



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y CENTRO DE QUÍMICA-INSTITUTO
DE CIENCIAS

Doctorado en Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

FACULTAD DE QUÍMICA

Doctorado en Química

**“Nuevos tio- y selenoderivados de carbohidratos en
enfermedades degenerativas: cáncer y Alzheimer”**

Presenta

M.C. Martha Velueta Viveros

Directores de tesis

Dra. Penélope Merino Montiel

Dr. Óscar López López

Puebla, México

Julio 2022



Memoria presentada por la M.C. Martha Velueta Viveros
para optar al grado de Doctora en Química.

Puebla, México. Julio de 2022



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y CENTRO DE QUÍMICA-INSTITUTO
DE CIENCIAS

Doctorado en Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

FACULTAD DE QUÍMICA

Doctorado en Química

Vº Bº de los Directores de la Tesis

Fdo. Dra. Penélope Merino
Montiel, Profesora Titular del
Departamento de Química
Orgánica del Posgrado en
Ciencias Químicas, BUAP

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



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. María Concepción Sara Montiel Smith, Dr. José María Fernández-Bolaños Guzmán, Dra. Inés Maya Castilla, Dr. José Luis Vega Báez y la Dra. Laura Leticia Romero Hernández, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Nuevos tio- y selenoderivados de carbohidratos en enfermedades degenerativas: cáncer y Alzheimer”**, que presenta la alumna **M.C. Martha Velueta Viveros** para obtener el grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los trece días del mes de junio del año dos mil veintidós.

ATENTAMENTE

Dra. María Concepción Sara Montiel Smith

Dr. José María Fernández-Bolaños Guzmán

Dra. Inés Maya Castilla

Dr. José Luis Vega Báez

Dra. Laura Leticia Romero Hernández



El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y en el Laboratorio de Química Fina de Carbohidratos de la Universidad de Sevilla, España bajo la dirección de la Dra. Penélope Merino Montiel y el Dr. Óscar López López con el apoyo otorgado por CONACYT a través de la beca nacional con el número (CVU/Becario) 628962/481149 y de la beca mixta (291250) del 1 de Agosto de 2017 al 31 de Julio de 2021.

Publicación derivada de esta Tesis:

Carbohydrate-derived bicyclic selenazolines as new multipotent agents against Alzheimer's disease. Martha Velueta-Viveros, Macarena Martínez-Bailén, Adrián Puerta, Laura Romero-Hernández, Penélope Merino-Montiel, Sara Montiel-Smith, Miguel X. Fernandes, Antonio J. Moreno-Vargas, José M. Padrón, Óscar López, José G. Fernández-Bolaños. *Bioorganic Chemistry* **2022**, en prensa.

Track Your Accepted Article

The easiest way to check the publication status of your accepted article

Carbohydrate-derived bicyclic selenazolines as new dual inhibitors (cholinesterases/OGA) against Alzheimer's disease

| | |
|----------------------------------|------------------------|
| Article reference | YBIOO_105983 |
| Journal | Bioorganic Chemistry |
| Corresponding author | Óscar López |
| First author | Martha Velueta-Viveros |
| Received at Editorial Office | 19 Dec 2021 |
| Article revised | 19 Jun 2022 |
| Article accepted for publication | 21 Jun 2022 |



ISSN 0045-2068 [↗](#)

Last update: 21 Jun 2022

[✉ Share via email](#)

Status comment

- Your article has been received for production.

Production events

21 Jun 2022 Received for production

Complimentary items

- You are entitled to a Share Link for your article free of charge. The Share Link will be sent you as soon as the final article is published in an issue. [🔗](#)

Bibliographic information

Volume/Issue
Will appear soon

Full bibliographic details
Will appear soon

Article available online
Will appear soon

[>](#) Track another article

Algunos de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis fueron presentados en los siguientes congresos y reuniones:

Martha Velueta Viveros, Óscar López López, Penélope Merino Montiel. **Síntesis de nuevos selenoheterociclos derivados de carbohidratos**. XXII Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas, Puebla, Puebla. 6 al 10 de noviembre de 2017.

Martha Velueta Viveros, Penélope Merino Montiel, Óscar López López, Sara Montiel Smith. **Síntesis de selenadiazoles derivados de D-glucosa**. 14a Reunión Internacional de investigación en Productos Naturales. Cuernavaca, Morelos. 23-26 de mayo de 2018.

Martha Velueta Viveros, Penélope Merino Montiel, José G. Fernández Bolaños, Óscar López López, Sara Montiel Smith. **Síntesis de nuevos selenoheterociclos derivados de carbohidratos**. 15a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, A. C. San Luis Potosí, San Luis Potosí. 22-25 de mayo de 2019.

Martha Velueta Viveros, José G. Fernández Bolaños, Óscar López López, Penélope Merino Montiel. **Síntesis de 2-alcoxiselenazolininas derivados de carbohidratos**. XXVIII Congreso Internacional de la Sociedad Italo-Latinoamericana de ETNOMEDICINA. La Habana, Cuba. 16-20 de septiembre de 2019.

Martha Velueta Viveros, Óscar López López, Penélope Merino Montiel. **Síntesis de 2-alcoxiselenazolininas derivados de carbohidratos**. XXIV Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas, Puebla, Puebla. 11 al 15 de noviembre de 2019.

Martha Velueta Viveros, Penélope Merino Montiel, José G. Fernández Bolaños, Óscar López López. **Síntesis de nuevas 2-alquiltio-1,3-oxazolininas bicíclicas derivadas de carbohidratos**. LatinXChem, Modalidad Virtual. 7 de septiembre de 2020.

Martha Velueta Viveros. **Síntesis de 2-alquiltio-1,3-oxazolininas bicíclicas derivadas de – glucosamina**. 4º Congreso (Virtual) de estudiantes de Doctorado en Química. Escuela internacional de Doctorado. Facultad de Química, Universidad de Sevilla. Sevilla. 2 al 3 de diciembre de 2020.

Martha Velueta Viveros, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith, José Luis Vega Báez, José G. Fernández Bolaños, Óscar López López. **Síntesis de nuevas 2-alquiltio-1,3-oxazolininas bicíclicas derivados de carbohidratos**. XVI Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica. Modalidad Virtual. 19-13 de abril de 2021.

