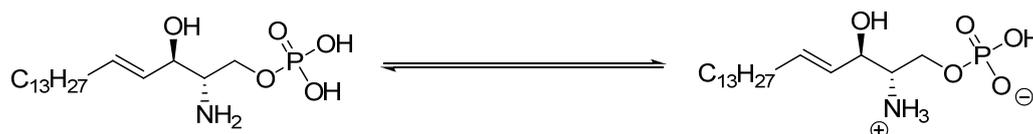
In our first experiments, we attempted to use the *N*-hydroxysuccinimidyl ester of hexadecanoic acid to achieve selective acylation (Scheme 4.59), since such activated esters are known to react preferentially with an amino over a hydroxy group.<sup>113,114</sup>



The reaction was performed under argon at room temperature with 1 equiv. of TEA, 2 equiv. of palmitoyl *N*-hydroxysuccinimidyl ester, and DMF as solvent, according to the literature. However, MS (ESI<sup>+/−</sup>) monitoring showed only starting material, even after stirring at higher temperature (50 °C, 15 h). This was attributed to the fact that S1P was only sparingly soluble in DMF. S1P must be in equilibrium between neutral form and internal salt (zwitterion) with the ionized amino and phosphate groups (Scheme 4.60).

<sup>113</sup> Ohlsson, J., Magnusson, G. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9975-9984.

<sup>114</sup> Hashimoto, M., Hatanaka, Y., Nabeta, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 89-91.

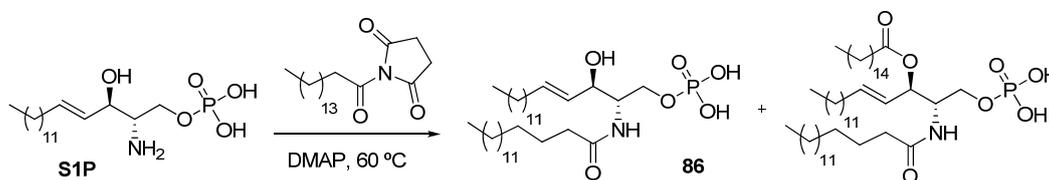


Scheme 4.60. Equilibrium in S1P

S1P was found to be insoluble in most common solvents (e.g. MeCN, EtOAc, THF, acetone, cyclohexane, MeOH, toluene, DCM) and very poorly soluble in DMF and DMSO. S1P only showed good solubility in pyridine. Therefore the reaction was repeated with pyridine as solvent at room temperature. Nevertheless, no product formation was observed by MS, nor by TLC. Consequently, we tried higher temperatures and longer reaction times. Only after performing the reaction at 60 °C for 48 hours in pyridine, **86** was detected by MS (ESI-).

Apparently, product formation proceeded very slowly, and therefore the reaction had to be catalyzed. As pyridine was used as solvent, dimethylaminopyridine (DMAP) was the catalyst of choice. DMAP is a widely used hyper-nucleophilic acylation catalyst. Compared to pyridine, DMAP is approximately  $10^4$  times more active when used as acylation catalyst.<sup>115</sup>

The employment of 0.1 equiv. of DMAP resulted in product formation already at room temperature. At 60 °C, nearly complete conversion was observed after 15 h. However, for full consumption of the starting material, at least 2 equivalents of the hydroxysuccinimidyl ester had to be used, and under these conditions also some double acylated product (*N*- and 3-*O*-acylation) was generated (Scheme 4.61).

Scheme 4.61. Formation of *N,O*-diacylated S1P

The formation of the *N,O*-diacylated product was surprising, because *N*-hydroxysuccinimidyl esters are reported to be very selective for *N*-acylation versus *O*-acylation. The harsh reaction conditions (60°C, DMAP catalysis), however, could possibly overrule this selectivity. Instead of using 2 equiv. of the acylation reagent, it

<sup>115</sup> Höfle, G., Steglich, W., Vorbrüggen, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 569-583

was attempted to avoid the double acylation by using only 1 equiv. As a result, S1P was not completely consumed, and double acylation happened nonetheless.

Since S1P and C16-ceramide-1-phosphate (**86**) are both very poorly soluble in most common solvents, it was decided to separate these two products from DMAP and the acylation reagent by their differences in solubility. Therefore the solvent (pyridine) of the reaction mixture was evaporated, and the residue suspended in hot EtOAc. The suspension was stirred for 2 h in order to completely dissolve DMAP and the acylation reagent, and finally filtered. The double acylated product also seemed to be soluble in hot EtOAc, as MS analysis of the filtrate showed the corresponding signals.

The filtered solid, which mainly consisted of S1P and product **86**, had to be further purified. Prep-HPLC was found out to be inadequate, since it caused partial decomposition of the product **86** under the conditions employed. Size exclusion chromatography (with Sephadex-LH20) would have been an alternative in order to separate S1P from the product **86**, according to the molecular weight difference, but could not be implemented, as the compounds to be separated could not be dissolved in any solvent suitable for this type of chromatography. Silica gel flash chromatography (*n*-BuOH:MeOH:NH<sub>4</sub>OH:H<sub>2</sub>O = 8:1:1:1, TLC monitoring in arseno-molibdate solution) was finally considered as the purification method of choice.

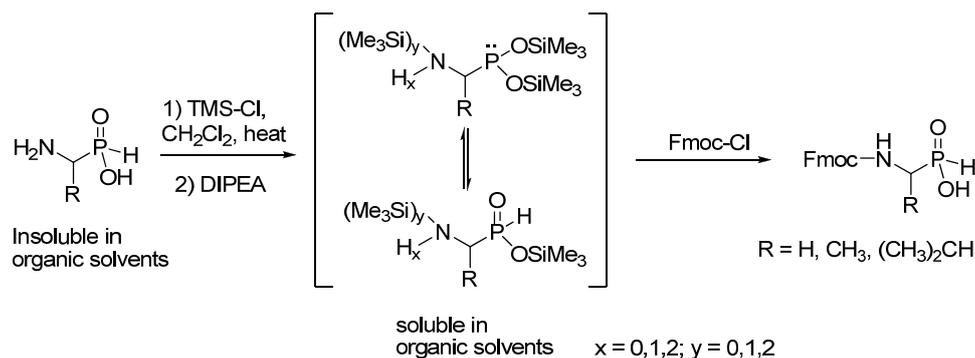
The very low solubility of S1P did not allow much variation of reaction conditions. Therefore, we planned to apply *in situ* intermediate protection of both the phosphate group and the 3-hydroxy group, still avoiding a multi-step sequence, and opted for a silyl protecting group which would be cleaved during work-up. For amino acids, this strategy had been known for a long time<sup>116</sup> and the application to phosphinate amino acids has also been reported.<sup>117</sup> The highly insoluble free amino phosphinates were protected as *N*-Fmoc derivatives by *in situ* trimethylsilylation of aminoalkylphosphinic acids, which then reacted with Fmoc-Cl providing the corresponding product in excellent yields and with high purity, after simple extractive isolation (Scheme 4.62). These protected compounds are the starting material in the synthesis of phosphonopeptide mimetics.<sup>118</sup>

---

<sup>116</sup> Birkofer, L., Konkol, W., Ritter, A. *Angew. Chem.* **1959**, *71*, 701.

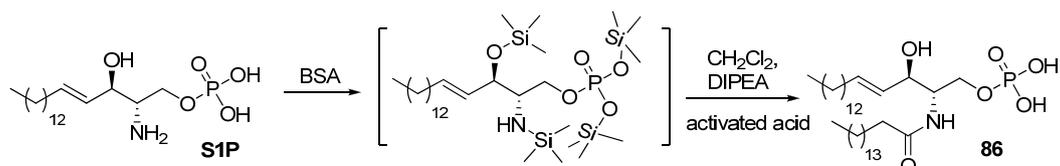
<sup>117</sup> Li, S., Whitehead, J.K., Hammer, R. P. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3116-3118.

<sup>118</sup> Collinsova, M., Jiracek, J. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 629-647.



Scheme 4.62. Preparation of Fmoc-protected amino phosphinic acids.<sup>117</sup>

In our case, the *in situ* silylation was achieved by reacting S1P with an excess of neat *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA). When after some minutes a homogeneous solution was observed, BSA was removed under vacuum and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and diisopropylethylamine (DIPEA) were added to give a clear solution. It was postulated that a highly silylated product is generated in the reaction mixture (Scheme 4.63). This solution was then treated *in situ* with 1 equivalent of hexadecanoyl chloride at  $0^\circ\text{C}$  for 2 h.

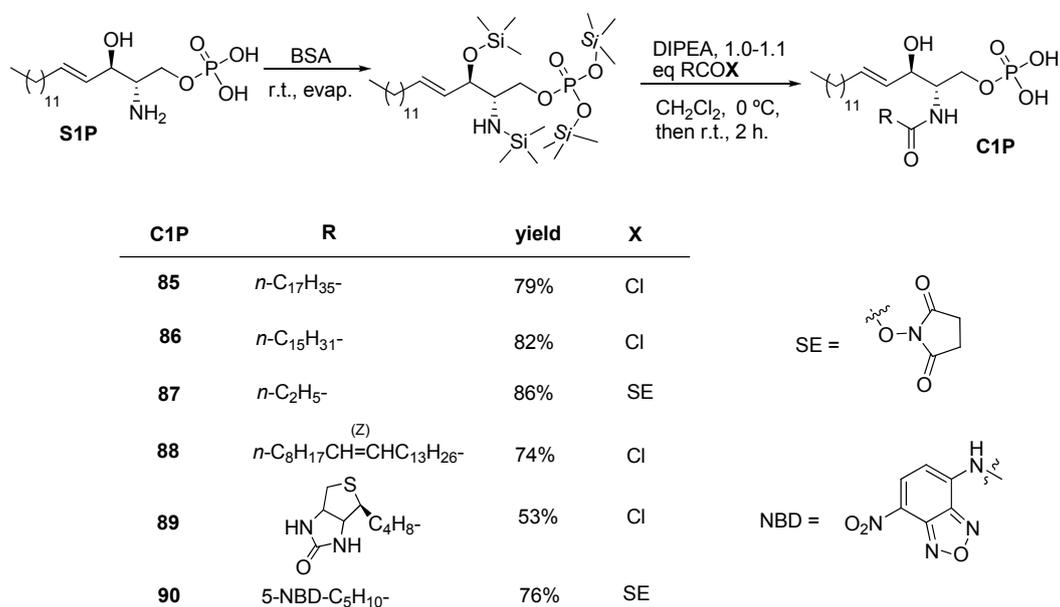


Esquema 4.63. Synthesis of the ceramide 1-phosphate **86** from S1P

Now the reaction proceeds smoothly, without formation of the double-acylated product and with nearly complete consumption of S1P. The silylated intermediates could not be analyzed due to their instability. The only remaining issue was the isolation and purification of the ceramide phosphate **86**, since aqueous treatment to remove the silyl protecting groups resulted in a very low soluble crude product, and simple precipitation with acetone from dichloromethane/methanol solution did not provide pure material. The optimized procedure that we developed was to directly load the crude reaction mixture, together with the solvent, on a RP-18 reversed phase chromatography samplet, and to perform the chromatographic purification without any work-up. The presence of water in the starting eluent was sufficient to cleave the silyl protecting groups and we never isolated any silylated S1P or C1P derivative by applying this procedure. Thus, the final

one-pot procedure became very simple, i.e. silylation of S1P, concentration, acylation and final chromatographic purification.

The next goal was to develop a method allowing broad variation of the *N*-acyl residue. Therefore, we made to react the *in-situ* generated silylated S1P with two other fatty acid chlorides: stearoyl chloride and nervonic acid chloride (Scheme 4.64). The corresponding products **85** and **88** were again obtained in high purity and good yield (79% and 74%, respectively). Then we applied the hydroxysuccinimidyl ester of propanoic acid as a model reagent, in combination with DMAP as catalyst to guarantee fast conversion. In this reaction we also obtained the desired ceramide phosphate derivative **87** in high yield (86%) demonstrating that less activated acid derivatives can be used as acylation reagents without the need for more drastic reaction conditions. This result is in contrast with the observation in the initial experiment that acylation of (non-silylated) S1P in pyridine with the hydroxysuccinimidyl ester of hexadecanoic acid was only partially achieved at 60 °C.



Scheme 4.64. Synthesis of ceramide 1-phosphates **85-90** from S1P

Next, we investigated the synthesis of C1P derivatives featuring two different labels, biotin and the fluorescent dye 7-nitro-4-benzofurazanamine (NBD, Scheme 4.64) in the fatty acid residue. The use of biotin chloride gave product **89** in moderate yield (53%). The introduction of the NBD-label was accomplished by using the commercially

available SE-activated ester, again in good yield (76%), confirming that, under the optimized conditions with the *in situ* silylation, the conversion of hydroxysuccinimidyl esters occurs readily at room temperature. Compound **90** is a useful tool to complement metabolism studies with the corresponding, commercially available NBD-C6-ceramide.

The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of ceramide-1-phosphate **90**, with the NBD label is shown in Figure 4.58.

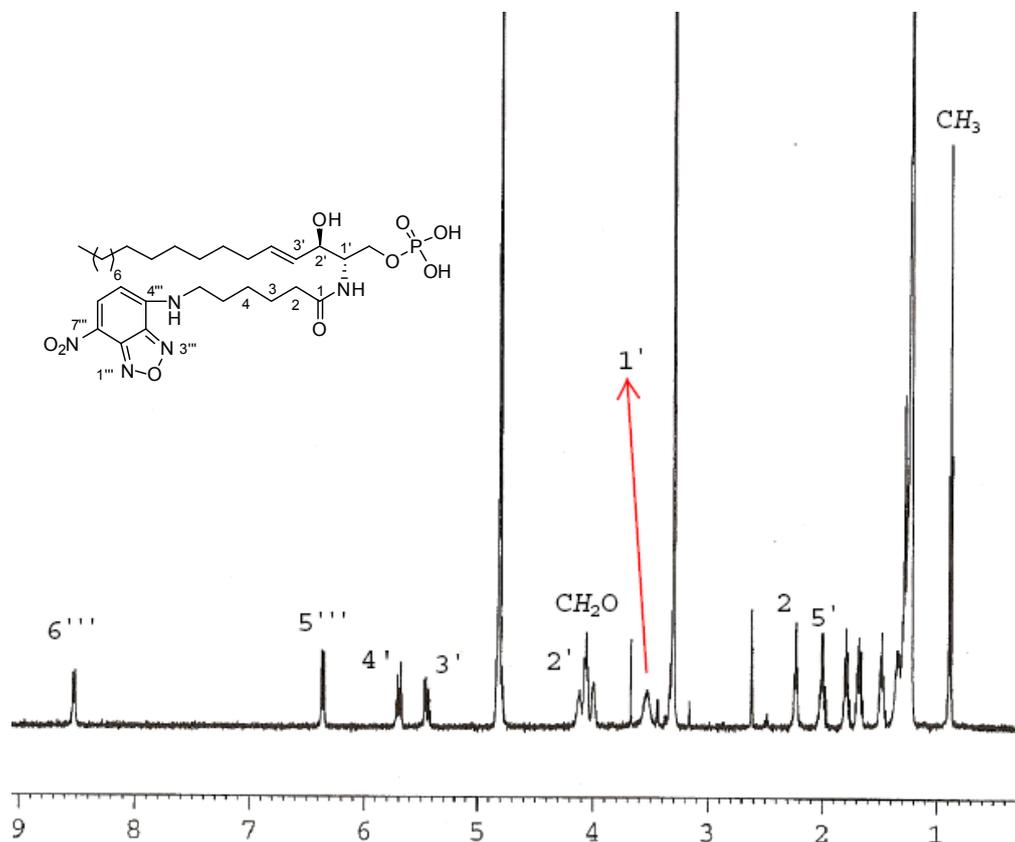


Figure 4.58.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of ceramide-1-phosphate **90**, recorded at 400 MHz in  $\text{CD}_3\text{OD}$

## 5. Conclusiones



## 5 Conclusiones

1. Se proponen dos métodos de síntesis, basados en la reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) y en el acoplamiento de Sonogashira-Hagihara (SH), respectivamente, para la incorporación del fluoróforo poliénico todo-(*E*)-feniltrienino conjugado (PTRI) a una cadena hidrocarbonada a través de un enlace C-C. Ambos métodos son de aplicación general y permiten obtener, con elevada diastereoselectividad y buenos rendimientos, nuevos compuestos estructural y funcionalmente relacionados con lípidos lineales, pero con nuevas propiedades espectroscópicas. Ambos métodos tienen ventajas y limitaciones específicas.

Asimismo, se demuestra la utilidad de la reacción de HWE, combinada con un paso de hidrogenación quimioselectiva, para la incorporación del fluoróforo todo-(*E*)-difeníl-1,6-hexatrieno (DPH) a una cadena polimetilénica. Los grupos emisores citados, PTRI y DPH, presentan intensa absorción en el UV próximo (~ 360 nm) y emisión de fluorescencia en la zona azul del espectro (~ 450 nm).

2. La aplicación de los métodos de síntesis mencionados ha permitido obtener los siguientes análogos fluorescentes del fármaco leishmanicida Miltefosina (MT, hexadecilfosfatidilcolina): MT-6C-PTRI (**11**), MT-5C-OMePTRI (**17**), MT-4C-DPH (**30**) y MT-6C-DPH (**31**). En estos compuestos se mantiene la conformación más o menos lineal y el carácter anfifílico del fármaco original. De esta serie, los análogos MT-5C-PTRI (descrito anteriormente) y MT-4C-DPH (**30**) reúnen la elevada actividad leishmanicida y las propiedades espectroscópicas adecuadas para su utilización en la investigación del mecanismo antiparasitario de MT. Asimismo, para facilitar dicha investigación, se obtuvieron los correspondientes compuestos de control inactivos OH-5C-PTRI (descrito anteriormente) y OH-4C-DPH (**28**).

3. A partir de los análogos poliénicos citados, y utilizando técnicas de microscopía y análisis de fluorescencia, se ha podido demostrar: a) la presencia de un mecanismo muy eficiente de internalización de Miltefosina en la membrana del parásito *Leishmania*, mediante el cual la concentración intracelular del fármaco llega a ser dos órdenes de magnitud mayor que en el entorno extracelular; b) que la única cepa conocida de *Leishmania* resistente a Miltefosina no internaliza el fármaco, es decir, no tiene el sistema translocador; y c) que el fármaco se distribuye de forma homogénea en el interior celular, sin acumulación privilegiada en ningún orgánulo. Estas observaciones son consistentes con un efecto leishmanicida del fármaco producido presumiblemente

por el deterioro funcional (y/o estructural) simultáneo de varios procesos metabólicos del organismo infectivo.

4. Asimismo, se proponen dos métodos de síntesis de aplicación general, para la incorporación del grupo fluorescente difluoroborodipirrometeno (BODIPY) a una cadena hidrocarbonada a través de un enlace C-C, que conducen a estructuras anfifílicas con la conformación más o menos lineal y similar a la de una cadena lipídica saturada. Mediante estos métodos se han obtenido los siguientes análogos fluorescentes de Miltefosina: MT-11C-BDP (**45**) y MT-11C-6EtBDP (**46**), para los que la etapa clave de su síntesis es una reacción de Johnson-Knorr de síntesis de pirroles, y MT-11C-2INBDP (**50**), en donde la etapa clave es un acoplamiento de Sonogashira-Hagihara (S.-H.). Estos tres análogos presentan en la zona visible del espectro excelentes propiedades de absorción ( $\lambda_{\text{abs máx}} = 517\text{--}533\text{ nm}$ ) y emisión ( $\lambda_{\text{f máx}} = 525\text{--}553\text{ nm}$ ,  $\Phi_{\text{f}} = 0.51\text{--}0.94$ ) y una estabilidad fotoquímica considerable.

5. Los análogos MT-11C-BDP (**45**) y MT-11C-6EtBDP (**46**) muestran una actividad leishmanicida igual o mayor que la del fármaco original, lo que ha posibilitado su utilización en los estudios del mecanismo leishmanicida mencionados. Además, las favorables propiedades espectroscópicas de ambos análogos son adecuadas para su aplicación al diagnóstico de parásitos resistentes a MT.

6. La reacción de Johnson-Knorr de síntesis de pirroles se puede utilizar, asimismo, para la preparación de derivados fluorescentes de ácidos grasos conteniendo el grupo BODIPY, de forma que las estructuras resultantes presenten una conformación lípdomimética. La utilidad y generalidad del método se demostró mediante la síntesis del correspondiente derivado fluorescente del ácido esteárico (**39**), que presenta en la zona visible del espectro excelentes propiedades de absorción ( $\lambda_{\text{abs máx}} = 529\text{ nm}$ ) y emisión ( $\lambda_{\text{f máx}} = 536\text{ nm}$ ,  $\Phi_{\text{f}} = 0.94$ ) y una apreciable estabilidad fotoquímica. Estas características son adecuadas para la aplicación de estos compuestos en estudios de metabolismo lipídico y como sondas moleculares de estructura y dinámica de bicapas lipídicas.

7. Se propone un método de síntesis para la obtención de un análogo de Miltefosina conteniendo un grupo tiol en posición terminal: MT-16C-SH (**72**). Este compuesto muestra una actividad leishmanicida idéntica a la del fármaco original, lo que ha permitido su utilización en el diseño de métodos específicos de cromatografía de afinidad dirigidos a la identificación de posibles receptores de MT en el parásito.

8. Combinando los métodos de síntesis mencionados anteriormente, se propone un método para la obtención de análogos bifuncionales de Miltefosina que permitan internalizar el fármaco de forma independiente del mecanismo natural de translocación. Aplicando este método se preparó el compuesto MT-8C-SHBDP (**84**), que contiene un grupo tiol en posición distal y un grupo fluorescente BODIPY unido al resto de la molécula por un enlace C-C. Este análogo presenta excelentes propiedades de absorción y emisión en el visible, alta estabilidad fotoquímica y una adecuada actividad leishmanicida.

9. Para la preparación de derivados fluorescentes del éter-lípido antineoplásico Edelfosina (1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-3-*rac*-glicero-3-fosfocolina, ET) conteniendo el grupo BODIPY, se proponen dos métodos generales de síntesis que permiten la incorporación de dicho grupo cromóforo a través de un enlace C-C. La utilización de estos métodos evita la introducción de grupos polares, como amida, éter, éster, y preservan en los dos análogos la conformación más o menos lineal de la cadena apolar original de Edelfosina. El primero de ellos tiene como etapa clave la reacción de Johnson-Knorr, y el método se utilizó para la obtención del análogo ET-11C-2EtBDP (**62**). El segundo método tiene como etapa clave un acoplamiento de Sonogashira, y se utilizó para la preparación del análogo ET-13C-2INBDP (**65**). Ambos análogos presentan en la zona visible del espectro excelentes propiedades de absorción ( $\lambda_{\text{abs máx}} = 529\text{--}533\text{ nm}$ ) y emisión ( $\lambda_{\text{f máx}} = 537\text{--}553\text{ nm}$ ,  $\Phi_{\text{f}} > 0.5$ ), así como una considerable resistencia a la fotodegradación.

10. Los análogos citados de Edelfosina, ET-11C-2EtBDP (**62**) y ET-13C-2INBDP (**65**), inducen el mecanismo de apoptosis en células cancerosas de forma similar al fármaco original. Esta bioactividad, unida a sus convenientes propiedades fluorescentes, ha permitido utilizar estos compuestos para analizar con gran detalle interacciones del fármaco con la membrana plasmática y el retículo endoplásmico de levaduras modificadas genéticamente.

11. Se propone un método de síntesis general para la obtención de ceramidas-1-fosfato (C1P) a partir de esfingosina-1-fosfato (S1P). La síntesis transcurre en una etapa, sin necesidad de utilizar reacciones de protección-desprotección, y resuelve el problema de la solubilización de S1P mediante sililación *in situ* y posterior reacción. Este método se aplicó para la obtención, entre otras, de una ceramida conteniendo el grupo fluorescente NBD (7-nitro-4-benzofurazanamina).



## 6. Parte experimental



## 6 Parte experimental

### 6.1 Materiales y métodos

Todas las reacciones sensibles al oxígeno y a la humedad se han realizado bajo atmósfera inerte (argón) en material de vidrio seco, en algunos casos utilizando las técnicas estándar de Schlenk.

La mayoría de los disolventes empleados se destilaron bajo atmósfera de argón, inmediatamente antes de usarse, previamente refluidos sobre el desecante correspondiente<sup>1</sup>, o bien se obtuvieron secos y desoxigenados mediante un sistema de secado de disolventes *Pure Solv* (Scharlau). El DMSO (Fluka) se utilizó seco y se almacenó sobre tamiz molecular. Los productos de partida empleados en las síntesis fueron comerciales (Aldrich, Acros, Lancaster, Fluka, Merck) y se usaron sin purificar.

Las cromatografías “flash” en columna se efectuaron sobre gel de sílice Merck de 230-400 mesh ASTM. Para la cromatografía en capa fina se utilizaron cromatofolios de gel de sílice sobre aluminio Merck 60F254, 0.25 mm. La resina mixta de intercambio iónico TMD-8 (MB-3A) fue suministrada por Sigma. Las ceramidas se purificaron mediante una columna C<sub>18</sub> de fase inversa (Biotage SP4).

Los compuestos con grupo polieno conjugado son inestables en medio ácido, en atmósfera de aire o al ser iluminados. Por ello, todas las reacciones en las que intervienen estos compuestos se han llevado a cabo sin iluminación directa y en atmósfera de argón.

Las reacciones de hidrogenación se llevaron a cabo en un hidrogenador Parr a presiones comprendidas entre 1.4 y 2.7 atm según el caso.

Los espectros <sup>1</sup>H-RMN se han realizado en los siguientes equipos: Varian Gemini FT-200, Inova FT-300, Inova 400, Mercury FT-400 y Bruker Avance 300 y 400. Los datos se dan en ppm (escala  $\delta$ ), utilizando como referencia interna la traza de disolvente sin deuterar. Los multipletes complejos (m) se dan como señales únicas o como intervalos, y la multiplicidad del resto de las señales se expresa como sigue: singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuádruplete (c), quintuplete (q), doble doblete (dd) y doble triplete (dt).

Los espectros <sup>13</sup>C-RMN se han realizado en los mismos equipos, usando como referencia la señal del disolvente deuterado. Las asignaciones de carbonos y protones se basan en experimentos DEPT, COSY, HSQC, HMBC y NOESY. Las proporciones de

---

<sup>1</sup> Perrin, D. D., Armarego, W. L. F., Perrin, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*, **1981**, Pergamon Press.

isómeros (*E*)/(*Z*) se calcularon mediante las integrales relativas de señales características en los espectros  $^1\text{H-RMN}$  y, en algunos casos, mediante análisis HPLC.

Los espectros IR se han realizado en dos aparatos con transformada de Fourier: Perkin-Elmer 681 y FT-Spectrum One. En cada caso se indican las bandas más significativas, expresadas en  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de masas de baja resolución se realizaron por impacto electrónico (EI) (70 eV) en un espectrómetro Hewlett-Packard 5973 mediante inyección directa, y por electrospray en el modo positivo ( $\text{ESI}^+$ ) en un espectrómetro Hewlett-Packard 1100. Los espectros de masas de alta resolución se determinaron en un espectrómetro AutoSpec Micromass (Waters) en el modo L-SIMS usando  $\text{Cs}^+$  (30 kV) en matriz de *m*-NBA y con PEG como patrón interno, o en un espectrómetro Bruker Daltonics 9.4T APEX-III FT-MS, en el modo PEAK MATCHING empleando un hidrocarburo perfluorado como patrón de masa exacta.

Los puntos de fusión se midieron en un microscopio con calefacción Reichert-Kofler y están sin corregir.

El análisis elemental se llevó a cabo en un microanalizador Carlo Erba CHN-1108.

Los análisis HPLC se realizaron a temperatura ambiente en un equipo Agilent 1100 equipado con un inyector de 20  $\mu\text{L}$ , una columna de fase inversa Agilent Eclipse XDB-C18 (15  $\times$  4.6 cm, 5  $\mu\text{m}$ ) y un detector de diodos de onda multilongitud, utilizando como longitudes de onda analíticas las que se especifican en cada caso, y como eluyentes mezclas  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} + 10 \text{ mM H}_3\text{PO}_4$  o  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ , con el flujo indicado en cada caso.

Los espectros UV-Vis se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2, mientras que los espectros de fluorescencia se obtuvieron empleando un espectrofluorímetro PC1 (ISS, EEUU).

Los espectros de emisión se corrigieron utilizando factores de corrección determinados previamente en el laboratorio mediante una lámpara patrón de filamento de wolframio. Estos factores eliminan el efecto de la diferente sensibilidad de los elementos ópticos y del detector del canal de emisión del fluorímetro, en función de la longitud de onda.

Para la medida del coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ) se prepararon disoluciones de concentraciones comprendidas entre  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  M en el disolvente indicado en cada caso, que corresponden a cantidades del orden de 2-10 mg del compuesto. Se usó para la pesada una balanza de precisión Sartorius BP 211D ( $d = 0.01\text{mg}$ ). Se diluyó con el mismo disolvente hasta preparar disoluciones de concentración  $\mu\text{M}$ . En las medidas de

fluorescencia, se utilizaron disoluciones con densidades ópticas  $< 0.1$ , para evitar fenómenos de filtro interno.

Para la determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_F$ ) se utilizó como patrón una disolución de sulfato de quinina en ácido sulfúrico 0.05 M ( $\Phi_{FSQ} = 0.51$ ),<sup>2</sup> en el caso de los análogos poliénicos, y el colorante PM567 ( $\Phi_{FPM567_{MeOH}} = 0.91$ )<sup>3</sup> en el mismo disolvente que la muestra a analizar, en el caso de los análogos con grupo BODIPY. La muestra y la disolución patrón se prepararon de manera que su absorbancia fuese similar, y siempre inferior a 0.1. El rendimiento cuántico se obtiene utilizando la expresión de Parker y Rees (Ecuación 6.1),<sup>4</sup> donde  $A_{muestra}$  y  $A_{referencia}$  son las absorbancias para la muestra y el patrón,  $S_{muestra}$  y  $S_{referencia}$  son las respectivas áreas de los espectros corregidos, y  $\eta_{muestra}$  y  $\eta_{referencia}$  son los índices de refracción de cada disolución a la temperatura de trabajo.

$$\Phi_{F-muestra} = \Phi_{F-referencia} \frac{A_{referencia}}{A_{muestra}} \frac{S_{muestra}}{S_{referencia}} \left( \frac{\eta_{muestra}}{\eta_{referencia}} \right)^2$$

Ecuación 6.1. Expresión de Parker y Rees

Para determinar la termoestabilidad de los análogos poliénicos se midió a diferentes tiempos y a temperatura ambiente la absorbancia a 368 nm de una disolución  $6.6 \times 10^{-6}$  M en cada disolvente, mantenida a resguardo de la luz directa.

## 6.2 Análisis de fósforo.

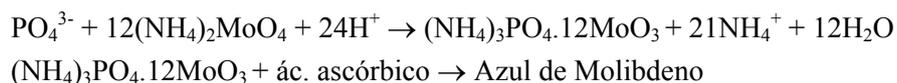
Los análisis de fósforo total se llevaron a cabo siguiendo básicamente un procedimiento descrito previamente,<sup>5</sup> consistente en la conversión del fósforo del fosfolípido en fosfato inorgánico,  $PO_4^{3-}$ , con ácido perclórico. Este fosfato se convierte a continuación en fosfomolibdato con molibdato amónico o con heptamolibdato amónico y, finalmente, el fosfomolibdato formado se valora a partir del espectro de absorción, tras formar Azul de Molibdeno por reducción con ácido ascórbico. Las reacciones se muestran a continuación:<sup>5</sup>

<sup>2</sup> Demas, J. N., Crosby, G. A. *J. Phys. Chem.* **1971**, 75, 991-1024.

<sup>3</sup> Lopez Arbeloa, F., Lopez Arbeloa, T., Lopez Arbeloa, I., Garcia Moreno, I., Costela, A., Amat-Guerri, F. *Chem. Phys.* **1998**, 236, 331-341.

<sup>4</sup> Parker, C. A., Rees, W. T. *Analyst* **1960**, 85, 587-593.

<sup>5</sup> Mrsny, R. J., Volwerk, J. J., Griffith, O. H. *Chem. Phys. Lipids* **1986**, 39, 185-191.



El protocolo seguido ha sido el siguiente: el fosfolípido a analizar se pesa y se disuelve en un volumen conocido de etanol. Volúmenes de esta disolución, cada una con un contenido en fósforo de menos de 10  $\mu\text{g}$ , se pasan a matraces Kjeldahl y el disolvente se evapora a sequedad con corriente de aire, nitrógeno o argón. Se preparan de modo similar al menos tres muestras de una disolución en agua de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , que servirán para el calibrado, y un blanco. Se añaden 0.60 mL de ácido perclórico al 70% (6.97 M) a cada matraz y se calienta a 180  $^\circ\text{C}$ , en vitrina, a reflujo suave, durante 2 h. Se enfría a temperatura ambiente, se añaden 2.5 mL de agua, 0.5 mL de heptamolibdato amónico tetrahidrato ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) al 2.5% p/v en agua (0.020 M), 0.5 mL de disolución acuosa de ácido ascórbico al 10% (0.568 M) y, por último, 1 mL de agua. Las disoluciones se calientan en los mismos matraces a 80-100  $^\circ\text{C}$  (baño de agua) durante 7 min, con lo que se forma el colorante de color azul intenso. Se enfría a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 820 nm en cubetas de 1 cm de paso óptico. No deben utilizarse absorbancias superiores a 1 (preferiblemente inferiores a 0.7). La pendiente (valor cercano a 6-7) de la recta de calibrado [ $\mu\text{g}$  de fósforo del patrón ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) vs. absorbancia a 820 nm] permite conocer los microgramos de fósforo en la muestra analizada.

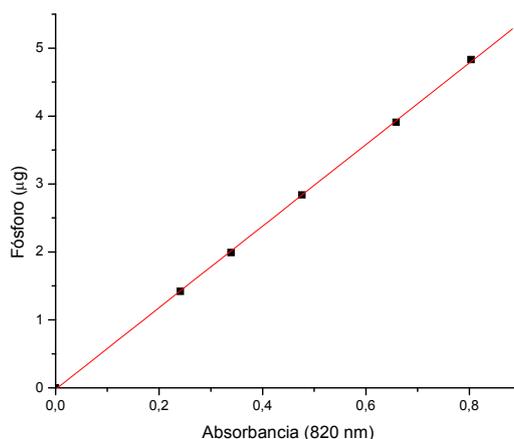
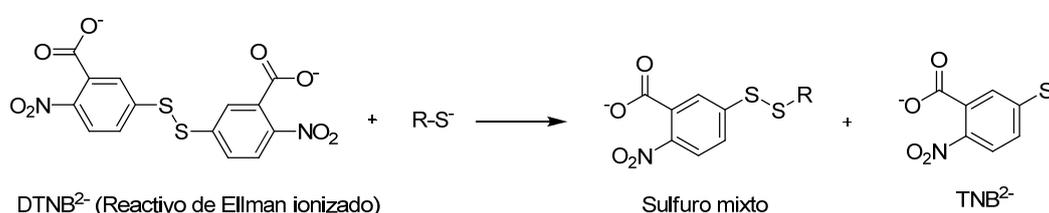


Figura 6.1. Recta de calibrado típica para la determinación de fósforo. Error relativo en la determinación:  $\pm 4\%$ .

En la Figura 6.1 se muestra una recta de calibrado típica, determinada utilizando un fosfato inorgánico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) como patrón. El método se contrastó con la sal dipotásica del hexafosfato de inositol (sal del ácido fítico) (Sigma, 95+%), uno de los fosfatos orgánicos más difíciles de mineralizar.

### 6.3 Análisis de tioles

Se utilizó la reacción de Ellman,<sup>6</sup> en la que el ácido 5,5'-ditio-*bis*(2-nitrobenzóico) (DTNB) reacciona en medio básico con los grupos tiolato para dar la mezcla de disulfuro y ácido 2-nitro-5-mercaptobenzóico (TNB) (Esquema. 6.1). El dianión  $\text{TNB}^{2-}$  es una especie fuertemente coloreada ( $\epsilon_{412} = 14.150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) cuya concentración se determina por espectrofotometría de absorción. El valor del coeficiente de absorción no depende del pH entre 7.6 y 8.6, aunque sí varía en función del disolvente.<sup>7</sup> El grado de conversión de esta reacción depende en gran medida del pH, del tiol a valorar y de factores estéricos.



Esquema 6.1. Valoración de sulfuros mediante el reactivo de Ellman

El protocolo seguido ha sido el siguiente: se prepara una recta de calibrado utilizando tres disoluciones de hidrocloreto de cisteína, con concentraciones comprendidas entre 0.25 mM y 1.25 mM, en tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M de pH 8, conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) (1 mM). Se pesa y se disuelve, en el mismo tampón, una muestra del tiol a analizar, con una concentración final dentro del entorno de la recta de calibrado. En distintos viales se colocan 250  $\mu\text{L}$  de cada disolución de hidrocloreto de cisteína, de la muestra a analizar y de un blanco. Se añaden a cada disolución 50  $\mu\text{L}$  de reactivo de Ellman (4 mg/mL) y 2.5 mL de tampón y se incuba en un baño de ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente. Se mide entonces la absorbancia a 412 nm en cubetas de 1 cm de paso óptico.

<sup>6</sup> Ellman, G. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, 82, 70-77.

<sup>7</sup> Riddles, P. W., Blakeley, R. L., Zerner, B. *Anal. Biochem.* **1979**, 94, 75-81.

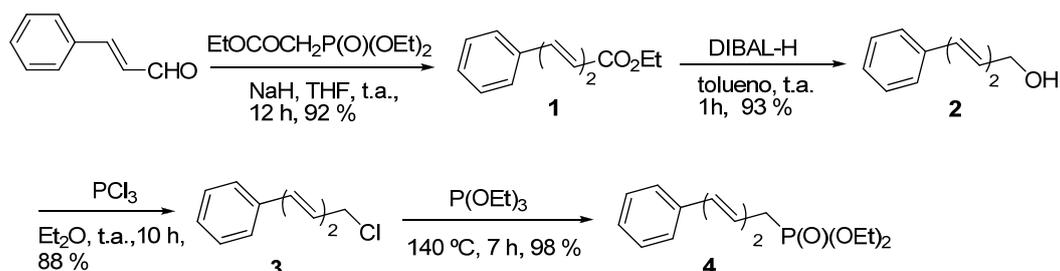
En el análisis de MT-16C-SH (**72**), en general, se han observado valores algo inferiores a lo esperado, debido probablemente a que la reacción no llega a su fin, tal vez por estar los grupos tiol protegidos en el interior de micelas generadas por este mismo compuesto.

## 6.4 Análogos fluorescentes poliénicos

### 6.4.1 Síntesis de productos de partida

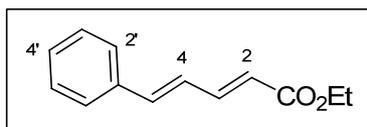
#### 6.4.1.1 Síntesis del fosfonato (4)

Se obtuvo a partir de *trans*-cinamaldehído en 4 pasos que dieron lugar al isómero todo-(*E*) (Esquema 6.2):<sup>9</sup>



Esquema 6.2. Obtención de (2*E*,4*E*)-5-fenilpenta-2,4-dienilfosfonato de dietilo

##### 6.4.1.1.1 (2*E*,4*E*)-5-Fenilpenta-2,4-dienoato de etilo (1)



Producto de síntesis descrita, se obtuvo por el mismo procedimiento.<sup>8</sup>

Sobre una suspensión de NaH (60 % en aceite mineral) (1.97 g, 49.1 mmol) en THF seco (40 mL) se adicionó en pequeñas porciones, con agitación, a 0°C y bajo atmósfera de argón, una disolución de fosfonoacetato de trietilo (9 mL, 45.4 mmol) en THF (10 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 0.5 h, se añadió (*E*)-cinamaldehído (4.8 mL, 37.8 mmol) en THF (30 mL) y se agitó durante 12 h más. Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) y H<sub>2</sub>O (25 mL), se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×20 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaCl (30 mL), se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se evaporó el disolvente del

<sup>8</sup> Quesada, E., Delgado, J., Gajate, C., Mollinedo, F., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. J. *Med. Chem.*, **2004**, *47*, 5333-5335.

filtrado a vacío y el residuo se cromatografió en columna de gel de sílice, usando como eluyente la mezcla hexano/AcOEt 9:1. Aceite amarillento. Rendimiento: 7.01 g (92%).

**TLC** (hexano/AcOEt 4:1):  $R_f = 0.75$ .

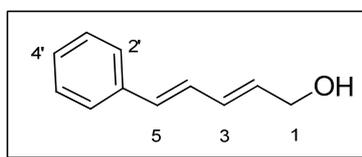
**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.31 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 4.23 (c,  $J = 7.2$  Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 5.99 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1 H, H-2), 6.88 (m, 2 H, H-4, H-5), 7.52-7.25 (m, 6 H, 5 H-Ph, H-3) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  14.3 ( $\text{CH}_3$ ), 60.2 ( $\text{CH}_2$ ), 121.3 (C-2), 126.2 (C-4), 127.1 (C-3', C-5'), 128.7 (C-2', C-6'), 128.9 (C-4'), 136.0 (C-1'), 140.3 (C-5), 144.4 (C-3), 166.9 (C-1) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2984, 1703 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1625, 1450, 1367, 1343, 1297, 1240, 1133, 1007, 844, 763, 715, 692  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 202 (43) [ $\text{M}^+$ ], 157 (34), 129 (100).

#### 6.4.1.1.2 (2E,4E)-5-Fenilpenta-2,4-dien-1-ol (**2**)



Producto descrito, se obtuvo por el mismo procedimiento.<sup>8</sup>

Sobre el éster **1** (0.5 g, 2.47 mmol), se añadió gota a gota y con agitación una disolución de DIBAL-H 1 M en tolueno (6.25 mL, 6.25 mmol), a temperatura ambiente y bajo atmosfera de argón. Se mantuvo la mezcla en estas condiciones 1 h, se añadieron unas gotas de disolución acuosa saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hasta el fin de la efervescencia y, tras añadir agua (20 mL), la mezcla se extrajo tres veces con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se secó la fase orgánica con  $\text{MgSO}_4$  y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se cromatografió en columna de sílice con hexano/AcOEt 7:3. Se obtuvo así el alcohol **2** como un sólido blanco. Rendimiento: 370 mg (93 %).

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.65$ .

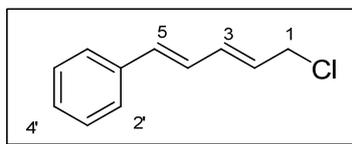
**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.21 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1 H, OH), 4.17 (m, 2 H, H-1), 5.87 (td,  $J = 6.0, 15.3$  Hz, 1 H, H-2), 6.36 (tdd,  $J = 1.4, 10.5, 15.3$  Hz, 1 H, H-3), 6.49 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1 H, H-5), 6.74 (dd,  $J = 10.5, 15.6$  Hz, 1 H, H-4), 7.17 (m, 1 H, H-4'), 7.24 (m, 2 H, H-3', H-5'), 7.32 (m, 2 H, H-2', H-6') ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  63.4 (C-1), 126.4 (C-2', C-6'), 127.6 y 128.1 (C-4', C-4), 128.6 (C-3', C-5'), 131.6, 132.5 y 132.8 (C-2, C-3, C-5), 137.1 (C-1') ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3425 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 989, 744, 690  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 160 (48) [ $\text{M}^+$ ], 141 (22), 128 (45), 115 (55), 104 (100), 91 (61), 77 (18).

#### 6.4.1.1.3 Cloruro de (2E,4E)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ilo (3)



Producto de síntesis descrita, se obtuvo por el mismo procedimiento.<sup>9</sup>

Sobre una disolución del alcohol **2** (400 mg, 2.5 mmol) en éter dietílico seco (10 mL) se añadió tricloruro de fósforo (80  $\mu\text{L}$ , 0.91 mmol) bajo atmósfera de argón, a 0 °C y con agitación, y la mezcla se mantuvo en estas condiciones 5 min y a temperatura ambiente 10 h. Se añadió agua (10 mL) y se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 $\times$ 10 mL). Se lavaron las fases orgánicas reunidas con una disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y luego con agua y se secaron con la mezcla  $\text{MgSO}_4/\text{CaCl}_2$  9:1 para eliminar trazas del alcohol **2**. Se eliminó el disolvente a vacío, obteniéndose el cloruro **3** como un sólido amarillo. Rendimiento: 390 mg (88 %).

**TLC** (hexano/ $\text{AcOEt}$  1:1):  $R_f$  = 0.95.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.20 (dd,  $J$  = 1.0, 7.4 Hz, 2 H, H-1), 5.93 (dt,  $J$  = 14.9, 7.4 Hz, 1 H, H-2), 6.46 (dd,  $J$  = 10.4, 14.9 Hz, 1 H, H-3), 6.60 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1 H, H-5), 6.8 (dd,  $J$  = 10.4, 15.6 Hz, 1 H, H-4), 7.24 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 1 H, H-4'), 7.33 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2 H, H-3', H-5'), 7.41 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 2 H, H-2', H-6') ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  45.3 (C-1), 126.6 (C-2', C-6'), 127.3, 127.9 y 128.5 (C-2, C-4, C-4'), 128.6 (C-3', C-5'), 134.3 y 134.6 (C-3, C-5), 136.7 (C-1') ppm.