Martha Velueta Viveros, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith, José Luis Vega Báez, José G. Fernández Bolaños, Óscar López López. **Síntesis de Se-metil derivados como potentes agentes antiproliferativos.** Congreso internacional de la Sociedad Química de México 2021, Modalidad Virtual. 30 de agosto al 3 de septiembre de 2021.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT:

Por la beca otorgada de doctorado, numero de becario: 628962

Por la beca de Movilidad al Extranjero (291250).

A la VIEP:

Por el apoyo económico de movilidad recibido para realizar la estancia en el extranjero.

Por el apoyo de Conclusión de Tesis.

Universidad de Sevilla, España:

Facultad de Química, Departamento de Química Orgánica

Grupo de *Química Fina de Carbohidratos* (FQM-134)

Por permitirme realizar una estancia de síntesis, caracterización de compuestos.

A mis asesores de tesis

Dra. Penélope Merino Montiel, Dr. Óscar López López

A los miembros de la comisión revisora:

Dra. Sara Montiel Smith, Dr. José María Fernández Bolaños Guzmán, Dra. Inés Maya Castilla, Dr. José Luis Vega Báez, Dra. Laura Leticia Romero Hernández.

Al grupo del Dr. José M. Padrón (U. La Laguna, España)

Por los ensayos antiproliferativos y de *docking*

A los Drs. Antonio J. Moreno Vargas y Macarena Martínez

Por la realización de los ensayos de inhibición en OGA y glicosidasas

DEDICATORIAS

A mi mamá Martha Viveros Pérez, a mi papá Alfredo Velueta Hernández y mi hermano Alfredo Velueta Viveros. Por su apoyo infinito durante esta etapa, por escucharme y por jamás dejarme sola, y sobre todo por creer en mí. Fueron pieza clave en momentos difíciles. Son y serán siempre lo más importante en mi vida.

A mis amigos, a mi familia, conocidos, personas que se fueron y personas que se quedaron en este trayecto. Gracias por el tiempo y su amor.

Gracias

Índice

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| RESUMEN | 12 |
| SUMMARY | 14 |
| 2. RELACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS PREPARADOS | 16 |
| 2-Alquiltio-1,3-oxazolinas bicíclicas..... | 16 |
| Selenoureas derivadas de carbohidrato | 16 |
| 2-Alquilamino-1,3-selenazolinas bicíclicas O-acetiladas..... | 16 |
| 2-Alquilamino-1,3-selenazolinas bicíclicas O-desprotegidas | 17 |
| N-alkuil-Se-metil selenocarbamato..... | 17 |
| Selenocarbamatos y carbamato derivados de carbohidrato | 17 |
| 2-Alcoxi-1,3-selenazolinas-O-acetiladas | 18 |
| 2-Alcoxi-1,3-selenazolinas O-desprotegidas..... | 18 |
| Se-alkuil isoselenocarbamatos derivados de carbohidrato | 19 |
| Glicotioureas derivadas de cumarinas..... | 19 |
| 3. NUEVOS DERIVADOS ORGANOSELÉNICOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTI-ALZHEIMER Y ANTIPROLIFERATIVA..... | 20 |
| 3.1. Introducción y antecedentes..... | 20 |
| 3.2. Objetivos | 53 |
| 3.3. Discusión de resultados..... | 53 |
| 3.5. Conclusiones del capítulo 3 | 130 |
| 4. NUEVOS GLICOCONJUGADOS DE CUMARINAS COMO POTENCIALES INHIBIDORES DE ANHIDRASAS CARBÓNICAS | 133 |
| 4.1. Introducción y antecedentes..... | 133 |
| 4.2. Objetivos | 149 |
| 4.3. Discusión de resultados..... | 149 |
| 4.4. Conclusiones del capítulo 4 | 155 |
| 5. PARTE EXPERIMENTAL | 156 |
| 5.1. Métodos generales..... | 156 |
| 5.2. Materias primas | 158 |
| 5.3. Nuevas investigaciones | 177 |

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral ha sido llevada a cabo en las líneas de investigación de los grupos *Síntesis y Modificación de Productos Naturales* (Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México) y *Química Fina de Carbohidratos* (Universidad de Sevilla, España), siendo un punto importante en ambos grupos la obtención de nuevos productos bioactivos.

La investigación desarrollada ha sido financiada por los proyectos Síntesis estereocontrolada de espirozúcares y de seleno-derivados y su evaluación como inhibidores enzimáticos y como agentes antioxidantes (CB-2015/257465, CONACYT, México), y por el MICIN (España) a través de los proyectos Moléculas y macromoléculas con actividad multidiana frente a enfermedades degenerativas (CTQ2016-78703-P) y Sistemas químicos para la vectorización y liberación selectiva de nuevos inhibidores enzimáticos citotóxicos (PID2020-116460RB-I00).

Los productos a los que se ha accedido en la Tesis Doctoral son el resultado de la búsqueda de nuevos agentes activos frente a dos de las enfermedades más complejas y con más impacto en la sociedad, como son el cáncer y el Alzheimer.

Una parte importante de la Tesis (capítulo 3) se ha dedicado a la preparación de nuevos compuestos organoselénicos, una temática en el que ambos grupos tienen una amplia experiencia. Es necesario resaltar que numerosos compuestos organoselénicos se caracterizan por exhibir interesantes propiedades biológicas, tales como antioxidantes, antiproliferativos, antimicrobianos, entre otras.

En este contexto, abordamos la preparación de una serie de 2-alkilamino- y 2-alcóxiamino-1-3-selenazolininas bicíclicas derivadas de carbohidrato (compuestos **10–12, 24–26**). Estos compuestos fueron diseñados como un prototipo novedoso de agentes duales anti-Alzheimer, con potencial para inhibir tanto a las colinesterasas (para aumentar los niveles significativamente bajos de acetilcolina, un aspecto característico de la enfermedad), como a la enzima OGA (O-GlcNAcase), que controla procesos de modificación postraduccional, y que también está correlacionada con las placas amiloide. Dichos compuestos son análogos estructurales a inhibidores muy conocidos de OGA, como el Thiamet-G, o la NAG-thiazolina.

El acceso a estos compuestos implica la preparación de un isoselenocianato de azúcar en posición C-2, y su conversión en selenoureas y selenocarbamatos mediante reacción con aminas o alcoholes alifáticos pequeños; la posterior ciclación térmica genera el sistema bicíclico anteriormente mencionado.