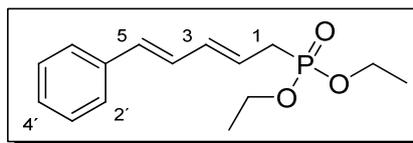
**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3014, 2949, 1636, 1447, 1255, 1073, 994, 818, 758, 694, 668  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 178 (no detectable) [masa nominal,  $\text{M}^+$ ], 142.1 (74), 128 (100), 115 (82), 91 (53).

**Análisis**: Calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{Cl}$  (178.66): C, 73.95; H, 6.21. Encontrado: C, 73.78; H, 6.35.

<sup>9</sup> Beck, A., Heissler, D., Duportail, G. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1459-1472.

#### 6.4.1.1.4 (2E,4E)-5-Fenilpenta-2,4-dienilfosfonato de dietilo (4)



Producto de síntesis descrita, se obtuvo mediante el mismo procedimiento con ligeras variantes.<sup>9</sup>

Una disolución del cloruro **3** (400 mg, 2.24 mmol) en fosfito de trietilo (5 mL) se calentó a 140 °C durante 7 h en un matraz provisto de un tubo de cloruro cálcico. El exceso de fosfito de trietilo se eliminó por destilación en un horno de bolas bajo presión reducida (120-140 °C, 0.1-0.5 mm Hg), obteniéndose un aceite viscoso amarillo que solidificó al aire. Rendimiento: 620 mg (98 %).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.32 (t, *J* = 7.0 Hz, 6 H, 2 x CH<sub>3</sub>), 2.71 (dd, *J* = 7.8, 22.7 Hz, 2 H, H-1), 4.12 (q, 7.0 Hz, 4 H, 2 x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.77 (td, *J* = 7.8, 15.4 Hz, 1 H, H-2), 6.34 (m, 1 H, H-3), 6.50 (d, *J* = 16.5 Hz, 1 H, H-5), 6.77 (dd, *J* = 10.7, 15.5 Hz, 1 H, H-4), 7.2 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H, H-4'), 7.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H, H-3', H-5'), 7.39 (d, *J* = 7.3 Hz, 2 H, H-2', H-6') ppm.

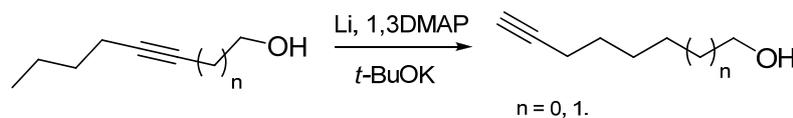
<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 16.5 (CH<sub>3</sub>), 30.9 (d, *J* = 143 Hz, C-1), 62.1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 122.6 (d, *J* = 51 Hz, C-2), 126.3 (C-2', C-6'), 127.6 y 128.3 (C-4, C-4'), 128.6 (C-3', C-5'), 132.0 (C-5), 135.1 y 135.3 (C-1', C-3) ppm.

FT-IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2983, 2934, 2905, 1720, 1674, 1598, 1495, 1449, 1393, 1246, 1026, 753 cm<sup>-1</sup>.

MS-ESI<sup>+</sup>, *m/z* (%): 281 [M+H<sup>+</sup>], 561 [2M+H<sup>+</sup>].

#### 6.4.1.2 Síntesis de alquinoles terminales

Para su obtención se siguió un procedimiento descrito para isomerizar alquinos no terminales a alquinos terminales (isomerización *zipper*)<sup>10</sup> (Esquema 6.3.).

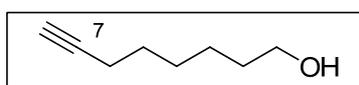


Esquema 6.3. Isomerización *zipper* de alquinos

<sup>10</sup> Hopf, H., Krüger, A. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4378-4385.

Una suspensión de litio (660 mg, 95 mmol) en 1,3-diaminopropano (50 mL), de color azul intenso, se calentó a 80 °C con agitación, hasta que la suspensión adquirió color blanco (2 h). Se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se añadió <sup>t</sup>BuOK (6.33 g, 56.4 mmol) en una sola porción. La mezcla se tornó anaranjada de inmediato. Se mantuvo la mezcla con agitación durante 15 min y se añadió el alquínol correspondiente (14 mmol) gota a gota. Tras 2 h, se vertió la mezcla de reacción sobre hielo y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 30 mL), la fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 10% (3 × 30 mL), disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 × 30 mL) y H<sub>2</sub>O (3 × 30 mL), se secó la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se eliminó el disolvente y el residuo se destiló a presión reducida, obteniéndose en todos los casos el alquínol correspondiente como un líquido amarillo.

#### 6.4.1.2.1 Oct-7-in-1-ol (5)



Se obtuvo a partir de oct-3-in-1-ol (14 mmol, 1.76 g). Rendimiento: 1.49 g (85 %).

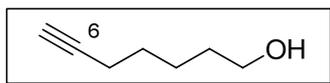
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.31-1.46 (m, 4 H, H-3, H-4), 1.55 (m, 4 H, H-2, H-5), 1.94 (t, *J* = 2.7 Hz, 1 H, H-8), 2.19 (td, *J* = 7.0, 2.7 Hz, 2 H, H-6), 3.64 (t, *J* = 6.6 Hz, 2 H, H-1) ppm

<sup>13</sup>C-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 18.7 (C-6), 25.6, 28.8 (C-3, C-4), 28.9 (C-5), 33.0 (C-2), 63.3 (C-1), 70.0 (C-8), 85.0 (C-7) ppm

FT-IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3305 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2935, 2855, 2115, 1458 1429, 1055, 1031, 999, 901 cm<sup>-1</sup>.

MS-ESI<sup>+</sup>, *m/z*: 127 [M+H<sup>+</sup>], 149 [M+Na<sup>+</sup>], 275 [2M+Na<sup>+</sup>].

#### 6.4.1.2.2 Hept-6-in-1-ol (6)



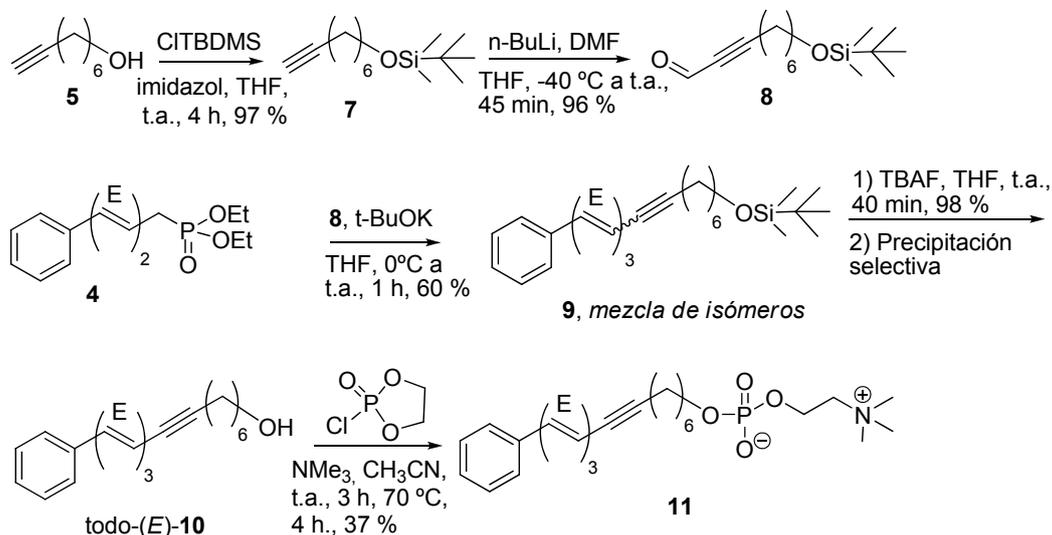
Se obtuvo a partir de hept-2-in-1-ol (14 mmol, 1.56 g). Rendimiento: 1.30 g (83 %).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.37-1.63 (m, 6 H, H-2, H-3, H-4), 1.94 (t, *J* = 2.6 Hz, 1 H, H-7), 2.20 (td, *J* = 6.8, 2.6 Hz, 2 H, H-5), 3.65 (t, *J* = 5.9 Hz, 2 H, H-1) ppm.

## 6.4.2 Síntesis de análogos de Miltefosina con grupo feniltrienino (PTRI)

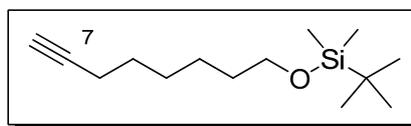
### 6.4.2.1 Método 1. Síntesis de MT-6C-PTRI (11)

Obtenido en 5 pasos a partir de oct-7-in-1-ol (**5**) y el fosfonato **4** (Esquema 6.4):



Esquema 6.4. Obtención del análogo **11** utilizando el método 1

#### 6.4.2.1.1 *tert*-Butildimetil-(oct-7-inilo)xilano (**7**)



Se siguió un procedimiento descrito para un compuesto similar.<sup>11</sup>

Una mezcla de oct-7-in-1-ol (2.05 g, 16.24 mmol), cloruro de *tert*-butildimetilsililo (TBDMSCl) (2.69 g, 17.87 mmol) e imidazol (1.44 g, 21.11 mmol) en THF (25 mL) se agitó 4 h a temperatura ambiente. Después de diluir con hexano (20 mL), se filtró el cloruro de imidazolio insoluble, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se cromatografió en columna de gel de sílice con la mezcla hexano/AcOEt 9:1. Aceite incoloro. Rendimiento: 3.66 g (97%).

<sup>11</sup> Guay, B., Deslongchamps, P. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6140-6148.

**TLC** (hexano/AcOEt 1:9):  $R_f = 0.75$ .

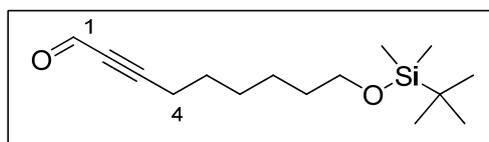
**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C):  $\delta$  0.06 (s, 6 H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.89 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.31-1.46 (m, 4 H, H-3, H-4), 1.52 (m, 4 H, H-2, H-5), 1.94 (t,  $J = 2.7$  Hz, 1 H, H-8), 2.19 (td,  $J = 7.0, 2.7$  Hz, 2 H, H-6), 3.60 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2 H, H-1) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C):  $\delta$  -4.9 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 15.7 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 18.5 (C-6), 26.1 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 25.7, 28.8 (C-3, C-4), 28.9 (C-5), 33.1 (C-2), 63.6 (C-1), 68.5 (C-8), 85.1 (C-7) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 2933, 2858, 1472, 1461, 1388, 1361, 1255, 1101, 1005, 937, 836, 775, 629  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ESI $^+$** ,  $m/z$ : 241 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ].

#### 6.4.2.1.2 9-(*terc*-Butildimetilsiloxi)non-2-inal (8)



Obtenido por formilación de Vilsmeier-Haack siguiendo un procedimiento descrito para un compuesto similar.<sup>11</sup>

Sobre una disolución del alquino **7** (1.90 g, 7.90 mmol) en THF (20 mL) a -40 °C, se añadió otra disolución de *n*-butillitio 1.6 M en hexano (4.93 mL, 7.90 mmol) y DMF anhidra (866 mg, 914  $\mu\text{L}$ , 11.85 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante 45 min con agitación, y se transfirió, vía cánula, sobre una mezcla a 0 °C de una disolución acuosa de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 %) y éter etílico. Se agitó, se decantó y la fase acuosa se extrajo con éter. Las fases orgánicas reunidas se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se evaporó el disolvente a vacío y el residuo se cromatografió en columna de gel de sílice usando como eluyente la mezcla hexano/AcOEt 9:1. Aceite incoloro. Rendimiento: 2.02 g (96%).

**TLC** (hexano/AcOEt, 9:1):  $R_f = 0.5$ .

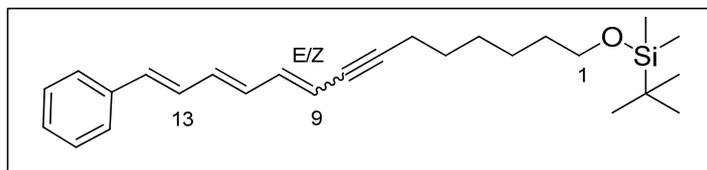
**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.04 (s, 6 H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.89 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.31-1.46 (m, 4 H, H-6, H-7), 1.56 (m, 4 H, H-2, H-5), 2.42 (td,  $J = 7.0, 0.6$  Hz, 2 H, H-4), 3.60 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2 H, H-9), 9.18 (t,  $J = 0.6$  Hz, 1 H, H-1) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):  $\delta$  -4.9 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 18.7 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.5 (C-4), 26.3 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 25.6, 29.0 (C-6, C-7), 28.9 (C-8), 33.1 (C-5), 63.6 (C-9), 82.1 (C-2), 99.7 (C-3), 177.6 (C-1) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2932, 2858, 2275, 2231, 2202, 1710, 1673, 1472, 1385, 1360, 1255, 1100, 1002, 836, 776  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ESI<sup>+</sup>**,  $m/z$ : 269  $[\text{M}+\text{H}^+]$ .

**6.4.2.1.3 *tert*-Butildimetil-(14-feniltetradeca-9,11,13-trien-7-iniloxi)silano (mezcla todo-(*E*)/(9*Z*,11*E*,13*E*) 9:1 (9))**



Se obtuvo por reacción de Wittig-Horner.<sup>12</sup>

Sobre una disolución del aldehído **8** (675 mg, 2.51 mmol) y el fosfonato **4** (846 mg, 3.02 mmol) en THF seco (20 mL) se adicionó lentamente una suspensión de *tert*-butóxido potásico (340 mg, 3.02 mmol) en THF seco (7 mL) con agitación, a 0°C y bajo atmósfera de argón. Se agitó la mezcla de reacción durante 1 h a temp. ambiente y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se cromatografió en columna de sílice con hexano/AcOEt 9:1 como eluyente, obteniéndose el compuesto **9** como una mezcla 1:9 de isómeros (9*Z*)(9*E*). Sólido amarillo. Rendimiento: 590 mg (60 %).

**TLC** (hexano/AcOEt, 9:1):  $R_f = 0.7$

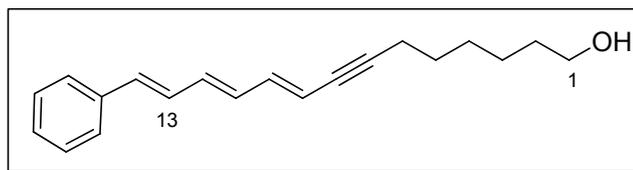
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C):  $\delta$  0.05 (s, 6 H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.90 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.31-1.46 (m, 4 H, H-3, H-4), 1.54 (m, 4 H, H-2, H-5), 2.35 (td,  $J = 7.0, 2.1$  Hz, 1.8 H, H-6 isómero 9*E*), 2.43 (td,  $J = 7.0, 2.2$  Hz, 0.2 H, H-6 isómero 9*Z*), 3.61 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, H-1), 5.46 (dt,  $J = 10.2, 2.2$  Hz, 0.1 H, H-9 isómero 9*Z*), 5.64 (dt,  $J = 15.2, 2.1$  Hz, 0.9 H, H-9 isómero 9*E*), 6.42 (m, 2 H, H-11, H-12), 6.59 (dd,  $J = 10.5, 15.5$  Hz, 1 H, H-10), 6.59 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1 H, H-14), 6.86 (m, 1 H, H-13), 7.22 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1 H,  $\text{H}_p$ ), 7.31 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H,  $\text{H}_m$ ), 7.3 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2 H,  $\text{H}_o$ ) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C), isómero (*E*):  $\delta$  -4.9 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 18.7 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 20.1 (C-6), 26.4 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 25.8, 28.9, 29.1, 33.1 (C-2 to C-5), 63.6 (C-1), 80.8 (C-8), 94.9 (C-7), 112.5 (C-9), 126.8 ( $\text{C}_o$ ), 128.1 ( $\text{C}_p$ ), 129.1 ( $\text{C}_m$ ), 129.2, 133.0, 140.9 (C-11 a C-13), 134.0, 134.6 (C-10, C-14), 137.6 ( $\text{C}_i$ ) ppm. La baja proporción de isómero (*Z*) impidió la asignación de sus señales.

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 394 (15)  $[\text{M}^+]$ , 337 (4), 263 (7), 193 (22), 178 (30), 165 (22), 117 (51).

<sup>12</sup> Maryanoff, B. E., Reitz, A. B. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863-927.

#### 6.4.2.1.4 todo-(*E*)-14-Feniltetradeca-9,11,13-trien-7-in-1-ol (OH-6C-PTRI) (todo-(*E*)-10)



Se obtuvo por desprotección del compuesto **9** (mezcla de isómeros) aplicando un procedimiento descrito,<sup>13</sup> y precipitación posterior del isómero todo-(*E*).

Sobre una disolución del sililéter **9** (mezcla de isómeros (*9Z*)/(*9E*) 1:9) (260 mg, 0.63 mmol) en THF seco (10 mL) se adicionó, a temperatura ambiente y con agitación, una disolución 1 M de fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en THF (0.95 mL). Se agitó la mezcla en estas condiciones 20 min, se añadieron 0.50 mL más de la disolución de TBAF y se mantuvo la mezcla con agitación durante otros 20 min. Se evaporó el disolvente a vacío y el producto se purificó en columna de sílice con hexano/AcOEt 7:3. Se obtuvo así el alcohol como un sólido amarillo. Rendimiento: 180 mg (98%). El isómero todo-(*E*)-**10** se separó puro del correspondiente isómero (*9Z*,11*E*,13*E*) precipitándolo con *n*-pentano de una disolución en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la mezcla (*9Z*)/(*9E*) 1:9. pf 98-100 °C .

Datos de todo-(*E*)-**10**:

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.65$ .

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta$  1.31-1.48 (m, 4 H, H-3, H-4), 1.58 (m, 4 H, H-2, H-5), 2.37 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2 H, H-6), 3.66 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2 H, H-1), 5.64 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1 H, H-9), 6.41 (m, 2 H, H-11, H-12), 6.59 (dd,  $J = 9.2, 15.2$  Hz, 1 H, H-10), 6.59 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1 H, H-14), 6.86 (dd,  $J = 9.5, 15.3$  Hz, 1 H, H-13), 7.22 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1 H, H<sub>p</sub>), 7.32 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, H<sub>m</sub>), 7.40 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, H<sub>o</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta$  20.1 (C-6), 25.7, 29.1, 29.1, 33.1 (C-2 a C-5), 63.4 (C-1), 80.8 (C-8), 94.9 (C-7), 112.4 (C-9), 126.8 (C<sub>o</sub>), 128.1 (C<sub>p</sub>), 129.1 (C<sub>m</sub>), 129.1 (C-13), 132.9, 134.1, 134.7, 141.0 (C-10, C-11, C-12, C-14), 137.6 (C<sub>i</sub>) ppm.

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 280 [M<sup>+</sup>] (43), 193 (45), 179 (100), 165 (58), 152 (21), 141 (25), 128 (29), 115 (63), 91 (80).

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3435, 2927, 2855, 2208, 1631, 1447, 1071, 995, 746, 688 cm<sup>-1</sup>.

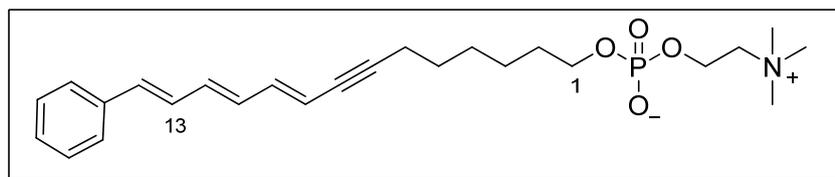
<sup>13</sup> Sneddon, H. F., Gaunt, M. J., Ley, S. V. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1147-1150.

**HPLC** (columna de fase inversa C<sub>18</sub>, MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1, 1.8 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}}$  356, 345, 250 nm):  $R_t = 3.06$  min (100% de pureza a dichas  $\lambda$ ).

**Absorción:** UV-VIS (DMF):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 326 (42000), 342 (63000), 360 (52000).

**Emisión** (DMF, corregido):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) 400, 421, 446 (máx), 471. Rendimiento cuántico de fluorescencia: 0.07; disolución  $\sim 10^{-6}$  M.

#### 6.4.2.1.5 todo-(*E*)-14-Feniltetradeca-9,11,13-trien-7-in-1-ilfosfatidilcolina (MT-6C-PTRI) (11)



Se obtuvo mediante el siguiente método general, también empleado en la obtención de otros fosfolípidos descritos en esta memoria:<sup>8</sup>

Sobre una disolución de todo-(*E*)-10 (70 mg, 0.25 mmol) en acetonitrilo (10 mL) en un tubo de presión a  $-78$  °C se condensó trimetilamina (ca. 2 mL) bajo atmósfera de argón y se añadió después 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-óxido (0.05 mL, 0.55 mmol). Se cerró el reactor y se mantuvo la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 3 h y después a 80 °C durante 4 h. Se enfrió a temperatura ambiente, se abrió el reactor y se eliminó a vacío el disolvente y el exceso de trimetilamina. El sólido residual se disolvió en THF/H<sub>2</sub>O 9:1, se añadió Amberlita MB-3 y se agitó la mezcla durante 10 min. Se separó la resina por filtración, se lavó con MeOH y se eliminaron los disolventes a vacío. El residuo se cromatografió en columna de gel de sílice utilizando sucesivamente como eluyentes CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1 y CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 65:25:3. El aceite amarillento aislado se purificó por precipitación, añadiendo acetona a una disolución concentrada en CHCl<sub>3</sub>. Sólido amarillento. Rendimiento: 41 mg (37 %), pf 179-182 °C.

**TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 65:25:5):  $R_f = 0.25$ .

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C):  $\delta$  1.40-1.53 (m, 4 H, H-3, H-4), 1.58 (m, 2 H, H-5), 1.70 (m, 2 H, H-2), 2.40 (td,  $J = 6.6, 2.1$  Hz, 2 H, H-6), 3.26 (s, 9 H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.66 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>N), 3.93 (c,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, H-1), 4.29 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) 5.70 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1 H, H-9), 6.45-6.56 (m, 2 H, H-11, H-12), 6.62 (m, 1 H, H-10), 6.66 (d,  $J =$

15.6 Hz, 1 H, H-14), 6.93 (dd,  $J = 9.7$ , 15.6 Hz, 1 H, H-13), 7.24 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1 H, H<sub>p</sub>), 7.34 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, H<sub>m</sub>), 7.46 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, H<sub>o</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta$  20.6 (C-6), 26.8, 30.0, 30.3, 32.2 (C-2 a C-5), 55.0, 55.1, 55.2 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 60.7 (d,  $J = 5.1$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 67.2 (d,  $J = 5.9$  Hz, C-1), 67.9 (s a), 81.8 (C-8), 95.2 (C-7), 113.5 (C-9), 127.9 (C<sub>o</sub>), 129.1 (C<sub>p</sub>), 130.1 (C-13), 130.3 (C<sub>m</sub>), 134.1, 135.2, 136.1, 142.1 (C-10, C-11, C-12, C-14), 139.1 (C<sub>i</sub>) ppm.

**MS-ESI<sup>+</sup>**,  $m/z$ : 446 [M+H<sup>+</sup>], 468 [M+Na<sup>+</sup>], 891 [2M+H<sup>+</sup>], 913 [2M+Na<sup>+</sup>].

**MS-HR** (peak matching): calculado para C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>4</sub>P+H 446.2454; encontrado 446.2452.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2940, 2207, 1674, 1479, 1229, 1085, 1060, 968, 923, 754 cm<sup>-1</sup>.

**Análisis**. Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>4</sub>P+1.5H<sub>2</sub>O (472.55): C, 63.54; H, 8.32; N, 2.96. encontrado: C, 63.24; H, 7.96; N, 3.06.

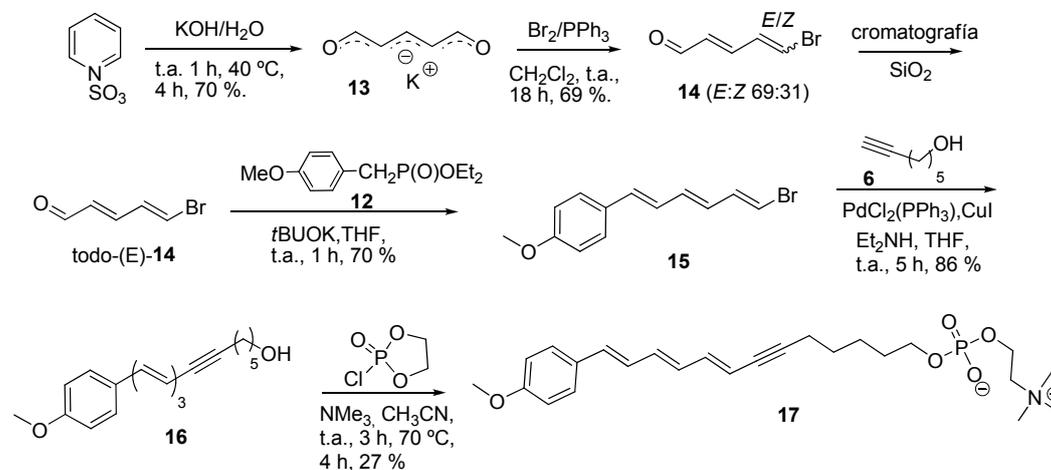
**HPLC** (columna de fase inversa C<sub>18</sub>, MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1+10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}}$  356, 345, 250 nm):  $R_t = 2.35$  min (100% de pureza a dichas  $\lambda$ ).

**Absorción**: UV-VIS (DMF):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 326 (38000), 342 (54000), 360 (44000). UV-VIS (DMSO):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 329 (43400), 345 (62100), 363 (51300). UV-VIS (MeOH):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 321 (43200), 335 (58000), 353 (52000). UV-VIS (THF):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) 326, 341, 358. UV-VIS (AcOEt):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) 323, 338, 355. UV-VIS (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) 322, 337, 354. UV-VIS (n-butanol):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) 324, 339, 356. UV-VIS (Hanks):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 323 (43000), 338 (58000), 355 (47500).

**Emisión** (DMF, corregido):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) 400, 422, 444, 472; (DMSO, corregido):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) 400, 425, 447, 475; (MeOH, corregido):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) 396, 418, 443, 470; (Hanks, corregido):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) 398, 422, 446, 470. Rendimiento cuántico de fluorescencia: 0.06 (disolución ~10<sup>-6</sup> M en DMF); 0.0025 (disolución ~10<sup>-6</sup> M en Hanks).

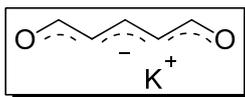
### 6.4.2.2 Método 2. Síntesis de MT-5C-OMePTRI (17)

Sintetizado en 5 pasos a partir de sulfonato de 1-piridinio, 4-metoxibencilfosfonato de dietilo (**12**) y hept-6-in-1-ol (**6**). (Esquema 6.5).



Esquema 6.5. Síntesis de MT-5C-OMePTRI (17)

#### 6.4.2.2.1 Sal potásica del gluconaldehído (13)



Producto de síntesis descrita, se obtuvo por el mismo procedimiento.<sup>14</sup>

Sobre una disolución de hidróxido potásico (43.55 g, 0.66 mol) al 85% en agua (88 mL), agitada mecánicamente y enfriada a -20 °C, se adicionó sulfonato de 1-piridinio (complejo trióxido de azufre-piridina) (25 g, 0.157 mol) y la mezcla se mantuvo a esta temperatura durante 1 h. A continuación se elevó la temperatura a 20 °C, se mantuvo así 4 h, se calentó a 40 °C durante 30 min y se enfrió a 5 °C. El sólido precipitado se filtró, se lavó con acetona (3 × 60 mL), con éter dietílico (50 mL) y se secó al aire. El sólido marrón obtenido (23 g) se calentó a reflujo en MeOH (500 mL) con carbón activo (1 g) durante 20 minutos. Tras enfriar a temperatura ambiente, el carbón activo se separó por filtración y la disolución resultante se concentró a vacío hasta un volumen de unos 20

<sup>14</sup> Becher, J. *Org. Synth* **1979**, *59*, 79.

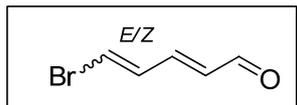
mL. Los cristales obtenidos se separaron por filtración, se lavaron con acetona ( $2 \times 20$  mL) y con éter etílico (20 mL), se secaron al aire y luego sobre  $P_2O_5$  a vacío. Cristales ligeramente amarillos. Rendimiento: 15 g (70 %), pf 352-356 °C.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  5.11 (dd,  $J = 9.2, 13.0$  Hz 2 H, H-2, H-4), 7.04 (t,  $J = 13.0$  Hz, 1 H, H-3), 8.66 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2 H, H-1, H-5) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  106.2 (C-2, C-4), 159.8 (C3), 184.3 (C-1, C-5) ppm.

UV-VIS (0.1 M KOH):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ ): 362 (69200).

#### 6.4.2.2.2 (2E,4E/Z)-5-Bromo-2,4-pentadienal (14)



Producto de síntesis descrita, se obtuvo por el mismo procedimiento.<sup>15</sup>

Sobre una disolución de  $PPh_3$  (14.8 g, 56.54 mmol) en  $CH_2Cl_2$  (200 mL) a 0 °C, bajo atmósfera de argón y con agitación, se adicionó, gota a gota, una disolución de  $Br_2$  (9.04 g, 2.9 mL, 56.54 mmol) en  $CH_2Cl_2$  (50 mL). A continuación, sobre la disolución blanca lechosa obtenida se añadió la sal potásica del gluconaldehído (**13**) (7.0 g, 51.4 mmol) y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Seguidamente se añadió agua (100 mL) y se separaron las fases. La fase orgánica se lavó con agua ( $3 \times 100$  mL), se secó con  $MgSO_4$ , se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se cromatografió en columna de sílice utilizando la mezcla éter de petróleo/éter dietílico 9:1, separándose así los isómeros (E)/(Z). Rendimiento: 5.70 g (69 %, en mezcla de isómeros (4E):(4Z) 69:31).

Isómero (4Z):

TLC (éter de petróleo/éter etílico 7:3):  $R_f = 0.60$ .

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  6.23 (dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 15.5$  Hz, 1 H, H-2), 6.70 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1 H, H-5), 6.9 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 7.0$  Hz, 1H, H-4), 7.43 (dd,  $J = 15.5, 10.5$  Hz, 1 H, H3), 9.68 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H, H-1) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 118.9 (C-5), 130.6 (C-4), 134.3 (C-2), 145.5 (C-3), 193.4 (C-1) ppm

Isómero (4E):

<sup>15</sup> Soullez, D., Plé, G., Duhamel, L., Duhamel, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 563-564.

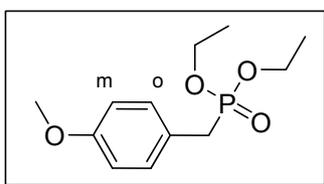
TLC (éter de petróleo/éter etílico 7:3):  $R_f = 0.50$ .

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.18 (dd,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 14.6$  Hz, 1 H, H-2), 6.95-7.04 (m, 3 H, H-3, H-4, H-5), 9.58 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1 H, H-1) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  119.8 (C-5), 131.9 (C-2), 135.5 (C-4), 147.7 (C-3), 193.1 (C-1) ppm.

MS-IE,  $m/z$  (%): 160 [masa nominal,  $\text{M}^+$ ] (5), 84.1 (100).

#### 6.4.2.2.3 *p*-Metoxibencilfosfonato de dietilo (12)

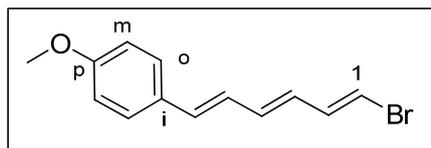


Producto de síntesis descrita, se obtuvo mediante el mismo procedimiento.<sup>16</sup>

Una disolución de bromuro de *p*-metoxibencilo (2.5 g, 1.79 mL, 12.4 mmol) en fosfito de trietilo (2.68 g, 2.76 mL, 16.12 mmol) se calentó a 130 °C durante 16 h en un matraz provisto de un tubo de cloruro cálcico. El exceso de fosfito de trietilo se eliminó por destilación en un horno de bolas bajo presión reducida (120-140 °C, 0.1-0.5 mm Hg), obteniéndose el compuesto **12** como un aceite incoloro. Rendimiento: 3.02 g (95 %).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.23 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.09 (d,  $J = 21.1$  Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3.79 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.00 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 6.84 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2 H,  $\text{H}_m$ ), 7.21 (dd,  $J = 8.5, 2.4$  Hz, 2 H,  $\text{H}_o$ ) ppm.

#### 6.4.2.2.4 (1*E*,3*E*,5*E*)-1-Bromo-6-(*p*-metoxifenil)hexa-1,3,5-trieno (15)



Obtenido por acoplamiento de Horner-Wadsworth-Emmons,<sup>12</sup> a partir de un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado.<sup>17</sup>

<sup>16</sup> Murias, M., Handler, N., Erker, T., Pleban, K., Ecker, G., Saico, P., Szekeres, T., Häger, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5571-5578.

Sobre una disolución de todo-(*E*)-5-bromo-2,4-pentadienal (400 mg, 2.48 mmol) y *p*-metoxibencilfosfonato de dietilo (**12**) (834 mg, 3.23 mmol) en THF seco (20 mL) se adicionó lentamente una suspensión de *tert*-butóxido potásico (557 mg, 4.96 mmol) en THF seco (15 mL) con agitación, a 0°C y bajo atmósfera de argón. Se dejó que la mezcla alcanzase la temperatura ambiente y, tras 1 hora, se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se cromatografió en columna de sílice con hexano/AcOEt 9:1 como eluyente, obteniéndose el compuesto **15** como un sólido amarillo. Rendimiento: 420 mg (70 %).

**TLC** (hexano/AcOEt 9:1):  $R_f = 0.5$ .

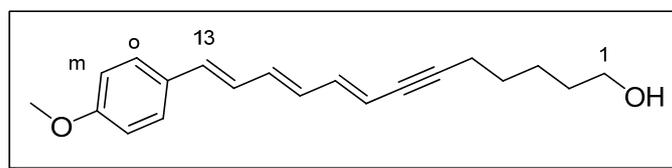
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  3.82 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 6.19 (dd,  $J = 14.7, 11.0$  Hz, 1 H, H-3), 6.32 (d,  $J = 13.3$  Hz, 1 H, H-1), 6.39 (dd,  $J = 14.7, 9.4$  Hz, 1 H, H-4), 6.62 (d,  $J = 14.1$  Hz, 1 H, H-6), 6.63 (m, 1 H, H-5), 6.79 (dd,  $J = 13.3, 11.0$  Hz, 1 H, H-2), 6.86 y 7.34 (dos m,  $J_{obs} = 8.8$  Hz, 4 H, H-Ar) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  55.3 (OCH<sub>3</sub>), 108.0 (C-1), 114.2 (C<sub>m</sub>), 126.2 (C-5), 127.7 (C<sub>o</sub>), 128.8 (C-3), 129.9 (C<sub>i</sub>), 133.7 (C-6), 134.2 (C4), 137.7 (C-2), 159.5 (C<sub>p</sub>) ppm.

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 264 [masa nominal, M]<sup>+</sup> (37), 185 [M-Br] (100), 170 (62), 153 (40), 141 (36).

**HPLC** (columna de fase inversa C<sub>18</sub>, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 9/1, 1 mL/min,  $\lambda_{anal} = 330$  nm):  $R_t = 3.63$  min (98% de pureza).

#### 6.4.2.2.5 (8*E*,10*E*,12*E*)-13-(*p*-Metoxifenil)trideca-8,10,12-trien-6-in-1-ol (OH-5C-OMePTRI) (**16**)



Se empleó en esencia un procedimiento descrito para obtener productos similares.<sup>18</sup>

Una mezcla de PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (52 mg, 0.073 mmol), CuI (28 mg, 0.147 mmol), dietilamina (15 mL) y THF seco (15 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 5 min bajo atmósfera de argón. A continuación se añadió **15** (324 mg, 1.22 mmol) y 5 min

<sup>17</sup> Lei, Y., Wroblewski, A. D., Golden, J. E., Powel, D. R., Aubé, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4552-4553.

<sup>18</sup> Quesada, E., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1308-1318.

después **6** (165 mg, 1.47 mmol). Se dejó la mezcla en las mismas condiciones durante 5 h, se eliminó el disolvente y el residuo se cromatografió en columna de gel de sílice con la mezcla hexano/acetato de etilo 4:1. Se aisló **16** como un sólido amarillo. Rendimiento: 315 mg (86%), pf 120-123 °C.

**TLC** (hexano/AcOEt, 2:1):  $R_f = 0.35$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.43-1.67 (m, 6 H, H-2, H-3, H-4), 2.38 (td,  $J = 6.6, 1.9$  Hz, 2 H, H-5), 3.66 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2 H, H-1), 3.81 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 5.60 (dt,  $J = 15.4, 1.9$  Hz, 2 H, H-8), 6.31 (dd,  $J = 14.6, 10.3$  Hz, 1 H, H-10), 6.40 (dd,  $J = 14.6, 9.7$  Hz, 1 H, H-11), 6.57 (m, 2 H, H-9, H-13), 6.68 (dd,  $J = 15.4, 9.7$  Hz, 1 H, H-12), 6.85 y 7.33 (dos m,  $J_{\text{obs}} = 8.7$  Hz, 4 H, H-Ar) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 19.7 (C-5), 25.0, 28.5, 32.3 (C-2, C-3, C-4), 55.3 ( $\text{CH}_3$ ), 62.8 (C-1), 80.6 (C-7), 93.9 (C-6), 111.2 (C-8), 114.1 ( $\text{C}_m$ ), 126.7 (C-12), 127.7 ( $\text{C}_o$ ), 130.0 ( $\text{C}_i$ ), 131.4 (C-10), 133.3 (C-13), 134.6 (C-11), 140.8 (C-9), 159.3 ( $\text{C}_p$ ) ppm.

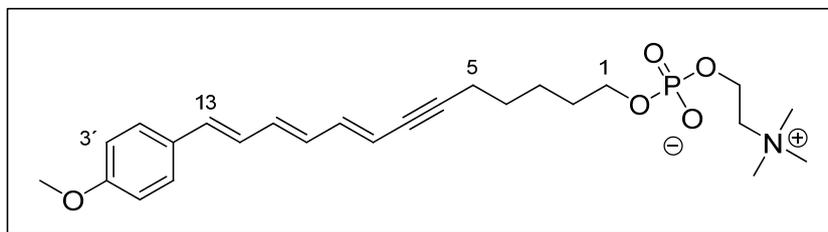
**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3435, 2937, 2197, 1711, 1589, 1508, 1462, 1441, 1303, 1253, 1172, 1030, 1001  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 296  $[\text{M}]^+$  (73), 223  $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9\text{O}]^+$  (27), 209  $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}^+]$  (28).

**Análisis** (%): calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$  C, 81.04; H, 8.16. Encontrado C, 81.24; H, 8.43.

**HPLC** (columna de fase inversa  $\text{C}_{18}$ ,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  9/1 + 1 %  $\text{AcOH}$ , 1 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}} = 346, 362$  nm):  $R_t = 3.63$  min (97% de pureza a dichas  $\lambda$ ).

#### 6.4.2.2.6 (8E,10E,12E)-13-(*p*-Metoxifenil)trideca-8,10,12-trien-6-inilfosfatidilcolina. (MT-5C-OMePTRI) (17)



Se siguió el método general para la introducción del grupo fosfatidilcolina, usando las siguientes proporciones: OH-5C-OMePTRI (**16**) (140 mg, 0.54 mmol) en acetonitrilo (10 mL), trimetilamina (c.a. 2 mL) y 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-óxido (0.1 mL, 1.09 mmol). Sólido ligeramente amarillo. Rendimiento: 66 mg (27 %), pf 219-222 °C.

**TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 65:25:5):  $R_f = 0.25$ .

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  1.55 (m, 4 H, H-3, H-4), 1.67 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, H-2), 2.37 (td,  $J = 6.4, 1.8$  Hz, 1 H, H-5), 3.22 (s, 9 H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.62 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>N), 3.78 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.90 (dt,  $J = 6.4, 6.4$  Hz, 2 H, H-1), 4.25 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 5.61 (dt,  $J = 15.4, 1.8$  Hz, 2 H, H-8), 6.34 (dd,  $J = 14.5, 9.4$  Hz, 1 H, H-10), 6.41 (m, 1 H, H-11), 6.52 (dd,  $J = 15.4, 9.4$  Hz, 1 H, H-9), 6.57 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1 H, H-13), 6.74 (dd,  $J = 15.4, 9.8$  Hz, 1 H, H-12), 6.86 y 7.36 (dos m,  $J_{obs} = 8.8$  Hz, 4 H, H-Ar) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  20.4 (C-5), 26.3, 29.7 (C-3, C-4), 31.4 (C-2), 54.70, 54.75 y 54.80 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 55.8 (OCH<sub>3</sub>), 60.3 (d,  $J = 4.9$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 66.8 (d,  $J = 5.9$  Hz, C-1), 67.6 (s a, CH<sub>2</sub>N), 81.7 (C-7), 94.5 (C-6), 112.4 (C-8), 115.3 (C<sub>m</sub>), 127.9 (C-12), 128.9 (C<sub>o</sub>), 131.5 (C<sub>i</sub>), 132.5 (C-10), 134.7 (C-13), 136.2 (C-11), 142.0 (C-9), 161.0 (C<sub>p</sub>) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{m\acute{a}x}$ : 3429, 2938, 1639, 1607, 1589, 1509, 1476, 1247 ( $\nu_{P=O}$ ), 1088 ( $\nu_{P-O-C}$ ), 1062, 994, 968 cm<sup>-1</sup>.

**MS-ESI+**,  $m/z$ : 462 [M+H<sup>+</sup>], 923 [2M+H<sup>+</sup>].

**MS-HR** (peak matching): calculado para C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>5</sub>P+H 462.2403; encontrado 462.2392.

**Análisis (%)**: calculado para C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>5</sub>P + H<sub>2</sub>O: C, 62.61; H, 7.99; N, 2.92. Encontrado C, 62.81; H, 7.96; N, 3.06.

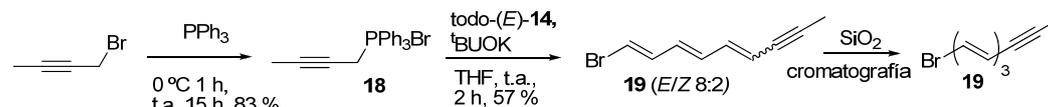
**HPLC** (columna de fase inversa C<sub>18</sub>, MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1 + 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mL/min,  $\lambda_{anal} = 362, 346$  nm):  $R_t = 1.89$  min (100% a dichas  $\lambda$ ).

**Absorción**: UV-VIS (DMF):  $\lambda_{m\acute{a}x}$  (nm) ( $\epsilon, M^{-1} cm^{-1}$ ): 336 (44000), 351 (62000), 370 (52000).

**Emisión** (DMF, corregido):  $\lambda_{m\acute{a}x}$  (nm) 460. Rendimiento cuántico de fluorescencia: 0.006; disolución  $\sim 10^{-6}$  M en DMF.

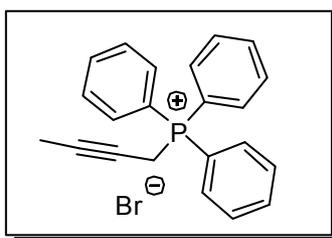
### 6.4.3 Síntesis del bromopolieno 19

Se obtuvo a partir de (2*E*,4*E*)-5-bromo-2,4-pentadienal (todo-(*E*)-**14**) y bromuro de 2-butiniltrifenilfosfonio (**18**) (Esquema 6.6).



Esquema 6.6. Síntesis de (1*E*,3*E*,5*E*)-1-bromonona-1,3,5-trien-7-ino (**19**).

#### 6.4.3.1.1 Bromuro de 2-butiniltrifenilfosfonio (**18**)

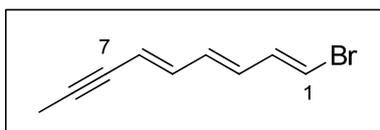


Producto de síntesis descrita, se obtuvo por el mismo procedimiento.<sup>19</sup>

Una mezcla de 1-bromo-2-butino (2.21 g, 1.5 mL, 16.6 mmol) y trifenilfosfina (4.36 g, 16.6 mmol) se agitó 1 h a 0 C° y 15 h más a temperatura ambiente. La suspensión resultante se filtró y el sólido separado se lavó con hexano (3 × 15 mL). Se obtuvo así el bromuro **18** como un sólido ligeramente amarillo. Rendimiento: 5.42 g (83 %), pf 91-93 °C.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.65 (dt, *J* = 6.4, 2.7 Hz, 3 H, H-4), 5.00 (dc, *J* = 14.8, 2.6 Hz, 2H, H-1), 7.64-7.90 (m, 15 H, Ar-H) ppm.

#### 6.4.3.1.2 (1E,3E,5E)-1-Bromonona-1,3,5-trien-7-ino (**19**)



Se obtuvo por reacción de Wittig usando un procedimiento descrito para productos similares.<sup>19</sup>

A una suspensión agitada de bromuro de 2-butiniltrifenilfosfonio (**18**) (1.47 g, 3.73 mmol) en THF seco (25 mL), bajo atmósfera de argón, se adicionó *tert*-butóxido potásico (474 mg, 4.22 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación se añadió todo-(E)-**14** (400 mg, 2.48 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La desaparición del aldehído se siguió por TLC. Se añadió agua (20 mL) y la mezcla se extrajo con éter dietílico (3 × 20 mL). Las fases orgánicas juntas se lavaron con agua y se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, el disolvente se eliminó a vacío y el residuo obtenido se cromatografió en columna de sílice utilizando éter de petróleo. Se separaron así los diastereoisómeros (1E,3E,5E)-**19** y (1E,3E,5Z)-**19**. Rendimiento: 275 mg (57 %, (E)/(Z) 8:2).

<sup>19</sup> Navarro, I., Mas, E., Fabriàs, G., Camps, F. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1267-1274.

**TLC** (éter de petróleo):  $R_f$  (*E*) = 0.45;  $R_f$  (*Z*) = 0.55.

Datos de todo-(*E*)-**19**:

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.98 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 5.65 (dc,  $J$  = 15.4, 2.0 Hz, 1 H, H-6), 6.13 (dd,  $J$  = 14.8, 10.5 Hz, 1 H, H-3), 6.25 (dd,  $J$  = 14.8, 10.5 Hz, 1 H, H-4), 6.36 (d,  $J$  = 13.5 Hz, 1 H, H-1), 6.47 (dd,  $J$  = 15.4, 10.5 Hz, 1 H, H-5), 6.72 (dd,  $J$  = 13.5, 10.5 Hz, 1 H, H-2) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.6 (CH<sub>3</sub>), 79.2 (C-7), 90.5 (C-8), 110.0 (C-1), 113.6 (C-6), 130.6 (C-3), 132.8 (C-4), 137.3 (C-2), 139.7 (C-5) ppm.

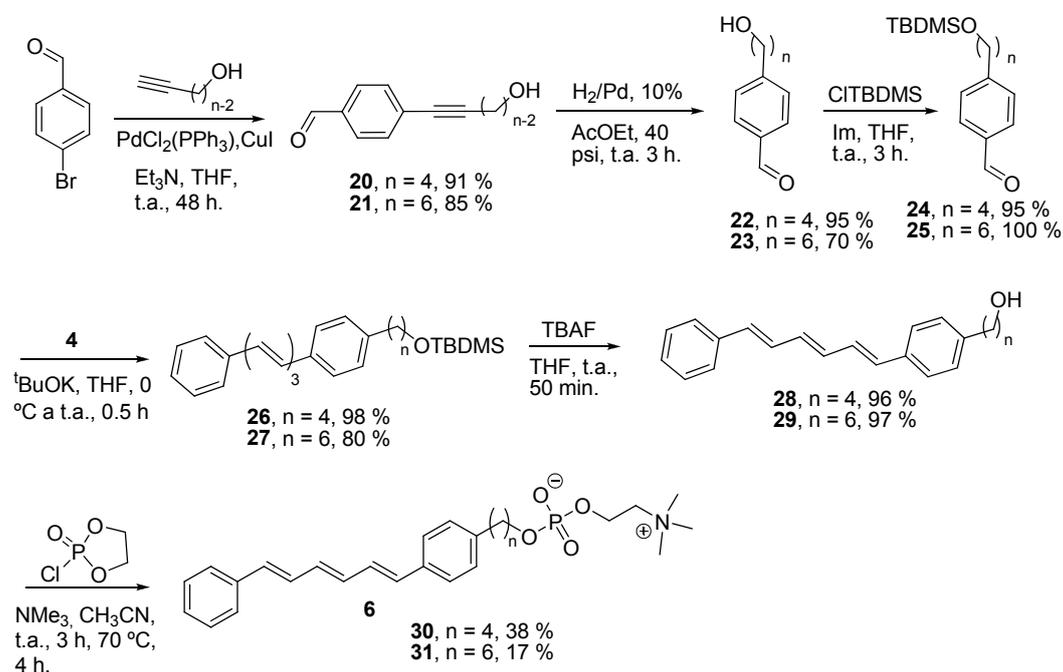
**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2208, 1628, 1598, 1277, 1185, 989 cm<sup>-1</sup>.

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 198 [M]<sup>+</sup> (30), 115.1 (100).

**HPLC** (columna de fase inversa C<sub>18</sub>, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 9/1, 1 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}}$  = 312 nm):  $R_t$  = 2.99 min (97% de pureza).

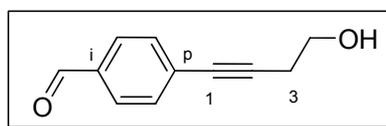
### 6.4.4 Síntesis de análogos con el grupo difenilhexatrieno (DPH)

Se llevó a cabo en 6 pasos (Esquema 6.7).



Esquema 6.7. Síntesis de MT-nC-DPH

#### 6.4.4.1.1 *p*-(4-Hidroxibut-1-inil)benzaldehido (**20**)



Obtenido por acoplamiento de Sonogashira siguiendo un procedimiento descrito para otros productos.<sup>20</sup>

Una mezcla de  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (75 mg, 0.11 mmol),  $\text{CuI}$  (40.7 mg, 0.22 mmol), trietilamina desoxigenada (8 mL) y THF seco (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 5 min bajo atmósfera de argón. A continuación se añadió 4-bromobenzaldehído

<sup>20</sup> Chinchilla, R., Najera, C. *Chem. Rev.* **2007**, 107 874-922.

(263 mg, 1.42 mmol) y 5 min después but-3-in-1-ol (150 mg, 2.14 mmol). Se dejó la mezcla en las mismas condiciones durante 48 h, se eliminó el disolvente y el residuo se cromatografió en columna de gel de sílice con la mezcla hexano/acetato de etilo 7:3. Aceite amarillo. Rendimiento: 227 mg (91%).

**TLC** (hexano/AcOEt, 1:1):  $R_f = 0.4$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.00 (s a, 1 H, OH), 2.72 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2 H, H-3), 3.84 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2 H, H-4), 7.54 y 7.80 (dos m,  $J_{obs} = 8.6$  Hz, 4 H, H-Ar), 9.98 (s, 1 H, CHO) ppm.

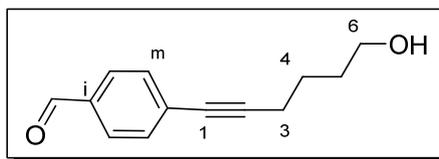
**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  24.3 (C-3), 53.8 (C-4), 82.1 (C-1), 91.6 (C-2), 129.9 (C<sub>o</sub>), 130.2 (C<sub>p</sub>) 132.6 (C<sub>m</sub>), 135.7 (C<sub>i</sub>), 191.8 (CHO) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3427 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2934, 2876, 2847, 2224, 1696 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1602, 1560, 1392, 1301, 1211, 1167, 1044, 830  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 174 [ $\text{M}^+$ ] (82), 144 (70), 115 (100).

**Análisis** (%): Calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_2$  (174.2): C, 75.84; H, 5.79. Encontrado: C, 75.57; H, 5.90.

#### 6.4.4.1.2 *p*-(6-Hidroxihex-1-inil)benzaldehido (21)



Obtenido por acoplamiento de Sonogashira a partir de  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (358 mg, 0.51 mmol), CuI (194 mg, 1.02 mmol), trietilamina (40 mL), THF (50 mL), 4-bromobenzaldehido (2.26 g, 12.23 mmol) y hex-5-in-1-ol (1.00 g, 10.20 mmol). Se cromatografió en columna de gel de sílice con la mezcla hexano/acetato de etilo 7:3. Aceite amarillo. Rendimiento: 1.73 g (85%).

**TLC** (hexano/AcOEt, 1:1):  $R_f = 0.3$ .

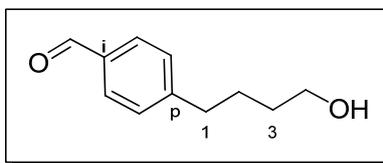
**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.39 (s a, 1 H, OH), 1.74 (m, 4 H, H-4, H-5), 2.50 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, H-3), 3.72 (m, 2 H, H-6), 7.52 y 7.80 (dos m,  $J_{obs} = 8.3$  Hz, 4 H, H-Ar), 9.98 (s, 1 H, CHO) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  19.3 (C-3), 24.8, 31.9 (C-4, C-5), 62.4 (C-6), 80.4 (C-1), 94.6 (C-2), 129.5 (C<sub>o</sub>), 130.4 (C<sub>p</sub>) 132.1 (C<sub>m</sub>), 135.0 (C<sub>i</sub>), 191.5 (CHO) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3434 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2944, 2871, 2221, 1701 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1604, 1406, 1388, 1274, 1209, 1170, 1105, 1016  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 202 [ $M^+$ ] (6), 184 [ $M-H_2O$ ] (9), 173 [ $M-CHO$ ] (13), 155 (47), 145 (29), 129 [ $M-C_4H_9O$ ] (100), 115 (67).

#### 6.4.4.1.3 *p*-(4-Hidroxibutil)benzaldehido (**22**)



Se siguió un procedimiento descrito en la bibliografía para un producto similar.<sup>21</sup>

Sobre una suspensión de Pd/C (10%) (90 mg, 0.08 mmol) en AcOEt (20 mL) en un vaso Parr, se añadió una disolución del aldehído **20** (180 mg, 1.03 mmol) en AcOEt (20 mL), y se hidrogenó a 40 psi durante 3 h. Se filtró el catalizador y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose el aldehído **22** como un aceite amarillo. Rendimiento: 175 mg (95%).

**TLC** (hexano/AcOEt, 1:1):  $R_f = 0.37$ .

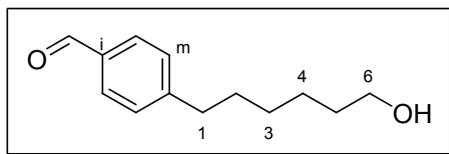
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz  $CDCl_3$ ):  $\delta$  1.62 (m, 2 H, H-3), 1.73 (m, 2 H, H-2), 2.73 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2 H, H-1), 3.67 (t,  $J = 6.3$  Hz, H-4), 7.34 y 7.79 (dos m,  $J_{obs} = 8.1$  Hz, 4 H, H-Ar), 9.96 (s, 1 H, CHO) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  27.2 (C-2), 32.2 (C-3), 35.8 (C-1), 62.6 (C-4), 129.0 ( $C_m$ ), 129.9 ( $C_o$ ) 134.4 ( $C_i$ ), 149.9 ( $C_p$ ), 192.0 (CHO) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{max}$ : 3380 ( $\nu_{OH}$ ), 2938, 2862, 2731, 1694 ( $\nu_{C=O}$ ), 1606, 1575, 1418, 1306, 1215, 1169, 1107, 1058  $cm^{-1}$ .

**MS-ESI<sup>+</sup>**,  $m/z$  (%): 179 [ $M+H^+$ ], 201 [ $M+Na^+$ ].

<sup>21</sup> Perchonock, C. D., Uzinskas, I., McCarthy, M. E., Erhard, K.F., Gleason, J. G., Wasserman, M. A., Muccitelli, R. M. DeVan, J. F., Tucker, S.S., Vickery, L. M., Kirchner, T., Weichman, B. M., Mong, S., Scott, M. O., Rosso, G. C., Wu, H. L., Croke, S. T., Newton, J. F. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1442-1452.

6.4.4.1.4 *p*-(6-Hidroxihexil)benzaldehido (**23**)

Obtenido a partir de Pd/C (10%) (**23** mg, 0.022 mmol), AcOEt (20 mL), *p*-(6-hidroxihex-1-inil)benzaldehido (**21**) (353 mg, 1.75 mmol) en AcOEt (20 mL). Aceite amarillo. Rendimiento: 250 mg (70%).

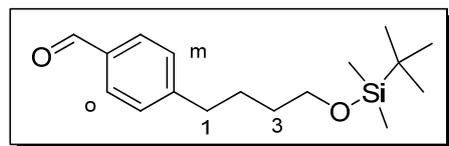
TLC (hexano/AcOEt, 1:1):  $R_f = 0.4$ .

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.38 (m, 4 H, H-3, H-4), 1.57 (m, 2 H, H-5), 1.66 (m, 2 H, H-2), 2.69 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2 H, H-1), 3.64 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, H-6), 7.33 y 7.80 (dos m,  $J_{obs} = 8.0$  Hz, 4 H, H-Ar), 9.97 (s, 1 H, CHO) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  25.5, 29.0 (C-3, C-4), 31.0 (C-2), 32.6 (C-5), 36.1 (C-1), 62.9 (C-6), 129.1 ( $\text{C}_m$ ), 129.9 ( $\text{C}_o$ ), 134.4 ( $\text{C}_i$ ), 150.2 ( $\text{C}_p$ ), 192.0 (CHO) ppm.

FT-IR (KCl)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3361 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2932, 2857, 2666, 2549, 1689 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1609, 1575, 1424, 1290, 1170, 1056  $\text{cm}^{-1}$ .

MS-IE,  $m/z$  (%): 206 (**23**) [ $\text{M}^+$ ], 133 (83) [ $\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9\text{O}$ ], 120 (84).

6.4.4.1.5 *p*-[4-(*tert*-Butildimetilsililo)butil]benzaldehido (**24**)

Se siguió en esencia un procedimiento descrito en la bibliografía para la protección de alcoholes.<sup>11</sup>

Sobre una disolución del alcohol **22** (200 mg, 1.12 mmol) e imidazol (480 mg, 2.70 mmol) en THF seco (10 mL) se añadió bajo atmósfera de argón una disolución de cloruro de *tert*-butildimetilsililo (CITBDMS) (254 mg, 1.68 mmol) en THF seco (5 mL). Se agitó 3 h a temperatura ambiente, se centrifugó el crudo, se lavaron las sales insolubles con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 10$  mL) y la disolución obtenida se llevó a sequedad con vacío. El residuo se cromatografió en columna de sílice usando la mezcla hexano/AcOEt 97:3. Se aisló **24** como un aceite incoloro. Rendimiento: 311 mg (95%).

TLC (hexano/AcOEt 20:1):  $R_f = 0.4$ .

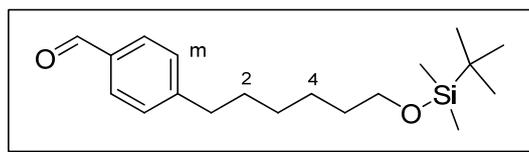
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.04 (s, 6 H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.89 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.56 (q, *J* = 6.1 Hz, 2 H, H-3), 1.71 (m, 2 H, H-2), 2.71 (t, *J* = 7.6 Hz, 2 H, H-1), 3.63 (t, *J* = 6.24, 2 H, H-4), 7.34 y 7.80 (dos m, *J*<sub>obs</sub> = 8.1 Hz, 4 H, H-Ar), 9.97 (s, 1 H, CHO) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -5.23 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 18.3 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 25.9 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.3 (C-2), 32.3 (C-3), 35.9 (C-1), 62.8 (C-4), 129.1 (C<sub>m</sub>), 129.9 (C<sub>o</sub>), 134.4 (C<sub>i</sub>), 150.2 (C<sub>p</sub>), 192.1 (CHO) ppm.

**FT-IR** (KBr) *v*<sub>máx</sub>: 2930, 2858, 2666, 2543, 1692 (*v*<sub>C=O</sub>), 1610, 1471, 1423, 1317, 1290, 1254, 1103, 836, 776 cm<sup>-1</sup>.

**MS-ESI<sup>+</sup>**, *m/z* (%): 293 [M+H<sup>+</sup>], 315 [M+Na<sup>+</sup>].

#### 6.4.4.1.6 *p*-[6-(*tert*-Butildimetilsililo)hexil]benzaldehido (**25**)



Obtenido, como en **24**, a partir de *p*-(6-hidroxi)hexilbenzaldehido (**23**) (230 mg, 1.12 mmol), imidazol (100 mg, 1.45 mmol), THF (10 mL), cloruro de *tert*-butildimetilsililo (CITBDMS) (202 mg, 1.33 mmol) en THF (5 mL). Se cromatografió en columna de sílice usando la mezcla hexano/AcOEt 97:3. Aceite incoloro. Rendimiento: 360 mg (100 %).

**TLC** (hexano/AcOEt 4:1): *R*<sub>f</sub> = 0.9.

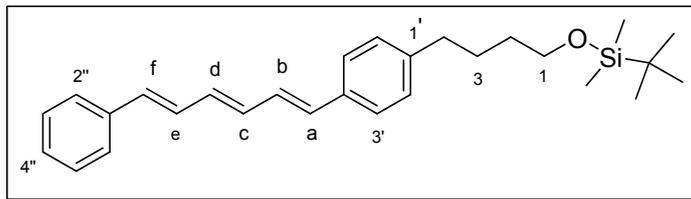
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ 0.04 (s, 6 H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.89 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.35 (m, 4 H, H-3, H-4), 1.51 (m, 2 H, H-5), 1.65 (q, *J* = 7.4 Hz, 2 H, H-2), 2.69 (t, *J* = 7.7 Hz, 2 H, H-1), 3.59 (t, *J* = 6.4 Hz, 2 H, H-6), 7.33 y 7.80 (dos m, *J*<sub>obs</sub> = 8.1 Hz, 4 H, H-Ar), 9.97 (s, 1 H, CHO) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -5.28 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 18.4 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 25.6 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.6, 29.0 (C-3, C-4), 31.0 (C-2), 32.7 (C-5), 36.1 (C-1), 63.1 (C-6), 129.1 (C<sub>m</sub>), 129.9 (C<sub>o</sub>), 134.4 (C<sub>i</sub>), 150.4 (C<sub>p</sub>), 192.0 (CHO) ppm.

**MS-IE**, *m/z* (%): 320 [M<sup>+</sup>] no observable, 263 [M-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] (100).

#### 6.4.4.1.7 todo-(*E*)-{4-[*p*-(6-Fenilhexa-1,3,5-trienil)fenil]butoxi}-*terc*-butildimetilsilano (26)

Se obtuvo por reacción de Wittig-Horner, usando las condiciones habituales.<sup>9</sup>



Sobre una disolución del aldehído **24** (200 mg, 0.684 mmol) y el fosfonato **4** (473 mg, 1.69 mmol) en THF seco (7 mL) se adicionó lentamente una suspensión de metóxido sódico (67 mg, 1.23 mmol) en THF seco (10 mL) con agitación, a 0 °C y bajo atmósfera de argón. Se dejó que la mezcla alcanzase la temperatura ambiente y tras 30 min se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se cromatografió en columna de sílice con hexano/AcOEt 97:3 como eluyente, obteniéndose el compuesto **26** como un sólido amarillo ceroso. Rendimiento: 280 mg (98 %).

**TLC** (hexano/AcOEt 20:1):  $R_f = 0.95$ .

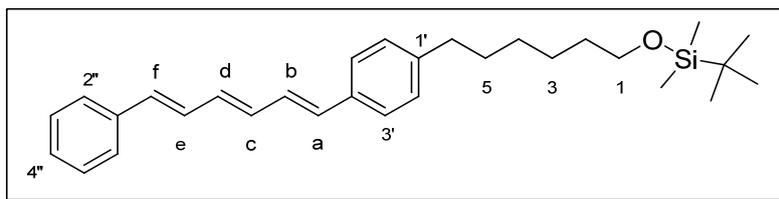
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.04 (s, 6 H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.89 (s, 9 H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.56 (m, 2 H, H-2), 1.65 (m, 2 H, H-3), 2.61 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, H-4), 3.63 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2 H, H-1), 6.55, (m, 4 H, H-a, H-c, H-d, H-f), 6.87 (m, 2 H, H-b, H-e), 7.25 (m, 9 H, H-Ar) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  -5.30 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 18.4 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.0 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.6 (C-3), 32.4 (C-2), 35.4 (C-4), 63.0 (C-1), 126.3, 127.4, 128.3, 128.6, 128.7 y 129.2 (C-b, C-e y 9 C-Ar con H), 132.3, 132.7, 133.0 y 133.8 (C-a, C-c, C-d, C-f), 134.9 (C-4'), 137.4 (C-1''), 142.3 (C-1') ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3014, 2929, 2855, 1627, 1468, 1255, 1101, 995, 835, 775, 691 cm<sup>-1</sup>.

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 418 [M<sup>+</sup>] (100), 361 [M-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] (16), 285 (28), 155 (22), 143 (19).

#### 6.4.4.1.8 todo-(*E*)-{6-[*p*-(6-Fenilhexa-1,3,5-trienil)fenil]hexiloxi}-*terc*-butildimetilsilano (27)



Se obtuvo por reacción de Wittig-Horner como **26**, a partir del aldehído **25** (360 mg, 1.12 mmol), (2*E*,4*E*)-5-fenilpenta-2,4-dienilfosfonato de dietilo (**4**) (341 mg, 1.215 mmol), THF (10 mL) y metóxido sódico (70 mg, 1.30 mmol) en THF (10 mL). El producto se cromatografió en columna de sílice con hexano/AcOEt 97:3 como eluyente. Sólido amarillo ceroso. Rendimiento: 410 mg (80 %).

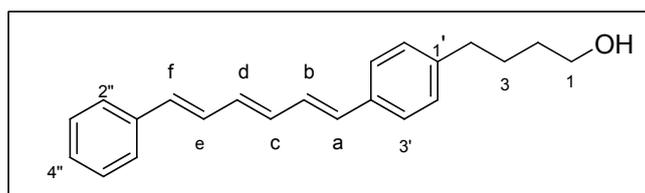
TLC (hexano/AcOEt 20:1):  $R_f = 0.95$ .

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.05 (s, 6 H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.90 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.35 (m, 4 H, H-3, H-4), 1.51 (m, 2 H, H-2), 1.62 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2 H, H-5), 2.59 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2 H, H-6), 3.60 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, H-1), 6.56, (m, 4 H, H-a, H-c, H-d, H-f), 6.87 (m, 2 H, H-b, H-e), 7.12-7.43 (9 H, H-Ar) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -5.30 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 18.4 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.0 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 25.7, 29.1 (C-3, C-4), 31.4 (C-5), 32.8 (C-2), 35.7 (C-6), 63.2 (C-1), 126.3, 127.4, 128.2, 128.6, 128.7, 129.2 (C-b, C-e y 9 C Ar con H), 132.3, 132.8, 133.0, 133.8 (C-a, C-c, C-d, C-f), 134.9 (C-4'), 137.5 (C-1''), 142.5 (C-1')

MS-IE,  $m/z$  (%): 446  $[\text{M}]^+$  (100), 389  $[\text{M}-\text{C}(\text{CH}_3)_3]$  (17), 243 (40).

#### 6.4.4.1.9 todo-(*E*)-4-[*p*-(6-Fenilhexa-1,3,5-trienil)fenil]butanol (28)



Se siguió en esencia un procedimiento descrito en la bibliografía para la desprotección de alcoholes.<sup>22</sup>

<sup>22</sup> Sneddon, H. F., Gaunt, M. J., Ley, S. V. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1147-1150.

Sobre una disolución del sililéter **26** (180 mg, 0.428 mmol) en THF seco (7 mL) se adicionó, a temperatura ambiente y con agitación, una disolución en THF de fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) 1 M (0.643 mL). Se agitó la mezcla en estas condiciones 30 min, se añadió más disolución de TBAF (0.30 mL) y se mantuvo la mezcla con agitación durante otros 20 min. Se evaporó el disolvente a vacío y el producto se purificó en columna de sílice con hexano/AcOEt 7:3. Se obtuvo así el alcohol **28** como un sólido amarillo. Rendimiento: 122 mg (96 %), pf 162-165 °C.

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.47$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.63 (m, 2 H, H-2), 1.71 (m, 2 H, H-3), 2.64 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, H-4), 3.67 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2 H, H-1), 6.55 (m, 4 H, H-a, H-c, H-d, H-f), 6.87 (m, 2 H, H-b, H-e), 7.07-7.43 (9 H, H-Ar) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  27.4 (C-3), 32.3 (C-2), 35.4 (C-4), 62.8 (C-1), 126.3, 126.4, 127.5, 128.4, 128.6, 128.7 y 129.2 (C-b, C-e y 9 C-Ar con H), 132.4, 132.6, 133.1 y 133.8 (C-a, C-c, C-d, C-f), 135.0 (C-4'), 137.4 (C-1''), 141.9 (C-1') ppm.

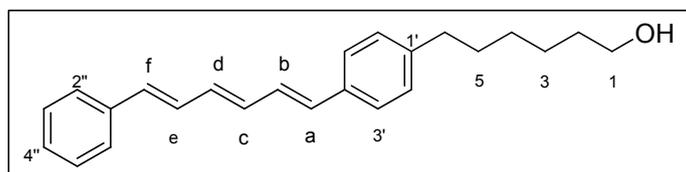
**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3412 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 3007, 2931, 2855, 1631, 1508, 1443, 1056, 994, 861, 745, 690, 518  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 304 (100) [ $\text{M}^+$ ], 245 (14), 231 (24), 215 (17), 163 (22), 153 (28), 141 (19), 128 (16), 115 (24), 91 (30).

**Absorción**: UV-VIS (DMF)  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 344 (35000), 361 (45000), 382 (33000), (error de  $\epsilon$ :  $\pm 4000$ ).

**Emisión** (DMF, corregido):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) 409, 433, 458, 487. Rendimiento cuántico de fluorescencia: 0.21; disolución  $\sim 10^{-6}$  M en DMF.

#### 6.4.4.1.10 *todo-(E)-6-[p-(Fenilhexa-1,3,5-trienil)fenil]hexanol (29)*



Obtenido como **28**, a partir del sililéter **27** (400 mg, 0.895 mmol), THF (15 mL), TBAF 1 M (1.35 mL, después 0.60 mL más). Se purificó en columna de sílice con hexano/AcOEt 4:1 y por precipitación en *n*-pentano frío. Sólido amarillo. Rendimiento: 285 mg (97 %), pf 159-163 °C.

**TLC** (hexano/AcOEt 4:1):  $R_f = 0.3$ .

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.38 (m, 4 H, H-3, H-4), 1.59 (m, 4 H, H-2, H-5), 2.60 (t, *J* = 7.7 Hz, 2 H, H-6), 3.64 (c, *J* = 6.3 Hz, 2 H, H-1), 6.56 (m, 4 H, H-a, H-c, H-d, H-f), 6.86 (m, 2 H, H-b, H-e), 7.28 (9 H, H-Ar) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 25.6, 29.0 (C-3, C-4), 31.3 (C-5), 32.7 (C-2), 35.6 (C-6), 63.0 (C-1), 126.3, 127.4, 128.3, 128.6, 128.7, 129.2 (C-b, C-e y 9 C-Ar con H), 132.3, 132.7, 133.0, 133.8 (C-a, C-c, C-d, C-f), 134.9 (C-4'), 137.4 (C-1''), 142.4 (C-1') ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3429 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2926, 2848, 1628, 1509, 1444, 1057, 995, 746, 690 cm<sup>-1</sup>.

**MS-IE**, *m/z* (%): 332 (100) [M<sup>+</sup>], 245 (13) [M-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>O], 231 (25) [M-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O].

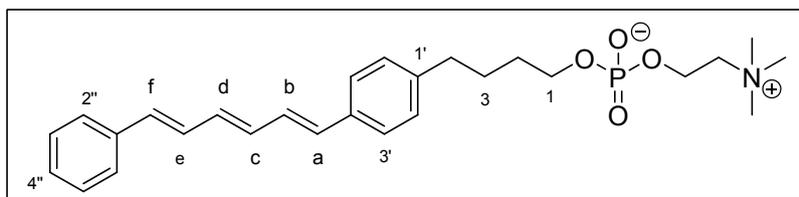
**Análisis** (%): calculado para C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>O: C, 86.70; H, 8.49. Encontrado: C, 86.47; H, 8.32.

**HPLC** (columna de fase inversa C<sub>18</sub>, MeOH/H<sub>2</sub>O 9/1, 1.8 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}}$  = 356, 345 nm): *R*<sub>t</sub> = 6.42 min (100% de pureza a ambas  $\lambda$ ).

**Absorción**: UV-VIS (DMF)  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 345 (56200), 361 (78810), 381 (62000).

**Emisión** (DMF, corregido):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) 433, 458. Rendimiento cuántico de fluorescencia: 0.20; disolución ~10<sup>-6</sup> M en DMF.

#### 6.4.4.1.11 *todo-(E)-4-[p-(6-Fenilhexa-1,3,5-trienil)fenil]butilfosfatidilcolina (30)*



Se siguió el método general para la introducción del grupo fosfocolina, partiendo del alcohol **28** (83 mg, 0.27 mmol) con acetonitrilo (5-10 mL), trimetilamina (c.a. 2 mL) y 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-óxido (0.1 mL, 1.09 mmol). El aceite amarillento aislado se purificó por precipitación de una disolución concentrada en metanol, por adición de acetona. Sólido amarillento. Rendimiento: 38 mg (30 %), *pf* 221-224 °C.

**TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 65:25:5): *R*<sub>f</sub> = 0.4.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 1.71 (m, 4 H, H-2, H-3), 2.64 (t, *J* = 7.1 Hz, 2 H, H-4), 3.19 (s, 9 H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.58 (m, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.90 (dt, *J* = 6.0, 6.1 Hz, 2 H, H-1), 4.21 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>N), 6.58 (m, 4 H, H-a, H-c, H-d, H-f), 6.94 (m, 2 H, H-b, H-e), 7.14-7.45 (9 H, H-Ar) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 28.8 (C-3), 31.3 (d, *J* = 7.5 Hz, C-2), 36.2 (C-4), 54.60, 54.65 y 54.70 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 60.2 (d, *J* = 4.9 Hz, CH<sub>2</sub>N), 66.7 (d, *J* = 5.9 Hz, C-1), 67.5 (s a,

OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 127.3, 127.4, 128.5, 129.6, 129.7, 129.9 y 130.4 (C-b, C-e y 9 C-Ar con H), 133.5, 133.7, 134.5 y 135.0 (C-a, C-c, C-d, C-f), 136.6 (C-4'), 139.0 (C-1''), 143.3 (C-1') ppm.

**MS-ESI+**, *m/z*: 470 [M+H<sup>+</sup>], 939 [2M+H<sup>+</sup>].

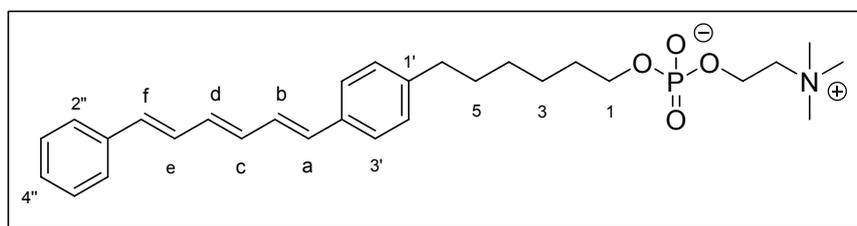
**MS-HR** (peak matching): calculado para C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>4</sub>P+H 470.2454; encontrado 470.2451.

**Análisis de fosforo:** Calculado para C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>4</sub>P (469.55): 6.60. Encontrado: 6.99.

**Absorción:** UV-VIS (EtOH) λ<sub>máx</sub> (nm) (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 340 (47100), 356 (60100), 375 (43400), (error de ε: ± 4000). UV-VIS (DMF) λ<sub>máx</sub> (nm) (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 344 (40000), 361 (55000), 382 (43000).

**Emisión** (DMF, corregido): λ<sub>máx</sub> (nm) 410, 434, 460, 488. (EtOH, corregido): λ<sub>máx</sub> (nm) 407, 431, 456, 485. Rendimiento cuántico de fluorescencia: 0.16 (disolución ~10<sup>-6</sup> M en DMF) y 0.22 (disolución ~10<sup>-6</sup> M en EtOH).

#### 6.4.4.1.12 *todo-(E)-6-[p-(Fenilhexa-1,3,5-trienil)fenil]hexilfosfatidilcolina (31)*



Se siguió el método general para la introducción del grupo fosfocolina, con el alcohol **29** (90 mg, 0.27 mmol), acetonitrilo (5-10 mL), trimetilamina (c.a. 2 mL) y 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-óxido (0.05 mL, 0.54 mmol). El aceite amarillento aislado se purificó por precipitación de una disolución metanólica concentrada, por adición de acetona. Sólido amarillento. Rendimiento: 22 mg (17 %), pf 231-235 °C.

**TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 65:25:5): *R<sub>f</sub>* = 0.4.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 1.40 (m, 4 H, H-3, H-4), 1.63 (m, 4 H, H-2, H-5), 2.60 (t, *J* = 7.6 Hz, 2 H, H-6), 3.21 (s, 9 H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.61 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>N), 3.87 (dt, *J* = 6.5, 6.5 Hz, 2 H, H-1), 4.23 (m, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 6.58 (m, 4 H, H-a, H-c, H-d, H-f), 6.93 (m, 2 H, H-b, H-e), 7.12-7.45 (m, 9 H, H-Ar) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 26.8, 30.0 (C-3, C-4), 31.8, 32.6 (C-2, C-5), 36.6 (C-6), 54.70, 54.75 y 54.80 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 60.3 (d, *J* = 4.9 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 66.9 (d, *J* = 5.9 Hz, C-1), 67.5 (s a, CH<sub>2</sub>N), 127.39, 127.44, 128.5, 129.6, 129.7, 129.8, 130.5 (C-b, C-e y 9 C-

Ar con H), 133.5, 133.8, 134.4, 135.1 (C-a, C-c, C-d, C-f), 136.5 (C-4'), 139.0 (C-1''), 143.6 (C-1') ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2924, 2852, 1670, 1446, 1220 ( $\nu_{\text{P=O}}$ ), 1085 ( $\nu_{\text{P-O-C}}$ ), 968  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ES<sup>+</sup>**,  $m/z$ : 498 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 520 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ], 995 [ $2\text{M}+\text{H}^+$ ].

**MS-HR** (peak matching): calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{NO}_4\text{P}+\text{H}$  498.2767; encontrado 498.2755.

**Análisis (%)**: calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{NO}_4\text{P}+2\text{H}_2\text{O}$ : C, 65.27; H, 8.31; N, 2.62. Encontrado C, 65.68; H, 7.89; N, 2.80.

**HPLC** (columna de fase inversa  $\text{C}_{18}$ , MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  9/1 + 10 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 1.2 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}} = 356, 345 \text{ nm}$ ):  $R_t = 3.96 \text{ min}$  (100% de pureza a ambas  $\lambda$ ).

**Absorción**: UV-VIS (DMF)  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ): 345 (53400), 361 (75885), 381 (61234).

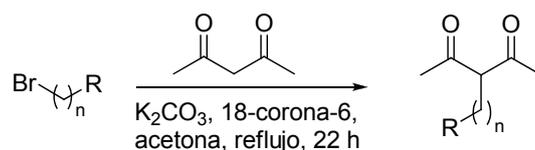
**Emisión** (DMF, corregido):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) 434, 458. Rendimiento cuántico de fluorescencia: 0.17 (disolución  $\sim 10^{-6} \text{ M}$ ).

## 6.5 Análogos fluorescentes con grupos BODIPY

### 6.5.1 Métodos generales

#### 6.5.1.1 Alquilación de acetilacetona (acacH)

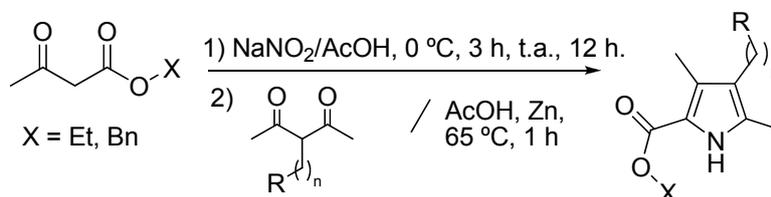
Se siguió un procedimiento descrito para la monoalquilación de 1,3-dionas (Esquema 6.8).<sup>23,24</sup>



Esquema 6.8. Alquilación de acetilacetona.

Una mezcla de acetilacetona (10 eq), el bromoderivado correspondiente (1 eq),  $K_2CO_3$  (5 eq) y 18-crown-6 (0.01 eq) se calentaron a reflujo de acetona (100-200 mL), protegiendo el reactor con un tubo de cloruro cálcico, durante 22 h con agitación. El crudo de reacción se filtró, el disolvente se eliminó a vacío y el residuo obtenido se cromatografió en columna de sílice utilizando como eluyente la mezcla de disolventes indicada en cada caso.

#### 6.5.1.2 Síntesis de Johnson-Knorr de pirroles



Esquema 6.9. Síntesis de Johnson-Knorr de pirroles

A partir de acetilacetato de etilo o de bencilo, nitrito sódico y 3-alkilacetilacetona. Se siguió un procedimiento descrito para productos similares (Esquema 6.9).<sup>25</sup>

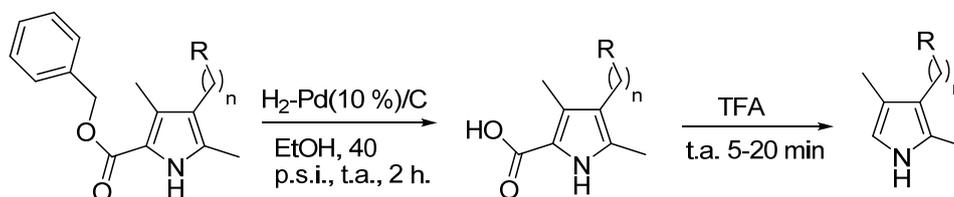
<sup>23</sup> Mori, M., Washioka, Y., Urayama, T., Yoshiura, K., Chiba, K., Ban, Y. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4058.

<sup>24</sup> Puzicha, G., Shrout, D. P., Lightner, D. A. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27*, 2117.

A una disolución de nitrito sódico (1 eq) en agua se añadió a otra disolución enfriada con hielo, bien agitada, del acetoacetato (1 eq) en ácido acético glacial, procurando que la temperatura de la mezcla no subiese de 14 °C. La disolución se mantuvo enfriada con hielo y con agitación durante 3 h, y a temperatura ambiente durante 12 h más. A continuación se añadió la 3-alkilacetilacetona (1 eq). Luego, poco a poco, Zn en polvo (2 eq) y la mezcla se calentó a 65 °C durante 1 h. Tras enfriar a temperatura ambiente, se añadió agua y se extrajo 3 veces con AcOEt. Se lavaron las fases orgánicas reunidas con disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, hasta fin de la efervescencia, se lavaron con agua, y se secaron con MgSO<sub>4</sub>. Se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se cromatografió en columna de sílice utilizando la mezcla de eluyentes indicada en casa caso.

### 6.5.1.3 Síntesis de $\alpha$ -H pirroles

Las dos siguientes etapas de síntesis se han llevado a cabo según procedimientos descritos en la bibliografía para productos similares (Esquema 6.10).<sup>26</sup>



Esquema 6.10. Desbencilación y descarboxilación de  $\alpha$ -benciloxycarbonilpirroles

Sobre una disolución del éster bencílico en EtOH se añadió una cantidad catalítica de Pd/C (10%) y la mezcla se hidrogenó en un vaso Parr a 40 psi durante 4 h. Se filtró el catalizador y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se puede cromatografiar en columna de gel de sílice con la mezcla indicada. A continuación, sobre el ácido seco se añadió ácido trifluoroacético recién destilado y se pasó argón a través de la disolución hasta la evaporación del ácido trifluoroacético. El aceite residual se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la disolución se lavó sucesivamente con agua, disolución saturada de bicarbonato sódico y agua. Se secó sobre sulfato sódico y se evaporó el disolvente a

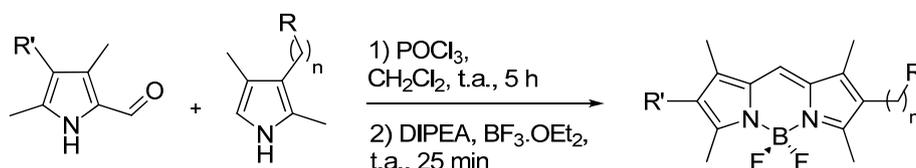
<sup>25</sup> García-Moreno, I., Amat-Guerri, F., Lira, M., Costela, A., Infantes, L., Sastre, R., López Arbeloa, F., Bañuelos, J., López Arbeloa, I. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 3088.

<sup>26</sup> Mackman, R. L., Micklefield, J., Block, M. H., Leepe, F. J., Battersby, A. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 2111.

presión reducida. El residuo se cromatógrafió en columna de sílice utilizando como eluyente la mezcla indicada en cada caso.

#### 6.5.1.4 Síntesis de BODIPYs asimétricos

Se llevó a cabo mediante un procedimiento descrito para productos similares (Esquema 6.11).<sup>27</sup>

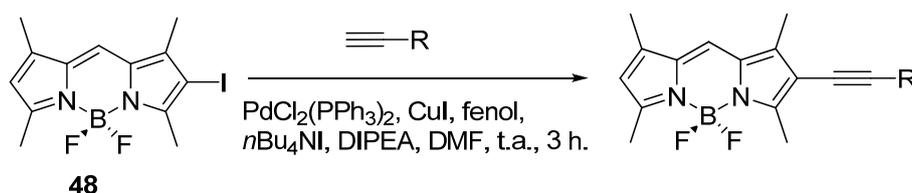


Esquema 6.11. Síntesis de BODIPYs.

$\text{POCl}_3$  (1 eq) se adicionó a una disolución del  $\alpha$ -H-pirrol (1 eq) y el 2-formilpirrol (1 eq) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y la mezcla se agitó durante 5 h bajo atmósfera de argón. A continuación se adicionó DIPEA (5 eq), 5 minutos después  $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$  (5 eq) y de nuevo DIPEA (5 eq) y  $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$  (5 eq). La disolución resultante se mantuvo con agitación 20 min, se lavó con agua, se secó con  $\text{MgSO}_4$ , se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se cromatógrafió en columna de sílice utilizando la mezcla de disolventes indicada en cada caso.

#### 6.5.1.5 Síntesis de BODIPYs 2-sustituidos (Sonogashira-Hagihara)

A partir de 2-yodo-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (**48**) y el correspondiente alquino terminal. Se siguió un procedimiento descrito para compuestos similares (Esquema 6.12)<sup>28</sup>



Esquema 6.12. Síntesis de 2-R-BODIPY por acoplamiento de Sonogashira.

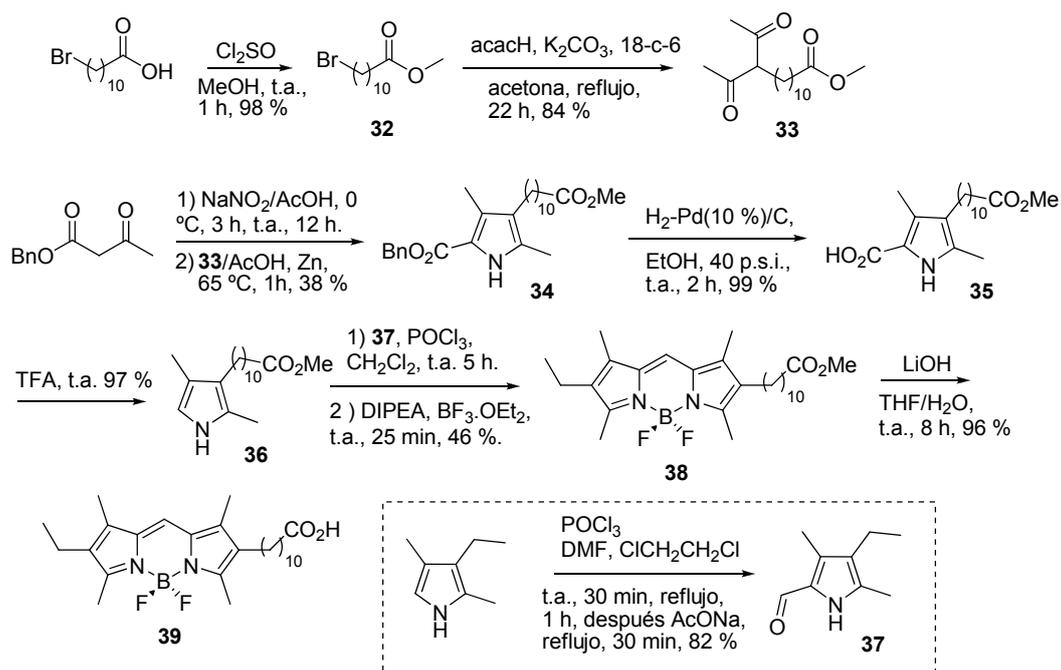
<sup>27</sup> Meltola, N. J., Wahlroos, R., Soini, A. E. *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 635.

<sup>28</sup> Wan, C., Burghart, A., Chen, J., Bergström, F., Johansson, L. B., Wolford, M. F., Kim, T. G., Topp, M. R., Hochstrasser, R. M., Burgess, K. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4430-4441.

Una mezcla de **48** (1 eq), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.11 eq), CuI (0.34 eq), fenol (0.9 eq), *n*Bu<sub>4</sub>NI (3.5 eq), DIPEA y DMF seca se agitó a temperatura ambiente durante 5 min bajo atmósfera de argón. A continuación se añadió el alquino correspondiente (1 eq) y se dejó la mezcla en las mismas condiciones durante 3 h. Se diluyó la mezcla con AcOEt, la disolución se lavó con agua, se secó con MgSO<sub>4</sub> y se evaporó el disolvente a presión reducida. El residuo se cromatografió en columna de gel de sílice con la mezcla indicada en cada caso.