Los seis compuestos se han evaluado como potenciales agentes anti-Alzheimer con ensayos *in vitro*, y se obtuvieron una serie de conclusiones interesantes. Por un lado, los

derivados **10-12** resultaron ser buenos inhibidores de BuChE, la colinesterasa que tiene una mayor prevalencia en estados avanzados del Alzheimer. En particular, el derivado **12** presentó actividad en el rango submicromolar, siendo también un muy potente inhibidor de la OGA (rango nanomolar), caracterizado además por una excelente selectividad, al no inhibir otras enzimas de tipo hexosaminidasa.

Las interacciones clave de **12** en relación con las colinesterasas y OGA fueron analizadas mediante cálculos *in silico*, y comparadas con la del Thiamet-cocristalizado con OGA, con objeto de obtener información acerca de las poses del derivado al interaccionar con la enzima. Es además destacable que estas selenazolininas prácticamente no afectaron a la actividad de proliferación ni de células tumorales ni de células no tumorales, por lo que podrían constituir un buen punto de partida en la búsqueda de nuevos agentes anti-Alzheimer.

También se han diseñado varias familias de derivados organoselénicos como potenciales agentes antiproliferativos. En este contexto, se han obtenido una serie de selenocarbamatos sencillos derivados de carbohidrato en C-2, con longitud de cadena variable (2-18 carbonos, **14-19**), con objeto de analizar las diferencias en cuanto a sus bioactividades. Algunos de estos selenocarbamatos fueron metilados en el átomo de Se, originando *Se*-alquil isoselenocarbamatos derivados de carbohidrato (**27-29**).

La diversidad estructural se incrementó con la preparación de un panel pequeño de imidazolidina-2-selenas bicíclicas (**30-32**) y un 2-amino-1,3,4-selenadiazol derivado de carbohidrato (**33**).

De entre todos los derivados evaluados hasta la fecha, destacan muy significativamente los *Se*-metil isoselenocarbamatos (**27-29**), que alcanzaron el nivel nanomolar en su actividad antiproliferativa frente al panel de líneas celulares empleadas, particularmente al incrementar el tamaño de la cadena. Esto supone una mejora de la actividad de hasta 4900 veces con respecto al cisplatino, un agente ampliamente utilizado en quimioterapia.

En el último capítulo de la Tesis Doctoral (capítulo 4) se ha llevado a cabo la preparación de un pequeño panel de nuevos glicoconjugados de cumarinas, en los cuales, la unidad de cumarina (*2H*-cromen-2-ona, ampliamente distribuida en la naturaleza) se ha conectado a un carbohidrato a través de un espaciador de tipo tioureido. El objetivo ha sido la preparación eficaz de inhibidores de anhidrasas carbónicas (CAs), enzimas presentes en todos los seres vivos, e implicadas en una plétora de actividades biológicas. Dos de las isoformas que se encuentran en humanos (CA IX y XII) son responsables de la acidificación del medio extracelular en procesos de desarrollo tumoral, por lo que su inhibición selectiva podría permitir el acceso a nuevas familias de agentes quimioterapéuticos.

SUMMARY

This Doctoral Thesis has been conducted within the research lines of the groups *Synthesis and Modification of Natural Products* (Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Mexico) and *Carbohydrates Fine Chemicals* (University of Seville, Spain); in both cases, an important topic is the search for bioactive compounds.

Research developed herein has been funded by the projects *Stereocontrolled synthesis of spiro-sugars and of selenoderivatives and their evaluation as enzymatic inhibitors and antioxidant agents* C(B-2015/257465, CONACYT, Mexico), and by the Spanish MICIN through the projects *Molecules and macromolecules with multitarget activity towards degenerative diseases* (CTQ2016-78703-P) and *Chemical systems for the vectorization and selective release of new cytotoxic enzymatic inhibitors* (PID2020-116460RB-I00).

Products obtained in this Thesis are the outcome of the search for new active agents towards two of the most complex diseases nowadays and with the highest impact in our society, like *cáncer* and Alzheimer's disease.

An important part of the Thesis (chapter 3) has been devoted to the preparation of new organoselenium derivatives, a topic in which both groups have an ample experience. It is worth mentioning that numerous organoselenium derivatives are endowed with a plethora of biological properties, like antioxidant, antiproliferative, or antimicrobial agents, among others.

In this context, we accomplished the preparation of a series of bicyclic 2-alkylamino and 2-alcoxyamino-1-3-selenazolines (compounds **10–12**, **24–26**). These compounds were designed as a novel prototype of dual anti-Alzheimer's agents, with potential to inhibit both, cholinesterases (in order to increase the significantly low levels of acetylcholine, a common feature in Alzheimer's disease), and also the enzyme OGA (O-GlcNAcase), which controls postranductional modifications and is also correlated with amyloid plaques. Such compounds are structural analogues of classical OGA inhibitors, like Thiamet-G or NAG-thiazoline.

Access to these compounds involves the preparation of a carbohydrate-derived isoselenocyanate on C-2 position, and its conversion into selenoureas and selenocaramates through reaction with short aliphatic amines or alcohols; subsequent thermal cyclization generates the bicyclic system previously mentioned.

The six compounds have been evaluated as potential anti-Alzheimer's agents with *in vitro* assays, and a series of relevant conclusions were achieved. Derivatives **10-12** turned out to be good BuChE inhibitors, the cholinesterase with a major prevalence in advanced stages of the disease. In particular, derivative **12** depicted activities within the subnanomolar range, being also a nanomolar inhibitor of OGA. Moreover, an outstanding selectivity was achieved, as no other hexosaminidases nor glycosidases were inhibited.

Key interactions of **12** with cholinesterases and OGS were analysed with *in silico* simulations, and compared with co-crystallized Thiamet-G, in order to get information about the poses of the derivative within the enzyme active site. Moreover, these selenazolines did not affect tumour and non-tumour cells, so they could be a good start point for the development of new anti-Alzheimer's agents.

Some other organoselenium families were also designed as potential antiproliferative agent. In this context, a series of simple sugar-derived selenocarbamates at C-2 have been obtained, with variable lengths (2-18 carbons, **14-19**), with the aim of analysing their bioactivities. Some of these selenocarbamates were also methylated on the selenium atom, yielding *Se*-alkyl isoselenocarbamates derived from carbohydrates (**27-29**).