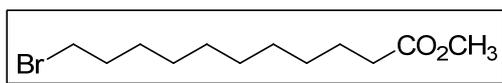
### 6.5.2 Síntesis de COOH-10C-2EtBDP (39)

Se obtuvo en 7 pasos a partir de ácido 11-bromoundecanoico (Esquema 6.13).



Esquema 6.13.

#### 6.5.2.1.1 11-Bromoundecanoato de metilo (32)



Se siguió un procedimiento descrito para la obtención de productos similares.<sup>29</sup>

<sup>29</sup> Starck, J. P., Nakatani, Y., Ourisson, G. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 2629-2638.

Sobre una disolución agitada de ácido 11-bromoundecánico (2 g, 7.54 mmol) en metanol (100 mL) a 0°C, bajo atmósfera de argón, se añadió gota a gota cloruro de tionilo ( $\text{Cl}_2\text{SO}$ ) (0.82 mL, 1.34 g, 11.3 mmol) recién destilado. Tras 1 h a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente a vacío. El producto se disuelve en AcOEt y se lava con una disolución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y luego con agua. Rendimiento: 2.06 g (98 %).

**TLC** (hexano/AcOEt 4:1):  $R_f = 0.85$ .

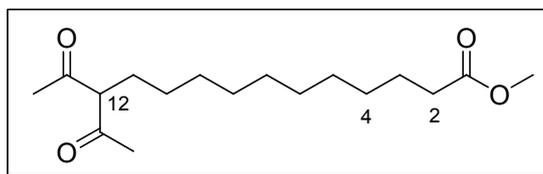
**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.23-1.35 (m, 10 H, H-4 a H-8), 1.41 (m, 2 H, H-9), 1.61 (m, 2 H, H-3), 1.85 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, H-10), 2.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2 H, H-2), 3.40 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, H-11), 3.66 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  24.9 (C-3), 28.1 (C-9), 28.7, 29.1, 29.2, 29.30, 29.33 (C4 a C-8), 32.8 (C-10), 34.0 (C-11), 34.1 (C-2), 51.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 174.3 (CO) ppm.

**FT-IR** (KCl)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2929, 2855, 1741 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1459, 1436, 1246, 1196, 1172  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 278 [masa nominal,  $\text{M}^+$ ] no observado, 199 [M-Br] (13).

#### 6.5.2.1.2 12-Acetil-13-oxotetradecanoato de metilo (33)



Se siguió el procedimiento general para la monoalquilación de acetilacetona partiendo de acetilacetona (7.24 g, 7.46 mL, 71.6 mmol), 11-bromoundecanoato de metilo (**32**) (2.0 g, 7.16 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (5.0 g, 35.8 mmol) y 18-corona-6 (0.07 mmol) en acetona (100 mL). Columna con hexano/AcOEt 9:1. Aceite incoloro. Rendimiento: 1.79 g (84%).

**TLC** (hexano/AcOEt, 9:1):  $R_f = 0.3$ .

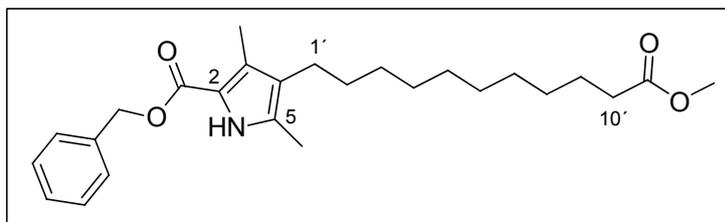
**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.23-1.32 (m, 12 H, H-4 a H-9), 1.36 (m, 2 H, H-10), 1.60 (m, 2 H, H-3), 1.69 (m, 2 H, H-11), 2.14 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 2.27 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 2.29 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2 H, H-2), 3.65 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.74 (t,  $J = 6.5$  Hz, 1 H, H-12) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  19.8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 24.9 (C-3), 25.9 (C-10), 28.6 (C-11), 29.10, 29.17, 29.19, 29.3, 29.4 (C-4 a C-9), 31.9 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 34.1 (C-2), 51.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 68.2 (C-12), 174.3 ( $\text{COOCH}_3$ ), 197.0 ( $\text{COCH}_3$ ) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3453, 2913, 2851, 1741 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , éster), 1676 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , ceto), 1596, 1274, 1175, 1058  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 298 [ $\text{M}^+$ ] no observado, 283 [ $\text{M}-\text{CH}_3$ ] (34), 251 (18), 225 [ $\text{M}-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ ] (16).

### 6.5.2.1.3 3,5-Dimetil-4-(10-metoxicarbonildecil)-1*H*-pirrol-2-ilcarboxilato de bencilo (34)



Obtenido por reacción de Johnson-Knorr mediante el método general a partir de nitrito sódico (415 mg, 6.0 mmol) en agua (2 mL), acetoacetato de bencilo (1.154 g, 1.037 mL, 6.0 mmol) en ácido acético glacial (8 mL), 12-acetil-13-oxotetradecanoato de metilo (**33**) (1.790 g, 6.0 mmol) y Zn en polvo (780 mg). Purificación: agua (20 mL), AcOEt (3 × 20 mL). Columna con hexano/AcOEt 9:1. Aceite amarillo. Rendimiento: 955 mg (38%).

**TLC** (hexano/AcOEt, 4:1):  $R_f = 0.4$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.22-1.44 (m, 12 H, H-3' a H-8'), 1.61 (m, 4 H, H-2', H-9'), 2.17, 2.27 (dos s, cada uno 3 H,  $\text{CH}_3$ -3,  $\text{CH}_3$ -5), 2.30 (m, 4 H, H-1' y H-10'), 3.66 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 5.28 (s, 2 H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 7.37 (m, 5 H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ) ppm.

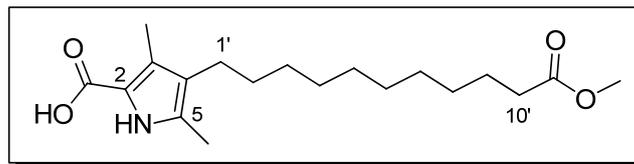
**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.7 ( $\text{CH}_3$ -pirrol), 11.6 ( $\text{CH}_3$ -pirrol), 24.0 (C-1'), 24.9 (C-9'), 27.6, 28.4, 28.9 a 29.6 (C-3' a C-8'), 30.7 (C-2'), 34.1 (C-10'), 51.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 65.3 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 110.6 (C-2), 116.3, 122.6 (C-3, C-4), 128.0, 128.1, 128.5 ( $\text{C}_o$ ,  $\text{C}_m$ ,  $\text{C}_p$ ), 129.7 (C-5), 136.7 ( $\text{C}_i$ ), 174.3 ( $\text{COOCH}_3$ ), 190.9 ( $\text{COOBn}$ ) ppm.

**FT-IR** (KCl)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3320, 2927, 2855, 1739 ( $\nu_{\text{C=O}}$  éster metílico), 1699 ( $\nu_{\text{C=O}}$  éster bencilico), 1436, 1258, 1169  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 427 [ $\text{M}^+$ ] (19), 242 [ $\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{18}\text{CO}_2\text{CH}_3$ ] (75).

En las siguientes dos etapas (compuestos **35** y **36**) se siguieron los métodos generales para desbencilar mediante hidrogenolisis y posterior descarboxilación del ácido generado, como sigue:

**6.5.2.1.4 Ácido 3,5-dimetil-4-(10'-metoxicarbonildecil)-1H-pirrol-2-carboxílico (35)**



A partir de **34** (950 mg, 2.22 mmol) en MeOH (25 mL) y Pd/C (10%) (70 mg)  
Rendimiento: 740 mg (99%).

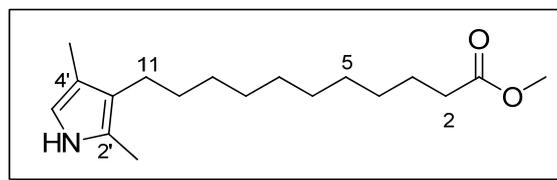
**TLC** (hexano/AcOEt, 4:1):  $R_f = 0.15$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.15-1.43 (m, 12 H, H-3' a H-8'), 1.60 (m, 2 H, H-9'), 1.82 (m, 2 H, H-2'), 2.16 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -pirrol), 2.16 (m, 2 H, H-1'), 2.26 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ -pirrol), 2.27 (m, 2 H, H-10'), 3.66 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ) 8.74 (s a, 1 H,  $\text{NH}$ ) ppm

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.6 ( $\text{CH}_3\text{Py}$ ), 11.6 ( $\text{CH}_3\text{Py}$ ), 22.8 (C-1'), 24.9 (C-9'), 27.5, 28.3, 29.0 a 29.4 (C-3' a C-8'), 30.7 (C-2'), 34.1 (C-10'), 51.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 110.7 (C-2), 112.6, 119.0 (C-3, C-4), 127.7 (C-5), 174.3 ( $\text{COOCH}_3$ ), 190.9 ( $\text{COOH}$ ) ppm.

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 337 [ $\text{M}^+$ ] no observado, 293 [ $\text{M}-\text{CO}_2\text{H}$ ] (6), 152 [ $\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{18}\text{CO}_2\text{CH}_3$ ] (8), 108 [ $\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{18}\text{CO}_2\text{CH}_3-\text{CO}_2\text{H}$ ] (100).

**6.5.2.1.5 11-(2',4'-Dimetil-1H-pirrol-3'-il)undecanoato de metilo (36)**



A partir de **35** (822 mg, 2.43 mmol) y ácido trifluoroacético (4 mL).  
Purificación: se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) y se lavó como se indica en los métodos generales. El residuo se cromatografió en columna de sílice utilizando como eluyente la mezcla hexano/AcOEt 9:1. Aceite incoloro. Rendimiento: 690 mg (97%).

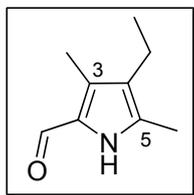
**TLC** (hexano/AcOEt, 4:1):  $R_f = 0.65$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.19-1.48 (m, 12 H, H-4 a H-9), 1.61 (m, 2 H, H-3), 1.82 (m, 2 H, H-10), 2.16 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ -pirrol), 2.19 (m, 2 H, H-11), 2.29 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ -pirrol), 2.32 (m, 2 H, H-2), 3.66 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.36 (s, 1 H, H-5'), 7.65 (s a, 1 H,  $\text{NH}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.3 ( $\text{CH}_3$ -pirrol), 11.2 ( $\text{CH}_3$ -pirrol), 22.7 (C-11), 24.9 (C-3), 27.4, 28.2, 28.9 a 29.4 (C-4 a C-9), 31.1 (C-10), 34.0 (C-2), 51.3 ( $\text{OCH}_3$ ), 112.6 (C-5'), 117.8, 118.9 123.5 (C-2', C-3', C-4'), 174.2 ( $\text{COOCH}_3$ ) ppm.

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 293 (9) [ $\text{M}^+$ ], 108 (100) [ $\text{M-C}_9\text{H}_{18}\text{CO}_2\text{CH}_3$ ].

#### 6.5.2.1.6 4-Etil-2-formil-3,5-dimetil-1H-pirrol (37)



Producto de síntesis descrita, se obtuvo por el mismo procedimiento.<sup>30,31</sup>

Sobre DMF anhidra (1.30 mL, 16.8 mmol), enfriada a 0 °C, agitada y bajo atmósfera de argón, se adicionó  $\text{POCl}_3$  (1.55 mL, 16.6 mmol), gota a gota. Después de agitar durante 10 min a 0°C, se adicionó 1,2-dicloroetano sobre el sólido formado (complejo de Vilsmeier) destilado (10 mL) seguido de una disolución de 3-etil-2,4-dimetil-1H-pirrol (*kriptopirrol*) (2 mL, 14.8 mmol) en 1,2-dicloroetano (10 mL). La mezcla se dejó a temperatura ambiente 30 min y a continuación se calentó a reflujo durante 1 h. Tras enfriar a temperatura ambiente, se añadió disolución acuosa de acetato sódico trihidratado (6 g en 10 mL de agua) y la mezcla se calentó nuevamente a reflujo durante 30 min. Tras enfriar, la fase acuosa se separó, se neutralizó con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2  $\times$  20 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (20 mL), con agua (2  $\times$  20mL), y se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se filtró, se eliminó el disolvente a vacío, y el residuo se cromatografió en columna de sílice utilizando hexano/AcOEt 4:1. El producto se recrystalizó de etanol/agua. Rendimiento: 1.99 g (82 %), pf 104-105 °C.

**TLC** (hexano/AcOEt 2:1):  $R_f = 0.65$ .

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.06 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 2.26 (s, 3 H, pirrol- $\text{CH}_3$ ), 2.27 (s, 3 H, pirrol- $\text{CH}_3$ ), 2.38 (c,  $J = 7.6$  Hz, 2 H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 9.45 (s, 1 H,  $\text{CHO}$ ), 9.92 (s a, 1 H,  $\text{NH}$ ) ppm.

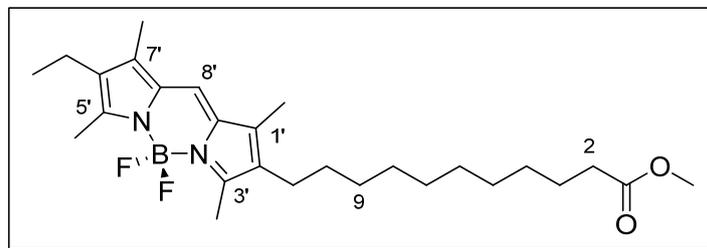
<sup>30</sup> Boiadjiev, S. E., Lightner, D. A. *Tetrahedron*. **1999**, *55*, 10871-10886.

<sup>31</sup> Lightner, D. A., Quistad, G. B. *J. Heterocycl. Chem.* **1973**, *10*, 273-274.

$^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.7 ( $\text{CH}_3\text{-C3}$ ), 11.5 ( $\text{CH}_3\text{-C5}$ ), 15.0 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 16.9 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 124.8 (C-4), 127.8 (C-2), 132.0, 135.6 (C-3, C-5), 175.6 (CHO) ppm.

MS-IE,  $m/z$  (%): 151 [ $\text{M}^+$ ] (42), 136 [ $\text{M-CH}_3$ ] (100).

**6.5.2.1.7 11-(1',3',5',7'-Tetrametil-4',4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indaceno-2-il)undecanoato de metilo (COOMe-10C-2EtBDP) (38)**



Se siguió el método general para la preparación de BODIPYs, a partir de  $\text{POCl}_3$  (120 mg, 73  $\mu\text{L}$ , 0.783 mmol) y los pirroles **37** (119 mg, 0.783 mmol) y **36** (230 mg, 0.783 mmol), en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 mL), DIPEA [ $2 \times$  (506 mg, 682  $\mu\text{L}$ , 3.92 mmol)],  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  [ $2 \times$  (556 mg, 495  $\mu\text{L}$ , 3.915 mmol)]. Purificación: lavados con agua ( $3 \times 50$  mL). Se cromatografió en columna de sílice utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Sólido rojo ceroso. Rendimiento: 170 mg (46 %).

TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $R_f = 0.50$ .

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.06 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.20-1.35 (m, 12 H, H-4 a H-9), 1.38 (m, 2 H, H-10), 1.60 (m, 2 H, H-3), 2.14, 2.15 (dos s, cada uno 3 H,  $\text{CH}_3\text{-C1}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C7}'$ ), 2.33 (m, 6 H, H-11,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , H-2), 2.48, 2.49 (dos s, cada uno 3 H,  $\text{CH}_3\text{-C3}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}'$ ) 3.66 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ) 6.94 (s, 1 H,  $\text{CH-8}'$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.4, 9.6 ( $\text{CH}_3\text{-C1}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C7}'$ ), 12.5, 12.7 ( $\text{CH}_3\text{-C3}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}'$ ), 14.6 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 17.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 24.1 (C-11), 24.9 (C-3), 29.1-29.5 (C-9 a C-4), 30.1 (C-10), 34.1 (C-2), 51.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 118.5 (C-8'), 130.2, 131.5, 132.3, 132.4, 136.6, 136.9 (C-1', C-7', C-7a', C-8a', C-2', C-6'), 154.5, 154.9 (C-3', C-5'), 174.3 (CO) ppm.

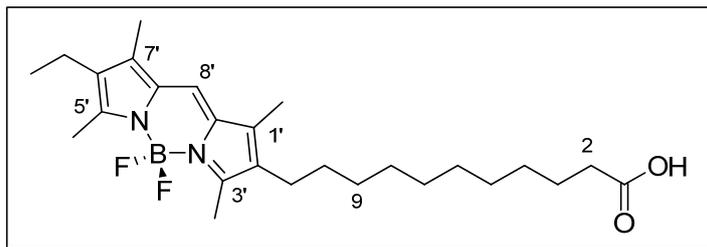
FT-IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2924, 2849, 1742 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1604, 1474, 1226, 1194, 1067, 976  $\text{cm}^{-1}$ .

MS-IE,  $m/z$  (%): 474 [ $\text{M}^+$ ] (19), 454 [ $\text{M-HF}$ ] (16), 289 [ $\text{M-C}_9\text{H}_{18}\text{CO}_2\text{CH}_3$ ] (100), 273 (14).

Análisis (%): calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ : C, 65.85; H, 8.80; N, 5.69. Encontrado C, 66.20; H, 9.24; N, 5.42.

HPLC (columna de fase inversa  $\text{C}_{18}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  9/1, 2 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}} = 450, 525$  nm):  $R_t = 7.63$  min (97% de pureza a dichas  $\lambda$ ).

**6.5.2.1.8 Ácido 11-(1',3',5',7'-tetrametil-4',4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-2-il)undecanóico (COOH-10C-2EtBDP) (39)**



Se siguió un procedimiento descrito para la hidrólisis de ésteres conteniendo el cromóforo BODIPY.<sup>32</sup>

Sobre una disolución del éster **38** (28 mg, 0.059 mmol) en THF/H<sub>2</sub>O 1:1 (10 mL) se añadió LiOH (29 mg, 1.18 mmol) y se mantuvo la mezcla de reacción con agitación y a temperatura ambiente durante 8 h. A continuación se añadieron 10 mL de agua, se enfrió la mezcla a 0 °C y se neutralizó con una disolución de HCl al 5% hasta pH ligeramente ácido. Se extrajo la mezcla con AcOEt (3 × 15 mL), las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua (3 × 20 mL) y se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se cromatografió en columna de sílice utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1. Rendimiento: 26 mg (96 %).

**TLC** (hexano/AcOEt 4:1+1% AcOH):  $R_f = 0.2$ .

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.06 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.20-1.37 (m, 12 H, H-9 a H-4), 1.39 (m, 2 H, H-10), 1.63 (m, 2 H, H-3), 2.15, 2.16 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-C1', CH<sub>3</sub>-C7'), 2.34 (m, 6 H, H-11, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H-2), 2.48 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-C3', CH<sub>3</sub>-C5'), 6.94 (s, 1 H, CH-8') ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.4, 9.6 (CH<sub>3</sub>-C1', CH<sub>3</sub>-C7'), 12.5, 12.7 (CH<sub>3</sub>-C3', CH<sub>3</sub>-C5'), 14.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 17.3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24.1 (C-11), 24.7 (C-3), 29.0-29.5 (C-9 a C-4), 30.1 (C-10), 34.0 (C-2), 118.5 (C-8'), 130.3, 131.6, 132.3, 132.4, 136.6, 137.0 (C-1', C-7', C-7a', C-8a', C-2', C-6'), 154.5, 154.9 (C-3', C-5'), 179.3 (CO) ppm.

**FT-IR** (KCl)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2926, 2853, 1705 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1605, 1470, 1408, 1232, 1195, 1079, 978 cm<sup>-1</sup>.

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 460.3 [M<sup>+</sup>] (17), 440 [M-HF] (10), 420 [M-2HF] (5), 289 [M-C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>CO<sub>2</sub>H] (100), 274 (13), 273 (14), 136 (48).

<sup>32</sup> Delgado, J. *Tesis Doctoral, U. Autónoma de Madrid*, **2004**, 174.

**MS-HR** (peak matching): calculado para  $C_{26}H_{39}BF_2N_2O_2$  460.3055; encontrado 460.3073.

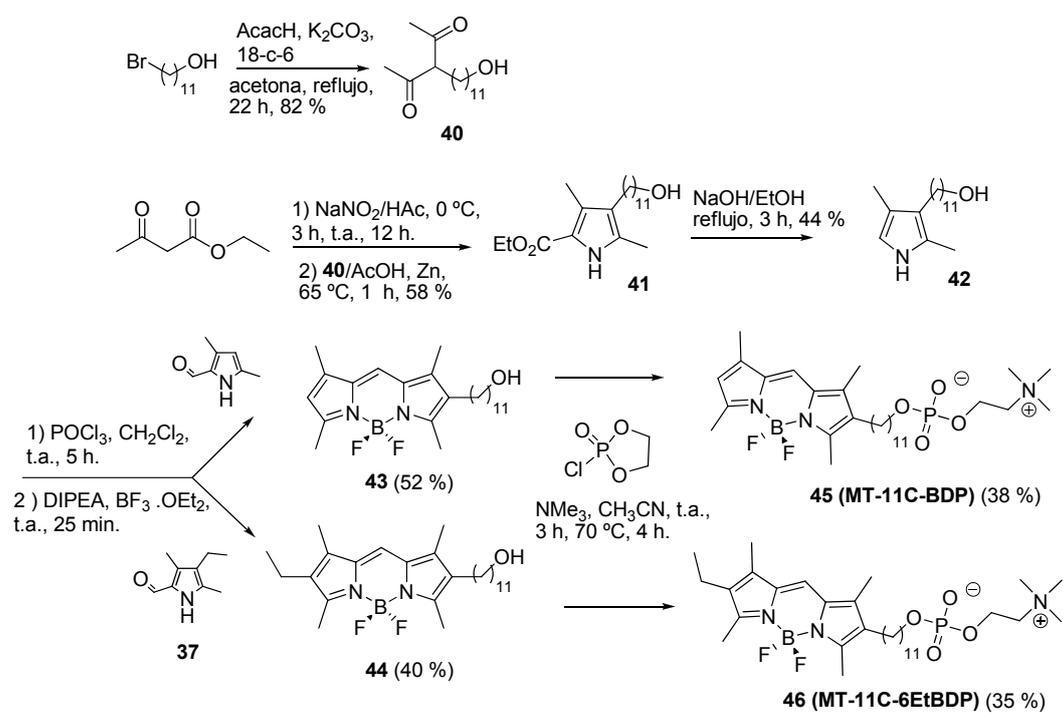
**Análisis** (%): calculado para  $C_{26}H_{39}BF_2N_2O_2+0.5H_2O$ : C, 66.52; H, 8.59; N, 5.97. Encontrado: C, 66.89; H, 8.86; N, 5.87.

**HPLC** (columna de fase inversa  $C_{18}$ , MeOH/ $H_2O$  9/1, 1.9 mL/min,  $\lambda_{anal} = 362, 346, 520$  nm):  $R_t = 4.49$  min (100% de pureza a dichas  $\lambda$ ).

### 6.5.3 Síntesis de análogos de Miltefosina con grupo BODIPY

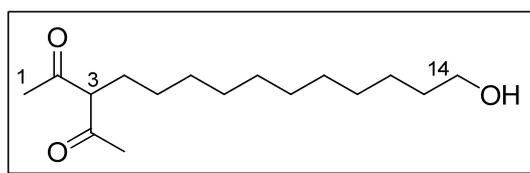
#### 6.5.3.1 Síntesis de MT-11C-BDP (45) y MT-11C-6EtBDP (46)

Ambas síntesis se llevaron a cabo en 5 pasos a partir de acetilacetona y 11-bromoundecanol (Esquema 6.14)



Esquema 6.14. Síntesis de análogos de Miltefosina mediante el método 1.

### 6.5.3.1.1 3-Acetil-14-hidroxitetradecan-2-ona (40)



Se siguió el método general para la monoalquilación de 1,3-dionas, usando acetilacetona (31.1 g, 32 mL, 308 mmol), 11-bromoundecanol (7.7 g, 30.8 mmol),  $K_2CO_3$  (21.3 g, 154 mmol) y 18-corona-6 (0.2 mmol), en acetona (200 mL). Columna con hexano/AcOEt 7:3. Aceite incoloro. Rendimiento: 6.8 g (82%).

TLC (hexano/AcOEt, 1:1):  $R_f = 0.35$ .

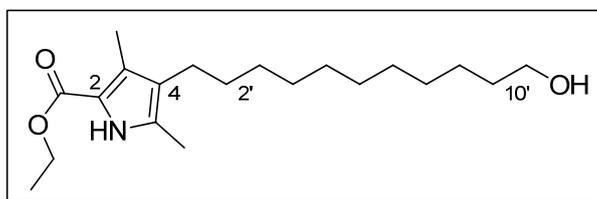
$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  1.22-1.43 (m, 14 H, H-5 a H-12), 1.56 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2 H, H-13), 1.7 (m, 2 H, H-4), 2.14 (s, 3 H,  $CH_3$ ), 2.28 (s, 3 H,  $CH_3$ ), 3.63 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, H-14), 3.75 (t,  $J = 6.5$  Hz, 1 H, H-3) ppm.

$^{13}C$ -RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  19.8 ( $CH_3$ ), 25.7, 25.9, 29.2 a 29.4 (C-5 a C-12), 28.6 (C-4), 31.9 ( $CH_3$ ), 32.8 (C-13), 63.0 (C-14), 68.2 (C-3), 197.0 (C=O) ppm.

FT-IR (KBr)  $\nu_{max}$ : 3391 ( $\nu_{OH}$ ), 2925, 2849, 1681 ( $\nu_{C=O}$ ), 1667, 1584 1469, 1408, 1358, 1278, 1171, 1066, 955  $cm^{-1}$ .

MS-ESI<sup>+</sup>,  $m/z$ : 271 [ $M+H^+$ ], 293 [ $M+Na^+$ ].

### 6.5.3.1.2 3,5-Dimetil-4-(11'-hidroxiundecil)-1H-pirrol-2-carboxilato de etilo (41)



Se siguió el método general usando la síntesis de Johnson-Knorr de pirroles. Cantidades: nitrito sódico (1.86g, 26.9 mmol) en agua (5 mL), acetoacetato de etilo (3.5 g, 26.9 mmol) en ácido acético glacial (10 mL), **40** (7.28 g, 26.9 mmol), Zn en polvo (3.5 g). Purificación: lavado con agua (30 mL) y extracción con AcOEt (3 × 20 mL). Eluyente de la columna: hexano/AcOEt 7:3. Aceite amarillo. Rendimiento: 5.29 g (58%).

TLC (hexano/AcOEt, 1:1):  $R_f = 0.50$ .

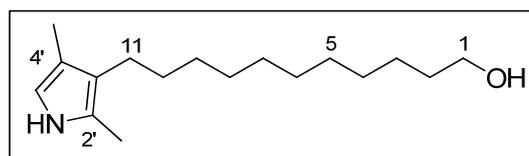
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.15-1.38 (m, 14 H, H-3' a H-9'), 1.36 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.55 (m, 4 H, H-2', H-10'), 2.12 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-C3), 2.16 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-C5), 2.40 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, H-1'), 3.63 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, H-11'), 4.3 (c,  $J = 7.2$  Hz, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>). 9.4 (s a, 1 H, NH) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.6 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 11.5 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 14.6, 15.1 (C1', CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 25.7, 29.3-29.5 (C-3' a C-9'), 31.3, 32.8 (C2', C10'), 60.3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 63.0 (C-11'), 118.0 (C-2), 122.4, 123.5 (C-3, C-4), 129.3 (C-5), 161.7 (CO) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3397, 3305, 2927, 2853, 1683 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1647, 1443, 1280 cm<sup>-1</sup>.

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 337 [M<sup>+</sup>] (33), 180 [M-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>O] (100).

#### 6.5.3.1.3 11-(2',4'-Dimetil-1H-pirrol-3-il)undecan-1-ol (42)



Se siguió el procedimiento descrito para la descarboxilación de productos similares.<sup>33</sup>

Sobre una disolución de 3,5-dimetil-4-(11'-hidroxiundecil)pirrol-2-carboxilato de etilo (**41**) (2.26 g, 6.7 mmol) en etanol (14 mL) se adicionó una disolución de NaOH (1.050 g, 26.2 mmol) en agua (6 mL) y la mezcla se calentó en baño de agua durante 3 h. Se añadió más agua (30 mL), se neutralizó hasta pH ligeramente ácido utilizando HCl al 5% y el producto se extrajo con AcOEt (3 × 20 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua, y se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se cromatografió en columna de sílice utilizando hexano/AcOEt 1:1. Se obtuvo así el ácido 3,5-dimetil-4-(11'-hidroxiundecil)pirrol-2-carboxílico como un aceite incoloro que oscurece en contacto con el aire. Rendimiento: 905 mg (44%).

**TLC** (hexano/AcOEt, 1:1):  $R_f = 0.2$ .

A continuación el ácido se disolvió en EtOH (5 mL) y sobre esta disolución se añadió ácido acético glacial (2 mL) a 90 °C. Tras 5 min se adicionó agua (20 mL), se extrajo con AcOEt (3 × 20 mL), las fases orgánicas reunidas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se eliminó el disolvente a vacío. Rendimiento: 790 mg (98%); rendimiento global: 44%.

<sup>33</sup> Paine III, J. B., Hiom, J., Dolphin, D. *J. Org. Chem.* **1998**, *53*, 2796-2802.

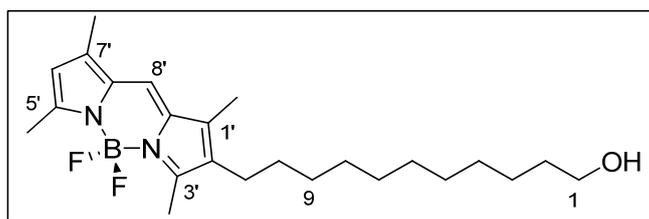
**TLC** (hexano/AcOEt, 1:1):  $R_f = 0.7$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.22-1.36 (m, 14 H, H-3 a H-9), 1.56 (m, 4 H, H-2, H-10), 2.01 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{-C4}'$ ), 2.15 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{-C2}'$ ), 2.41 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2 H, H-11), 3.64 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, H-1), 6.38 (s, 1 H, H-5'), 7.50 (s a, 1 H, NH) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.3 ( $\text{CH}_3\text{-pirrol}$ ), 11.2 ( $\text{CH}_3\text{-pirrol}$ ), 20.8 (C-11), 24.3, 25.6, 29.3-29.6 (C-3 a C-9), 31.1, 32.5 (C-2, C-10), 62.8 (C-1), 112.6 (C-5'), 117.8, 118.9 (C-3', C-4'), 123.5 (C-2') ppm.

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 265 [ $\text{M}^+$ ] (21), 108 [ $\text{M-C}_{10}\text{H}_{21}\text{O}$ ] (100).

#### 6.5.3.1.4 11-(1',3',5',7'-Tetrametil-4',4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-2'-il)undecan-1-ol (OH-11C-BDP) (43)



Se llevó a cabo utilizando el método general para la síntesis de BODIPYs, con  $\text{POCl}_3$  (163 mg, 100  $\mu\text{L}$ , 1.06 mmol), 3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2-carbaldehído (131 mg, 1.06 mmol), el alcohol **42** (280 mg, 1.06 mmol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 mL), DIPEA (685 mg, 923  $\mu\text{L}$ , 5.3 mmol) y  $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$  (752 mg, 665  $\mu\text{L}$ , 5.3 mmol). Purificación: lavado con agua (3  $\times$  50 mL) y cromatografía en columna con  $\text{CHCl}_3$ . Sólido rojo. Rendimiento: 230 mg (52 %), pf 88-91  $^\circ\text{C}$ .

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.7$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.23-1.36 (m, 14 H, H-9 a H-3), 1.42 (m, 2 H, H-10), 1.56 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2 H, H-2), 2.16 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{-C1}'$ ), 2.22 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{-C7}'$ ), 2.34 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, H-11), 2.50, 2.51 (dos s, 3 H cada uno H,  $\text{CH}_3\text{-C3}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}'$ ), 3.63 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, H-1), 6.00 (s, 1 H,  $\text{CH-6}'$ ), 6.98 (s, 1 H,  $\text{CH-8}'$ ) ppm.

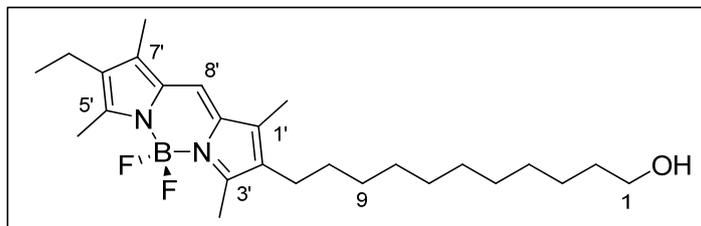
**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.6 ( $\text{CH}_3\text{-C1}'$ ), 11.2 ( $\text{CH}_3\text{-C7}'$ ), 12.8, 14.5 ( $\text{CH}_3\text{-C3}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}'$ ), 24.1 (C-11), 25.7, 29.4-29.5, 30.0 (C-10 a C-3), 32.8 (C-2), 63.0 (C-1), 118.2 (C-6'), 119.2 (C-8'), 131.1, 132.8, 133.1, 137.9, 139.8 (C-1', C-7', C-7a', C-8a', C-2'), 155.0, 156.7 (C-3', C-5') ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3588, 3433, 2927, 2850, 1614, 1469, 1236, 1068  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 418 [ $M^+$ ] (20), 398 [ $M-FH$ ] (62), 383 (9), 261 (100), 241 (17).

**HPLC** (columna de fase inversa  $C_{18}$ , MeOH/ $H_2O$  9/1, 1.8 mL/min,  $\lambda_{anal} = 356, 345, 520$  nm):  $R_t = 4.83$  min (100% de pureza a dichas  $\lambda$ ).

**6.5.3.1.5 11-(6'-Etil-1',3',5',7'-tetrametil-4',4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-2'-il)undecan-1-ol (OH-11C-6EtBDP) (44)**



A partir de  $POCl_3$  (130 mg, 80  $\mu$ L, 0.85 mmol), el aldehído **37** (129 mg, 0.85 mmol), y el pirrol **42** (226 mg, 0.85 mmol),  $CH_2Cl_2$  (170 mL), DIPEA (550 mg, 740  $\mu$ L, 4.25 mmol) y  $BF_3 \cdot OEt_2$  (603 mg, 534  $\mu$ L, 4.25 mmol). Purificación: lavado con agua (3  $\times$  50 mL) y cromatografiado con hexano/AcOEt 4:1. Sólido rojo ceroso. Rendimiento: 150 mg (40 %).

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.65$ .

**$^1H$ -RMN** (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  1.05 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H,  $CH_2CH_3$ ), 1.21-1.35 (m, 14 H, H-9 a H-3), 1.41 (m, 2 H, H-10), 1.55 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2 H, H-2), 2.14, 2.15 (dos s, 3 H cada uno,  $CH_3-C1'$ ,  $CH_3-C7'$ ), 2.36 (m, 4 H, H-11,  $CH_2CH_3$ ), 2.48 (s, 6 H,  $CH_3-C3'$ ,  $CH_3-C5'$ ), 3.62 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, H-1), 6.93 (s, 1 H, H-8') ppm.

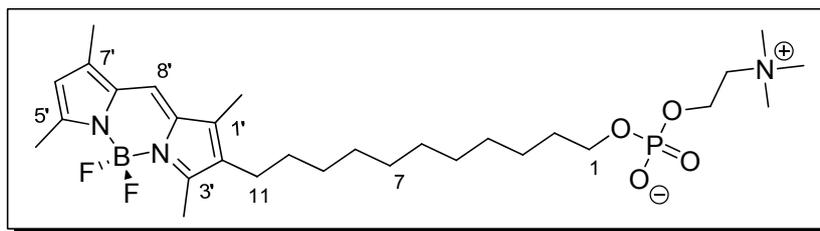
**$^{13}C$ -RMN** (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  9.3, 9.5 ( $CH_3-C1'$ ,  $CH_3-C7'$ ), 12.5, 12.6 ( $CH_3-C3'$ ,  $CH_3-C5'$ ), 14.6 ( $CH_2CH_3$ ), 17.2 ( $CH_2CH_3$ ), 24.0 (C-11), 25.7, 29.4-29.5 (C-9 a C-3), 30.1 (C-10), 32.7 (C-2), 63.0 (C-1), 118.5 (C-8'), 130.3, 131.5, 132.4, 136.6, 137.0 (C-1', C-2', C-6', C-7', C-7'a, C-8'a), 154.5, 154.9 (C-3', C-5') ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{max}$ : 3436 ( $\nu_{OH}$ ), 2924, 2852, 1612, 1475, 1234, 1195, 1070, 978  $cm^{-1}$ .

**MS-ESI $^+$** ,  $m/z$ : 446 [ $M+H^+$ ] no observado, 427 [ $M-F$ ] $^+$ , 469 [ $M+Na^+$ ], 915 [ $2M+Na^+$ ].

**HPLC** (columna de fase inversa  $C_{18}$ , MeOH/ $H_2O$  9/1, 1.2 mL/min,  $\lambda_{anal} = 375, 529$  nm):  $R_t = 6.66$  min (100 % de pureza a ambas  $\lambda$ ).

### 6.5.3.1.6 11-(1',3',5',7'-Tetrametil-4'4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacene-2'-il)undecilfosfatidilcolina (MT-11C-BDP) (45)



Se siguió el procedimiento general para la introducción del grupo fosfocolina, a partir del alcohol **43** (112 mg, 0.27 mmol), acetonitrilo (10 mL), trimetilamina (c.a. 2 mL) y 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-oxido (0.05 mL, 0.54 mmol). Sólido rojo. Rendimiento: 38 mg (24 %), pf 200-206 °C.

**TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 65:25:5):  $R_f = 0.3$ .

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  1.26-1.39 (m, 14 H, H-3 a H-9), 1.45 (m, 2 H, H-10), 1.63 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2 H, H-2), 2.19 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-C1'), 2.24 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-C7'), 2.39 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, H-11), 2.44 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-C3', CH<sub>3</sub>-C5'), 3.21 (s, 9 H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.61 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>N), 3.86 (dt,  $J = 6.5, 6.5$  Hz, 2 H, H-1), 4.24 (m, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 6.05 (s, 1 H, H-6'), 7.29 (s, 1 H, H-8') ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  9.6 (CH<sub>3</sub>-C1'), 11.2 (CH<sub>3</sub>-C7'), 13.0, 14.6 (CH<sub>3</sub>-C3', CH<sub>3</sub>-C5'), 24.8 (C-11), 27.0, 30.5-30.8, 31.2 (C-3 a C-10), 31.9 (C-2), 54.68, 54.73, 54.78 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 60.3 (d,  $J = 4.9$  Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 67.0 (d,  $J = 5.9$  Hz, C-1), 67.5 (s a, CH<sub>2</sub>N), 119.2 (C-6'), 121.3 (C-8'), 132.2, 134.3, 134.5, 139.9, 142.0 (C-1', C-7', C-7a', C-8a', C-2'), 156.1, 157.4 (C-3', C-5') ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3436, 2924, 2848, 1614, 1472, 1235 ( $\nu_{\text{P=O}}$ ), 1085 ( $\nu_{\text{P-O-C}}$ ), 971 cm<sup>-1</sup>.

**MS-ESI+**,  $m/z$ : 584 [M+H<sup>+</sup>], 1168 [2M+H<sup>+</sup>].

**MS-HR** (peak matching): calculado para C<sub>29</sub>H<sub>49</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>P+H 584.3594; encontrado 584.3570.

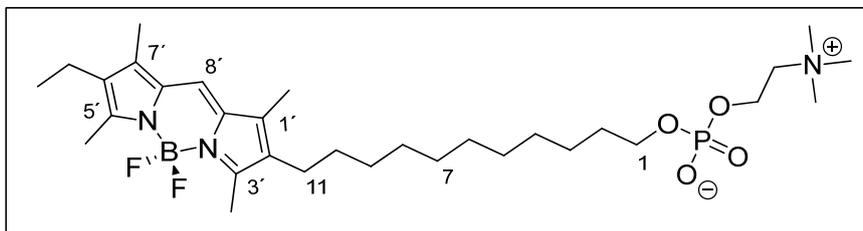
**Análisis** (%): calculado para C<sub>29</sub>H<sub>49</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>P+1.5H<sub>2</sub>O: C, 57.05; H, 8.58; N, 6.88. Encontrado: C, 57.03; H, 8.43; N, 6.53.

**HPLC** (columna de fase inversa C<sub>18</sub>, MeOH/H<sub>2</sub>O 9/1 + 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}} = 356, 345, 520$  nm):  $R_t = 3.21$  min (100% de pureza a todas la  $\lambda$ ).

**Absorción**: UV-VIS (DMSO):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 376 (6500), 490 (28900), 517 (71100) (error estimado para  $\epsilon$ :  $\pm 1500$ ).

**Emisión** (MeOH, corregido): 526 nm: rendimiento cuántico de fluorescencia: 0.93 (disolución  $\sim 10^{-6}$  M en MeOH).

**6.5.3.1.7 11-(6'-Etil-1',3',5',7'-tetrametil-4',4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-2'-il)undecilfosfatidilcolina (MT-11C-6EtBDP) (46)**



Obtenido a partir del alcohol **44** (98 mg, 0.22 mmol), acetonitrilo (10 mL), trimetilamina (2 mL) y 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-oxido (40  $\mu$ L, 63 mg, 0.44 mmol) siguiendo las condiciones descritas antes para la introducción del grupo fosfatidilcolina. Sólido rojo. Rendimiento: 45 mg (35 %), pf 218-221  $^{\circ}$ C.

**TLC** ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:5):  $R_f = 0.3$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1.06 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.22-1.37 (m, 14 H, H-3 a H-9), 1.40 (m, 2 H, H-10), 1.62 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2 H, H-2), 2.15, 2.16 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3\text{-C}1'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C}7'$ ), 2.39 (m, 4 H, H-11,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.41, 2.42 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3\text{-C}3'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C}5'$ ), 3.21 (s, 9 H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.61 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.86 (dt,  $J = 6.5, 6.5$  Hz, 2 H, H-1), 4.24 (m, 2 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 7.2 (s, 1 H, H-8')

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  9.4, 9.6 ( $\text{CH}_3\text{-C}1'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C}7'$ ), 12.7, 12.9 ( $\text{CH}_3\text{-C}3'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C}5'$ ), 15.0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 18.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 24.8 (C-11), 27.0, 30.5-30.8, 31.3 (C-3 a C-10), 31.9 (C-2), 54.68, 54.73 y 54.78 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), 60.3 (d,  $J = 5.0$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 67.0 (d,  $J = 5.9$  Hz, C-1), 67.5 (s a,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 120.6 (C-8'), 131.4, 132.8, 133.9, 138.6, 138.9 (C-1', C-7', C-7a', C-8a', C-2', C-6'), 155.4, 155.6 (C-3', C-5')

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3436, 2925, 2847, 1611, 1475, 1232 ( $\nu_{\text{P=O}}$ ), 1070 ( $\nu_{\text{P-O-C}}$ ), 972  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ESI $^+$** ,  $m/z$ : 612 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 634 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ], 1223 [ $2\text{M}+\text{H}^+$ ], 1245 [ $2\text{M}+\text{Na}^+$ ].

**Análisis (%)**: calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{53}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_4\text{P}+3.5\text{H}_2\text{O}$ : C, 55.19; H, 8.96; N, 6.23. Encontrado: C, 55.04; H, 9.50; N, 6.50.

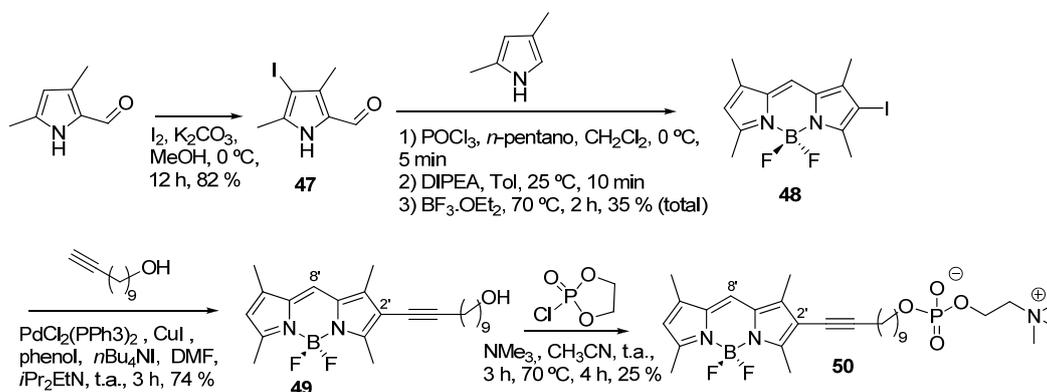
**HPLC** (columna de fase inversa  $\text{C}_{18}$ ,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  9/1 + 10 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 1.2 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}} = 375, 529$  nm):  $R_t = 3.55$  min (100% de pureza a dichas  $\lambda$ ).

**Absorción**: UV-VIS (MeOH):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 380 (10000), 502 (35000), 527 (82000).

**Emisión:** máximo a 536 nm, rendimiento cuántico de fluorescencia: 0.94 (disolución  $\sim 10^{-6}$  M en MeOH).

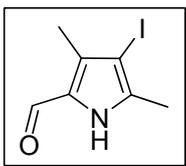
### 6.5.3.2 Síntesis de MT-11C-2INBDP (46)

Se sintetizó en 4 pasos a partir de 3,5-dimetilpirrol-2-carbaldehído y undec-10-in-1-ol (Esquema 6.15).



Esquema 6.15. Síntesis de MT-11C-2INBDP

#### 6.5.3.2.1 4-Yodo-3,5-dimetilpirrol-2-carbaldehído (47)



Compuesto de síntesis descrita. Se obtuvo por el mismo procedimiento.<sup>28</sup>

Una mezcla de 3,5-dimetilpirrol-2-carbaldehído (1g, 8.12 mmol), yodo (2.27 g, 8.93 mmol) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.68 g, 12.18 mmol) se agitó en metanol (25 mL) bajo atmósfera de argón a 0 °C durante 12 h. A continuación se añadió agua (30 mL) y la mezcla de reacción se extrajo con dietiléter (50 mL). La fase orgánica se lavó con disolución saturada de tiosulfato sódico (50 mL), se secó con  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se evaporó el disolvente. El residuo se recristalizó de pentano-diclorometano 5:1 v/v. Sólido blanco. Rendimiento: 1.57 g (82 %), pf 159-161 °C (lit.<sup>28</sup> 161-163 °C).

TLC (hexano/EtOAc 4:1):  $R_f = 0.20$ .

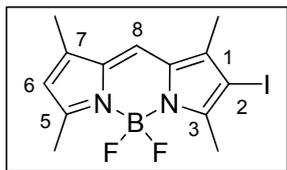
$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.28, 2.35 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3\text{-C3}$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}$ ), 9.49 (s, 1 H,  $\text{CHO}$ ), 10.44 (s a,  $\text{NH}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.7, 14.3 ( $\text{CH}_3\text{-C3}$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}$ ), 72.6, 129.0, 136.7, 139.9 (C-2, C-3, C-4, C-5), 176.2 ( $\text{CHO}$ ) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3206, 2521, 1636 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1624, 1552, 1500, 1435, 1363, 1266, 1048, 826, 786, 690  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 249 [ $\text{M}^+$ ] (100), 220 [ $\text{M-CHO}$ ] (23).

#### 6.5.3.2.2 1,3,5,7-Tetrametil-2-yodo-4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (2-I-tetraMe-BDP) (48)



Producto de síntesis descrita. Se obtuvo por el mismo procedimiento.<sup>28</sup>

Se adicionó  $\text{POCl}_3$  (12.89 mmol, 1.98 g, 1.202 mL) a una disolución agitada de 3,5-dimetilpirrol (12.89 mmol, 1.22 g, 1.32 mL) y el yodopirrol **47** (12.89 mmol, 3.22 g) en *n*-pentano (7 mL) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7 mL), y la mezcla se mantuvo con agitación 5 min a 0 °C. El precipitado rojo formado se filtró y se lavó con *n*-pentano frío. El sólido se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) y la disolución se trató con una disolución acuosa saturada de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , se lavó con agua, se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó el disolvente, obteniéndose un sólido naranja. Este sólido se redisolvió en tolueno (25 mL), se añadió DIPEA (18.04 mmol, 2,33 g, 3.15 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación se adicionó  $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$  (30.94 mmol, 4.40 g, 3.89 mL) y se calentó a 70 °C durante 2 h. Se enfrió a temperatura ambiente, se añadió  $\text{AcOEt}$  (120 mL), se lavó con agua, se secó con  $\text{MgSO}_4$ , se filtró, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se cromatógrafió en columna de gel de sílice con la mezcla hexano/acetato de etilo 7:3. Sólido rojo. Rendimiento: 1.69 g (35 %), pf 210-214 °C (lit.<sup>28</sup> 212-214 °C).

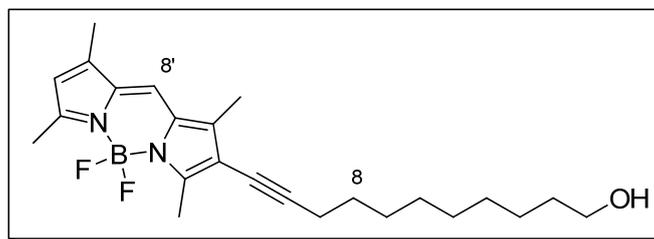
**TLC** (hexano/ $\text{AcOEt}$  1:1):  $R_f$  = 0.85.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.18, 2.22 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3\text{-C1}$ ,  $\text{CH}_3\text{-C7}$ ), 2.53, 2.57 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3\text{-C3}$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}$ ), 6.09 (s, 1 H, H-6), 7.04 (s, 1 H, H-8) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  11.3, 13.6 ( $\text{CH}_3\text{-C1}$ ,  $\text{CH}_3\text{-C7}$ ), 14.8, 15.4 ( $\text{CH}_3\text{-C3}$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}$ ), 80.5 (C-2) 120.0, 120.1 (C-6, C-8), 132.1, 134.0, 142.2, 143.2 (C-1, C-7, C-7a, C-8a), 155.1, 159.1 (C-3, C-5) ppm.

**MS-IE**, m/z (%): 374 [M]<sup>+</sup> (100), 354 [M-HF] (41).

**6.5.3.2.3 11-(1',3',5',7'-Tetrametil-4',4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-2'-il)undec-10-in-1-ol (OH-11C-2INBDP) (49)**



Se obtuvo por acoplamiento de Sonogashira, siguiendo el procedimiento general. Cantidades: **48** (0.70 mmol, 260 mg), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.08 mmol, 54 mg), CuI (0.24 mmol, 45 mg), fenol (0.63 mmol, 60 mg), *n*Bu<sub>4</sub>NI (2.43 mmol, 898 mg), DMF (7 mL), *i*Pr<sub>2</sub>EtN (3.5 mL) y undec-9-in-1-ol (0.7 mmol, 117 mg, 134 μL) Purificación: lavados con AcOEt (40 mL). Se cromatografió en columna de gel de sílice con la mezcla hexano/acetato de etilo 7:3. Sólido rojo. Rendimiento: 215 mg (74 %), pf 89-92 °C.

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1): *R<sub>f</sub>* = 0.55.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.24–1.48 (m, 10 H, H-3 a H-7), 1.50–1.64 (m, 4 H, H-2, H-8), 2.21, 2.23 (dos s, cada uno 3 H, CH<sub>3</sub>-C1', CH<sub>3</sub>-C7'), 2.44 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H, H-9), 2.51, 2.56 (dos s, cada uno 3 H, CH<sub>3</sub>-C3', CH<sub>3</sub>-C5'), 3.61 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H, H-1), 6.03 (s, 1 H, H-6'), 6.99 (s, 1 H, H-8') ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.5, 11.2 (CH<sub>3</sub>-C1', CH<sub>3</sub>-C7'), 13.3, 14.6 (CH<sub>3</sub>-C3', CH<sub>3</sub>-C5'), 19.6 (C-9), 25.7, 28.7, 28.9, 29.0, 29.3, 29.4, 32.7 (C-2 a C-8), 62.9 (C-1), 72.4 (C-11), 96.6 (C-10), 114.6 (C-2'), 119.4 (C-6'), 120.2 (C-8'), 131.6, 134.0, 141.0, 142.0 (C-1', C-7', C-7a', C-8a'), 157.8 (C-3', C-5') ppm.

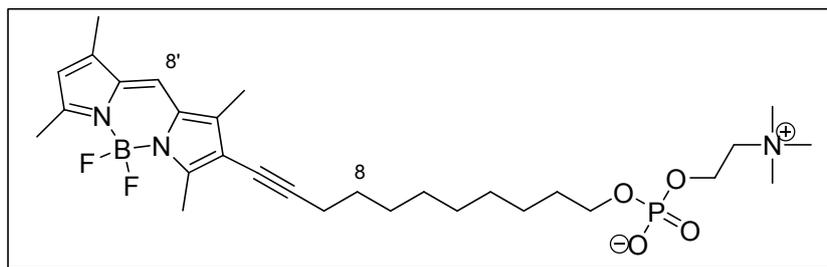
**FT-IR** (KBr) *v*<sub>máx</sub>: 3436, 2929, 2854, 1601, 1471, 1384, 1238, 1161, 1080, 1001 cm<sup>-1</sup>.

**MS-IE**, m/z (%): 414 [masa nominal, M<sup>+</sup>] (28), 394 [M-HF] (100), 379 [M-HF-CH<sub>3</sub>] (28).

**Análisis** (%): calculado para C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O: C, 69.57; H, 8.03; N, 6.76. Encontrado: C, 69.31; H, 7.85; N, 6.68.

**HPLC** (columna de fase inversa C<sub>18</sub>, MeOH/H<sub>2</sub>O 9/1, 1.8 mL/min, λ<sub>anal</sub> = 280, 375 y 529 nm): *R<sub>t</sub>* = 3.34 min. (100% de pureza a dichas λ).

**6.5.3.2.4 11-(1',3',5',7'-tetrametil-4',4'difluoro-4'-bora-3a',4a'-diazas-indacen-2'-il)undec-10-inilfosfatidilcolina (MT-11C-2INBDP) (50)**



Se siguió el procedimiento general para la introducción del grupo fosfatidilcolina en alcoholes. Cantidades: alcohol **49** (89 mg, 0.22 mmol), acetonitrilo (10 mL), 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-oxido (40  $\mu$ L, 0.43 mmol), trimetilamina (2 mL). Sólido rojo. Rendimiento: 32 mg (25 %), pf 207-209  $^{\circ}$ C.

**TLC** ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:5):  $R_f = 0.2$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1.31–1.54 (m, 10 H, H-3 a H-7), 1.56–1.69 (m, 4 H, H-2, H-8), 2.24 (6 H,  $\text{CH}_3\text{-C1}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C7}'$ ), 2.47 (m, 8 H,  $\text{CH}_3\text{-C3}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}'$ , H-9), 3.21 (s, 9 H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.61 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.86 (m, 2 H, H-1), 4.24 (m, 2 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 6.13 (s, 1 H, H-6'), 7.34 (s, 1 H, H-8') ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  10.6, 11.3 ( $\text{CH}_3\text{-C1}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C7}'$ ), 13.5, 14.8 ( $\text{CH}_3\text{-C3}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}'$ ), 20.3 (C-9), 27.0, 29.9, 30.1, 30.2, 30.5, 30.7, 31.9 (C-2 a C-8), 54.68, 54.73, 54.78 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), 60.3 (d,  $J = 4.8$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 67.0 (d,  $J = 5.9$  Hz, C-1), 67.5 (s a,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 73.4 (C-11), 97.5 (C-10), 115.6 (C-2'), 120.7 (C-6'), 122.6 (C-8'), 132.9, 135.8, 142.5, 144.6 (C-1', C-7', C-7a', C-8a'), 157.8, 159.4 (C-3', C-5') ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2926, 2855, 1619, 1474, 1406, 1246 ( $\nu_{\text{P=O}}$ ), 1085 ( $\nu_{\text{P-O-C}}$ ), 971  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ESI $^+$** , m/z: 580 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 602 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ], 1160 [ $2\text{M}+\text{H}^+$ ];

**Análisis** (%): calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_4\text{P} + 1.5 \text{H}_2\text{O}$ : C, 57.43; H, 7.98; N, 6.93. Encontrado: C, 57.72; H, 7.95; N, 6.81.

**HPLC** (columna de fase inversa  $\text{C}_{18}$ ,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  9/1, 1.2 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}} = 280, 375$  y 529 nm):  $R_t = 2.811$  min (97% de pureza a dichas  $\lambda$ ).

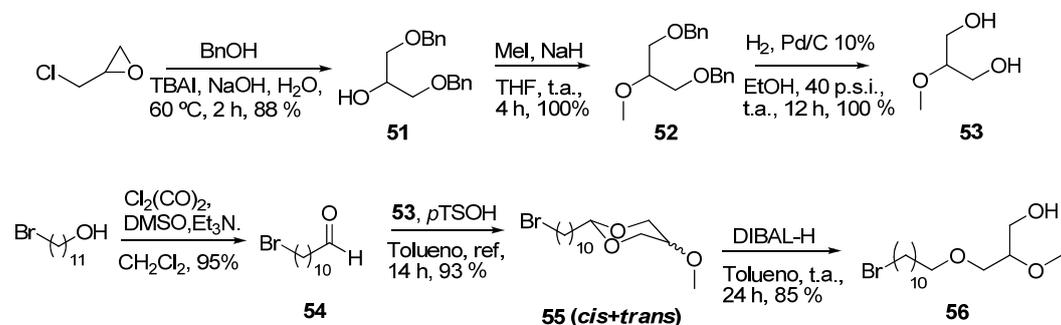
**Absorción**: UV-VIS (EtOH)  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 533 (61270).

**Emisión** (EtOH, corregido):  $\lambda_{\text{máx}}$  553 nm. Rendimiento cuántico de fluorescencia: 0.51 (disolución  $\sim 10^{-6}$  M en EtOH).

## 6.5.4 Síntesis de análogos de Edelfosina con grupo BODIPY

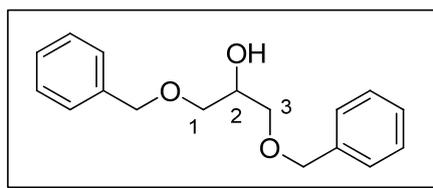
### 6.5.4.1 Síntesis del glicerol precursor 56

Se llevó a cabo en 6 pasos a partir de epiclorhidrina racémica y 11-bromoundecanol (Esquema 6.16).



Esquema 6.16. Preparación del glicerol 56.

#### 6.5.4.1.1 1,3-Di-(O-bencil)glicerol (51)



Producto descrito.<sup>34</sup> Para su obtención se siguió en esencia un procedimiento descrito.<sup>35</sup> Sobre una mezcla de alcohol bencilico (25 mL, 26 g, 240 mmol), yoduro de tetrabutilamonio (4 g, 10.8 mmol), NaOH (14.5 g, 362.5 mmol) y H<sub>2</sub>O (5 mL) se adicionó epiclorhidrina racémica (15 mL, 17.74 g, 192 mmol) gota a gota. La mezcla se calentó a 60 °C durante 2 h con agitación, se dejó alcanzar la temperatura ambiente, se añadió H<sub>2</sub>O (5 mL), se extrajo con tolueno (3 x 50 mL) y se eliminó el disolvente a presión reducida. El alcohol **51** se purificó por destilación en un horno de bolas bajo presión reducida (160-240 °C, 0.5-1.0 mm Hg), obteniéndose un líquido viscoso amarillo. Rendimiento: 46 g (88%).

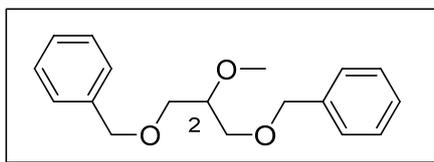
<sup>34</sup> Cassel, S., Debaig, C., Benvegna, T., Chaimbault, P., Lafosse, M., Plusquellec, D., Rollin, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 875-896.

<sup>35</sup> Nemoto, H., Wilson, J. G., Nakamura, H., Yamamoto, Y. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 435-435.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.66 (d, *J* = 4.0 Hz, 1 H, OH), 3.55 (dd, *J* = 9.7, 6.0 Hz, 2 H, H-1a, H-3a), 3.61 (dd, *J* = 9.7, 4.7 Hz, H-1b, H-3b), 4.05 (m, 1 H, H-2), 4.58 (s, 4 H, 2 × CH<sub>2</sub>Ph), 7.36 (m, 10 H, 2 × 5 *H*-Ph) ppm.

**MS-IE**, *m/z* (%): 272 [M<sup>+</sup>] (no observable), 181 [M-PhCH<sub>2</sub>] (42), 107 [PhCH<sub>2</sub>O] (48), 91 [PhCH<sub>2</sub>] (100).

#### 6.5.4.1.2 1,3-Di-(*O*-bencil)-2-*O*-metilglicerol (**52**)



Se siguió en esencia un procedimiento descrito.<sup>36</sup>

Sobre una suspensión de NaH (60 % en aceite mineral) (2.70 g, 67.4 mmol) en THF (70 mL), a temperatura ambiente, con agitación y bajo argón, se añadieron el alcohol **51** (10.8 g, 39.65 mmol) en THF (70 mL) y yoduro de metilo (3.70 mL, 8.44 g, 59.5 mmol), gota a gota. Tras 4 h en las mismas condiciones, se adicionó agua lentamente (60 mL) y la mezcla se extrajo con AcOEt (3 × 50 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una disolución saturada de NaCl, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se eliminó el disolvente. El residuo se cromatografió en columna de sílice utilizando hexano/AcOEt 9:1. Se obtuvo así el triéter **52** como un líquido incoloro. Rendimiento: 12.01 g (100 %).

**TLC** (hexano/AcOEt, 4:1): *R<sub>f</sub>* = 0.45.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.53 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.65 (m, 5 H, H-1, H-2, H-3), 4.60 (s, 4 H, 2 × CH<sub>2</sub>Ph), 7.38 (m, 10 H, 2 × 5 *H*-Ph) ppm.

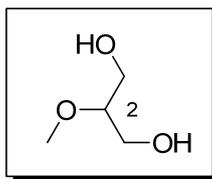
**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 58.2 (OCH<sub>3</sub>), 69.9 (C-2), 73.6 (CH<sub>2</sub>Ph), 79.6 (C-1, C-3), 127.8 (C-4'), 127.9 (C-2', C-6'), 128.6 (C-3', C-5'), 138.4 (C-1') ppm.

**FT-IR** (KBr) *v*<sub>máx</sub>: 3063, 3030, 2862, 1496, 1453, 1366, 1310, 1258, 1200, 1103, 1028, 910, 737, 698 cm<sup>-1</sup>

**MS-IE**, *m/z* (%): 286 [M<sup>+</sup>] (no observable), 195 [M-PhCH<sub>2</sub>] (45), 107 [PhCH<sub>2</sub>O] (15), 91 [PhCH<sub>2</sub>] (100).

<sup>36</sup> Berecoechea, J., Anatol, J., Tréfouël, J. C. R. Acad. Sci. C. Chim. **1969**, 268, 434-437.

## 6.5.4.1.3 2-O-Metilglicerol (53)



Se siguió en esencia un procedimiento descrito en la bibliografía.<sup>37</sup>

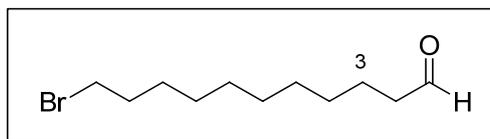
Sobre una suspensión de Pd/C (10 %) (430 mg, 0.4 mmol) en EtOH (70 mL) en un vaso Parr, se añadió una disolución del triéter **52** (8.6 g, 30 mmol) en EtOH (10 mL), y la mezcla se hidrogenó a 40 psi durante 12 h. Se filtró el catalizador y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose 2-O-metilglicerol como un líquido incoloro. Rendimiento: 3.27 g (100 %).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.67 (s a, 2 H, 2 × OH), 3.34 (q, *J* = 4.7 Hz, 1 H, H-2), 3.46 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.68 (dd, *J* = 11.8, 4.8 Hz, 2 H, H-1a, H-3a), 3.77 (dd, *J* = 11.8, 4.5 Hz, 2 H, H-1b, H-3b) ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 57.5 (OCH<sub>3</sub>), 61.7 (C-1, C-3), 81.2 (C-2) ppm.

MS-ESI<sup>+</sup>, *m/z*: 107 [M+H<sup>+</sup>], 129 [M+Na<sup>+</sup>], 219 [2M-OH+Na<sup>+</sup>].

## 6.5.4.1.4 11-Bromoundecanal (54)



Se obtuvo por oxidación de Swern.<sup>38</sup> Producto descrito.<sup>39</sup>

Sobre una disolución agitada de cloruro de oxalilo (1.92 mL, 22 mmol) en diclorometano seco (50 mL) a -60 °C y bajo atmósfera de argón se adicionó lentamente, durante unos 5 min, una disolución de DMSO (3.41 mL, 48 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) y la mezcla se mantuvo en estas condiciones durante 10 min. A continuación se adicionó, gota a gota, una disolución de 11-bromoundecanol (5.02 g, 20 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) durante 10 min y la mezcla se agitó durante 45 min más. Seguidamente se adicionó Et<sub>3</sub>N

<sup>37</sup> Padgett, H. C., Csendes, I. G., Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3492-3496.

<sup>38</sup> Omura, K., Swern, D. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1651-1660.

<sup>39</sup> Baldwin, J. E., Adlington, R. M., Ramchartar, S. H. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 3413-3428.

(14 mL, 100 mmol) y el precipitado blanco formado se dejó evolucionar a temperatura ambiente con agitación durante 10 min. A continuación se adicionó agua (50 mL), se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 100 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron con MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se cromatografió en columna de sílice utilizando hexano/AcOEt 9:1. Rendimiento: 4.71 g (95 %).

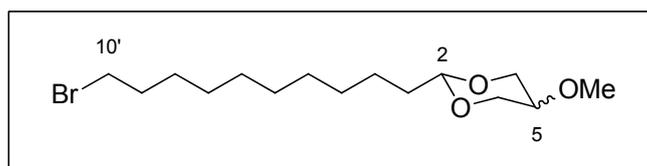
**TLC** (hexano/AcOEt 4:1):  $R_f = 0.8$ .

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.23-1.45 (m, 12 H, H-4 a H-9), 1.61 (m, 2 H, H-3), 1.83 (q,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, H-10), 2.40 (td,  $J = 7.3, 1.8$  Hz, 2 H, H-2), 3.39 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, H-11), 9.74 (t,  $J = 1.9$  Hz, 1 H, CHO) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  22.0, 28.1, 28.7, 29.1, 29.2, 29.3, 32.8 (C-10), 33.9 (C-11), 43.8 (C-2), 202.8 (CHO) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2930, 2860 ( $\nu_{\text{fermi}}$ ), 2720, 1730 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1465, 1255, 720 cm<sup>-1</sup>.

**6.5.4.1.5 5-Metoxi-2-(10'-bromodecil)-[1,3]-dioxano, mezcla 5-cis/5-trans (cis/trans-55)**

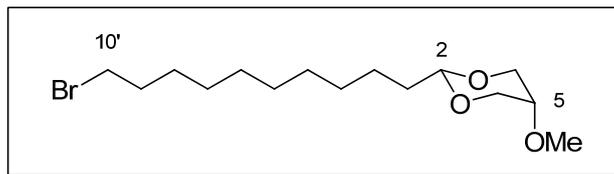


Se siguió en esencia un procedimiento descrito para la acetalización de aldehidos.<sup>40</sup>

Una disolución de 11-bromoundecanal (**54**) (4.71 g, 18.9 mmol), 2-*O*-metilglicerol (2.6 g, 24.57 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico (108 mg, 0.57 mmol) en tolueno (200 mL) se calentó a reflujo durante 14 h en un matraz con refrigerante equipado con un Dean-Stark. Tras enfriar, se añadió exceso de NaHCO<sub>3</sub> sólido (300 mg), se filtró la mezcla, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se cromatografió en columna de gel de sílice, utilizando hexano/AcOEt desde 9:1 hasta 4:1 como eluyente. De la cromatografía se aislaron puros los dos isómeros del acetal **55**. Rendimiento global: 5.88 g (93 %).

<sup>40</sup> Sokolowski, A., Burczyk, B., Oles, J. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 807-809.

***cis*-5-Metoxi-2-(10'-bromodecil)-[1,3]-dioxano** (*cis*-55): líquido incoloro.  
Rendimiento: 1.58 g (25 %)



**TLC** (hexano/AcOEt 4:1):  $R_f = 0.4$ .

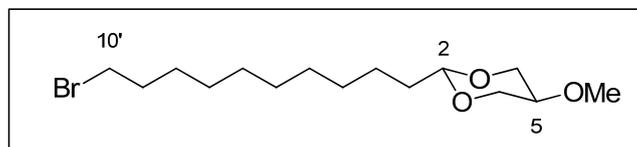
**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.20-1.45 (m, 14 H, H-2' a H-8'), 1.63 (m, 2 H, H-1'), 1.83 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2 H, H-9'), 3.05 (m, 1 H, H-5), 3.39 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, H-10'), 3.42 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.79 (dd,  $J = 12.6, 1.4$  Hz, 2 H, H-4<sub>ax</sub>, H-6<sub>ax</sub>), 4.19 (dd,  $J = 12.6, 1.4$  Hz, 2 H, H-4<sub>ec</sub>, H-6<sub>ec</sub>), 4.53 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1 H, H-2) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  23.9, 28.1, 28.7, 29.3 (C-2' a C-8'), 32.8 (C-9'), 34.0 (C-10'), 34.8 (C-1'), 56.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 68.0 (C-4, C-6), 72.4 (C-5), 102.4 (C-2) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2976, 2922, 2851, 2819, 1469, 1437, 1407, 1347, 1287, 1248, 1153, 1108, 1082, 1001, 956, 942, 904, 777  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 336 [ $\text{M}^+$ ] (no observable), 117 (100).

***trans*-5-Metoxi-2-(10'-bromodecil)-[1,3]-dioxano** (*trans*-55): Sólido cristalino.  
Rendimiento: 4.30 g (68 %).



**TLC** (hexano/AcOEt 4:1):  $R_f = 0.9$ .

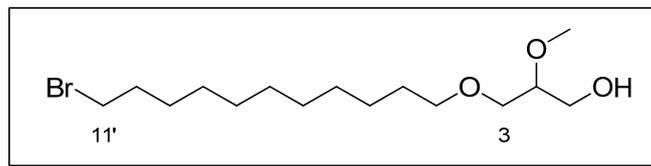
**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.21-1.45 (m, 14 H, H-2' a H-8'), 1.58 (m, 2 H, H-1'), 1.84 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2 H, H-9'), 3.30-3.44 (m, 5 H, H-5, H-4<sub>ax</sub>, H-6<sub>ax</sub>, H-10'), 3.37 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.24 (dd,  $J = 10.4, 4.3$  Hz, 2 H, H-4<sub>ec</sub>, H-6<sub>ec</sub>), 4.38 (t,  $J = 5.1$  Hz, 1 H, H-2) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  24.1, 28.1, 28.7, 29.4 (C-2'-C8'), 32.8 (C-9'), 34.0 (C-10'), 34.4 (C-1'), 57.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 69.5 (C-4, C-6), 69.8 (C-5), 102.2 (C-2) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2979, 2923, 2850, 1633, 1462, 1408, 1281, 1252, 1199, 1149, 1131, 1108, 1035, 960  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 336 [ $\text{M}^+$ ] (no observable), 117 (100).

#### 6.5.4.1.6 3-O-(11'-Bromoundecil)-2-O-metil-*rac*-glicerol (**56**)



Se obtuvo mediante apertura con DIBAL-H de **55**, siguiendo un procedimiento descrito.<sup>8,41</sup>

Sobre *trans*-**55** o *cis*-**55** (2.83 g, 8.39 mmol) (se utilizaron los correspondientes isómeros *cis* o *trans* puros, aunque podrían emplearse sus mezclas), a 0 °C, bajo atmósfera de argón y con agitación, se adicionó una disolución de DIBAL-H 1 M en tolueno (42 mL). Se dejó que la mezcla alcanzase la temperatura ambiente y se mantuvo en estas condiciones durante 24 h. A continuación la disolución se enfrió con hielo y se añadieron gotas de disolución acuosa saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hasta el fin de la efervescencia, se añadió una disolución acuosa de HCl al 5 % (70 mL) y la mezcla se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3  $\times$  50 mL). Se lavaron las fases orgánicas reunidas con disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , luego con agua, y se secaron con  $\text{MgSO}_4$ . Se filtró y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se cromatografió en columna de sílice utilizando hexano/AcOEt 4:1. Se obtuvo así el alcohol **56** como un aceite incoloro. Rendimiento: 2.42 g (85%).

**TLC** (hexano/AcOEt, 1:1):  $R_f = 0.4$ .

**$^1\text{H}$ -RMN** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.22-1.36 (m, 12 H, H-3' a H-8'), 1.41 (m, 2 H, H-9'), 1.56 (m, 2 H, H-2'), 1.84 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, H-10'), 2.25 (dd,  $J = 6.7, 5.6$  Hz, 1 H, OH), 3.39 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2 H, H-11'), 3.41-3.48 (m, 3 H, H-2, H-1'), 3.46 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.53 (m, 2 H, H-3), 3.64 (m, 1 H, H-1a), 3.74 (m, 1 H, H-1b) ppm.

**$^{13}\text{C}$ -RMN** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  28.1 (C-9'), 26.0, 28.7, 29.4, 29.4, 29.5, 29.6 (C-2' a C-8'), 32.8 (C-10'), 34.0 (C-11'), 57.7 ( $\text{OCH}_3$ ), 62.6 (C-1), 70.6 (C-3), 71.9 (C-1'), 79.9 (C-2) ppm.

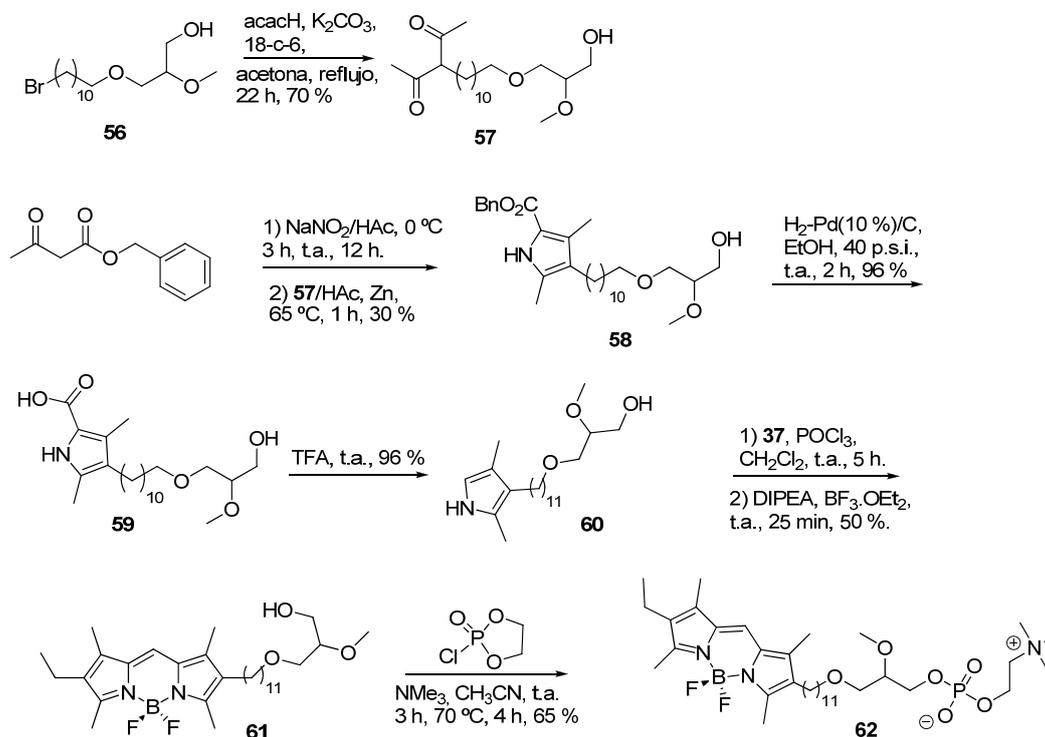
**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3436, 2928, 2855, 1649, 1464, 1119, 1089  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ESI<sup>+</sup>**,  $m/z$ : 338 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 361 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ].

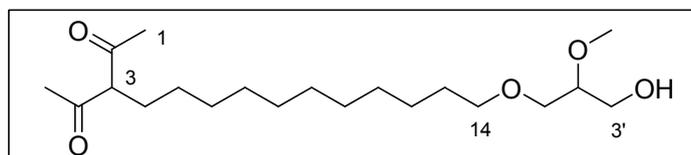
<sup>41</sup> Takasu, M., Naruse, Y., Yamamoto, H. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 1947-1950.

## 6.5.4.2 Síntesis de ET-11C-6EtBDP (62)

Se obtuvo en 6 pasos a partir del glicerol **56** (Esquema 6.17).



Esquema 6.17. Obtención de ET-11C-6EtBDP (**62**) aplicando la reacción de Johnson-Knorr

6.5.4.2.1 3-Acetil-14-(2'-metoxi-3'-hidroxipropiloxi)-tetradecan-2-ona (**57**).

Se siguió el método general para la monoalquilación de acetilacetona. Cantidades: acetilacetona (7.21 g, 7.43 mL, 71.30 mmol), glicerol **56** (2.42 g, 7.13 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.93 g, 35.65 mmol) y 18-corona-6 (40 mg, 0.14 mmol). Se cromatografió en columna de gel de sílice utilizando la mezcla hexano/AcOEt 1:1. Aceite incoloro. Rendimiento: 1.79 g (70%).

**TLC** (hexano/AcOEt 1:4):  $R_f = 0.35$ .

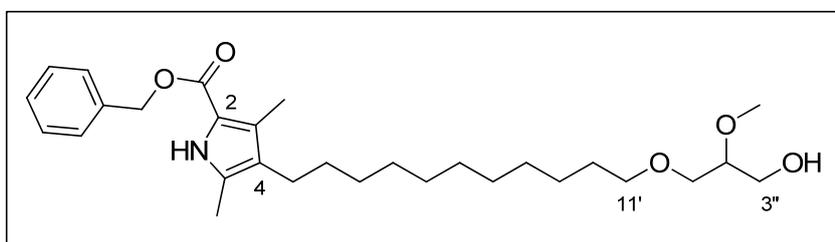
**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.22-1.41 (m, 16 H, H-5 a H-12), 1.55 (m, 2 H, H-13), 1.69 (m, 2 H, H-4), 2.13 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 2.26 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 3.39-3.48 (m, 3 H, H-2', H-14), 3.45 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.52 (m, 2 H, H-1'), 3.64 (m, 1 H, H-3'a), 3.74 (m, 1 H, H-3'b), 3.74 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, H-3) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  19.8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 25.9 (C-5), 28.6 (C-4), 26.0, 29.2, 29.4, 29.4, 29.5, 29.5 (C-6 a C-13), 31.9 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 57.7 ( $\text{OCH}_3$ ), 62.6 (C-3'), 68.2 (C-3), 70.6 (C-1'), 71.9 (C-14), 79.8 (C-2'), 197.0 (C=O) ppm.

**FT-IR** (KCl)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3436, 2928, 2850, 1679 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1583, 1461, 1402, 1359, 1275, 1169, 1117, 954  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ESI $^+$** ,  $m/z$ : 359 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 381 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ].

#### 6.5.4.2.2 3,5-Dimetil-4-[11'-(2''-metoxi-3''-hidroxipropiloxi)undecil]-1H-pirrol-2-carboxilato de bencilo (**58**)



Se sintetizó por reacción de Johnson-Knorr. Cantidades: nitrito sódico (344 mg, 4.98 mmol) en agua (2 mL), acetoacetato de bencilo (960 mg, 862  $\mu\text{L}$ , 4.98 mmol) en ácido acético glacial (8 mL), el alcohol **57** (1.788 g, 4.98 mmol) y Zn en polvo (648 mg). Purificación: se extrajo con AcOEt ( $3 \times 20$  mL) y se cromatografió en columna de sílice utilizando hexano/AcOEt 4:1. Aceite amarillo. Rendimiento: 720 mg (30%).

**TLC** (hexano/AcOEt, 1:1):  $R_f = 0.5$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.19-1.40 (m, 16 H, H-2' a H-9'), 1.55 (m, 2 H, H-10'), 2.16, 2.26 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3\text{-C3}$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}$ ), 2.31 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, H-1'), 3.37-3.49 (m, 3 H, H-11', H-2''), 3.44 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.52 (m, 2 H, H-1''), 3.62 (dd,  $J = 11.4$ , Hz, 1 H, H-3''a), 3.74 (dd,  $J = 11.4$ , 3.9 Hz, 1 H, H-3''b), 5.27 (s, 2 H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 7.36 (m, 5 H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 8.84 (s a, 1 H,  $\text{NH}$ ) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.7 ( $\text{CH}_3\text{-pirrol}$ ), 11.4 ( $\text{CH}_3\text{-pirrol}$ ), 23.9 (C-1'), 29.3-29.5, 30.8 (C-2'a-C-10'), 57.7 ( $\text{OCH}_3$ ), 62.5 (C-3''), 65.2 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 70.5 (C-1''), 71.8

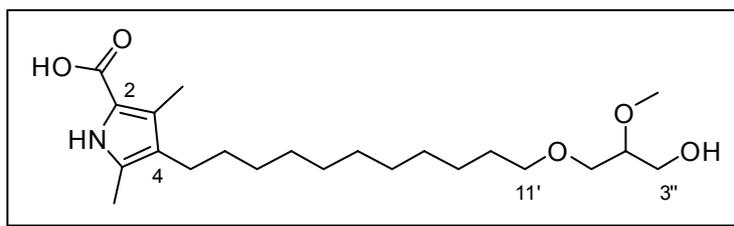
(C-11'), 79.9 (C-2''), 116.2 (C-2), 122.5 (C-4), 127.9, 127.9, 128.4 (C<sub>o</sub>, C<sub>m</sub>, C<sub>p</sub>, C-3), 129.9 (C-5), 136.6 (C<sub>i</sub>), 161.3 (COOBn) ppm.

**FT-IR** (KCl)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3319, 2928, 2850, 1740 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1682, 1667, 1502, 1440, 1365, 1264, 1116, 1088  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ESI+**,  $m/z$ : 488 [M+H<sup>+</sup>], 510 [M+Na<sup>+</sup>].

Las dos siguientes etapas se llevaron a cabo siguiendo los métodos generales para la desbencilación hidrogenolítica y la descarboxilación en  $\alpha$  de pirroles.

#### 6.5.4.2.3 Ácido 3,5-dimetil-4-[11'-(3''-hidroxi-2''-metoxipropilo)undecil]-1H-pirrol-2-carboxílico (59)



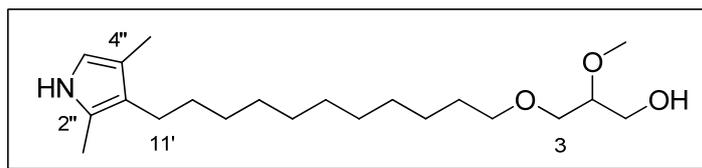
Obtenido a partir del éster **58** (1.237 g, 2.54 mmol) en MeOH (30 mL) y Pd/C (10%) (130 mg). Se cromatografió en columna de sílice utilizando hexano/AcOEt 1:1. Aceite incoloro que oscurece al aire. Rendimiento: (96%).

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.15$ .

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.18-1.40 (m, 16 H, H-2' a H-9'), 1.54 (m, 2 H, H-10'), 2.17, 2.26 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-C3, CH<sub>3</sub>-C5), 2.31 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, H-1'), 3.37-3.48 (m, 3 H, H-11', H-2''), 3.44 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.51 (m, 2 H, H-1''), 3.62 (dd,  $J = 12.0, 4.0$  Hz, 1 H, H-3''a), 3.73 (dd,  $J = 12.0, 4.0$  Hz, 1 H, H-3''b), 9.03 (s a, 1 H, NH) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  10.6 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 11.5 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 24.0 (C-1'), 29.3-29.5, 30.7 (C-2' a C-10'), 57.7 (OCH<sub>3</sub>), 62.5 (C-3''), 70.5 (C-1''), 71.8 (C-11'), 80.0 (C-2''), 116.6 (C-2), 122.5 (C-4), 128.2 (C-3), 130.2 (C-5), 165.7 (COOH) ppm.

**6.5.4.2.4 3-O-[11'-(2'',4'')-Dimetil-1*H*-pirrol-3-il)undecil]-2-O-metil-*rac*-glicerol (60)**



Obtenido a partir del ácido carboxílico **59** (237 mg, 0.60 mmol) y ácido trifluoroacético recién destilado (1.5 mL). Purificación: Se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL). El residuo se cromatografió en columna de sílice utilizando como eluyentes la mezcla hexano/AcOEt 4:1. Aceite incoloro. Rendimiento: 201 mg (96%).

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.55$ .

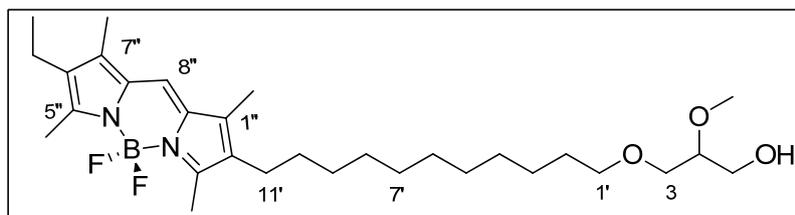
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.20-1.44 (m, 16 H, H-3' a H-10'), 1.55 (m, 2 H, H-2'), 2.07, 2.14 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-C3'', CH<sub>3</sub>-C5''), 2.33 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, H-11'), 3.39-3.49 (m, 3 H, H-2, H-1'), 3.45 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.53 (m, 2 H, H-3), 3.63 (dd,  $J = 12.1, 4.7$  Hz, 1 H, H-1a), 3.74 (dd,  $J = 11.5, 4.1$  Hz, 1 H, H-1b), 6.36 (s, 1 H, H-5''), 7.60 (s a, 1 H, NH) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  10.4 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 11.3 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 24.3 (C-11'), 29.3-29.5, 31.1 (C-2' a C-10'), 57.7 (OCH<sub>3</sub>), 62.6 (C-1), 70.5 (C-3), 71.9 (C-1'), 80.0 (C-2), 112.6 (C-5''), 117.9, 119.0, 123.5 (C-2'', C-3'', C-4'') ppm.

**FT-IR** (KCl)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3400, 2927, 2855, 1741, 1695, 1464, 1367, 1240, 1118, 1047 cm<sup>-1</sup>.

**MS-ESI<sup>+</sup>**,  $m/z$ : 354.2 [M+H<sup>+</sup>], 392.3 [M+K<sup>+</sup>].

**6.5.4.2.5 3-O-[11'-(6''-Etil-1'',3'',5'',7''-tetrametil-4'',4''-difluoro-4''-bora-3''a,4''a-diaza-s-indacen-2''-il)undecil]-2-O-metil-*rac*-glicerol (OH-11C-6EtBDP) (61)**



Se obtuvo mediante el método general para la síntesis de BODIPYs.

Cantidades: POCl<sub>3</sub> (87 mg, 53 μL, 0.57 mmol), 4-etil-3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2-carbaldehído (**37**) (86 mg, 0.57 mmol), el pirrol **60** (200 mg, 0.57 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL), DIPEA (366 mg, 493 μL, 2.83 mmol) y BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> (402 mg, 356 μL, 2.83 mmol). Purificación: Se lavó con agua (3 × 50 mL) y se cromatografió en hexano/AcOEt 7:3. Sólido rojo ceroso. Rendimiento: 151 mg (50 %).

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.6$ .

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.05 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.22-1.36 (m, 14 H, H-3' a H-9'), 1.40 (m, 2 H, H-10'), 1.55 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2 H, H-2'), 2.14, 2.15 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-C1'', CH<sub>3</sub>-C7''), 2.35 (m, 4 H, H-11', CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.47 (s, 6 H, CH<sub>3</sub>-C3'', CH<sub>3</sub>-C5''), 3.40-3.48 (m, 3 H, H-2, H-1'), 3.45 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.53 (m, 2 H, H-3), 3.63 (dd,  $J = 11.6, 5.2$  Hz, 1 H, H-1a), 3.74 (dd,  $J = 11.6, 4.2$  Hz, 1 H, H-1b), 6.93 (s, 1 H, H-8'') ppm.

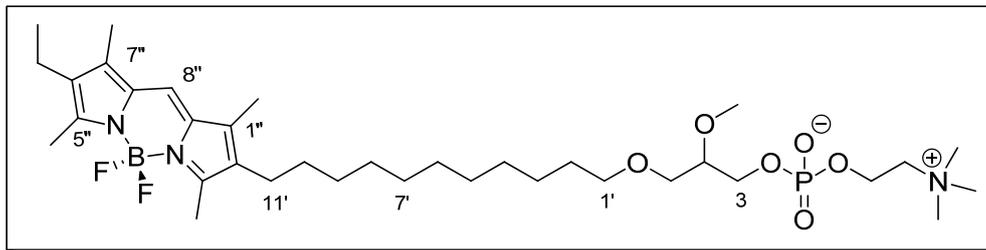
**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.3, 9.5 (CH<sub>3</sub>-C1'', CH<sub>3</sub>-C7''), 12.5, 12.6 (CH<sub>3</sub>-C3'', CH<sub>3</sub>-C5''), 14.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 17.2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24.0 (C-11'), 26.0, 29.4-29.5 (C-2' a C-9'), 30.1 (C-10'), 57.7 (OCH<sub>3</sub>), 62.6 (C-1), 70.5 (C-3), 71.8 (C-1'), 79.8 (C-2), 118.5 (C-8''), 130.2, 131.5, 132.4, 136.5, 136.9 (C-1'', C-7'', C-7''a, C-8''a, C-2'', C-6''), 154.5, 154.9 (C-3'', C-5'') ppm.

**FT-IR** (KCl)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3394, 2925, 2850, 1604, 1471, 1226, 1191, 1069, 976 cm<sup>-1</sup>.

**MS-ESI<sup>+</sup>**,  $m/z$ : 535 [M<sup>+</sup>] no observado, 515 [M-F<sup>+</sup>], 495 [M-2F+H<sup>+</sup>].

**HPLC** (columna de fase inversa C<sub>18</sub>, MeOH/H<sub>2</sub>O 9/1, 1.2 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}} = 375, 529$  nm):  $R_t = 10.18$  min (98% de pureza a ambas  $\lambda$ ).