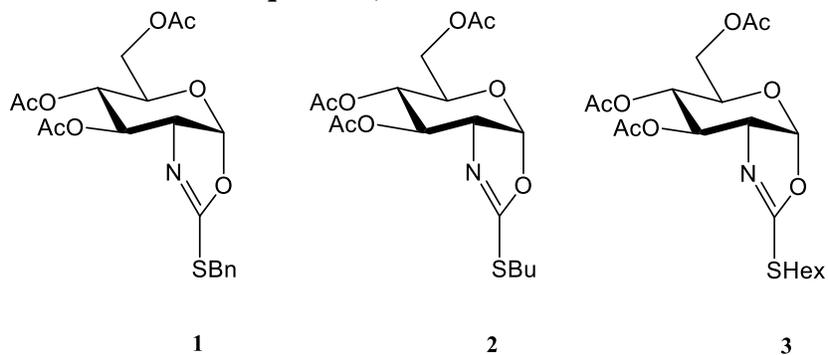
Structural diversity was increased by the preparation of a short panel of imidazolidine-2-selenoes (**30-32**) and a 2-amino-1,3,4-selenadiazole derived from carbohydrate (**33**).

Among all the tested compounds so far, *Se*-methyl isoselenocarbamates (**27-29**) are particularly interesting, as they reached the nanomolar range in their antiproliferative activities against the panel of cell lines tested, particularly when increasing the length of the chain. This represents an up to 4900-fold increase when compared with cisplatin, a widely used chemotherapeutic agent.

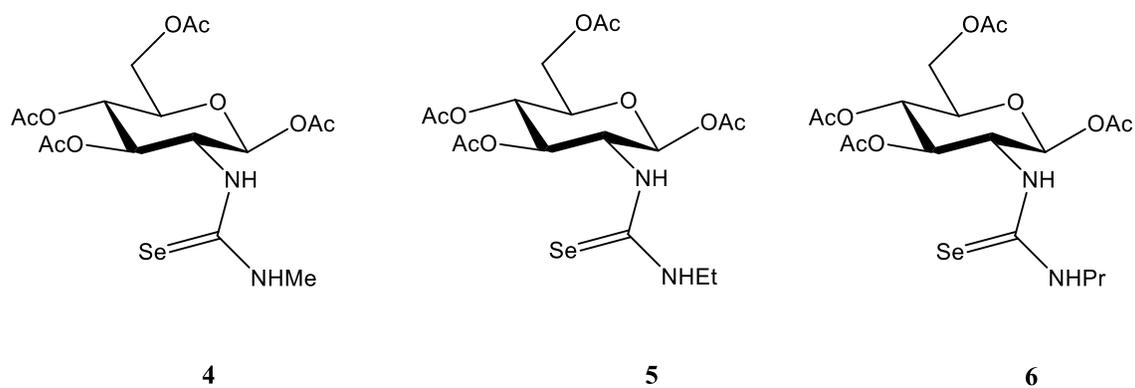
In the last section of the Doctoral Thesis (chapter 4), a short panel of new coumarin-glycoconjugates has been accessed, in which the coumarin residue (*2H*-chromen-2-one, widely distributed in nature) has been connected to a carbohydrate scaffold through a thioureido linker. The target has been the efficient preparation of new carbonic anhydrase inhibitors (CAs), enzymes distributed in all life kingdoms, and involved in a plethora of biological activities. Two of the isoforms present in mammals (CA IX and XII) are responsible for the acidification of the extracellular medium in tumour processes; therefore, their selective inhibition might allow the Access to new families of chemotherapeutic agents.

2. RELACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS PREPARADOS

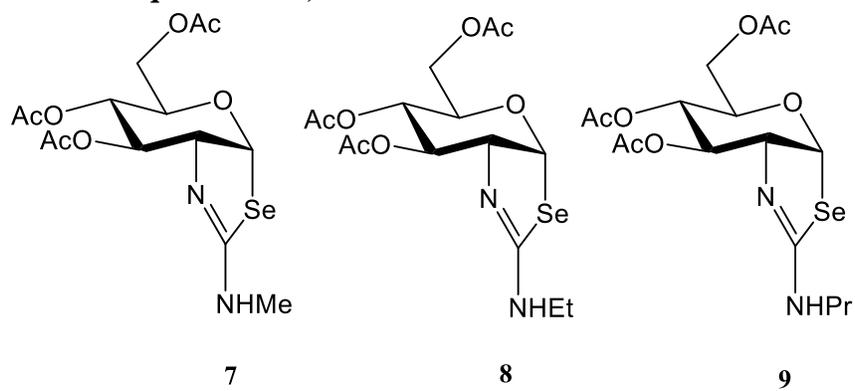
2-Alquiltio-1,3-oxazolininas bicíclicas



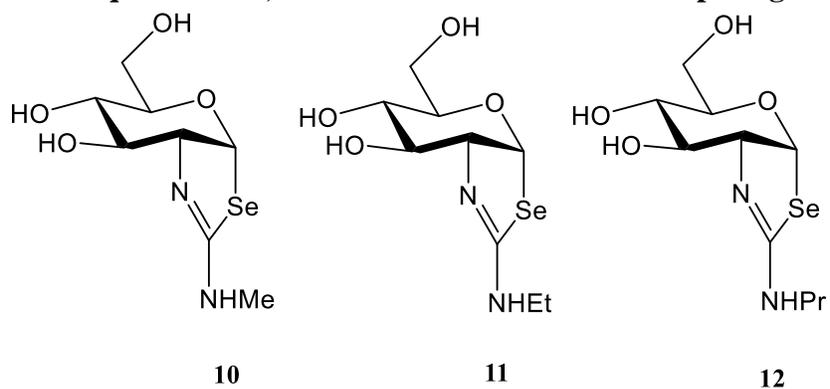
Selenoureas derivadas de carbohidrato



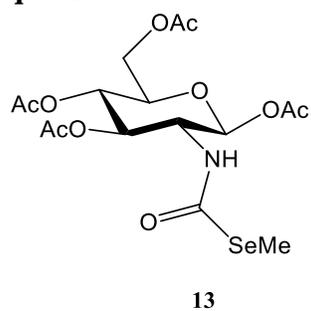
2-Alquilamino-1,3-selenazolininas bicíclicas O-acetiladas