**6.5.4.2.6 1-O-[11'-(6''-Etil-1'',3'',5'',7''-tetrametil-4''-4''-difluoro-4''-bora-3''a,4''a-diaza-s-indacen-2''-il)undecil]-2-O-metil-rac-glicero-3-fosfatidilcolina (ET-11C-6EtBDP) (62)**



Se obtuvo por introducción del grupo fosfatidilcolina en el glicerol **61** (81 mg, 0.152 mmol), utilizando acetonitrilo (10 mL), trimetilamina (c.a. 2 mL) y 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-oxido (28  $\mu$ L, 0.303 mmol). Sólido rojo. Rendimiento: 70 mg (65 %).

**TLC** ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:5):  $R_f = 0.2$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1.06 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.25-1.37 (m, 14 H, H-3' a H-9'), 1.41 (m, 2 H, H-10'), 1.54 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2 H, H-2'), 2.15, 2.16 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3\text{-C}1''$ ,  $\text{CH}_3\text{-C}7''$ ), 2.39 (m, 4 H, H-11',  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.41, 2.42 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3\text{-C}3''$ ,  $\text{CH}_3\text{-C}5''$ ), 3.22 (s, 9 H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.45 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.41-3.59 (m, 6 H, H-1, H-2, H-1'), 3.63 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.85-4.01 (m, 2 H, H-3), 4.27 (m, 2 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 7.20 (s, 1 H, H-8'') ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.4, 9.6 ( $\text{CH}_3\text{-C}1''$ ,  $\text{CH}_3\text{-C}7''$ ), 12.7, 12.9 ( $\text{CH}_3\text{-C}3''$ ,  $\text{CH}_3\text{-C}5''$ ), 15.0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 18.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 24.8 (C-11'), 27.3, 30.5-30.8 (C-2' a C-9'), 31.3 (C-10'), 54.67, 54.72, 54.77 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), 58.3 ( $\text{OCH}_3$ ), 60.4 (d,  $J = 5.0$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 66.2 (d,  $J = 5.8$  Hz, C-3), 67.5 (s a,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 71.1 (C-1), 72.7 (C-1'), 80.9 (d,  $J = 8.0$  Hz, C-2), 120.6 (C-8''), 131.4, 132.8, 133.9, 138.6, 138.9 (C-1'', C-7'', C-7''a, C-8''a, C-2'', C-6''), 155.4, 155.6 (C-3'', C-5'') ppm.

**FT-IR** (KCl)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2922, 2847, 1602, 1469, 1226 ( $\nu_{\text{P=O}}$ ), 1065 ( $\nu_{\text{P-O-C}}$ ), 975  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ESI+**,  $m/z$ : 700 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 1399 [ $2\text{M}+\text{H}^+$ ].

**Análisis elemental** (%): calculado para  $\text{C}_{35}\text{H}_{61}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_6\text{P}+4.5\text{H}_2\text{O}$ : C, 53.84; H, 9.04; N, 5.38. Encontrado: C, 53.81; H, 8.85; N, 5.43.

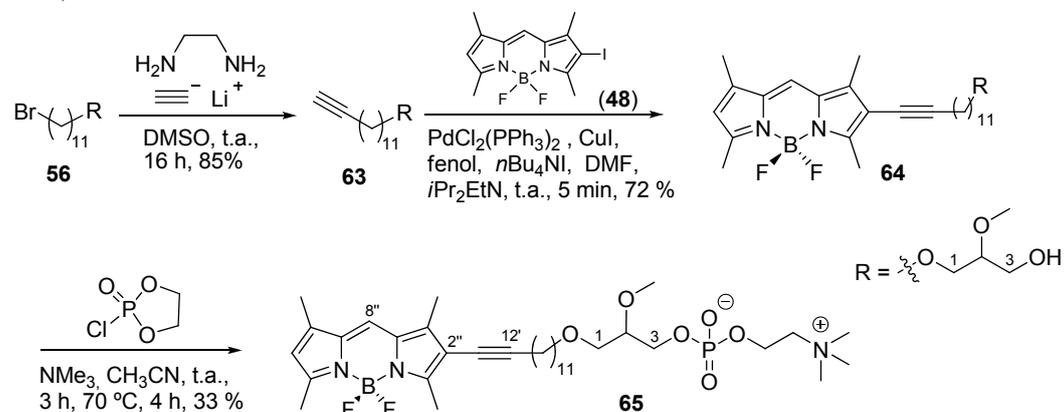
**HPLC** (columna de fase inversa  $\text{C}_{18}$ ,  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  9/1 + 10 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 1.2 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}} = 375, 529$  nm):  $R_t = 5.60$  min (100% de pureza a ambas  $\lambda$ ).

**Absorción**: UV-VIS (EtOH):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 380 (9000), 503 (33500), 529 (79000). UV-VIS (DMSO):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 529 (79000).

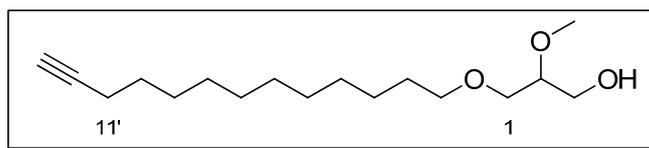
**Emisión** (EtOH, corregido): máximo a 537 nm, rendimiento cuántico de fluorescencia: 0.60 (disolución  $\sim 10^{-6}$  M en EtOH).

### 6.5.4.3 Síntesis de ET-13C-2INBDP (65)

Se sintetizó en 3 pasos a partir del glicerol **56** y 2-I-tetraMe-BDP (**48**) (Esquema 6.18).



#### 6.5.4.3.1 1-O-(Tridec-12-inil)-2-O-metil-*rac*-glicerol (**63**)



Se siguió un procedimiento descrito para la alquilación de bromuros de alquilo.<sup>42</sup>

1-O-(11'-Bromoundecil)-2-O-metil-*rac*-glicerol (**56**) (1.98 g, 5.83 mmol) en DMSO (15 mL) se adicionó sobre una disolución desgasificada del complejo etilendiamina-acetiluro de litio (1.34 g, 14.58 mmol) en DMSO (5 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. A continuación se adicionó agua lentamente (20 mL), la mezcla se diluyó con más agua (100 mL) y se extrajo con éter etílico ( $3 \times 20$  mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron con  $MgSO_4$ , se filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo

<sup>42</sup> Oppolzer, W., Radinov, R.N., El-Sayed, E. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4766-4770.

obtenido se cromatógrafió en columna de sílice utilizando hexano/AcOEt 4:1. Rendimiento: 1.4 g (85 %).

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.55$ .

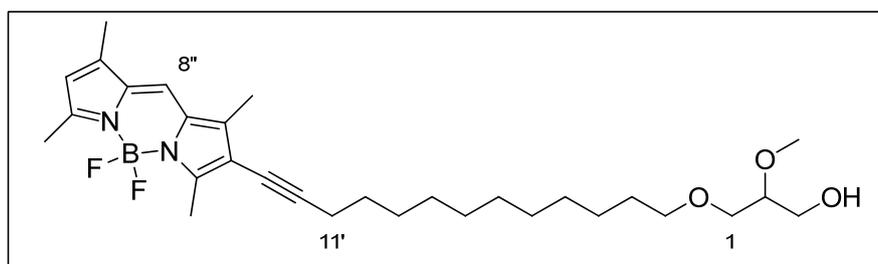
**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.22–1.42 (m, 14 H, H-3' a H-9'), 1.46–1.60 (m, 4 H, H-2', H-10'), 1.93 (t,  $J = 2.6$  Hz, 1 H, H-13'), 2.17 (td,  $J = 7.1, 2.6$  Hz, 2 H, H-11'), 3.40–3.49 (m, 3 H, H-2, H-1'), 3.46 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 3.53 (m, 2 H, H-1), 3.63 (dd,  $J = 11.6, 4.7$  Hz, 1 H, H-3a), 3.75 (dd,  $J = 11.6, 4.7$  Hz, 1 H, H-3b) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  18.4 (C-11'), 26.0, 28.5, 28.7, 29.1, 29.4, 29.6 (C-2' a C-10'), 57.7 ( $\text{CH}_3$ ), 62.6 (C-3), 68.0 (C-13'), 70.6 (C-1), 71.9 (C-1'), 79.8 (C-2), 84.8 (C-12') ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3445, 3312, 2928, 2855, 1465, 1119  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ESI+**,  $m/z$ : 285  $[\text{M}+\text{H}^+]$ , 307  $[\text{M}+\text{Na}^+]$ .

#### 6.5.4.3.2 1-O-[13'-(1'',3'',5'',7''-Tetrametil-4'',4''-difluoro-4''-bora-3'',4''-diazas-indacen-2''-yl)tridec-12-inil]-2-O-metil-rac-glicerol (64)



Se obtuvo por acoplamiento de Sonogashira, siguiendo el procedimiento general a partir de 2-I-tetraMe-BDP (**48**) (393 mg, 1.05 mmol),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (81 mg, 0.12 mmol),  $\text{CuI}$  (68 mg, 0.36 mmol), fenol (89 mg, 0.95 mmol),  $n\text{Bu}_4\text{NI}$  (1358 mg, 3.68 mmol), DMF (10 mL),  $i\text{Pr}_2\text{EtN}$  (5 mL) y el glicerol **63** (300 mg, 1.05 mmol). Purificación: lavados con agua (40 mL). Eluyente de la columna: hexano/AcOEt 7:3. Sólido rojo ceroso. Rendimiento: 401 mg (72 %).

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.45$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.20–1.48 (m, 14 H, H-3' a H-9'), 1.50–1.63 (m, 4 H, H-2', H-10'), 2.19, 2.21 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3\text{-C1''}$ ,  $\text{CH}_3\text{-C7''}$ ), 2.43 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, H-11'), 2.49, 2.55 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3\text{-C3''}$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5''}$ ), 3.38–3.48 (m, 3 H,

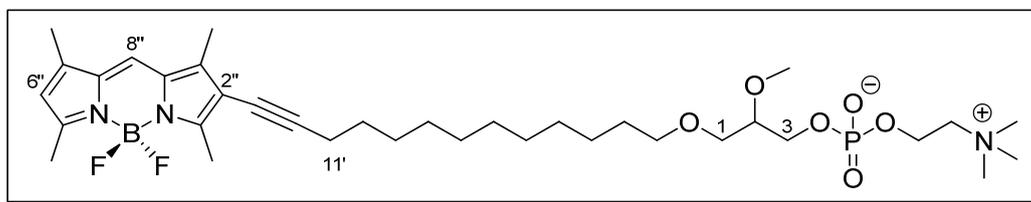
H-2, H-1'), 3.44 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>O), 3.51 (m, 2 H, H-1), 3.61 (dd,  $J = 11.5, 5.2$  Hz, 1 H, H-3a), 3.72 (dd,  $J = 11.5, 3.8$  Hz, 1 H, H-3b), 6.01 (s, 1 H, H-6''), 6.98 (s, 1 H, H-8'') ppm.  
<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.4, 11.1 (CH<sub>3</sub>-C1'', CH<sub>3</sub>-C7''), 13.3, 14.6 (CH<sub>3</sub>-C3'', CH<sub>3</sub>-C5''), 19.6 (C-11'), 26.0, 28.7, 28.9, 29.0, 29.3–29.5 (C-2' a C-10'), 57.6 (CH<sub>3</sub>O), 62.5 (C-3), 70.5 (C-1), 71.8 (C-1'), 72.3 (C-13'), 79.8 (C-2), 96.5 (C-12'), 114.5 (C-2''), 119.3 (C-6''), 120.2 (C-8''), 131.6, 134.0, 140.9, 141.9 (C-1'', C-7'', C-7''a, C-8''a), 157.7, 157.8 (C-3'', C-5'') ppm.

FT IR (entre cristales)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3428, 2927, 2850, 1602, 1574, 1471, 1406, 1240, 1194, 1160, 1079, 1000, 894, 807 cm<sup>-1</sup>.

MS ESI<sup>+</sup>,  $m/z$ : 553 [M+Na<sup>+</sup>], 511 [M-F]<sup>+</sup>, 491 [M-2F+H<sup>+</sup>]

HPLC (columna de fase inversa C<sub>18</sub>, MeOH/H<sub>2</sub>O 9/1, 1.8 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}} = 280, 375$  y 529 nm):  $R_t = 6.32$  min (100% de pureza a dichas  $\lambda$ ).

#### 6.5.4.3.3 1-O-[13'-(1'',3'',5'',7''-Tetramethyl-4'',4''-difluoro-4''-bora-3''a,4''a-diaza-s-indacen-2''-yl)tridec-12-inil]-2-O-metil-*rac*-glicerol-3-fofatidilcolina (ET-13C-INBDP) (65)



Se obtuvo por introducción del grupo fosfatidilcolina en **64** siguiendo el procedimiento general, a partir de trimetilamina (2 mL), el glicerol **64** (56 mg, 0.10 mmol), acetonitrilo (10 mL) y 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-oxido (20  $\mu$ L, 0.21 mmol). Sólido rojo. Rendimiento: 23 mg (33 %), pf 124-127 °C.

TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 65:25:5):  $R_f = 0.2$ .

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 1.26–1.40 (m, 14 H, H-3' a H-9'), 1.46–1.66 (m, 4 H, H-2', H-10'), 2.25, 2.26 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-C1'', CH<sub>3</sub>-C7''), 2.47 (m, 8 H, CH<sub>3</sub>-C3'', CH<sub>3</sub>-C5'', H-11'), 3.21 (s, 9 H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.45 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>O), 3.41–3.58 (m, 6 H, H-1, H-2, H-1'), 3.63 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>N), 3.85–4.00 (m, 2 H, H-3), 4.27 (m, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 6.14 (s, 1 H, H-6''), 7.36 (s, 1 H, H-8'') ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 10.6, 11.3 (CH<sub>3</sub>-C1'', CH<sub>3</sub>-C7''), 13.5, 14.8 (CH<sub>3</sub>-C3'', CH<sub>3</sub>-C5''), 20.3 (C-11'), 27.3, 29.9, 30.1, 30.2, 30.7–30.8 (C-2' a C-10'), 54.66, 54.71, 54.77 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 58.3 (CH<sub>3</sub>O), 60.4 (d,  $J = 5.0$  Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 66.2 (d,  $J = 5.6$  Hz, C-

3), 67.5 (s a, CH<sub>2</sub>N), 71.1 (C-1), 72.7 (C-1'), 73.4 (C-13'), 80.9 (d,  $J = 8.1$  Hz, C-2), 97.5 (C-12'), 115.6 (C-2''), 120.7 (C-6''), 122.6 (C-8''), 132.9, 135.8, 142.5, 144.6 (C-1'', C-7'', C-7''a, C-8''a), 157.9, 159.5 (C-3'', C-5'') ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2927, 2854, 1619, 1472, 1406, 1247, 1159, 1068, 974 cm<sup>-1</sup>.

**MS-ESI<sup>+</sup>**,  $m/z$ : 696 [M+H<sup>+</sup>], 1391.7 [2M+H<sup>+</sup>].

**Análisis (%)**: calculado para C<sub>35</sub>H<sub>57</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>P + 1.5 H<sub>2</sub>O: C, 58.17; H, 8.37; N, 5.81. Encontrado C, 58.15; H, 8.86; N, 5.83.

**HPLC** (columna de fase inversa C<sub>18</sub>, MeOH/H<sub>2</sub>O 9/1 + 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mL/min,  $\lambda_{\text{anal}} = 280, 375, 529$  nm):  $R_t = 4.29$  min (100% de pureza a ambas  $\lambda$ ).

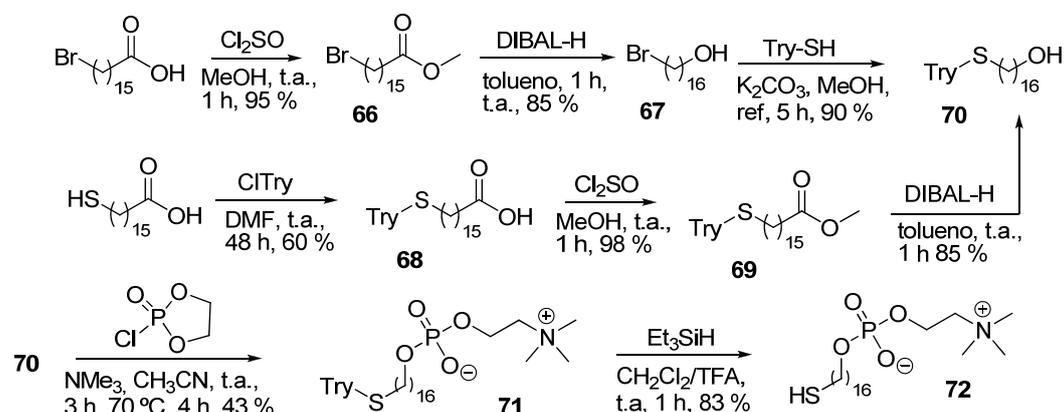
**Absorción**: UV-VIS (EtOH):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 390 (9009), 533 (56620). UV-VIS (DMSO):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 530 (42255).

**Emisión**: máximo a 553 nm, rendimiento cuántico de fluorescencia: 0.50 (disolución ~10<sup>-6</sup> M en EtOH).

## 6.6 Análogos reactivos de Miltefosina

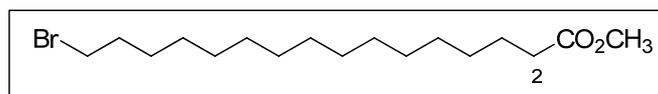
### 6.6.1 Síntesis de MT-16C-SH (72)

Se llevó a cabo en 5 pasos, a partir de ácido 16-bromohexadecanoico o de ácido 16-mercaptohexadecanoico (Esquema 6.19).



Esquema 6.19. Síntesis de MT-16C-SH (72)

#### 6.6.1.1.1 16-Bromohexadecanoato de metilo (66)



Se siguió un procedimiento descrito para la obtención de productos similares.<sup>43</sup>

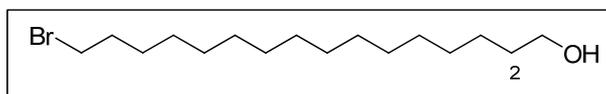
Sobre una disolución agitada de ácido 16-bromoundecanoico (2 g, 6.0 mmol) en metanol (100 mL) a 0 °C, bajo atmósfera de argón, se añadió gota a gota cloruro de tionilo ( $\text{Cl}_2\text{SO}$ ) (0.67 mL, 1.1 g, 8.9 mmol) recién destilado. Tras 1 h a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente a vacío. El producto, disuelto en AcOEt, se purifica por lavado con una disolución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y luego con agua. Rendimiento: 2.49 g (95 %).

TLC (hexano/AcOEt 4:1):  $R_f = 0.85$ .

<sup>43</sup> Starck, J. P., Nakatani, Y. G. Ourisson, *Tetrahedron* **1995**, 51, 2629-2638.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.22-1.33 (m, 18 H, H-4 a H-13), 1.41 (m, 2 H, H-14), 1.61 (q, *J* = 7.2 Hz, 2 H, H-3), 1.85 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, H-15), 2.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H, H-2), 3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H, H-16), 3.66 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>) ppm.

#### 6.6.1.1.2 16-Bromohexadecanol (67)



Sobre el éster **66** (2.40 g, 6.87 mmol) se añadió gota a gota y con agitación disolución de DIBAL-H 1 M en tolueno (15 mL, 15 mmol), a temperatura ambiente y bajo atmosfera de argón. Se mantuvo la mezcla en estas condiciones 1 h, se añadieron unas gotas de disolución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl hasta el fin de la efervescencia y, tras añadir agua (20 mL), la mezcla se extrajo tres veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se secó la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub>, se filtró, y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se cromatografió en columna de sílice con hexano/AcOEt 7:3. Se obtuvo así el alcohol **67** como un sólido blanco. Rendimiento: 1.99 g (90 %).

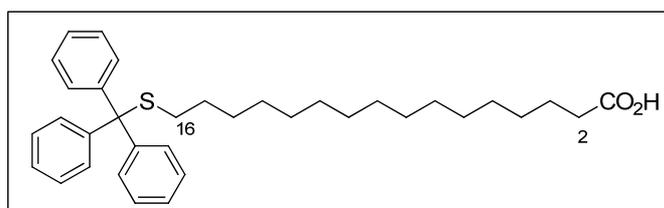
**TLC** (hexano/AcOEt 4:1): *R<sub>f</sub>* = 0.45.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.21-1.34 (m, 22 H, H-3 a H-13), 1.42 (m, 2 H, H-14), 1.57 (m, 2 H, H-2), 1.85 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, H-15), 3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H, H-16), 3.64 (t, *J* = 6.6 Hz, 1 H, H-1) ppm.

**FT-IR** (KBr) *ν*<sub>máx</sub>: 3401, 3297, 2918, 2849, 1631, 1472, 1462, 1071 cm<sup>-1</sup>.

**Análisis** (%): calculado para C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>BrO: C, 59.80; H, 10.35. Encontrado: C, 59.75; H, 10.60.

#### 6.6.1.1.3 Ácido 16-tritiliohexadecanoico (68)



Producto de síntesis descrita, se obtuvo por el mismo procedimiento.<sup>44</sup>

<sup>44</sup> Halter, M., Nogata, Y., Dannenberger, O., Sasaki, T., Vogel, V. *Lagmuir* **2004**, *20*, 2416-2423.

Una mezcla de ácido 16-mercaptohexadecanoico (353.0 mg, 1.22 mmol), cloruro de tritilo (511.7 mg, 1.84 mmol) y dimetilformamida (2 mL) se dejó reaccionar durante 48 h con agitación y bajo argón. Se añadió  $\text{CHCl}_3$  (10 mL) y la disolución se lavó con agua, la fase orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  y el disolvente se evaporó a vacío. El residuo se purificó separando el trifenilmetanol formado en la reacción por precipitación con éter dietílico a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , eliminando el disolvente y cristalizando el aceite residual en MeOH. Polvo blanco, pf 43.5-44.0  $^\circ\text{C}$ . Rendimiento: 388.5 mg (60%).

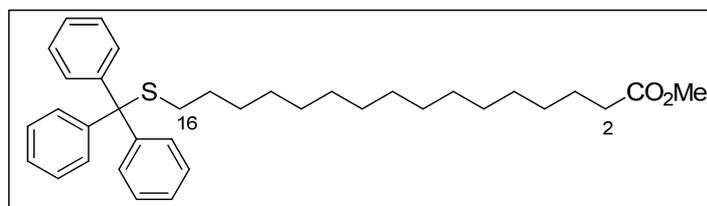
**TLC** (hexano/ $\text{Et}_2\text{O}$  1:1):  $R_f = 0.64$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.24 (m, 24 H, H-4 a H-15), 1.63 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2 H, H-3), 2.13 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2 H, H-16), 2.34 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2 H, H-2), 7.20 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3 H,  $\text{H}_p\text{-Ph}$ ), 7.28 (t,  $J = 7.3$  Hz, 6 H,  $\text{H}_m\text{-Ph}$ ), 7.41 (d,  $J = 7.3$  Hz, 6 H,  $\text{H}_o\text{-Ph}$ ) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  22.3 (C-15), 24.7 (C-3), 28.6-29.6 (C-4 a C-14), 32.0 (C-16), 34.0 (C-2), 66.4 ( $\text{CPh}_3$ ), 126.5 ( $\text{C}_p$ ), 127.9 ( $\text{C}_m$ ), 129.6 ( $\text{C}_o$ ), 145.0 ( $\text{C}_i$ ), 179.3 (CO) ppm.

**MS-ESI $^+$** ,  $m/z$ : 531 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ].

#### 6.6.1.1.4 16-Tritiliohexadecanoato de metilo (69)



Obtenido por esterificación de **68** siguiendo un procedimiento descrito.<sup>43</sup>

Sobre una suspensión de ácido 16-tritiliohexadecanoico (90 mg, 0.170 mmol) en metanol (10 mL) a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  se añadió cloruro de tionilo (1 mL), gota a gota y con agitación. Tras 1 h a temperatura ambiente, el precipitado formado se filtró, se lavó con metanol frío y se recrystalizó de hexano-éter dietílico 95:5. Polvo blanco. Rendimiento: 90 mg (98 %).

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.07-1.35 (m, 22 H, H-4 a H-14), 1.39 (q,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, H-15), 1.62 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2 H, H-3), 2.13 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2 H, H-16), 2.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2 H, H-2), 3.66 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.20 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3 H,  $\text{H}_p\text{-Ph}$ ), 7.28 (t,  $J = 7.3$  Hz, 6 H,  $\text{H}_m\text{-Ph}$ ), 7.41 (d,  $J = 7.3$  Hz, 6 H,  $\text{H}_o\text{-Ph}$ ) ppm.

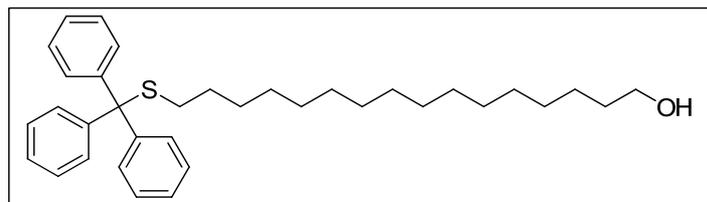
$^{13}\text{C-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  25.0 (C-3), 28.6-29.6 (C-4 a C-15), 32.0 (C-16), 34.1 (C-2), 51.9 ( $\text{CH}_3$ ), 66.8 ( $\text{CPh}_3$ ), 126.9 ( $\text{C}_p$ ), 128.2 ( $\text{C}_m$ ), 130.0 ( $\text{C}_o$ ), 145.5 ( $\text{C}_i$ ), 174.8 (CO) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2919, 2850, 1744 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1439, 1167, 740, 700  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ESI<sup>+</sup>**,  $m/z$ : 545  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**Análisis (%)**: Calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{O}_2\text{S}$  (650.81): C, 79.20; H, 8.73; S, 6.04. Encontrado: C, 79.26; H, 8.59; S, 5.72.

#### 6.6.1.1.5 16-Tritiltiohexadecanol (70)



A partir de bromoalcohol **67**:

Una mezcla del alcohol **67** (200 mg, 0.62), tritilmetanotiol (258 mg, 0.93 mmol) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (130 mg, 0.93 mmol) se calentó a reflujo de metanol (15 mL), durante 5 h con agitación. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo obtenido se cromatografió en columna de sílice utilizando como eluyentes la mezcla hexano/ $\text{Et}_2\text{O}$  4:1. Se obtuvo así el alcohol **70** como un sólido blanco. Rendimiento: 275 mg (90 %).

A partir de 16-tritiltiohexadecanoato de metilo (**69**):

Sobre el éster **69** (100 mg, 0.18 mmol) se añadió DIBAL-H 1 M en tolueno (0.7 mL, 0.7 mmol), gota a gota, a temperatura ambiente, con agitación y en atmósfera de argón. Se mantuvo la mezcla de reacción en estas condiciones durante 1 h, se añadieron gotas de disolución acuosa saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hasta el fin de la efervescencia y, tras añadir agua (20 mL), la mezcla se extrajo tres veces con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se secó la fase orgánica con  $\text{MgSO}_4$  y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se cromatografió en columna de sílice con hexano/ $\text{Et}_2\text{O}$  4:1. Se obtuvo así el alcohol **70** como un aceite que solidificó al enfriar. Rendimiento: 79 mg (85 %).

**TLC** (hexano/ $\text{Et}_2\text{O}$  1:1):  $R_f$  = 0.75.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.02-1.48 (m, 24 H, C-3 a C-14), 1.37 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2 H, H-15), 1.56 (q,  $J$  = 7.3 Hz, 2 H, H-2), 2.13 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2 H, H-16), 3.64 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2 H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 7.19 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3 H,  $\text{H}_p\text{-Ph}$ ), 7.27 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 6 H,  $\text{H}_m\text{-Ph}$ ), 7.41 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 6 H,  $\text{H}_o\text{-Ph}$ ) ppm.

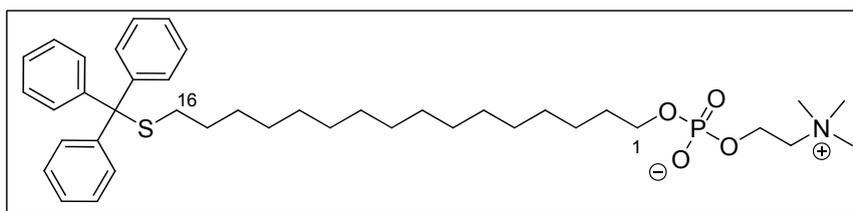
$^{13}\text{C-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  25.7 (C-3), 28.4-29.6 (C-4 a C-15), 32.0 (C-16), 32.8 (C-2), 63.5 (C-1), 66.8 ( $\text{CPh}_3$ ), 126.9 ( $\text{C}_p$ ), 128.2 ( $\text{C}_m$ ), 130.02 ( $\text{C}_o$ ), 145.5 ( $\text{C}_i$ ) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3435 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2918, 2850, 1631, 1591, 1483, 1465, 1445, 743  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ES+**,  $m/z$ : 539 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ], 243 [ $\text{CPh}_3^+$ ].

**Análisis** (%): Calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{O}_2\text{S}$  (502.33): C, 81.22; H, 9.22; S, 6.38. Encontrado: C, 81.25; H, 9.38; S, 6.15.

#### 6.6.1.1.6 16-Tritilitiohexadecilfosfatidilcolina (71)



Se siguió el método general para la introducción del grupo fosfocolina en el alcohol **70** (70 mg, 0.135 mmol), con acetonitrilo (5-10 mL), trimetilamina (2 mL) y 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-óxido (0.1 mL, 1.09 mmol). El sólido blanco aislado se purificó por precipitación de una disolución en  $\text{CHCl}_3$ , añadiendo acetona, y, después, de otra, también de  $\text{CHCl}_3$ , añadiendo  $\text{Et}_2\text{O}$ . Rendimiento: 39 mg (43 %).

**TLC** ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:5):  $R_f = 0.55$ .

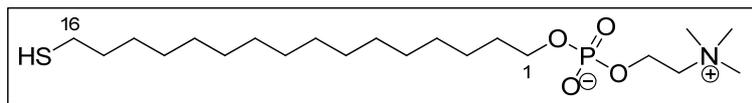
$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  0.97-1.33 (m, 26 H, H-3 a H-15), 1.44 (m, 2 H, H-2), 2.06 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, H-16), 3.13 (s, 9 H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.49 (s a., 2 H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.57 (c,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, H-1), 3.99 (s a., 2 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 7.24 (t,  $J = 4.5$  Hz, 3 H,  $\text{H}_p\text{-Ph}$ ), 7.29-7.35 (m, 12 H,  $\text{H}_m\text{-Ph}$ ,  $\text{H}_o\text{-Ph}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  25.5-29.3 (C-3 a C-15), 30.6 (d,  $J = 7.0$  Hz, C-2), 31.2 (C-16), 52.9, 53.0, 53.1 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), 58.1 (d,  $J = 5.1$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 63.8 (d,  $J = 5.8$  Hz, C-1), 65.5 (sa.,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 66.0 ( $\text{CPh}_3$ ), 126.6 ( $\text{C}_p$ ), 127.9 ( $\text{C}_m$ ), 129.1 ( $\text{C}_o$ ), 144.6 ( $\text{C}_i$ ) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2922, 2851, 1634, 1591, 1487, 1442, 1237, 1089, 968, 741, 699  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ESI+**  $m/z$ : 243 [ $\text{CPh}_3^+$ ], 682 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 1364 [ $2\text{M}+\text{H}^+$ ].

## 6.6.1.1.7 16-Mercaptohexadecilfosfatidilcolina (72)



Se empleó en su síntesis una metodología descrita.<sup>45</sup>

El fosfolípido protegido **71** (90 mg, 0.132 mmol) se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CF}_3\text{COOH}$  1:1 v:v (2 mL), se añadió  $\text{Et}_3\text{SiH}$  (44.3  $\mu\text{L}$ , 0.032 mg, 0.277 mmol), se mantuvo una hora con agitación a temperatura ambiente, y se evaporó el disolvente con corriente de argón. El residuo se cromatografió en columna de gel de sílice utilizando sucesivamente como eluyentes  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1 y  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:3. El sólido blanco **72** aislado se purificó mediante dos precipitaciones sucesivas de  $\text{CHCl}_3$  añadiendo acetona la primera vez y  $\text{Et}_2\text{O}$  la segunda. Rendimiento: 50 mg (83 %), pf 229-231 °C.

**TLC** ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:5):  $R_f = 0.38$ .

**$^1\text{H}$ -RMN** (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  1.11-1.38 (m, 24 H, H-3 a H-14), 1.45 (q,  $J = 5.5$  Hz, 2 H, H-2), 1.51 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, H-15), 2.22 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1 H, HS), 2.46 (c,  $J_{\text{obs}} = 7.1$  Hz, 2 H, H-16), 3.13 (s a, 9 H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.48 (s a, 2 H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.57 (c,  $J_{\text{obs}} = 6.5$  Hz, 2 H, H-1), 3.99 (s.a., 2 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ) ppm.

**$^{13}\text{C}$ -RMN** (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  23.7 (C-16), 25.5-29.1 (C-3 a C-14), 30.6 (d,  $J = 7.3$  Hz, C-2), 33.4 (C-15), 52.9, 53.0, 53.1 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), 58.1 (d,  $J = 4.8$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 63.8 (d,  $J = 6.0$  Hz, C-1), 65.5 (s a,  $\text{CH}_2\text{N}$ ) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3028, 2917, 2849, 2551 ( $\nu_{\text{SH}}$ ), 1483, 1471, 1243, 1079, 1060, 968.  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-ESI+**,  $m/z$ : 440 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 880 [ $2\text{M}+\text{H}^+$ ], 1319 [ $3\text{M}+\text{H}^+$ ].

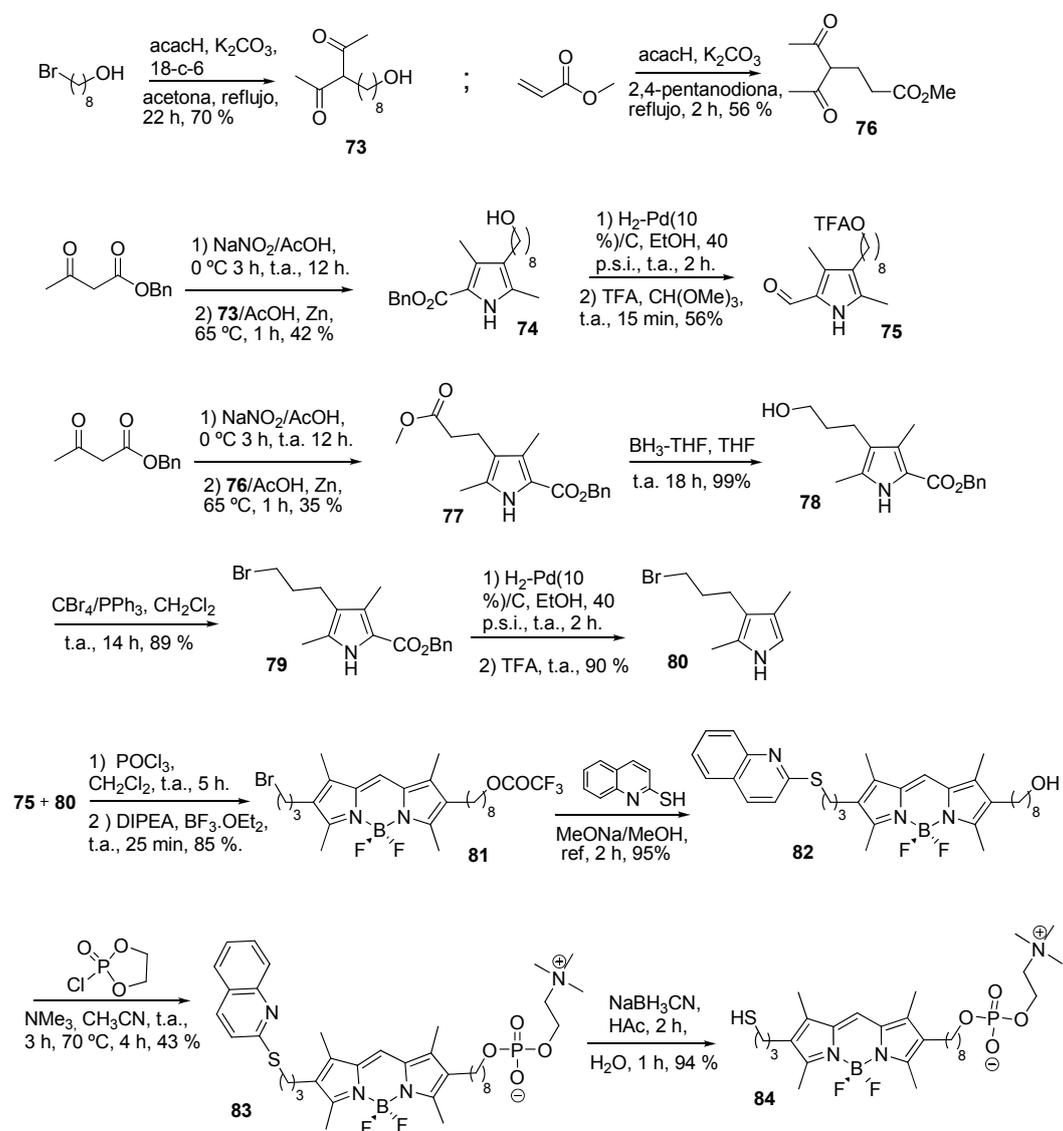
**MS-HR** (peak matching): calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{46}\text{NO}_4\text{PS}+\text{H}$  440.2958; encontrado 440.2965.

**Análisis** (%): Calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{46}\text{NO}_4\text{SP}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (457.66 = 439.63 + 18.03): C, 55.11; H, 10.57, N, 3.06; S, 7.29. Encontrado: C, 55.07; H, 10.18; N, 3.22, S, 6.91 (corresponde a una pureza del 96% en peso).

<sup>45</sup> Pearson, D.A., Blanchette, M., Baker, M. L., Guindon, C. A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2739-2742.

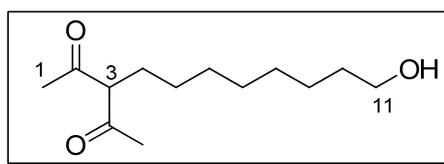
### 6.6.2 Síntesis de MT-8C-SHBDP (84)

Se llevó a cabo en 12 pasos (Esquema 6.20).



Esquema 6.20. Síntesis de MT-8C-SHBDP (84)

### 6.6.2.1.1 3-Acetil-11-hidroxiundecan-2-ona (73)



Se siguió el procedimiento general para la monoalquilación de acetilacetona. Cantidades: acetilacetona (22.7 g, 23.3 mL, 227 mmol), 8-bromooctanol (4.75 g, 22.7 mmol),  $K_2CO_3$  (15.7 g, 113.5 mmol) y 18-corona-6 (57 mg, 0.21 mmol). Eluyente de la columna: hexano/AcOEt 7:3. Aceite incoloro. Rendimiento: 3.6 g (70%).

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.4$ .

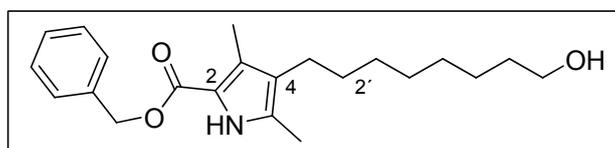
**$^1H$ -RMN** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.23-1.36 (m, 8 H, H-6 a H-9), 1.40 (m, 2 H, H-5), 1.64 (m, 2 H, H-10), 2.07 (s, 3 H,  $CH_3$ ), 2.17 (s, 3 H,  $CH_3$ ), 3.37 (c,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, H-4) 3.79 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, H-11), 4.33 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1 H, H-3) ppm.

**$^{13}C$ -RMN** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  19.1 ( $CH_3$ ), 25.3, 25.4, 28.0, 28.7, 28.8 (C-6 a C-10), 31.7 ( $CH_3$ ), 32.5 (C-5), 60.6 (C-4), 66.5 (C-3), 67.9 (C-11), 195.9 (C=O)) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{max}$ : 3393 ( $\nu_{OH}$ ), 2924, 2847, 1683 ( $\nu_{C=O}$ ), 1667 ( $\nu_{C=O}$ ), 1585, 1469, 1406, 1358, 1275, 1171, 1067, 956  $cm^{-1}$ .

**MS-ESI $^+$** ,  $m/z$ : 229 [ $M+H^+$ ], 251 [ $M+Na^+$ ].

### 6.6.2.1.2 3,5-Dimetil-4-(8'-hidroxiocetil)-1H-pirrol-2-carboxilato de bencilo (74)



Se obtuvo por reacción de Johnson-Knorr. Cantidades: nitrito sódico (1.05 g, 15.24 mmol) en agua (3 mL), acetoacetato de bencilo (2.9 g, 2.6 mL, 15.24 mmol) en ácido acético glacial (10 mL), **73** (3.48 g, 15.24 mmol) y Zn en polvo (2 g, 30.6 mmol). Purificación: lavados con agua (30 mL) y AcOEt (3  $\times$  30 mL). Eluyente de la columna: hexano/AcOEt 4:1. Aceite amarillo. Rendimiento: 2.28 g (42%).

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.6$ .

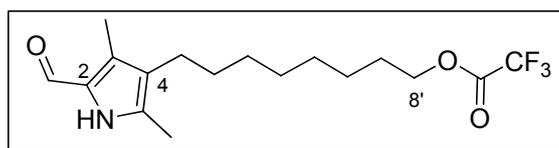
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.24-1.44 (m, 10 H, H-2' a H-6'), 1.55 (m, 2 H, H-7'), 2.17, 2.27 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-3, CH<sub>3</sub>-5), 2.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, H-1'), 3.62 (t, *J* = 6.6 Hz, 2 H, H-8'), 5.28 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.36 (m, 5 H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 8.81 (s a, 1 H, NH) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.7 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 11.5 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 23.9 (C-1'), 25.7, 29.3-29.5, 30.8 (C-2' a C-6'), 32.7(C-7'), 62.9 (C-8'), 65.3 (CH<sub>2</sub>Ph), 116.2 (C-2), 122.5 (C-4), 127.7 (C-3), 127.9, 128.0, 128.4 (C<sub>o</sub>, C<sub>m</sub>, C<sub>p</sub>), 129.9 (C-5), 136.6 (C<sub>i</sub>), 161.3 (COOBn) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3390, 3306, 2925, 2853, 1683 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1645, 1442, 1283 cm<sup>-1</sup>.

**MS-IE**, *m/z* (%): 357 [M<sup>+</sup>] (49), 242 [M-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>O] (100).

#### 6.6.2.1.3 3,5-Dimetil-2-formil-4-(8'-trifluorometilcarboniloxioctil)-1*H*-pirrol (75)



Se siguió un procedimiento descrito para la obtención de 2-formilpirroles a partir de 2-bencilpirroles.<sup>46</sup>

Sobre una disolución de **74** (2.28 g, 6.38 mmol) en EtOH (30 mL) se añadió Pd/C (10%) (200 mg) y la mezcla se hidrogenó en un vaso Parr a 40 psi durante 2 h. Se filtró el catalizador y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose así el ácido 3,5-dimetil-4-(8'-hidroxioctil)-1*H*-pirrol-2-carboxílico como un aceite incoloro que oscurece al aire. A continuación, sobre el ácido aislado se añadió ácido trifluoroacético recién destilado (6 mL) y la mezcla se agitó durante 15 minutos. Se enfrió la mezcla con baño de hielo y se añadió ortoformiato de trimetilo (4 mL) gota a gota y con agitación. Tras 30 min a temperatura ambiente, se adicionó agua (20 mL), se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 20 mL), las fases orgánicas reunidas se neutralizaron con disolución saturada de bicarbonato sódico y se lavaron con agua. Se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. El residuo se cromatografió en columna de sílice utilizando como eluyentes la mezcla hexano/AcOEt 9:1. Aceite amarillo. Rendimiento: 1.25 g (56 %).

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1): *R<sub>f</sub>* = 0.8.

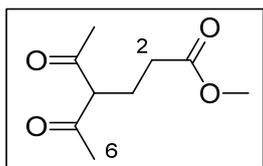
<sup>46</sup> Lash, T. D., Mani, U. N., Lyons, E. A., Thientanavanich, P., Jones, M. A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 478.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ 1.24-1.46 (m, 10 H, H-2' a H-6'), 1.55 (q, *J* = 6.9 Hz, 2 H, H-7'), 2.25 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-3, CH<sub>3</sub>-5), 2.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, H-1'), 4.34 (t, *J* = 6.7 Hz, 2 H, H-8'), 9.42 (s, 1 H, CHO), 10.24 (s a, 1 H, NH) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.8 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 11.6 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 23.7 (C-1'), 25.4, 28.0, 29.0, 29.2, 29.3 (C-2' a C-6'), 30.5 (C-7'), 68.2 (C-8'), 116.4 (CF<sub>3</sub>), 123.3 (C-4), 127.8 (C-2), 132.6, 136.4 (C-3, C-5), 157.7 (COCF<sub>3</sub>), 175.4 (CHO) ppm.

**MS-IE**, *m/z* (%): 347 [M<sup>+</sup>], no observado, 251 (13), 136 [M-C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>COCF<sub>3</sub>] (100).