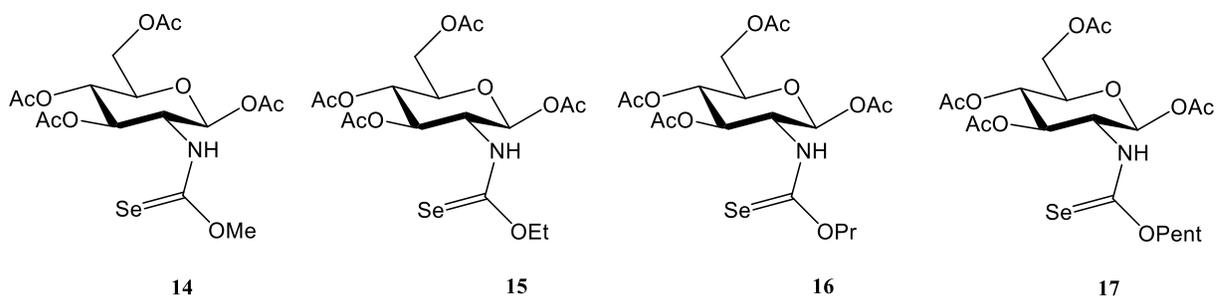
2-Alquilamino-1,3-selenazolininas bicíclicas O-desprotegidas

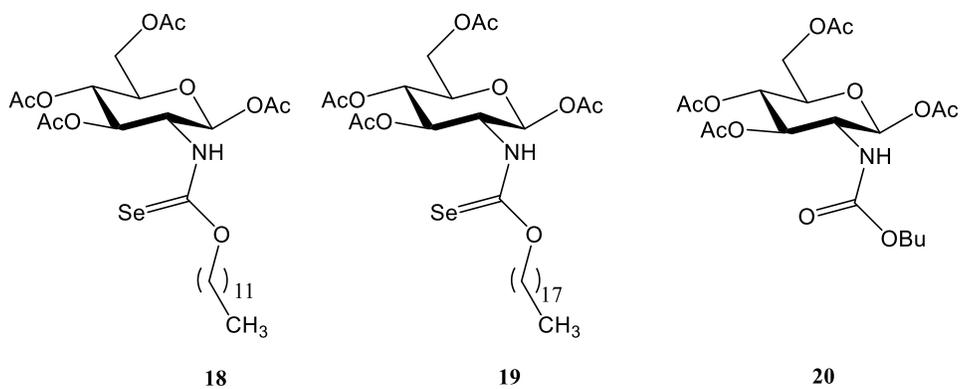


N-alkil-Se-metil selenocarbamato

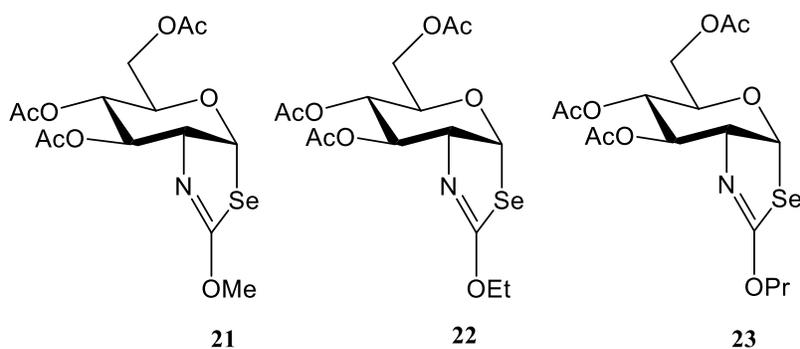


Selenocarbamatos y carbamato derivados de carbohidrato

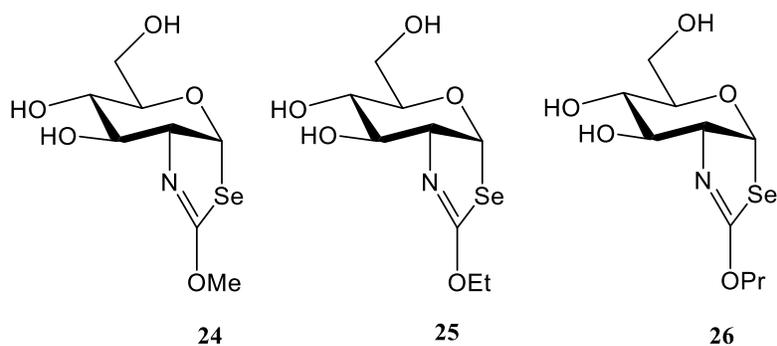




2-Alcoxi-1,3-selenazolin-5-yl-O-acetiladas



2-Alcoxi-1,3-selenazolin-5-yl-O-desprotegidas



3. NUEVOS DERIVADOS ORGANOSELÉNICOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTI-ALZHEIMER Y ANTIPROLIFERATIVA

3.1. Introducción y antecedentes

Enfermedad de Alzheimer (EA)

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la demencia es un síndrome de carácter degenerativo que provoca el deterioro progresivo de la función cognitiva, en unos niveles que van más allá del simple envejecimiento. Tiene efectos irreversibles sobre la memoria, lenguaje, orientación, comprensión o aprendizaje.^{1,2} La demencia, en sus múltiples variantes, afecta en la actualidad a más de 50 millones de personas en todo el mundo (el 60% en países de ingresos bajos o medios, y en el 60% de los casos, a mujeres), y se prevé un crecimiento exponencial y preocupante hasta alcanzar los 82 millones en el año 2030, y los 152 millones en el 2050.^{1,3} Estos datos suponen la aparición de un nuevo caso de demencia cada 3.2 s.⁴ El aumento de la esperanza de vida contribuye a aumentar los casos de demencia, que suelen manifestarse en la población mayor de 60 años.

La demencia provoca una enorme carga emocional y económica, tanto a las familias del enfermo, como sobre los sistemas públicos de salud.⁵ Se ha estimado que para el año 2030, el conjunto de dichos costes será de unos 2.8 trillones de US\$.¹ Por todos estos motivos, la OMS ha catalogado el conjunto de las demencias como una *prioridad de salud pública*.⁶

Las demencias, que en numerosas ocasiones son difíciles de diagnosticar, debido a su carácter multifactorial, se han dividido en varios grupos, recogidos en la **Tabla 3.1**.^{7 8}

-
1. Organización Mundial de la salud, <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Último acceso: 18 de abril de 2022.
 2. Arvanitakis, Z.; Shah, R. C.; Bennett, D. A. *JAMA*, **2019**, 322, 1589–1599.
 3. World Alzheimer Report 2019. <https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2019.pdf>. Último acceso: 20 de Marzo 2022.
 4. Alzheimer's Disease International. <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/>. Último acceso: 18 de abril de 2022.
 5. Xu, J.; Zhang, Y.; Qiu, C.; Cheng, F. *Lancet*, **2017**, 390, S47.
 6. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/dementia-a-public-health-priority>. Último acceso: 18 de abril de 2022.
 7. Raz, L.; Knoefel, J.; Bhaskar, H. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2016**, 36, 172–186.
 8. Alzheimer's association, *Alzheimer's Dement.* **2021**, 17, 327–406.

Tabla 3.1. Causas comunes de demencia y características.

| Causa | Características |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Enfermedad de Alzheimer | Es la causa más común de demencia ⁹ y representa aproximadamente del 60% al 80% de los casos. ^{10,11} Algunos de los signos tempranos que presenta son la dificultad para recordar conversaciones, nombres o eventos recientes, además de ser personas apáticas y con depresión. |
| Demencia vascular (enfermedades cerebrovasculares) | Proceso por el cual se dañan los vasos sanguíneos del cerebro y/o se lesiona el tejido cerebral por no recibir suficiente sangre, oxígeno o nutrientes. Algunos de los síntomas iniciales son: juicio deteriorado o la capacidad deteriorada para tomar decisiones, así como afectaciones en la memoria. Además de presentar dificultades con funciones motoras, especialmente el caminar lento y falta de equilibrio. |
| Demencia con cuerpos de Lewy | Son agregaciones anormales de la proteína alfa-sinucleína en las neuronas; si se desarrollan en la corteza pueden provocar demencia. Algunos de los síntomas iniciales son trastornos del sueño, alucinaciones visuales y deterioro visoespacial. |
| Degeneración lobular frontotemporal (DLFT) | Los primeros síntomas típicos incluyen cambios marcados en la personalidad y el comportamiento y/o dificultad para producir o comprender el lenguaje. A diferencia de la EA, la memoria se conserva en las primeras etapas de la enfermedad. |
| Enfermedad de Parkinson (EP) | Algunos de los síntomas más comunes de la EP son la lentitud, rigidez, temblores y cambios en la forma de caminar. |
| Esclerosis del hipocampo | Se produce el endurecimiento del tejido en el hipocampo del cerebro, lo que ocasiona la pérdida de memoria. Muchas veces puede ser confundida con la EA. |
| Patologías mixtas | La presencia de más de una alteración cerebral se denomina patología mixta. Cuando estas patologías presentan síntomas de demencias se denomina demencia mixta. |

9. Lane, C. A.; Hardy, J.; Schott, J. M. *Eur. J. Neurol.* **2018**, *25*, 59–70.

10. Holtzman, D. M.; Morris, J. C.; Goate, A. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*.

11. Gaugler, J.; James, B.; Johnson, T.; Reimer, J.; Weuve, J. *Alzheimer Dement.* **2021**, *17*, 327–406.

De acuerdo con la OMS, el número de muertes provocados por el conjunto de todas las demencias en el año 2019, fueron de 1.62 millones de personas en todo el mundo.¹² Además, cabe resaltar que ese mismo año, el Alzheimer y el resto de demencias se situaron como la séptima causa de muerte, por detrás de enfermedades cardiovasculares (cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular), enfermedades respiratorias (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infecciones de las vías respiratorias inferiores), afecciones neonatales y cáncer de tráquea, bronquios y pulmón (**Figura 3.1**).

Causas principales de defunción en el mundo



Fuente: WHO Global Health Estimates.

Figura 3.1. Causas principales de defunción, Obtenida de la OMS.¹³

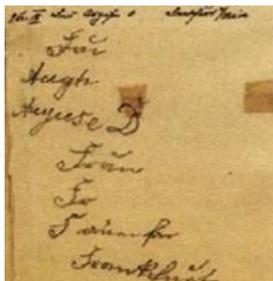
12. Alzheimer's association, *Alzheimer's Dement.* **2019**, 7, e12200.

13. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Último acceso: 18 de abril de 2022.

En el S. XIX, los patólogos observaron un pequeño estrechamiento de los vasos sanguíneos del cerebro, y lo relacionaron con la hipoperfusión que podría conducir al daño cerebral observado en las demencias. A esto se le conoció con el nombre de *demencia arteriosclerótica*, es decir, producida por el endurecimiento de las arterias.⁷

Alois Alzheimer, neuropsiquiatra y neuropatólogo alemán, comenzó a cuestionarse que la demencia siempre fuera causada por arterosclerosis cerebral. En el año 1898 estudió a un paciente que presentó demencia a una edad muy temprana; al examinar su cerebro comprobó que había una gran pérdida de células neuronales, pero no había cambio significativo arteriosclerótico.¹⁴

En 1901, Emil Sioli, director del Hospital Mental de Frankfurt (*Städtische Anstalt für Irre und Epileptische*), le presentó el caso de Auguste Deter, mujer de 50 años de edad, que presentaba delirios, alucinaciones, desorientación, alteraciones en la memoria, paranoia y confusión progresiva; con el paso del tiempo se volvió mucho más apática. Los días 26, 28, 29 y 30 de Noviembre de 1901, A. Alzheimer entrevista a la paciente con una serie de preguntas sencillas cuyas respuestas anota de forma manuscrita¹⁵ en su informe (en la **Figura 3.2** se muestra una transcripción parcial), observándose que una gran mayoría de las respuestas son totalmente incoherentes. También muestra trastorno amnésico de la escritura al intentar escribir su nombre y la ciudad en la que reside (**Figura 3.2**).



Se sienta en la cama con una expresión de desamparo. ¿Cuál es su nombre? **Auguste**. ¿Apellido? **Auguste**. ¿Cuál es el nombre de su marido? **Auguste, creo**. ¿Su marido? **Ah, mi marido**. Mira como si no entendiera la pregunta. ¿Está casada? **Con Auguste**. ¿Es Ud. la Sra. Deter? **Sí, con Auguste Deter**. ¿Cuánto tiempo ha estado aquí? Parece estar tratando recordar. **Tres semanas**. ¿Qué es esto? Le muestro un lápiz. **Un bolígrafo**. ¿Qué año es? **Mil ochocientos**. ¿Está Ud. enferma? **Segundo mes**.