#### 6.6.2.1.4 4-Acetil-5-oxohexanoato de metilo (76)



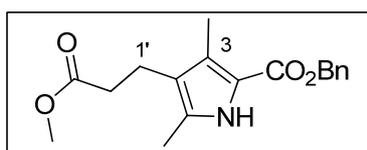
Producto descrito.<sup>47</sup>

Sobre una mezcla a reflujo de 2,4-pentanodiona (15.52 mL, 0.15 mol) y carbonato potásico seco (500 mg) en 2-pentanona se añadió gota a gota acrilato de metilo (12.13 g, 12.69 mL, 0.15 mol) y la mezcla se mantuvo con agitación durante 2 h. La mezcla de reacción fría se filtró, el disolvente se eliminó a vacío y el residuo obtenido se destiló a vacío. Rendimiento: 14.8 g (56 %). Líquido incoloro, p. eb. 148-150 °C (20 mm Hg).

**<sup>1</sup>H-RMN** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.15 (m, 2 H, H-3), 2.18 (s, 6 H, COCH<sub>3</sub>), 2.26 (m, 2 H, H-3), 3.34 (m, 1 H, H-4), 3.65 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>) ppm.

**FT-IR** (entre cristales)  $\nu_{\text{máx}}$ : 1736 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , éster), 1700 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , ceto) cm<sup>-1</sup>.

#### 6.6.2.1.5 3,5-Dimetil-4-(2'-metoxicarboniletil)-1H-pirrol-2-carboxilato de bencilo (77)



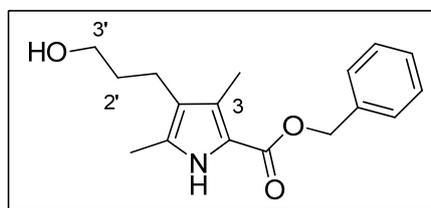
<sup>47</sup> Battersby, A. R., Hunt, E., McDonald, E., Paine III, J. B., Saunders, J. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1976**, 1008.

Producto descrito.<sup>48</sup> Para su obtención se utilizó el método general de Johnson-Knorr. Cantidades: nitrito sódico (3.71 g, 53.8 mmol) en agua (10 mL), acetoacetato de bencilo (10.3 g, 53.8 mmol) en ácido acético glacial (20 mL), 4-acetil-5-oxohexanoato de metilo (**76**) (10 g, 53.8 mmol) y Zn en polvo (7 g, 107 mmol). Purificación: tras enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo picado. El sólido precipitado se separó decantando el exceso de Zn, se redisolvió en acetato de etilo, se filtró, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se recrystalizó de metanol. Agujas amarillas. Rendimiento: 5.94 g (35 %).

<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ 2.22, 2.30 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-3, CH<sub>3</sub>-5), 2.44 (t, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-2'), 2.72 (t, *J* = 8.4 Hz, H-1'), 3.67 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 5.30 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.37 (m, 5 H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 8.67 (s a, 1 H, NH) ppm.

FT-IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3308, 1736 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , éster), 1666 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , ceto), 1270 cm<sup>-1</sup>.

#### 6.6.2.1.6 3,5-Dimetil-4-(3'-hidroxipropil)-1H-pirrol-2-carboxilato de bencilo (**78**)



Se siguió un procedimiento descrito para la reducción de un homólogo.<sup>49</sup>

Sobre una disolución del diéster **77** (2.87 g, 9.1 mmol) en THF (10 mL) se añadió gota a gota y con agitación otra disolución del complejo BH<sub>3</sub>-THF 1 M en THF (23 mL, 23 mmol), a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón. Se mantuvo la mezcla en estas condiciones 18 h, se añadieron unas gotas de MeOH hasta el fin de la efervescencia y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se cromatografió en columna de sílice utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5 como eluyente. Se obtuvo así el alcohol **78** como un sólido blanco. Rendimiento: 2.61 g (99 %).

TLC (hexano/AcOEt 1:1): *R<sub>f</sub>* = 0.5.

<sup>48</sup> Johnson, A. W., Markham, E., Price, R., Shaw, K. B. *J. Chem. Soc.* **1958**, 4254.

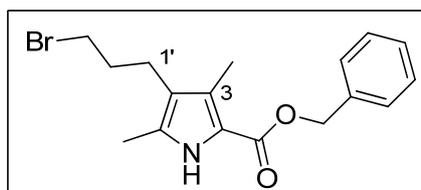
<sup>49</sup> Smith, K. M., Fujinari, E. M., Pandey, R. K., Tabba, H. D. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 4667-4676.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ 1.70 (q,  $J_{obs} = 6.7$  Hz, 2 H, H-2'), 2.20, 2.29 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-3, CH<sub>3</sub>-5), 2.46 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, H-1'), 3.63 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2 H, H-3'), 5.29 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.37 (m, 5 H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 8.61 (s a, 1 H, NH) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.7 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 11.5 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 20.2 (C-1'), 33.4 (C-2'), 62.4 (C-3'), 65.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 116.5 (C-2), 121.4 (C-4), 127.6 (C-3), 128.0, 128.1, 128.5 (C<sub>o</sub>, C<sub>m</sub>, C<sub>p</sub>), 129.9 (C-5), 136.6 (C<sub>i</sub>), 161.3 (COOBn) ppm.

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 287 [M<sup>+</sup>] (33), 242 [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O] (40).

#### 6.6.2.1.7 3,5-Dimetil-4-(3'-bromopropil)-1H-pirrol-2-carboxilato de bencilo (79)



Se siguió un procedimiento descrito para productos similares.<sup>50</sup>

3,5-Dimetil-4-(3'-hidropropil)-1H-pirrol-2-carboxilato de bencilo (**78**) (120 mg, 0.42 mmol) y CBr<sub>4</sub> (166 mg, 0.50 mmol) se disuelven en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) y se enfría la mezcla en baño de hielo. Después se añade, gota a gota, una disolución de trifenilfosfina (131 mg, 0.50 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 14 h. Se concentra la disolución a un volumen de 4 mL y se cromatografía en columna de sílice utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se obtuvo así el bromuro **79** como un sólido blanco. Rendimiento: 130 mg (89 %).

**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.75$ .

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.98 (q,  $J_{obs} = 7.1$  Hz, 2 H, H-2'), 2.22, 2.29 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-3, CH<sub>3</sub>-5), 2.53 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, H-1'), 3.38 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, H-3'), 5.29 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>Ph), 7.40 (m, 5 H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 8.52 (s a, 1 H, NH) ppm.

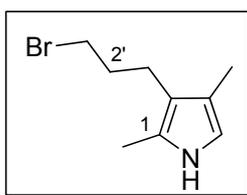
**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.8 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 11.6 (CH<sub>3</sub>-pirrol), 22.2 (C-1'), 33.3 (C-2'), 33.5 (C-3'), 65.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 116.6 (C-2), 120.3 (C-4), 127.6 (C-3), 127.9, 128.0, 128.5 (C<sub>o</sub>, C<sub>m</sub>, C<sub>p</sub>), 130.3 (C-5), 136.5 (C<sub>i</sub>), 161.3 (COOBn) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{m\acute{a}x}$ : 3308, 2921, 1657 ( $\nu_{C=O}$ , éster), 1439, 1271, 1094 cm<sup>-1</sup>.

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 349 (46) [M<sup>+</sup>], 242 (90) [M-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Br].

<sup>50</sup> Baughman, T. W., Sworen, J. C., Wagener, K. B. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10943-10948.

## 6.6.2.1.8 2,4-Dimetil-3-(3'-bromopropil)-1H-pirrol (80)



Se siguieron los procedimientos generales para la desbencilación hidrogenolítica y la descarboxilación en  $\alpha$  de pirroles a partir del bromoéster **79** (904 mg, 2.58 mmol) en EtOH (15 mL), con Pd/C (10%) (81 mg) y ácido trifluoroacético recién destilado (6 mL). Aceite incoloro. Rendimiento: 500 mg (90%).

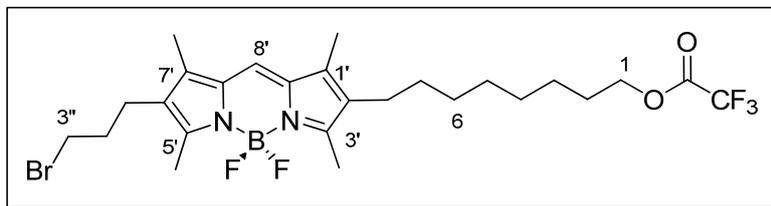
TLC (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.9$ .

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.05 (q,  $J_{\text{obs}} = 6.9$  Hz, 2 H, H-2), 2.05, 2.21 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3$ -3,  $\text{CH}_3$ -5), 2.56 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2 H, H-1), 3.44 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H, H-3), 6.41 (s, 1 H, H-5), 7.53 (s a, 1 H, NH) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.4 ( $\text{CH}_3$ -pirrol), 11.4 ( $\text{CH}_3$ -pirrol), 22.6 (C-1), 33.8 (C-2), 33.9 (C-3), 113.0 (C-5), 116.7 (C-4), 117.9 (C-3), 124.3 (C-2) ppm.

MS-IE,  $m/z$  (%): 215 [ $\text{M}^+$ ] (10), 108 [ $\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{Br}$ ] (63).

## 6.6.2.1.9 Trifluoroacetato de 8-[6'-(3''-bromopropil)-1',3',5',7'-tetrametil-4',4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-2'-il]octilo (TFA-8C-6BrBDP) (81)



Se siguió el método general para la síntesis de BODIPYs. Cantidades:  $\text{POCl}_3$  (167 mg, 102  $\mu\text{L}$ , 1.09 mmol),  $\alpha$ -H pirrol **80** (236 mg, 1.09 mmol), aldehído **75** (380 mg, 1.09 mmol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 mL), DIPEA (704 mg, 950  $\mu\text{L}$ , 5.45 mmol) y  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (774 mg, 685  $\mu\text{L}$ , 5.45 mmol). Se cromatografió en columna de sílice utilizando hexano/AcOEt 9:1. Sólido ceroso rojo. Rendimiento: 725 mg (85 %).

**TLC** (hexano/AcOEt 4:1):  $R_f = 0.6$ .

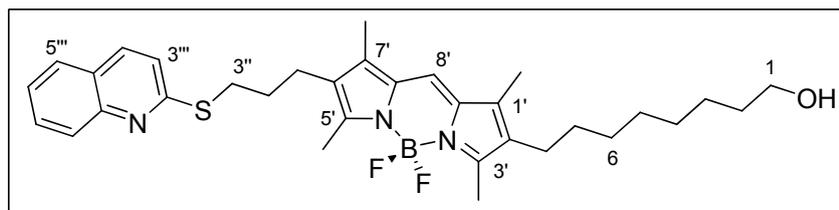
**$^1\text{H-RMN}$**  (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.26-1.46 (m, 10 H, H-7 a H-3), 1.74 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, H-2), 1.99 (q,  $J_{\text{obs}} = 6.9$  Hz, 2 H, H-2''), 2.15, 2.19 (dos s, 6 H,  $\text{CH}_3\text{-C1}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C7}'$ ), 2.35 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2 H, H-8), 2.48, 2.49 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3\text{-C3}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}'$ ), 2.54 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, H-1''), 3.41 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2 H, H-3''), 4.34 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2 H, H-1), 6.96 (s, 1 H, H-8') ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.6, 9.7 ( $\text{CH}_3\text{-C1}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C7}'$ ), 12.6, 12.8 ( $\text{CH}_3\text{-C3}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}'$ ), 22.3 (C-1''), 24.0 (C-8), 25.4, 29.0, 29.2, 29.3, 30.0 (C-7 a C-3), 28.0 (C-2), 32.9 (C-2''), 33.2 (C-3''), 68.2 (C-1), 115.9 ( $\text{CF}_3$ ), 118.8 (C-8'), 127.7, 130.6, 132.1, 132.8, 137.1, 137.6 (C-1', C-7', C-7'a, C-8'a, C-2', C-6'), 154.0, 155.9 (C-3', C-5'), 157.7 ( $\text{COCF}_3$ ) ppm.

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 2930, 2858, 1785 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1606, 1473, 1403, 1229, 1065  $\text{cm}^{-1}$ .

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 592 [ $\text{M}^+$ ] no observado, 496 (28), 476 (37), 381 [ $\text{M-C}_7\text{H}_{14}\text{CO}_2\text{CF}_3$ ] (100).

**6.6.2.1.10 8-[6'-[3''-(Quinol-2'''-ilmercapto)propil]-1',3',5',7'-tetrametil-4',4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-2'-il]octan-1-ol (OH-8C-6QSB DP) (82)**



Se siguió un procedimiento descrito para la incorporación de grupos tioles en BODIPYs.<sup>51</sup>

Sobre una disolución de quinoleina-2-tiol (76 mg, 0.47 mmol) en metanol (10 mL) se adicionó MeONa (25 mg, 0.47 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 min. Se añadió el bromuro **81** (70 mg, 0.12 mmol), y la mezcla se calentó a reflujo durante 2 h. Se eliminó el disolvente a vacío, el residuo sólido se lavó con  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $3 \times 20$  mL) y los extractos reunidos se llevaron a sequedad. El residuo se cromatografió en columna de

<sup>51</sup> Imahori, H., Norieda, H., Yamada, H., Nishimura, Y., Yamazaki, I., Sakata, Y., Fukuzumi S. J. *Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 100-110.

sílice utilizando hexano/AcOEt 7:3. Se obtuvo así el compuesto **82** como un sólido ceroso rojo. Rendimiento: 65 mg (95 %).

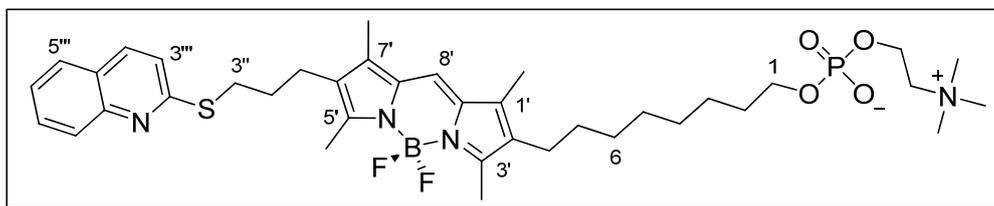
**TLC** (hexano/AcOEt 1:1):  $R_f = 0.5$ .

**$^1\text{H-RMN}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.27-1.35 (m, 8 H, H-6 a H-3), 1.41 (m, 2 H, H-7), 1.55 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2 H, H-2), 1.93 (q,  $J_{\text{obs}} = 7.4$  Hz, 2 H, H-2'') 2.14, 2.17 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3\text{-C1}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C7}'$ ), 2.33 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2 H, H-8), 2.48, 2.51 (dos s, 3 H cada uno,  $\text{CH}_3\text{-C3}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}'$ ), 2.57 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2 H, H-1''), 3.34 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H, H-3''), 3.62 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2 H, H-1), 6.93 (s, 1 H, H-8'), 7.19 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1 H, H-3'''), 7.42 (m, 1 H, H-7'''), 7.63 (m, 1 H, H-6'''), 7.70 (dd,  $J = 8.1, 1.0$  Hz, 1 H, H-8'''), 7.88 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1 H, H-4'''), 7.93 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H, H-5''') ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.5, 9.6 ( $\text{CH}_3\text{-C1}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C7}'$ ), 12.7, 12.8 ( $\text{CH}_3\text{-C3}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}'$ ), 23.2 (C-1''), 24.0 (C-8), 25.7, 29.2, 29.3, 29.3, 29.4, 29.6, 30.0 (C-2'', C-3'', C-3 a C-7), 32.7 (C-2), 62.9 (C-1), 118.6 (C-8'), 120.9 (C-3'''), 125.2 (C-7'''), 125.8 (C-4''')a), 127.5, 127.8 (C-5''', C-8'''), 129.7 (C-6'''), 135.4 (C-4'''), 127.7, 130.4, 132.2, 132.5, 137.0, 137.2 (C-1', C-7', C-7'a, C-8'a, C-2', C-6'), 148.0 (C-8''')a), 154.4, 155.3 (C-3', C-5'), 159.0 (C-2''') ppm.

**MS-IE**,  $m/z$  (%): 577 [ $\text{M}^+$ ] (11), 557 [ $\text{M-HF}$ ] (89), 537 [ $\text{M-2HF}$ ] (100), 396 (63), 370 (40), 301 (95), 273 (65).

**6.6.2.1.11 8-{6'-[3''-(Quinol-2'''-ilmercapto)propil]-1',3',5',7'-tetrametil-4',4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-2'-il}octilfosfatidilcolina(MT-8C-6QSB DP) (83)**



Se obtuvo por introducción del grupo fosfatidilcolina en el alcohol **82**. Cantidades: OH-8C-6QSB DP (**82**) (63 mg, 0.11 mmol), acetonitrilo (10 mL), trimetilamina (c.a. 2 mL) y 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-oxido (20  $\mu\text{L}$ , 31 mg, 0.218 mmol). Sólido rojo. Rendimiento: 35 mg (43 %).

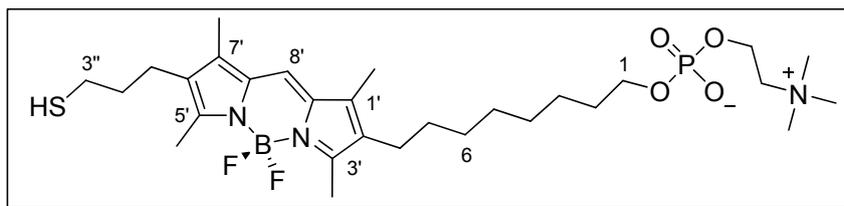
**TLC** ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:5):  $R_f = 0.4$ .

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz CD<sub>3</sub>OD): δ 1.28-1.37 (m, 8 H, H-3 a H-6), 1.39 (m, 2 H, H-7), 1.62 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2 H, H-2), 1.90 (q,  $J_{obs} = 7.4$  Hz, 2 H, H-2''), 2.15, 2.16 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-C1', CH<sub>3</sub>-C7'), 2.37 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, H-8), 2.42, 2.43 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-C3', CH<sub>3</sub>-C5'), 2.57 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, H-1''), 3.19 (s, 9 H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.29 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2 H, H-3''), 3.59 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>N), 3.86 (td,  $J = 6.7, 6.5$  Hz, 2 H, H-1), 4.22 (m, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 7.19 (s, 1 H, H-8'), 7.22 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1 H, H-3'''), 7.41 (ddd,  $J = 8.1, 7.0, 1.2$ , Hz, 1 H, H-7'''), 7.60 (ddd,  $J = 8.5, 7.0, 1.5$ , Hz, 1 H, H-6'''), 7.75 (dd,  $J = 8.1, 1.3$  Hz, 1 H, H-8'''), 7.8 (m, 1 H, H-5'''), 7.97 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1 H, H-4''') ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 9.6, 9.7 (CH<sub>3</sub>-C1', CH<sub>3</sub>-C7'), 12.9 (CH<sub>3</sub>-C3', CH<sub>3</sub>-C5'), 24.0 (C-1''), 24.8 (C-8), 27.0, 30.0, 30.5, 30.5, 30.7, 31.0, 31.3, 31.8, 31.9 (C-2 a C-7, C-2'', C-3''), 54.65, 54.69, 54.72 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 60.3 (d,  $J = 4.7$  Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 66.9 (d,  $J = 6.1$  Hz, C-1), 67.5 (s a, CH<sub>2</sub>N), 120.8 (C-8'), 121.9 (C-3'''), 126.5, 130.9 (C-6''', C-7'''), 127.4 (C-4''')a), 128.7, 128.9 (C-5''', C-8'''), 130.2, 131.6, 133.8, 134.0, 139.1, 139.2 (C-1', C-7', C-7a', C-8'a, C-2', C-6'), 136.9 (C-4'''), 149.5 (C-8''')a), 155.5, 156.1 (C-3', C-5'), 160.7 (C-2''') ppm.

**MS-ESI<sup>+</sup>**,  $m/z$ : 743 [M+H<sup>+</sup>].

**6.6.2.1.12 8-[6'-(3''-Mercaptopropil)-1',3',5',7'-tetrametil-4',4'-difluoro-4'-bora-3a',4a'-diazas-indacen-2'-il]octilfosfatidilcolina (MT-8C-6SHBDP) (84)**



Se siguió un procedimiento descrito para la desprotección del grupo tiol.<sup>52,53</sup>

Sobre una disolución de **83** (35 mg, 0.047 mmol) en ácido acético (900 μL) se adicionó NaBH<sub>3</sub>CN (15 mg, 0.236 mmol) y se mantuvo la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió agua (700 μL) y la mezcla se agitó durante 1 h, se diluyó con agua (5 mL), se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 10 mL) y los extractos reunidos se llevaron a sequedad. El residuo se cromatografió en columna de sílice utilizando sucesivamente como eluyentes CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1 y CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 65:25:3. Sólido rojo. Rendimiento: 27 mg (94 %), pf 199-201 °C.

<sup>52</sup> Zhang, J., Matteucci, M. D. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1467-1470.

<sup>53</sup> Nakamura, S., Furutani, A., Toru, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1690-1695.

**TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 65:25:5):  $R_f = 0.40$ .

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  1.30-1.38 (m, 8 H, H-3 a H-6), 1.42 (m, 2 H, H-7), 1.64 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2 H, H-2), 1.72 (q,  $J_{obs} = 7.3$  Hz, 2 H, H-2''), 2.17, 2.18 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-C1', CH<sub>3</sub>-C7'), 2.38 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2 H, H-8), 2.42, 2.43 (dos s, 3 H cada uno, CH<sub>3</sub>-C3', CH<sub>3</sub>-C5'), 2.50 (m, 4 H, H-1'', H-3''), 3.22 (s, 9 H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.63 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>N), 3.87 (td,  $J = 6.7, 6.5$  Hz, 2 H, H-1), 4.25 (m, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 7.24 (s, 1 H, H-8').

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  9.6 (CH<sub>3</sub>-C1', CH<sub>3</sub>-C7'), 12.8, 12.9 (CH<sub>3</sub>-C3', CH<sub>3</sub>-C5'), 23.4, 24.6 (C-1'', C-3''), 24.8 (C-8), 30.4, 30.5, 30.7, 31.3, 31.8, 31.9 (C-2 a C-7), 35.5 (C-2''), 54.68, 54.72 y 54.75 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 60.3 (d,  $J = 4.9$  Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 66.9 (d,  $J = 5.9$  Hz, C-1), 67.5 (s a, CH<sub>2</sub>N), 120.8 (C-8'), 130.2, 131.6, 133.8, 134.0, 139.1, 139.2 (C-1', C-7', C-7'a, C-8'a, C-2', C-6'), 155.4, 156.1 (C-3', C-5').

**FT-IR** (KBr)  $\nu_{m\acute{a}x}$ : 3435, 2927, 2855, 1606, 1474, 1228 ( $\nu_{p=O}$ ), 1069 ( $\nu_{p-O-C}$ ), 969 cm<sup>-1</sup>.

**MS-HR** (peak matching): calculado para C<sub>29</sub>H<sub>49</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>PS+H 616.3321; encontrado 616.3319.

**MS-ESI<sup>+</sup>**,  $m/z$ : 616 [M+H<sup>+</sup>], 638 [M+Na<sup>+</sup>].

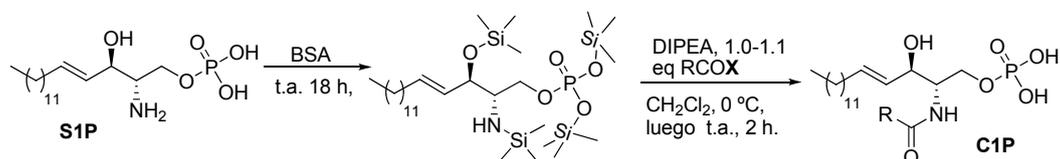
**HPLC** (columna de fase inversa C<sub>18</sub>, MeOH/H<sub>2</sub>O 9/1, 1.2 mL/min,  $\lambda_{anal} = 280, 380, 503, 529$  nm),  $R_t = 2.63$  min (100% de pureza a dichas  $\lambda$ ).

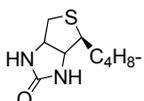
**Absorción**: UV-VIS (EtOH):  $\lambda_{m\acute{a}x}$  (nm) ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 380 (10000), 502 (35000), 529 (82000).

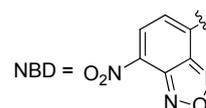
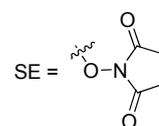
## 6.7 Síntesis de ceramidas 1-fosfato (C1P)

### 6.7.1 Procedimiento general

Se obtuvieron mediante el procedimiento general descrito para el compuesto **85** (Esquema 6.21).

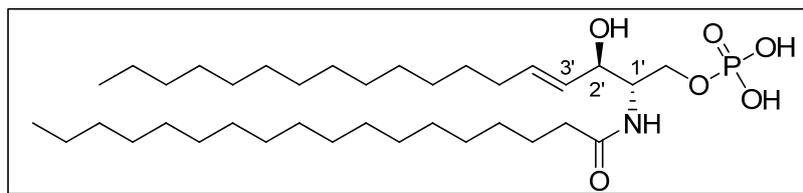


C1P	R	Rendimiento	X
<b>85</b>	$n\text{-C}_{17}\text{H}_{35}\text{-}$	79%	Cl
<b>86</b>	$n\text{-C}_{15}\text{H}_{31}\text{-}$	82%	Cl
<b>87</b>	$n\text{-C}_2\text{H}_5\text{-}$	86%	SE
<b>88</b>	$n\text{-C}_8\text{H}_{17}\text{CH}=\text{CH}^{\text{(Z)}}\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{-}$	74%	Cl
<b>89</b>		53%	Cl
<b>90</b>	5-(7-NBD)- $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{-}$	76%	SE



Esquema 6.21. Síntesis de C1P a partir de S1P

**6.7.1.1.1 (1'S,2'R,3'E)-N-[2'-Hidroxi-1'-(fosfonooximetil)heptadec-3'-en-1'-il]-octadecanamida (C18-ceramida 1-fosfato) (85)**<sup>54,55</sup>



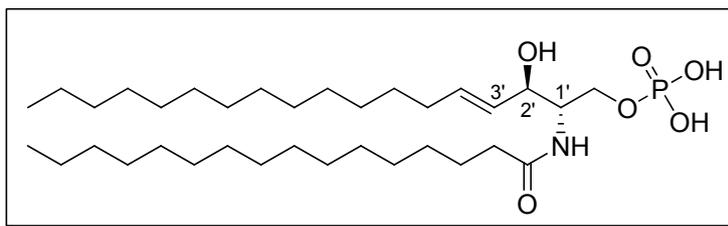
Una mezcla de esfingosina-1-fosfato (S1P) (10.3 mg, 0.027 mmol) y *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) (400  $\mu$ l) se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El exceso de BSA se evaporó a alto vacío, el residuo se redisolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (400  $\mu$ l), se enfrió a 0  $^\circ\text{C}$  y se añadió diisopropiletilamina (15  $\mu$ l, 0.08 mmol), y cloruro de estearoilo (8.2 mg, 0.027 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.4 mL). La mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, se concentró a vacío al 30 % de su volumen inicial y se añadió sobre un soporte de muestra (“samplet”) para cromatografía de fase inversa (Biotage<sup>TM</sup>). El “samplet” se secó a vacío, se cargó en una columna cromatográfica de fase inversa RP-18 (Biotage<sup>TM</sup>) y se cromatografió utilizando como eluyente inicial  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  50:50:1, seguido por eluyentes con proporciones crecientes de MeOH, hasta alcanzar  $\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  100:1. El aceite aislado se purificó por precipitación, añadiendo acetona a una disolución concentrada en  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Sólido blanco. Rendimiento: 13.8 mg (79%).

TLC ( $\text{SiO}_2$ , *n*BuOH/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$  8:1:1:1):  $R_f = 0.40$ .

<sup>54</sup> Szulc, Z.M., Hannun, Y.A., Bielawska, A. *Tetrahedron Lett.* **2000** 41, 7821–7824.

<sup>55</sup> Byun, H. S., Erulalla, R. K., Bittman, R. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 6495–6498.

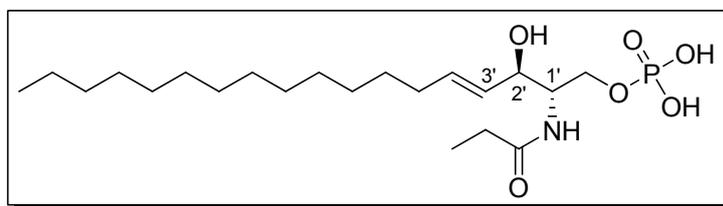
**6.7.1.1.2 (1'S,2'R,3'E)-N-[2'-Hidroxi-1'-(fosfonooximetil)heptadec-3'-en-1'-il]-hexadecanamida (C16-ceramida 1-fosfato) (86)<sup>54,55</sup>**



Se siguió el método general descrito para la síntesis de **85** empleando cloruro de palmitoilo. Sólido blanco. Rendimiento: 82%.

TLC (SiO<sub>2</sub>, *n*BuOH/MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH 8:1:1:1): *R<sub>f</sub>* = 0.40

**6.7.1.1.3 (1'S,2'R,3'E)-N-[2'-Hidroxi-1'-(fosfonooximetil)heptadec-3'-en-1'-il]-propanamida (C3-ceramida 1-fosfato) (87)**



Se siguió el método general utilizando propionato de *N*-hidroxisuccinimida (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) y 4-dimetilaminopiridina (0.2 eq). Sólido blanco. Rendimiento: 86%.

TLC (SiO<sub>2</sub>, *n*BuOH/MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH 8:1:1:1): *R<sub>f</sub>* = 0.20.

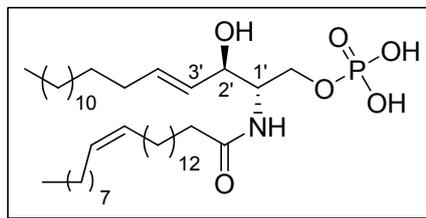
<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 0.94 (t, *J* = 6.8 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.13 (t, *J* = 7.6 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.27 a 1.40 (m, 22 H), 2.04 (c, *J* = 7.1 Hz, 2 H, H-5'), 2.22 (c, *J* = 7.6 Hz, 2 H, COCH<sub>2</sub>), 3.90 a 3.95 (m, 2 H), 4.10 a 4.24 (m, 2 H), 5.48 (dd, *J* = 15.2, 7.6 Hz, 1 H, H-3'), 5.72 (dt, *J* = 15.2, 6.7 Hz, 1 H, H-4') ppm.

<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 10.9, 14.8, 24.1, 30.7, 30.8, 30.9, 31.0, 31.1, 31.2, 33.5, 33.8, 34.6, 55.9 (C-1'), 65.5 (OCH<sub>2</sub>), 73.0 (C-2'), 131.5 (CH=C), 135.1 (CH=C), 177.1 (C=O) ppm.

<sup>31</sup>P-RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 2.77 ppm.

**MS-HR** (peak matching): calculado para  $C_{21}H_{42}NO_6P+Na$  458.2642; encontrado 458.2643.

**6.7.1.1.4 (1'S,2'R,3'E,15Z)-N-[2'-Hidroxi-1'-(fosfonooximetil)heptadec-3'-en-1'-il]-tetracos-15-enamida (C24:1-ceramida 1-fosfato) (88)**



Se siguió el método general descrito para **85** empleando cloruro de nervonoilo (preparado previamente por reacción de ácido nervónico (Sigma-Aldrich) con cloruro de oxalilo a temperatura ambiente durante 5 h y evaporación a sequedad en alto vacío). Sólido blanco. Rendimiento: 74 %.

**TLC** ( $SiO_2$ ,  $nBuOH/MeOH/H_2O/NH_4OH$  8:1:1:1):  $R_f = 0.45$ .

**$^1H$ -RMN** (400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  0.90 (t,  $J = 6.8$  Hz, 6 H,  $2 \times CH_3$ ), 1.25 a 1.40 (m, 54 H), 1.54 a 1.63 (m, 2 H), 1.98 a 2.07 (m, 6 H), 2.13 a 2.24 (m, 2 H,  $COCH_2$ ), 3.84 a 3.91 (m, 2 H), 4.10 a 4.23 (m, 2 H), 5.30 a 5.39 (m, 2 H, (Z)- $CH=CH$ ), 5.45 (dd,  $J = 15.2, 7.6$  Hz, 1 H, H-3'), 5.70 (dt,  $J = 15.2, 6.7$  Hz, 1 H, H-4') ppm.

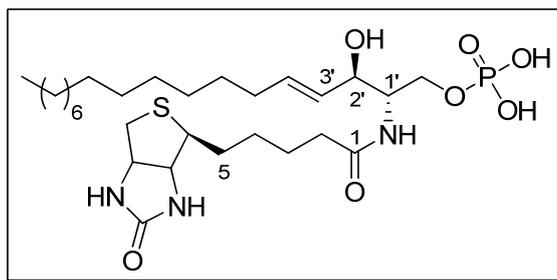
**$^{13}C$ -RMN** (100 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  14.9, 24.1, 27.5, 28.5, 30.7, 30.8, 30.9, 31.0, 31.1, 31.2, 31.3, 33.4, 33.5, 33.9, 37.8, 55.9 (C-1'), 65.5 ( $OCH_2$ ), 72.8 (C-2'), 131.3 ( $CH=$ ), 131.6 ( $CH=$ ), 135.1 ( $CH=$ ), 176.3 (C=O) ppm.

**$^{31}P$ -RMN** (400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  3.11 ppm.

**MS-ESI**: 726 [M-H]<sup>-</sup>.

**MS-HR** (peak matching): calculado para  $C_{42}H_{82}NO_6P+H$  728.5953; encontrado 728.5951.

**6.7.1.1.5 (1'S,2'R,3'E)-N-[2'-Hidroxil-1'-(fosfonooximetil)heptadec-3'-en-1'-il]-biotinamida (biotina-ceramida 1-fosfato) (89)**



Se siguió el método general descrito para **85** empleando el cloruro del ácido carboxílico biotina (preparado previamente por reacción de biotina con cloruro de oxalilo a temperatura ambiente durante 5 h, seguido de evaporación a sequedad en alto vacío). Sólido blanco. Rendimiento: 53 %.

**TLC** (SiO<sub>2</sub>, *n*BuOH/MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH 8:1:1:1): *R<sub>f</sub>* = 0.30.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.23 a 1.78 (m, 28 H), 2.03 (c, *J* = 7 Hz, 2 H, H-5'), 2.22 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, H-2), 2.70 (d, *J* = 12.6 Hz, 1 H), 2.92 (dd, *J* = 5.0, 12.6 Hz, 1 H), 3.17 a 3.25 (m, 1 H), 3.91 a 4.00 (m, 2 H), 4.07 a 4.27 (m, 2 H), 4.28 a 4.34 (m, 1 H), 4.46 a 4.52 (m, 1 H), 5.47 (dd, *J* = 15.2, 7.5 Hz, 1 H, H-3'), 5.70 (dt, *J* = 15.0, 6.7 Hz, 1 H, H-4') ppm.

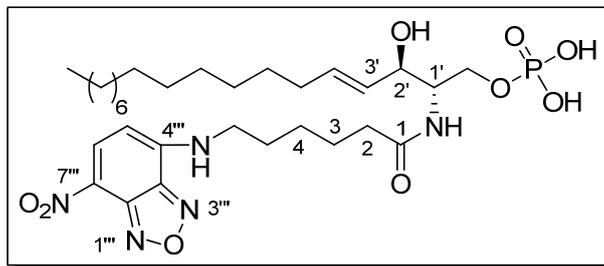
**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 13.1, 22.3, 25.4, 28.0, 28.4, 28.9, 29.0, 29.3, 29.4, 31.7, 32.0, 35.5, 39.7, 54.0, 55.5, 60.2, 61.9, 64.1 (OCH<sub>2</sub>), 71.1 (CHOH), 129.7 (CH=), 133.4 (CH=), 174.3 (C=O) ppm. C=O de biotina no observado.

**<sup>31</sup>P-RMN** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 3.11 ppm.

**MS-ESI**:- 604 [M-H]<sup>-</sup>

**MS-HR** (peak matching): calculado para C<sub>28</sub>H<sub>52</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>PS+Na 628.3156; encontrado 628.3157.

**6.7.1.1.6 (1'S,2'R,3'E)-N-[2'-Hidroxil-1'-(fosfonooximetil)heptadec-3'-en-1'-il]-6-[(7'''-nitro-2''',1''',3'''-benzoxadiazol-4'''-il)amino]hexanamida (NBD-C6-ceramida 1-fosfato) (90)**



Se siguió el método general utilizando NBD-hexanoato de *N*-hidroxisuccinimida y 4-dimetilaminopiridina (0.2 eq). Sólido amarillento. Rendimiento: 76 %.

**TLC** (SiO<sub>2</sub>, *n*BuOH/MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH 8:1:1:1): *R*<sub>f</sub> = 0.30.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.20 a 1.38 (m, 22 H), 1.48 (q, *J* = 7.6 Hz, 2 H), 1.68 (q, *J* = 7.6 Hz, 2 H), 1.79 (q, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 2.00 (c, *J* = 7.0 Hz, 2 H, H-5'), 2.20-2.28 (m, 2 H, H-2), 3.48 a 3.57 (m, 2 H, H-1'), 3.97 a 4.18 (m, 4 H), 5.45 (dd, *J* = 15.2, 7.3 Hz, 1 H, H-3'), 5.70 (dt, *J* = 15.3, 6.7 Hz, 1 H, H-4'), 6.37 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, HAr), 8.53 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, HAr) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 14.4, 23.7, 26.6, 27.6, 28.8, 30.3, 30.4, 30.5, 30.7, 30.8, 33.0, 33.4, 36.7, 44.2, 55.0, 66.2, 72.6 (H-2'), 99.4 (CAr), 131.0 (CH=), 135.0 (CH=), 138.4 (CAr), 174.7 (C=O) ppm.

**<sup>31</sup>P-RMN** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 2.77 ppm.

**MS-ESI**:- 654 [M-H].

**MS-HR** (peak matching): calculado para C<sub>31</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>P-H 654.3273; encontrado 654.3279.

## 6.8 Ensayos biológicos

### 6.8.1 Actividad leishmanicida de los análogos de MT<sup>56</sup>

#### 6.8.1.1 Recolección de parásitos

Se recogen parásitos de cultivos en fase exponencial tardía de crecimiento (aproximadamente  $10^7$  parásitos/ml), en tubos de 50 mL de capacidad, y se centrifugan a 2000 rpm en una centrífuga clínica refrigerada Beckman GPR, 10 min, 4 °C. A continuación se lavan dos veces con 30 mL de disolución salina Hanks (136.8 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 4.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.1 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH = 7.2) suplementada con 1% de glucosa (Hanks + Glc) en las mismas condiciones de centrifugación y el sedimento se vuelve a resuspender en 1 ml de Hanks + Glc. Tras los lavados, se lleva a cabo un recuento mediante una cámara Neubauer. Finalmente, las células se resuspenden en el medio y a la densidad correspondiente de cada ensayo.

#### 6.8.1.2 Viabilidad de los parásitos mediante reducción de MTT

Para evaluar la pérdida de viabilidad de los parásitos, tanto a corto plazo (4 h) como en inhibición de la proliferación (48/72h), se utiliza como parámetro la inhibición de la reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán. En ambos ensayos, los parásitos se resuspenden en Hanks + Glc a una densidad de  $2 \times 10^7$  células ml<sup>-1</sup>. En los ensayos a corto plazo, se incuban alícuotas de 120 µL de dicha suspensión, junto con el compuesto correspondiente, a las concentraciones deseadas durante 4 h. Seguidamente se lavan 100 µL de la suspensión con 10 volúmenes de Hanks + Glc por centrifugación, y se resuspenden en 100 µL de una disolución de 0.5 mg ml<sup>-1</sup> MTT en Hanks + Glc. Tras 2 h de incubación en oscuridad a 25 °C, se solubiliza el formazán resultante de la reducción de MTT por los parásitos, mediante adición de 100 µl de SDS al 10%. Tras incubación a 25 °C en oscuridad (2 h) se valora espectrofotométricamente la absorbancia a 600 nm en un lector de placas ELISA (BioRad Mod. 450).

Para los ensayos de inhibición de la proliferación de los parásitos tras su incubación con el compuesto correspondiente, se añaden 10 µl de la suspensión a una placa de microcultivo de 96 pocillos, con 200 µl/pocillo de medio de crecimiento. Los

---

<sup>56</sup> Chicharro, C., Granata, C., Lozano, R., Andreu, D., Rivas, L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2441.

parásitos se dejan proliferar durante 48/72 h, tras las cuales se añadieron al medio 0.5 mg ml<sup>-1</sup> de MTT en Hanks + Glc. El proceso de solubilización del formazán y su posterior valoración es idéntico al descrito en el párrafo anterior.

### 6.8.1.3 Marcado de *Leishmania* mediante análogos fluorescentes de Miltefosina

Se incubó una suspensión de parásitos ( $2 \times 10^7$  parásitos/ml) junto al análogo fluorescente correspondiente (7.5 μM) durante 4 h a 26 °C. Los parásitos se lavaron tres veces con PBS + 10 mg mL<sup>-1</sup> BSA para eliminar las uniones inespecíficas, se resuspendieron en 25 μL del mismo medio y se transfirieron sobre un portaobjetos para fluorescencia (Cell-Line, Portsmouth, NH). Las muestras se observaron y fotografiaron en un microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS-UV (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) con entorno de excitación ultravioleta y visible ( $\lambda_{EX} = 351$  nm,  $\lambda_{EM} = 460$  nm para los análogos fenilpoliéricos, y  $\lambda_{EX} = 465-495$  nm,  $\lambda_{EM} = 515-550$  nm para los análogos con grupo BODIPY).



## 7. Referencias y Notas



## 7 REFERENCIAS Y NOTAS

### 1. Introducción

1. Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. en *Springer Series on Fluorescence*, **2008**, 4, 3-20. Springer-Verlag, Berlin.
2. Tinnenfeld, P., Sauer, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2642-2671.
3. Schmidt, R., Wurm, C. A., Jakobs, S., Engelhardt, J., Egner, A., Hell, S. W. *Nature Meth.* **2008**, 6, 539-544.
4. Yuste, R. *Nature Meth.* **2005**, 2, 902-904. b) Lichman, J. W., Conchello, J.-A. *Nature Meth.* **2005**, 2, 910-919.
5. Giepmans, B. N. G., Andams, S. R., Ellisman, M. H., Tsien, R. Y. *Science* **2006**, 312, 217-224.
6. Coley, H. M., Amos, W. B., Twentyman, P.R., Workman, P. *Br. J. Cancer* **1993**, 67, 1316-1323.
7. McGrath, J. C., Arribas, S., Daly, C. *TiPS* **1996**, 17, 393-399.

### 2. Antecedentes

1. McGrath, J. C., Arribas, S., Daly, C. J. *TiPS*. **1996**, 17, 393-399.
2. McGrath, J. C., Daly, C. J. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, 139, 187-189.
3. Abal, M., Souto, A. A., Amat-Guerri, F., Acuña, A. U., Andreu, J. M., Barasoain, I. *Cell Motil. Cytoskel.* **2001**, 49, 1-5.
4. Lillo, M. P., Cañadas, O., Dale, R. E., Acuña, A. U. *Biochemistry* **2002**, 41, 12436-12449.
5. Coley, H. M., Amos, W. B., Twentyman, P. R., Workman, P. *Br. J. Cancer* **1993**, 1316-1323.
6. Lakowicz, J. R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Biochemical Applications*, Plenum Press, Nueva York, **1991**. Vol. 3.
7. Dewey, T. J. *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, Nueva York, **1991**.
8. Valeur, B., Brochon, J.-C. *New Trends in Fluorescence Spectroscopy. Applications to Chemical and Life Sciences*, Springer, Berlin, **2001**.
9. Stewart, M. L., Krishna, S., Burchmore, R. J., Brun, R., de Koning, H. P., Boykin, D. W., Tidwell, R. R., Hall, J. E., Barrett, M. P. *Lancet* **2005**, 366, 486-487.
10. Kruszewski, S., Burke, T. G. *SPIE-Proc. Internat. Soc. Opt. Eng.* **2003**, 5064, 75-83.
11. Gryczynski, I., Gryczynski, Z., Lakowicz, J. R., Yang, D., Burke, T. G. *Photochem. Photobiol.* **1999**, 69, 421-428.
12. Haugland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes Inc., Oregon, **2002**.
13. Newton, B. A. *J. Gen. Microbiol.* **1955**, 12, 226-236.