Figura 3.2. Extracto de las notas de A. Alzheimer (Noviembre de 1901)¹⁶ y transcripción de algunas respuestas de A. Deter.¹⁵

14. Verhey, F. R. J. *J. Neurol.*, **2009**, 256, 502–503.

15. Maurer, K. Volk, S.; Gerbaldo, H. *Lancet*, **1997**, 349, 1546–1549.

16. Investigación y ciencia. <https://www.investigacionyciencia.es/blogs/psicologia-y-neurociencia/63/posts/la-historia-clinica-de-auguste-d-13791>. Último acceso: 18 de abril 2022.

La paciente murió 4 años después de su ingreso a causa de una septicemia provocada por úlceras de decúbito, y al realizar la autopsia, Alois Alzheimer describió alteraciones histológicas en el cerebro,¹⁷ que años más tarde serían conocidas como placas seniles o amiloides y ovillos neurofibrilares, además de atrofia cortical (disminución del córtex). Este descubrimiento fue hecho público en 1906 en el 37 Simposio de psiquiatras alemanes del Suroeste, celebrado en Tübingen, el 3 de Noviembre de 1906. En dicho congreso científico impartió la conferencia titulada “Sobre el peculiar proceso patológico de la corteza cerebral”, que no tuvo especial repercusión en ese momento, y que años más tarde sería publicada.^{17,18}

Gateano Perusini presentó a Alois Alzheimer el caso de Johann Feigl, paciente que mostró síntomas similares a los de Auguste Deter. Su cerebro mostraba las placas amiloides clásicas, pero con la excepción de que carecía de ovillos neurofibrilares.¹⁹ Posteriormente se descubrió una predisposición familiar a desarrollar demencia presenil.²⁰

Fue Emil Kraepelin, compañero de Alzheimer, quien dio el nombre de “Enfermedad de Alzheimer”; en su libro publicado en 1909. En el capítulo sobre trastornos psiquiátricos seniles y preseniles, Kraepelin discute el significado clínico y nosológico de la enfermedad de Alzheimer. Cita que es una enfermedad que se caracteriza por una demencia grave cuyos síntomas comienzan a una edad de 50 años y no se encuentran signos de arteroesclerosis cerebral.²¹

Los archivos originales de Alzheimer acerca de los dos pacientes evaluados no fueron encontrados hasta 1995 tras una ardua investigación, hallándose también las muestras histopatológicas en el Instituto de Munich de Neuropatología.²²

La EA es considerada como una de las enfermedades más complejas y devastadoras en la actualidad,²³ que en estados avanzados conlleva la pérdida total de la capacidad de

17. Stelmann, R. A.; Schitzlein H. N.; Murtagh, R. *Clin. Anat.* **1995**, 8, 429–431.

18. Alzheimer, A. *Psychisch-Gerichtl Med.* **1907**, 64, 146–148.

19. Dahm, R. *Curr. Biol.* **2006**, 16, R906–R910.

20. Klünemann, H. H.; Fronhöfer, W.; Wuster, H.; Fischer, W.; Ibach, B.; Klein, H. E. *Ann Neurol.* **2002**, 52, 520–523.

21. Weber, M. M. *J. Psychiat. Res.* **1997**, 6, 635–643.

22. Hippus, H.; Neundörfer, G. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2003**, 5, 101–108.

23. Talwar, P.; Sinha, J.; Grover, S.; Rawat, C.; Kushwaha, S.; Agarwal, R.; Taneja, V.; Kukreti, R. *Mol. Neurobiol.* **2016**, 53, 4833–4864.

realizar las tareas diarias, y la completa dependencia del paciente de sus cuidadores.²⁴ En este trastorno neurodegenerativo se pueden observar efectos severos e irreversibles, como el deterioro cognitivo, pérdida de memoria, cambios de comportamiento, depresión, psicosis o síntomas parkinsonianos, entre otros;²⁵ se cree que los cambios patológicos en el cerebro ocurren hasta 20 años antes del inicio de los síntomas,²⁶ lo que implica la importancia fundamental de desarrollar protocolos de detección temprana.²⁷

Tradicionalmente, los fármacos se han diseñado con el propósito de que los síntomas o el desarrollo de una enfermedad determinada se pueda abordar mediante la modulación adecuada de una sola diana biológica; sin embargo, se ha demostrado que los fármacos orientados a una sola diana resultan ser obsoletos para lograr un tratamiento terapéutico.²⁸ Se recomienda encarecidamente, también para la EA, el diseño de ligandos multidiana,²⁹ es decir, la combinación de varios farmacóforos para abordar simultáneamente las principales dianas terapéuticas de la enfermedad.³⁰

El estilo de vida (por ejemplo, fumar) y el estado de salud (por ejemplo, diabetes, obesidad, hipertensión) están estrechamente relacionados con el riesgo de desarrollar EA.³¹ Estudios recientes incluso relacionan la EA con la diabetes tipo 2; debido a esta conexión, a la EA a veces se le denomina diabetes tipo 3³² o diabetes cerebral.³³ La conexión entre ambas enfermedades se debe al hecho de que la insulina no solo regula los niveles de azúcar en la