14. Buku, A., Price, J. A., Mendlowitz, M., Masur, S. *Peptides* **2001**, *22*, 1993-1998.
15. Jenkinson, K. M., Morgan, J. M., Furness, J. B., Southwell, B. R. *Histochem. Cell Biol.* **1999**, *112*, 233-246.
16. Fabry, M., Cabrele, C., Hocker, H., Beck-Sickingher, A. G. *Peptides* **2000**, *21*, 1885-1893.
17. Von Bohlen, Halbacht, O., Albrecht, H. D. *Neuroendocrinology* **2000**, *72*, 218-223.
18. Tran, D., Durroux, T., Stelly, N., Seyer, R., Tordjmann, T., Combettes, L., Claret, M. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47*, 401-410.
19. McGrath, J. C., Mackenzie, J. F., Daly, C. J. *J. Auton. Pharmacol.* **1999**, *19*, 303-310.
20. Mackenzie, J. F., Daly, C. J., Pediani, J. D., McGrath, J. C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *294*, 434-443.
21. Hartwig, J. F., Pil, P. M., Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8292-8293.
22. Susten, S. S., Kempton, R. J., Black, A. M., Freisheim, J. H. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 1957-1962.
23. Stearns, M. E., Jenkins, D. P., Tew, K. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1985**, *82*, 8483-8487.
24. Suffness, M. *Taxol, Science and Applications*, CRC Press, Boca Raton, Florida, **1995**.
25. Geog, G. I., Chen, T. T., Ojima, I., Vyas, D. M. *Taxane Anticancer Agents*, ACS Symposium Series, San Diego, California, **1994**.
26. Manfredi, J. J., Horwitz, S. B. *Pharmacol. Ther.* **1984**, *25*, 83-125.
27. Diaz, F., Andreu, J. M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2747-2755.
28. Souto, A. A., Acuña, A. U., Andreu, J. M., Barasoain, I., Abal, M., Amat-Guerri, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 2710-2712.
29. Lillo, M. P., Canadas, O., Dale, R. E., Acuña, A. U. *Biochemistry* **2002**, *41*, 12436-12449.
30. Nussbaumer, P., Etmayer, P., Peters, C., Rosenbeiger, D., Hogenauer, K. *Chem. Commun.* **2005**, 5086-5087.
31. Etmayer, P., Baumruker, T., Guerini, D., Mechtcheriakova, D., Nussbaumer, P., Streiff, M. B., Billich, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 84-87.
32. Morales, A., Fernandez-Checa, J. C. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 371-382.
33. Etmayer, P., Billich, A., Baumruker, T., Mechtcheriakova, D., Schmid, H., Nussbaumer, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1555-1558.
34. Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lehninger, Principles of Biochemistry*, Worth Publisher, New York, **2000**.
35. Gulik, A., Luzzati, V., De Rosa, M., Gambacorta, A. *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 131-149.
36. Runge, M. H., Andreesen, R., Pfliederer, A., Munder, P. G. *J. Natl. Cancer Inst.* **1980**, *64*, 1301-1306.
37. Hirt, R., Berchtold, R. *Pharmac. Acta Helv.* **1958**, *33*, 349-354.
38. Berdel, W. E. *Br. J. Cancer* **1991**, *64*, 208-211.
39. Brachwitz, H., Vollgraf, C. *Pharm & Therapeut.* **1995**, *66*, 39-82.
40. Vink, S. R., van Blitterswijk, W. J., Schellens, J. H., Verheij, M. *Cancer Treat. Rev.* **2007**, *33*, 191-202.

41. Clive, S., Gardiner, J., Leonard, R. C. *Cancer Chem. Pharm.* **1999**, *44 Suppl.* S29-S30.
42. Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., Saravia, N. G. *Lancet* **2005**, *366*, 1561-1577.
43. Desjeux, P. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *27*, 305-318.
44. Alvar, J., Croft, S., Olliaro, P. *Advan. Parasitol.* **2006**, *61*, 223-274.
45. Handman, E. *Adv. Parasitol.* **1999**, *44*, 1-39.
46. Pan, A. A., Duboise, S. M., Eperon, S., Rivas, L., Hodgkinson, V., Traub-Cseko, Y., McMahon-Pratt, D. J. *Eukaryot. Microbiol.* **1993**, *40*, 213.
47. Alexander, B., Maroli, M. *Med. Vet. Entomol.* **2003**, *17*, 1-18.
48. Khamesipour, A., Rafati, S., Davoudi, N., Maboudi, F., Modabber, F. *Indian J. Med. Res.* **2006**, *123*, 423-438.
49. Croft, S. L., Neal, R. A.; Pendergast, W., Chan, J. M. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 2633-2336.
50. Croft, S. L., Barrett, M. P., Urbina, J. A. *Trends Parasitol.* **2005**, *21*, 508-512.
51. Sindermann, H., Engel, J. T. *Roy. Soc. Trop. Med. H.* **2006**, *100 Suppl 1*, S17-S20.
52. Soto, J., Soto, P. *Expert Rev. Antiinfect. Ther.* **2006**, *4*, 177-185.
53. Sundar, S., Rai, M. *Expert Opin. Pharmacother.* **2005**, *6*, 2821-2829.
54. Loiseau, P. M., Bories, C. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 539-550.
55. Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C., Breard, J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 852-859.
56. Verma, N. K., Dey, C. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3010-3015.
57. Urbina, J. A. *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.* **2006**, *100 S*, 59-516.
58. Santa-Rita, R. M., Henriques-Pons, A., Barbosa, H. S., de Castro, S. L. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 704-710.
59. Pérez-Victoria, F. J., Sánchez-Cañete, M. P., Seifert, K., Croft, S. L., Sundar, S., Castanys, S., Gamarro, F. *Drug Resist. Update* **2006**, *9*, 26-39.
60. Pérez-Victoria, F. J., Gamarro, F., Ouellette, M., Castanys, S. *J. Biol. Chem* **2003**, *278*, 49965-49971.
61. Rosario-Jansen, T., Jiang, R.-T., Tsai, M.-D. *Biochemistry* **1988**, *27*, 4619-4624.
62. Mollinedo, F., Martínez-Dalmau, R., Modolell, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *192*, 603-609.
63. Kny, G. *Tesis Doctoral*, Universidad de Freiburg, **1969**.
64. Tsushima, S., Yoshioka, Y., Tanida, S., Nomura, H., Nojima, S., Hozumi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 3260-3270.
65. Hirth, G., Barner, R. *Helv. Chim. Acta* **1982**, 1059-1084.
66. Rampy, M. A., Pinchuk, A. N., Weichert, J. P., Skinner, R. W., Fisher, S. J., Wahl, R. L., Gross, M. D., Counsell, R. E. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3156-3162.
67. Bittman, R., Qin, D., Wong, D.-A., Tigyi, G., Samadder, P., Arthur, G. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4277-4282.
68. Mollinedo, F., Gajate, C., Modolell, M. *Mundo Científico* **1998**, *186*, 32-39.

69. Diomede, L., Colotta, F., Piovani, B., Re, F., Modest, E. J., Salmona, M. *Int. J. Cancer* **1993**, *53*, 124.
70. Mollinedo, F., Martinez-Dalmau, R., Modolell, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *192*, 603-609.
71. Modolell, M., Andressen, R., Pahlke, W., Brugger, U., Munder, P. G. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 4681.
72. Mollinedo, F., Gajate, C., Martin-Santamaria, S., Gago, F. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3163-3184.
73. Nicolaou, A., Kokotos, G. (Eds.), *Bioactive Lipids*, The Oily Press Lipid Library, Bridgewater, UK, **2004**, vol. 17.
74. Thirsk, C., Whiting, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **2002**, 999-1023.
75. (a) *Leukotrienes and Lipoxygenase*, Rockack, J., ed., Elsevier, Nueva York, **1989**; (b) Green, R. H., Lambeth, P. F. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 1687; (c) Evans, J., Zamboni, R., Nathaniel, D., Leveille C., Ford-Hutchinson, A. W. *Prostaglandins* **1985**, *30*, 981; (d) Simmonds, R. J. *Chemistry of Biomolecules. An Introduction*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1992**, cap. 7.
76. *Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids*, Dawson, M. L., Okamura, W. H., ed., CRC Press, Boca Raton, FL, **1990**.
77. Semlyen, J. A. *Large Ring Molecules*, Wiley, Chichester, **1996**.
78. Maryanoff, B. E., Reitz, A. B. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863.
79. Yadav, J. S., Barma, D. K. Dutta, D. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 143.
80. Pattenden, G., Robson, D. C. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 7477-7483.
81. Kelly, S. E. En *Comprehensive Organic Synthesis*, Trost, B. M. y Fleming, I., ed., Pergamon, Oxford, 1991, vol. 1, 729-817.
82. Nicolaou, K. C., Sorensen, E. J. *Classics in Total Synthesis: Targets, Strategies, Methods*, Wiley-VCH, **1996**, p. 24.
83. Espinet, P., Echavarren, A. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4704-4734.
84. Stille, J. K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 508-524.
85. Panek, J. S., Masse, C. E. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8290.
86. Lopez, S., Montenegro, J., Saa, C. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9572-9581.
87. (a) Suzuki, A., Miyaura, N. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457; (b) Suzuki, A. en *Metal-catalyzed Cross-coupling Reactions*, Diederich, F., Stang, P. J., eds., Wiley VCH, Nueva York, 1998, p. 49.
88. Nicolaou, K. C., Nold, A. L., Milburn, R. R., Schindler, C. S., Cole, K. P. Yamaguchi, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1760-1768.
89. Knowles, J. P., Whiting, A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 31-44.
90. Lightfoot, A. P., Twiddle, S. J. R., Whiting, A. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3167-3172.
91. Chinchilla, R., Nájera, C. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 874-922.
92. (a) Casser, L. *J. Organomet. Chem.* **1975**, *93*, 253-258; (b) Dick, H. A., Heck, R. F. *J. Organomet. Chem.* **1975**, *93*, 259-263.

93. Sonogashira, K., Tohda, Y., Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467.
94. Boland, W., Pantke, S. *J. Prakt. Chem.* **1994**, *336*, 714-715.
95. Lindlar, H., Dubuis, R. *Org. Synth.* **1973**, *5*.
96. (a) Quesada, E., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2095-2097; (b) Quesada, E., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1308-1318.
97. Lipshutz, B. H., Lindsley, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4555.
98. Lipshutz, B. H., Ullman, B., Lindsley, C., Pecchi, S., Buzard, D. J., Dickson, D. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6092.
99. Coleman, R. S., Walczak, M. C. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2289-2291.
100. Lee, S. J., Gray, K. C., Paek, J. S., Burke, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 466-468.
101. Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H., Tsien, R. Y. *Science* **2006**, *312*, 217-224.
102. Navratil, M., Mabbott, G. A., Arriaga, E. A. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4006-4020.
103. Yeagle, P. L. *The structure of biological membranes*, CRC Press, New York, **1992**.
104. Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lehninger, Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, Nueva York, **2000**.
105. Sklar, L. A., Hudson, B., Simoni, R. D. *Biochemistry* **1977**, *16*, 819-828.
106. Hudson, B. S., Cavalier, S., en *Spectroscopic Membrane Probes*, Loew, L. M. Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, EEUU, **1988**, *1*, 43-62.
107. (a) Castanho, M., Prieto, M. E., Acuña, A. U. *Biochim. Biophys. Acta.* **1996**, *1279*, 164-168. b) Mateo, C. R., Acuña, A. U., Brochon, J. C. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 978-987.
108. Souto, A. A., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5907-5910.
109. Mateo, C. R., Souto, A. A., Amat-Guerri, F., Acuña, A. U. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2177-2191.
110. Kuerschner, L., Ejsing, C. S., Ekroos, K., Shevchenko, A., Anderson, K. I., Thiele, C. *Nat. Methods* **2004**, *2*, 39-45.
111. Quesada, E., Delgado, J., Hornillos, V., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2285-2295.
112. (a) Dale, R. E. *Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology*, NATO ASI, serie A 69, Plenum Press, Nueva York, **1988**. b) Shinitzky, M., Barenholz, Y. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 2652-2657. c) Lackowicz, J. R., Prendergast, F. G., Hogen, D. *Biochemistry* **1979**, *18*, 508-519. d) Engel, L. W., Prendergast, F. G. *Biochemistry* **1981**, *20*, 7338-7345.
113. Para algunas aplicaciones, véase: a) Pap, E. H., Horst, J. J., van Hoek, A., Visser, A. J. W. *G. Biophys. Chem.* **1994**, *48*, 337-351. b) Lentz, B. R. *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 99-116.
114. Cundall, R. B., Johnson, Y., Jones, M. W., Thomas, E. W., Munro, H. Y. *Chem. Phys. Lett.* **1979**, *64*, 39-42.
115. Prendergast, F. G., Haugland, R. P., Callahand, P. J. *Biochemistry*, **1981**, *20*, 7333-7338.

116. Morgan, C. G., Thomas, E. W., Moras, T. S., Yiannis, P. Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *692*, 196-201.
117. (a) Allen, M. T., Miola, L., Whitten, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3198-3206. b) Mateo, C. R., Lillo, M. P., Brochon, J. C., Martínez-Ripoll, M., Sanz-Aparicio, J., Acuña, A. U. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 3486-3491.
118. Parente, R. A., Lentz, B. R. *Biochemistry* **1985**, *24*, 6178-6185.
119. Drew, J., Letellier, M., Morand, P., Szabo, A. G. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4047-4052.
120. Quesada, E., Delgado, J., Gajate, C., Mollinedo, F., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5333-5335.
121. Saugar, J. M., Delgado, J., Hornillos, V., Luque-Ortega, J. R., Amat-Guerri, F., Acuña, A. U., Rivas, L. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5994-6003.
122. El titular de la presente Memoria de Tesis Doctoral colaboró activamente en el desarrollo del trabajo experimental de estas síntesis.
123. Treibs, A., Kreuzer, F. H. *Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718*, 208-223.
124. Shah, M., Thangraj, K., Soong, M. L., Wolford, L., Boyer, J. H., Politzer, I. R., Pavlopoulos, T. G. *Heteroatom Chem.* **1990**, *1*, 389-399.
125. Molecular Probes; <http://probes.invitrogen.com>.
126. Dixon, H. B. F., Cornish-Bowden, A., Liebecq, C., Loening, K. L., Moss, G. P., Reedijk, J., Velick, S. F., Venetianer, P., Vliegthart, J. F. G. *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 779.
127. Van, Koeveringe, J. A., Lugtenburg, J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1977**, *96*, 55.
128. Wael, E. V. D., Pardoën, J. A., Koeveringe, J. A. V., Lugtenburg, J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* **1977**, *96*, 306.
129. Boyer, J. H., Haag, A. M., Sathyamoorthi, G., Soong, M. L., Thangaraj, K., Pavlopoulos, T. G. *Heteroatom Chem.* **1993**, *4*, 39.
130. Li, Z., Mintzer, E., Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1718.
131. Wagner, R. W., Lindsey, J. S. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1373-1380
132. Baruah, M., Qin, W., Basaric, N., De Borggraeve, W. M., Boens, N. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4152-4157.
133. Arsenault, G. P., Bullock, E., MacDonald, S. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4384-4396.
134. Al-Sheikh-Ali, A., Cameron, K. S., Cameron, T. S., Robertson, K. N., Thompson, A. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4773.
135. Wan, C.-W., Burghart, A., Chen, J., Bergstroem, F., Johansson, L. B.-A., Wolford, M. F., Kim, T. G., Topp, M. R., Hochstrasser, R., Burgess, K. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4430-4441.
136. Meltola, N. J., Wahlroos, R., Soini, A. E. *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 635-647.
137. García-Moreno, I., Amat-Guerri, F., Lira, M., Costela, A., Infantes, L., Sastre, R., López Arbeloa, F., Bañuelos, J., López Arbeloa, I. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 3088-3098.
138. Wood, T. E., Thompson, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1831-1861.
139. Haugland, R. P., Kang, H. C. *U.S. Patent* 4,774,339, **1988**.
140. Yogo, T., Urano, Y., Ishitsuka, Y., Maniwa, F., Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12162-12163.

141. Rohand, T., Baruah, M., Qin, W., Boens, N., Dehaen, W. *Chem. Commun.* **2006**, 266.
142. Baruah, M., Qin, W., Vallee, R. A. L., Beljonne, D., Rohand, T., Dehaen, W., Boens, N. *Org. Lett.* **2005**, 7, 4377-4380.
143. Amat-Guerri, F., Liras, M., Carrascoso, M. L., Sastre, R. *Photochem. Photobiol.* **2003**, 77, 577-584.
144. Sathyamoorthi, G., Boyer, J. H., Allik, T. H., Chandra, S. *Heteroatom Chem.* **1994**, 5, 403.
145. Rurack, K., Kollmannsberger, M., Daub, J. *New J. Chem.* **2001**, 25, 289-292.
146. Coskun, A., Akkaya, E. U. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 4947-4949.
147. Dost, Z., Atilgan, S., Akkaya, E. U. *Tetrahedron* **2006**, 62, 8484-8488.
148. Yu, Y.-H., Descalzo, A. B., Shen, Z., Röhr, H., Liu, Q., Wang, Y.-W., Spieles, M., Rurack, Y.-Z., Li, K., You, X.-Z. *Chem. Asian J.* **2006**, 1, 176-187.
149. Baruah, M., Qin, W., Flors, C., Hofkens, J., Vallee, R. A. L., Beljonne, D., Van der Auweraer, M., De Borggraeve, W. M., Boens, N. *J. Phys. Chem. A.* **2006**, 110, 5998.
150. (a) Chen, T., Boyer, J. H., Trudell, M. L. *Heteroatom Chem.* **1997**, 8, 51-54. (b) Sathyamoorthi, G., Wolford, L. T., Haag, A. M., Boyer, J. H. *Heteroatom Chem.* **1994**, 5, 245.
151. Rohand, T., Qin, W., Boens, N., Dehaen, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4658.
152. Qin, W., Rohand, T., Dehaen, W., Clifford, J. N., Driesen, K., Beljonne, D., Van Averbeke, B., Van der Auweraer, M., Boens, N. *J. Phys. Chem. A.* **2007**, 111, 8588-8594.
153. Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004.
154. Peña-Cabrera, E., Aguilar-Aguilar, A., Gonzalez-Dominguez, M., Lager, E., Zamudio-Vazquez, R., Godoy-Vargas, J., Villanueva-García, F. *Org. Lett.* **2007** 9, 3985-3988.
155. Yang, H., Hao, L., Wittenberg, R., Egi, M., Huang, W., Liebeskind, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1132-1140.
156. Murase, S., Tominaga, T., Kohama, A. *Eur. Patent* 1253151a, **2002**.
157. Goze, C., Ulrich, G., Mallon, L. J., Allen, B. D., Harriman, A., Ziessel, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10231-10239.
158. Goze, C., Ulrich, G., Ziessel, R. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 313-322.
159. Goze, C., Ulrich, G., Ziessel, R. *Org. Lett.* **2006**, 8, 4445-4448.
160. Hiroyuki, S., Yojiro, K., Tsutayoshi, M., Keisuke, T. *Japan Patent* 11043491, **1999**.
161. Harriman, A., Izzet, G., Ziessel, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10868-10875.
162. Morgan, L. R., Boyer, J. H. *US Patent* 5446157, **1993**.
163. Carreira, E., Zhao, W. *PCT Patent* WO 058448, **2006**.
164. Killoran, J., O'Shea, D. F. *Chem. Commun.* **2006**, 1503.
165. Zhao, W., Carreira, E. M. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 7254-7264.
166. Loudet, A., Burgess, K. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4891-4932.
167. Knorr, L., Lange, K. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, 35, 2998.
168. (a) Gilchrist, T. L. *Heterocyclic Chemistry*, 3<sup>a</sup>. ed.; Longman Scientific & Technical: Essex, **1997**. (b) Eicher, T., Hauptmann, S. *The Chemistry of Heterocycles*, 2<sup>a</sup>. ed.; Wiley-VCH: Weinheim, **2003**.

169. Patterson, J. M. *Synthesis* **1976**, 281.
170. Clezy, P. S., Fookes, C. J. R., Liepa, A. J. *Aust. J. Chem.* **1972**, *25*, 1979-1990.
171. Yadav, J. S., Reddy, B. V. S., Kondaji, G., Srinivasa Rao, R., Pravee Kumar, S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8133-8135.
172. Wallace, D. M., Leung, S. H., Senge, M. O., Smith, K. M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7245-7257.
173. Schmuck, C. *Chem. Commun.* **1999**, 843-844.
174. Schmuck, C. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2397-2403.
175. Schmuck, C., Graupner, S. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1295-1298.
176. Martyn, D. C., Abell, A. D. *Aust. J. Chem.* **2004**, *57*, 1073-1077.
177. Clezy, P. S., Fookes, C. J. R., Prashar, J. K. *Aust. J. Chem.* **1989**, *42*, 766.
178. Woodward, R. B., Ayer, W. A., Beaton, J. M., Bickelhaupt, F., Bonnett, R., Buchschacher, P., Closs, G. L., Dutler, H., Hannah, J., Hauck, F. P., Ito, S., Langemann, A., Le Goff, E., Leimgruber, W., Lwowski, W., Sauer, J., Valenta, Z., Volz, H. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7599-7659.
179. (a) Harrison, P. J., Sheng, Z.-C., Fookes, C. J. R., Battersby, A. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1987**, 1667-1678. (b) Bauer, V. J., Clive, D. L. J., Dolphin, D., Paine, J. B. III, Harris, F. L., King, M. M., Loder, J., Chien Wang, S.-W., Woodward, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6429-6436.
180. Paine, J. B. III., Dolphin, D. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2787-2795.
181. Thyraann, T., Lightner, D. A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4345-4348.
182. Mackman, R. L., Micklefield, J., Block, M. H.; Leeper, F. J., Battersby, A. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 2111.
183. Schmuck, C., Rupprecht, D., Urban, C., Walden, N. *Synthesis* **2006**, 89.
184. Algunas síntesis recientes de pirroles polisustituidos: (a) Su, S., Porco, J. A., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7744. (b) Shindo, M., Yoshimura, Y., Hayashi, M., Soejima, H., Yoshikawa, T., Matsumoto, K., Shishido, K. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1963. (c) Rodríguez Rivero, M., Buchwald, S. L. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 973. (d) Cyr, D. J. S., Martin, N., Arndtsen, B. A. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 449. (e) Binder, J. T., Kirsch, S. F. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2151. (f) Gorin, D. J., Davis, N. R., Toste, F. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11260. (g) Bharadwaj, A. R., Scheidt, K. A. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2465. (h) Dhawan, R., Arndtsen, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 468. (i) Kelin, A. V., Sromek, A. W., Gevorgyan, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2074. (j) Boger, D. L., Boyce, C. W., Labroli, M. A., Sehon, C. A., Jin, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 54.
185. Richter, J. M. *Indole and Pyrrole Synthesis*. The phill. S. Baran laboratory/group seminars.
186. Schmuck, C., Rupprecht, D. *Synthesis* **2007**, *20*, 3095-3110.
187. Fabiano, E., Golding, B. T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1991**, 3371.
188. Kleinspehn, G. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1546-1548.
189. Paine III, J. B., Dolphin, D. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5598-5604.
190. Xie, M., Lightner, D. A. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 2185.

191. Bullock, E., Johnson, A. W., Markham, E., Shaw, K. B. *J. Chem. Soc.* **1958**, 1430.
192. Harbuck, J. W., Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 853.
193. Arriman, A., Rostron, J. P., Cesario, M., Ulrico, G. Ziessel, R. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 7994-8002.
194. Ulrich, G., Ziessel, R., Arriman, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184.
195. Boldyrev, I. A., Molotkovsky, J. G. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2006**, *32*, 78.
196. Omel'kov, A. V., Pavlova, Y. B., Boldyrev, I. A., Molotkovsky, J. G. *Rus. J. Bioorg. Chem.* **2006**, *33*, 505.
197. Boldyrev, I. A., Zhai, X., Momsen, M. M., Brockman, H. L., Brown, R. E., Molotkovsky, J. G. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 1518-1532.
198. Li, J., Kim, I. H., Roche, E. D., Beeman, D., Lynch, A. S., Ding, C. Z., Ma. *Z. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 794-797.
199. Emmerson, P. J., Archer, S., El-Hamouly, W., Mansour, A., Akil, H., Medzihradsky, F. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *54*, 1315.
200. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596-2599.
201. Verdoes, M., Hillaert, U., Floreaa, B. I., Sae-Henga, M., Risseuwa, M. D. P., Filippova, D. V., van der Marela, G. A., Overkleeft, H. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6169-6171.
202. McCusker, C., Carroll, J. B., Rotello, V. M. *Chem. Comm.* **2005**, 996-1001.
203. Pagano, R. E., Watanabe, R., Wheatley, C., Dominguez, M. *Methods Enzymol.* **2000**, *312*, 523-534.
204. Liu, Y., Bittman, R. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *142*, 58.
205. Li, Z., Mintzer, E., Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1718.
206. Li, Z., Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8376.
207. Peters, C., Billich, A., Ghobrial, M., Hogenauer, K., Ullrich, T., Nussbaumer, P. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 1842-1845.
208. Merrill, A. H., Sullards, C. M., Wang, E., Voss, K. A., Riley, R. T. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*, 283-289.
209. Thudichum, J. L.W. *A treatise on the chemical constitution of the brain*, Londres, 1884.
210. Baumruker, T., Billich, A., Brinkman, V. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2007**, *16*, 283-289.
211. Nussbaumer, P. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 543-551.
212. Liao, J., Tao, J., Lin, G., Liu, D. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4715-4733.
213. Chalfant, C. E., Spiegel, S. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 4605-4612.
214. Baumruker, T., Bornancin, F., Billich, A. *Immunol. Lett.* **2005**, *96*, 175-185.
215. Marcu, A. C., Chalfant, C.E. *Future Lipidol.* **2007** *2*, 75-84.
216. Graf, C., Rovina, P., Tausin, L., Schanzer, A. Bornancin, F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *354*, 309-314.
217. Pettus, B. J., Bielawska, A., Subramanian, P., Wijesinghe, D. S., Maceyka, M., Leslie, C. *C. J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 11320-11326.

218. Byun, H.-S., Erukulla, R. K., Bittmann, R. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6495-6498.
219. Szulc, Z. M., Hannun, Y. A., Bielawska, A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7821-7824.
220. Garner, P., Park, J.M. *Org. Synth.* **1991**, *70*, 18-28
221. Garner P., Park, J. M., Malecki, E. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4395-4398.
222. Nussbaumer, P., Hornillos, V., Ghobrial, M., Ullrich, T. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *151*, 125-128.

#### 4. Resultados y discusión

1. Hilgard, P., Stekar, J., Voegeli, R., Engel, J., Schumacher, W., Eibl, H., Unger, C., Berger, M. R. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1988**, *24*, 1457-1461.
2. Lohmeyer, L., Bittman, R. *Drug Future* **1994**, *19*, 1021-1037.
3. Brachwitz, H., Vollgraf, C. *Pharmacol. Therapeut.* **1995**, *66*, 39-82.
4. Holý, A., Otová, B., Buděšinský, M., Emerson, D., Wiles, M. E. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4462-4467.
5. Croft, S. L., Neal, R. A., Pendergast, W., Chan, J. M. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 2633-2336.
6. Unger, C., Maniera, T., Kaufmann-Kolle, P., Eibl, H. *Drugs Today* **1998**, *34*, 133-140.
7. Avlonitis, N., Lekka, E., Detsi, A., Koufaki, M., Calogeropoulou, T., Scoulica, E., Siapi, E., Kyrikou, I., Mavromoustakos, T., Tsotinis, A., Grdadolnik, S. G., Makriyannis, A. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 755-767.
8. Nössner, G., Kutscher, B., Engel, J., Schumacher, W., Steker, J., Hilgard, P. Patente US 6172050 (2001).
9. Yeagle, P. L. *The structure of biological membranes*, CRC Press, New York, **1992**.
10. Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lehninger, Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, New York, **2000**.
11. Quesada, E., Delgado, J., Gajate, C., Mollinedo, F., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5333-5335.
12. Saugar, J. M., Delgado, J., Hornillos, V., Luque-Ortega, J. R., Amat-Guerri, F., Acuña, A. U., Rivas, L. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5994-6003.
13. Boland, W., Pantke, S. *J. Prakt. Chem.* **1994**, *336*, 714-715.
14. Maryanoff, B. E., Reitz, A. B. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863-927.
15. Villieras, J., Rambaud, M. *Synthesis* **1983**, 300-303.
16. Beck, A., Heissler, D., Duportail, G., *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1459-1472.
17. Bhattacharya, A. K., Thyagarajan, G. *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 415-430.
18. Kimmel, T., Becker, D. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 2494-2496.
19. Hopf, H., Krüger, A. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4378-4385.
20. Journet, M., Cai, D., Dimichele, L. M., Larsen, R. D. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6427-6428.
21. Harris, S. J., Walton, D. R. M. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1037-1042.
22. Hirt, R., Berchtold, R. *Pharm. Acta Helv.* **1958**, *33*, 349-354.

23. Thuong, N. T., Chabrier, P. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1974**, 667-676.
24. Brockeroff, H., Ayengar, N. K. N. *Lipids* **1978**, **14**, 88-89.
25. Huang, Z., Guo, X., Li, W., MacKay, J. A., Szoka, F. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, **128**, 60-61.
26. Magolda, R. L., Johnson, P. R. *Tetrahedron Lett.* **1985**, **26**, 1167-1170.
27. Gadek, T. R. *Tetrahedron Lett.* **1989**, **30**, 915-918.
28. Hansen, W. J., Ramaswamy, M., Wedmid, Y., Baumann, W. J. *Lipids* **1982**, **17**, 453-459.
29. Erukulla, R. K., Byun, H. S., Bittman, R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, **35**, 5783-5784.
30. Technical Support, © Avanti Polar Lipids, Inc. ([www.avantilipids.com/TechnicalSupport.asp](http://www.avantilipids.com/TechnicalSupport.asp)).
31. Kang, E., Kataoka, S., Kato, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, **78**, 1558-1564.
32. Soullez, D., Plé, G., Duhamel, L., Duhamel, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 563-564.
33. Becher, J. *Org. Synth.* **1979**, **59**, 79.
34. Becher, J. *Synthesis* **1980**, 589.
35. Soullez, D., Plé, G., Duhamel, L., Duhamel, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 563-564.
36. Lipshutz, B. H., Ullman, B., Lindsley, C., Pecchi, S., Buzard, D. J., Dickson, D. *J. Org. Chem.* **1998**, **63**, 6092.
37. Murias, M., Handler, N., Erker, T., Pleban, K., Ecker, G., Saico, P., Szekeres, T., Häger, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, **12**, 5571-5578.
38. Lei, Y., Wroblewski, A. D., Golden, J. E., Powel, D. R., Aubé, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, **127**, 4552-4553.
39. Quesada, E., Delgado, J., Hornillos, V., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2285-2295.
40. Navarro, I., Mas, E., Fabriàs, G., Camps, F. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, **5**, 1267-1274.
41. Beck, A., Heissler, D., Duportail, G., *Tetrahedron* **1991**, **47**, 1459-1472.
42. De Luca, L., Giacomelli, G., Taddei, M. *J. Org. Chem.* **2001**, **66**, 2534-2537.
43. Morgan, C. G., Thomas, E. W., Moras, T. S., Yiannis, P. Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, **692**, 196-201.
44. Chinchilla, R., Najera, C. *Chem. Rev.* **2007**, **107**, 874-922.
45. Perchonock, C. D., Uzinskas, I., McCarthy, M. E., Erhard, K.F., Gleason, J. G., Wasserman, M. A., Muccitelli, R. M., DeVan, J. F., Tucker, S.S., Vickery, L. M., Kirchner, T., Weichman, B. M., Mong, S., Scott, M. O., Rosso, G. C., Wu, H. L., Croke, S. T., Newton, J. F. *J. Med. Chem.* **1986**, **29**, 1442-1452.
46. Lee-Dutra, A., Arienti, K. L., Buzard, D. J., Hack, M. D., Khatuya, H., Desai, P. J., Nguyen, S., Thurmond, R. L., Karlsson, L., Edwards, J. P., Breitenbucher, J. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, **16**, 6043-6048.
47. Kohler, B. E., Spangler, C. N., Westerfield, C. J. *J. Chem. Phys.* **1991**, **94**, 908-917.

48. Cundall, R. B., Johnson, I., Jones, M. W., Thomas, E. W., Munro, I. H. *Chem. Phys. Lett.* **1979**, *64*, 39-42.
49. Hudson, B. S., Kohler, B. E., Schulten, K., *Excited States*, Lim, E. C., Ed., Academic Press, Nueva York, **1982**, Vol. 6, pp. 1-95.
50. Reyes Mateo, C., Souto, A. A., Amat-Guerri, F., Acuña, A. U. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2177-2191.
51. Tormo, L., Hornillos, V., Amat-Guerri, F., Acuña, A. U. (*en preparación*).
52. Croft, S. L., Seifert, K., Duchene, M. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *126*, 165-172.
53. Pérez-Victoria, F. J., Castanys, S., Gamarro, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2397-2403.
54. Zilberstein, D., Dwyer, D. M. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 1716-1720.
55. Pérez-Victoria, F. J., Sánchez-Canete, M. P., Seifert, K., Croft, S. L., Sundar, S., Castanys, S., Gamarro, F. *Drug Resist. Update* **2006**, *9*, 26-39.
56. De Castro, S. L., Santa-Rita, R. M., Urbina, J. A., Croft, S. L. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 141-151.
57. Koenig, K., Schneckenburger, H. *J. Fluoresc.* **1994**, *4*, 17-39.
58. Arsenaault, G. P., Bullock, E., MacDonald, S. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4384-4396.
59. Mori, M., Washioka, Y., Urayama, T., Yoshiura, K., Chiba, K., Ban, Y. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4058.
60. Puzicha, G., Shrouf, D. P., Lightner, D. A. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27*, 2117.
61. Liotta, C. L., Berknerin, J. "18-Crown-6", en *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* (Ed: L. Paquette) **2004**, J. Wiley & Sons, New York.
62. Bullock, E., Johnson, A. W., Markham, E., Shaw, K. B. *J. Chem. Soc.* **1958**, 1430.
63. Harbuck, J. W., Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 853.
64. Wan, C., Burghart, A., Chen, J., Bergström, F., Johansson, L. B., Wolford, M. F., Kim, T. G., Topp, M. R., Hochstrasser, R. M., Burgess, K. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4430-4441.
65. Urbina, J. A. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *100S*, 59-516.
66. Mateo, C. R., Acuña, A. U. Brochon, J. C. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 978-987
67. Mackman, R.L., Micklefield, J., Block, M. H., Leepe, F. J., Battersby, A.R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 2111.
68. Boldyrev, I. A., Molotkovsky, J. G. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2006**, *32*, 78.
69. Omel'kov, A. V., Pavlova, Y. B., Boldyrev, I. A., Molotkovsky, J. G. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2006**, *33*, 505.
70. Meltola, N. J., Wahlroos, R., Soini, A. E. *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 635-647.
71. Brachwitz, H., Vollgraf, C. *Pharmacol. Ther.* **1995**, *66*, 39.
72. Mollinedo, F., Fernández-Luna, J. L., Gajate, C., Martín-Martín, B., Benito, A., Martínez-Dalmau, R., Modolell, M. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1320-1328.
73. Mollinedo, F., Gajate, C., Martín-Santamaria, S., Gago, F. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3163-3184.

74. Houlihan, W. J., Lohmeyer, M., Workman, P., Cheon, S. *Med. Res. Rev.* **1995**, *15*, 157-223.
75. Fos, E., Suesa, N., Borrás, L., Lobato, C., Banfi, P., Gambetta, R. A., Zunino, F., Mauleón, D., Carganico, G. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1216-1228.
76. Surlés, J. R., Wykle, R. L., O'Flaherty, J. T., Salzer, W. L., Thomas, M. J., Snyder, F., Piantadosi, C. *J. Med. Chem.* **1984**, *28*, 73-78.
77. Cassel, S., Debaig, C., Benvegnu, T., Chaimbault, P., Lafosse, M., Plusquellec, D., Rollin, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 875-896.
78. Murza, M. M., Safarov, M. G., Nazmukhanova, R. M. *J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1984**, *20*, 119-120.
79. Arsénault, G. P., Bullock, E., MacDonald, S. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4384-4396.
80. Nemoto, H., Wilson, J. G., Nakamura, H., Yamamoto, Y. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 435-435.
81. Berecochea, J., Anatol, J., Tréfouël, J. C. *R. Acad. Sci. C. Chim.* **1969**, *268*, 434-437.
82. Padgett, H. C., Csendes, I. G., Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3492-3496.
83. Eliel, E. L., Hofer, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 8041.
84. Mittendorf, J., Hiemstra, H., Speckamp, W. N. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 4049-4062.
85. Takano, S., Akiyama, M., Sato, S., Ogasawara, K. *Chem. Lett.* **1983**, 1593-1596.
86. Mackman, R.L., Micklefield, J., Block, M. H., Leepe, F. J., Battersby, A.R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 2111.
87. Trost, B. M., Matsubara, S., Caringi, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8745-8746.
88. Oppolzer, W., Radinov, R.N., El-Sayed, E. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4766-4770.
89. Carlsson, J., Janson, J. C., Sparrman, M., en *Protein Purification. Principles, High-Resolution Methods and Applications*, Janson, J. C., Rydén, L., Eds.; Wiley: Nueva York, 1998, 275-329.
90. Burdine, L., Kodadek, T. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 593-597.
91. Prime, K. L., Whitesides, G. M. *Science* **1991**, *252*, 1164.
92. Reshetnyak, Y. K., Andreev, O. A., Lehnert, U., Engelman, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 6460.
93. Hornillos, V., Saugar, J. M., De la Torre, B. G., Andreu, D., Rivas, L., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5190-5193.
94. Pearson, D.A., Blanchette, M., Baker, M. L., Guindon, C. A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739.
95. Ellman, G. L. *Archiv. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70.
96. Halter, M., Nogata, Y., Dannenberger, O., Sasaki, T., Vogel, V. *Langmuir* **2004**, *20*, 2416.
97. Capozzi, G., Modena, G. Oxidation of Thiols. En: *The Chemistry of the Thiol Group*; Patai, S., Ed.; Wiley: Nueva York, 1974; Vol. 18, p. 785
98. Chicharro, C., Granata, C., Lozano, R., Andreu, D., Rivas, L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2441.

99. Greene, T. W., Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2<sup>a</sup> ed.; Wiley: Nueva York, 1991
100. Kocieński, P. J. *Protecting Group*, 3<sup>a</sup> ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2005.
101. Wood, T. E., Thompson, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1831-1861.
102. Zhang, J., Matteucci, M. D. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1467-1470.
103. Riyadh, S. M., Ishii, H., Fuchigami, T. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 8817-8221.
104. Johnson, A. W., Markham, E., Price, R., Shaw, K. B. *J. Chem. Soc.* **1958**, 4254.
105. Smith, K. M., Fujinari, E. M., Pandey, R. K., Tabba, H. D. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4667-4676.
106. Appel, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 801.
107. Baughman, T. W., Sworen, J. C., Wagener, K. B. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10943-10948.
108. Mackman, R. L., Micklefield, J., Block, M. H., Leepe, F. J., Battersby, A. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 2111.
109. Lin, N-H., Xia, P., Kovar, P., Park, C., Chen, Z., Zhang, H., Rosenberg, S. H., Sham, H. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 421-426.
110. Clezy, P. S., Fookes, C. J. R., Liepa, A. J. *Aust. J. Chem.* **1972**, *25*, 1979-1990.
111. Imahori, H., Norieda, H., Yamada, H., Nishimura, Y., Yamazaki, I., Sakata, Y., Fukuzumi S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 100-110.
112. Nakamura, S., Furutani, A., Toru, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1690-1695.
113. Ohlsson, J., Magnusson, G. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9975-9984.
114. Hashimoto, M., Hatanaka, Y., Nabeta, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 89-91.
115. Höfle, G., Steglich, W., Vorbrüggen, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 569-583
116. Birkofer, L., Konkol, W., Ritter, A. *Angew. Chem.* **1959**, *71*, 701.
117. Li, S., Whitehead, J.K., Hammer, R. P. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3116-3118.
118. Collinsova, M., Jiracek, J. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 629-647.

## 6. Parte experimental

1. Perrin, D. D., Armarego, W. L. F., Perrin, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*, **1981**, Pergamon Press.
2. Demas, J. N., Crosby, G. A. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991-1024.
3. Lopez Arbeloa, F., Lopez Arbeloa, T., Lopez Arbeloa, I., Garcia Moreno, I., Costela, A., Amat-Guerri, F. *Chem. Phys.* **1998**, *236*, 331-341.
4. Parker, C. A., Rees, W. T. *Analyst* **1960**, *85*, 587-593.
5. Mrsny, R. J., Volwerk, J. J., Griffith, O. H. *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *39*, 185-191.
6. Ellman, G. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70-77.
7. Riddles, P. W., Blakeley, R. L., Zerner, B. *Anal. Biochem.* **1979**, *94*, 75-81.
8. Quesada, E., Delgado, J., Gajate, C., Mollinedo, F., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5333-5335.
9. Beck, A., Heissler, D., Duportail, G. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1459-1472.
10. Hopf, H., Krüger, A. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4378-4385.

11. Guay, B., Deslongchamps, P. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6140-6148.
12. Maryanoff, B. E., Reitz, A. B. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863-927.
13. Sneddon, H. F., Gaunt, M. J., Ley, S. V. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1147-1150.
14. Becher, J. *Org. Synth* **1979**, *59*, 79.
15. Soullez, D., Plé, G., Duhamel, L., Duhamel, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 563-564.
16. Murias, M., Handler, N., Erker, T., Pleban, K., Ecker, G., Saico, P., Szekeres, T., Häger, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5571-5578.
17. Lei, Y., Wroblewski, A. D., Golden, J. E., Powel, D. R., Aubé, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4552-4553.
18. Quesada, E., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1308-1318.
19. Navarro, I., Mas, E., Fabriàs, G., Camps, F. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1267-1274.
20. Chinchilla, R., Najera, C. *Chem. Rev.* **2007**, *107* 874-922.
21. Perchonock, C. D., Uzinskis, I., McCarthy, M. E., Erhard, K.F., Gleason, J. G., Wasserman, M. A., Muccitelli, R. M. DeVan, J. F., Tucker, S.S., Vickery, L. M., Kirchner, T., Weichman, B. M., Mong, S., Scott, M. O., Rosso, G. C., Wu, H. L., Croke, S. T., Newton, J. F. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1442-1452.
22. Sneddon, H. F., Gaunt, M. J., Ley, S. V. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1147-1150.
23. Mori, M., Washioka, Y., Urayama, T., Yoshiura, K., Chiba, K., Ban, Y. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4058.
24. Puzicha, G., Shrouf, D. P., Lightner, D. A. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27*, 2117.
25. García-Moreno, I., Amat-Guerri, F., Lira, M., Costela, A., Infantes, L., Sastre, R., López Arbeloa, F., Bañuelos, J., López Arbeloa, I. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 3088.
26. Mackman, R. L., Micklefield, J., Block, M. H., Leepe, F. J., Battersby, A. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 2111.
27. Meltola, N. J., Wahlroos, R., Soini, A. E. *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 635.
28. Wan, C., Burghart, A., Chen, J., Bergström, F., Johansson, L. B., Wolford, M. F., Kim, T. G., Topp, M. R., Hochstrasser, R. M., Burgess, K. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4430-4441.
29. Starck, J. P., Nakatani, Y., Ourisson, G. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 2629-2638.
30. Boiadjiev, S. E., Lightner, D. A. *Tetrahedron.* **1999**, *55*, 10871-10886.
31. Lightner, D. A., Quistad, G. B. *J. Heterocycl. Chem.* **1973**, *10*, 273-274.
32. Delgado, J. *Tesis Doctoral, U. Autónoma de Madrid*, **2004**, 174.
33. Paine III, J. B., Hiom, J., Dolphin, D. *J. Org. Chem.* **1998**, *53*, 2796-2802.
34. Cassel, S., Debaig, C., Benvegnu, T., Chaimbault, P., Lafosse, M., Plusquellec, D., Rollin, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 875-896.
35. Nemoto, H., Wilson, J. G., Nakamura, H., Yamamoto, Y. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 435-435.
36. Berecoechea, J., Anatol, J., Tréfouël, J. *C. R. Acad. Sci. C. Chim.* **1969**, *268*, 434-437.
37. Padgett, H. C., Csendes, I. G., Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3492-3496.
38. Omura, K., Swern, D. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1651-1660.

39. Baldwin, J. E., Adlington, R. M., Ramcharar, S. H. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 3413-3428.
40. Sokolowski, A., Burczyk, B., Oles, J. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 807-809.
41. Takasu, M., Naruse, Y., Yamamoto, H. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1947-1950.
42. Oppolzer, W., Radinov, R.N., El-Sayed, E. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4766-4770.
43. Starck, J. P., Nakatani, Y. G. Ourisson, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 2629-2638.
44. Halter, M., Nogata, Y., Dannenberger, O., Sasaki, T., Vogel, V. *Lagmuir* **2004**, *20*, 2416-2423.
45. Pearson, D.A., Blanchette, M., Baker, M. L., Guindon, C. A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739-2742.
46. Lash, T. D., Mani, U. N., Lyons, E. A., Thientanavanich, P., Jones, M. A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 478.
47. Battersby, A. R., Hunt, E., McDonald, E., Paine III, J. B., Saunders, J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1976**, 1008.
48. Johnson, A. W., Markham, E., Price, R., Shaw, K. B. *J. Chem. Soc.* **1958**, 4254.
49. Smith, K. M., Fujinari, E. M., Pandey, R. K., Tabba, H. D. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4667-4676.
50. Baughman, T. W., Sworen, J. C., Wagener, K. B. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10943-10948.
51. Imahori, H., Norieda, H., Yamada, H., Nishimura, Y., Yamazaki, I., Sakata, Y., Fukuzumi S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 100-110.
52. Zhang, J., Matteucci, M. D. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1467-1470.
53. Nakamura, S., Furutani, A., Toru, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1690-1695.
54. Szulc, Z.M., Hannun, Y.A., Bielawska, A. *Tetrahedron Lett.* **2000** *41*, 7821-7824.
55. Byun, H. S., Erulalla, R. K., Bittman, R. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6495-6498.
56. Chicharro, C., Granata, C., Lozano, R., Andreu, D., Rivas, L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2441.