-
24. Coimbra, J. R. M.; Marques, D. F. F.; Baptista, S. J.; Pereira, C. M. F.; Moreira, P. I.; Dinis, T. C. P.; Santos, A. E.; Salvador J. A. R. *Front. Chem.* **2018**, *6*.
 25. Knopman, D. S.; Amieva, H.; Petersen, R. C.; Chételat, G.; Holtzman, D. M.; Hyman, D. T.; Nixon, R. A.; Jones, D. T. *Nat. Rev. Dis. Primers.* **2021**, *7*.
 26. Beason-Held, L. L.; Goh, J. O.; An, Y.; Kraut, M. A.; O'Brien, R. J.; Ferrucci, L.; Resnick, S. M. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 18008–18014.
 27. Frisoni, G. B.; Boccardi, M.; Barkhof, F.; Blennow, K.; Cappa, S.; Chiotis, K.; Démonet, J.-F.; Garibotto, V.; Giannakopoulos, P.; Gietl, A.; Hansson, O.; Herholz, K.; Jack Jr., C. R.; Nobili, F.; Nordberg, A.; Snyder, H. M.; Kate, M. T.; Varrone, A.; Albanese, E.; Becker, S.; Bossuyt, P.; Carrillo, M. C.; Cerami, C.; Dubois, B.; Gallo, V.; Giacobini, E.; Gold, G.; Hurst, S.; Lönneborg, A.; Lovblad, K.-O.; Mattsson, N.; Molinuevo, J.-L.; Monsch, A. U.; Mosimann, U.; Padovani, A.; Picco, A.; Porteri, C.; Ratib, O.; Saint-Aubert, L.; Scerri, C.; Scheltens, P.; Schott, J. M.; Sonni, I.; Teipel, S.; Vineis, P.; Visser, P. J.; Yasui, Y.; Winblad, B. *Lancet Neurol.* **2017**, *16*, 661–676.
 28. Bolognesi, M. L.; Cavalli, A. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1190–1192.
 29. Sameem, B.; Saeedi, M.; Mahdavi, M.; Shafiee, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *128*, 332–345.
 30. Catania, M.; Giaccone, G.; Salmons, M.; Tagliavini, F.; Di Fede, G. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, *11*, 317.
 31. Aisen, P. S.; Cummings, J.; Jack Jr., C. R.; Morris, J. C.; Sperling, R.; Frölich, L.; Jones, R. W.; Dowsett, S. A.; Matthews, B. R.; Raskin, J.; Scheltens, P.; Dubois, B. *Alzheimer's Res. Ther.* **2017**, *9*.
 32. Kandimalla, R.; Thirumala, V.; Reddy, P. H. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* **2017**, *1863*, 1078–1089.
 33. Ferreira-Vieira, T.; Guimaraes, I. M.; Silva, F. R.; Ribeiro, F. M. *Curr. Neuropharmacol.* **2016**, *14*, 101–115.

sangre, sino que también actúa como un factor de crecimiento en todas las células, incluidas las neuronas del sistema nervioso central. Las alteraciones en la señalización de la insulina parecen ser el principal deterioro común que afecta el crecimiento y la diferenciación celular, los mecanismos de reparación celular, el metabolismo energético y la utilización de la glucosa. Por lo tanto, el deterioro de la señalización de la insulina no solo afecta los niveles de glucosa en sangre, sino que también activa numerosos procesos degenerativos.³⁴

Así pues, en base a todo lo comentado, puede comprenderse cómo la fisiopatología de la EA presenta una etiología extraordinariamente compleja,³⁵ de naturaleza multifactorial; el hecho de que no se comprenda completamente el origen patógeno dificulta enormemente el desarrollo de tratamientos adecuados.

Características de la EA

Las dos principales señas de identidad de la EA en el cerebro son la amiloidogénesis y los ovillos neurofibrilares (NFTs). La primera de estas manifestaciones clínicas hace referencia al proceso patológico en el que las proteínas o péptidos se auto-ensamblan de forma natural en oligómeros, protofibrillas y fibrillas amiloides maduras, las cuales forman agregados que originan las placas A β neurotóxicas.³⁶ Por otro lado, los NFTs se generan por la hiperfosforilación anormal de la proteína tau (una proteína asociada a microtúbulos de neuronas maduras).^{37,38} Además, una miríada de otros eventos microscópicos tienen lugar en el cerebro de los pacientes: niveles disminuidos del neurotransmisor acetilcolina (involucrado en la función cognitiva),³⁹ neuroinflamación,⁴⁰ un estrés oxidativo profundo,⁴¹ desregulación de la homeostasis de biometales, que conduce a la sobreproducción de H₂O₂, que por un lado genera estrés oxidativo, y por otro, favorece el depósito de placas amiloides,⁴²

34. Li, L.; Hölscher, C. *Brain Res. Rev.* **2007**, *56*, 384–402.

35. Kumar, A.; Singh, A.; Ekavali, *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 195–203.

36. Stanciu, G. D.; Bild, V.; Ababei, D. C.; Rusu, R. N.; Cobzaru, A.; Paduraru, L.; Bulea, D. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1713.

37. Malafaia, D.; Albuquerque, H. M.T.; Silva, A. M. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *214*, 113209.

38. Wang, J.; Gu, B. J.; Masters, C. L.; Wang, Y.-J. *Nat. Rev. Neurol.* **2017**, *13*, 6112–623.

39. Stanciu, G. D.; Luca, A.; Rusu, R. N.; Bild, V.; Chiriac, S. I. B.; Solcan, C.; Bild, W.; Ababei, D. C. *Biomolecules*, **2020**, *10*, 40.

40. Leng, F.; Edison, P. *Nat. Rev. Neurol.* **2021**, *17*, 157–172.

41. Butterfield, A. D.; Halliwell, D. *Nat. Rev. Neurosci.* **2019**, *20*, 148–160.

42. Greenough, M. A.; Camakaris, J.; Bush, A. I. *Neurochem. Int.* **2013**, *62*, 540–555.

sobreexpresión de β -secretasa 1 (BACE-1)⁴³ y enzimas MAO-B,⁴⁴ acumulación de glutamato en la hendidura sináptica (que produce excitotoxicidad y apoptosis neuronal),⁴⁵ o disfunción mitocondrial⁴⁶ (**Figura 3.3**).

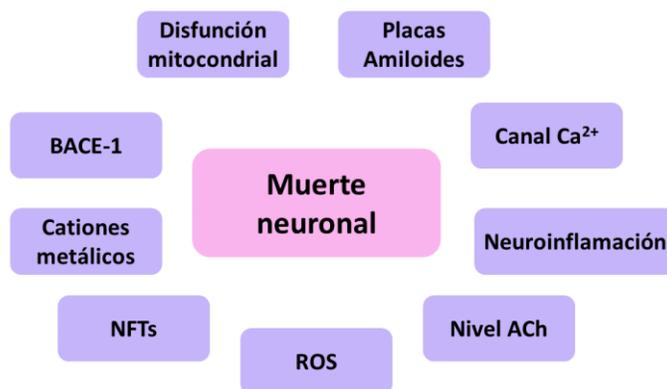


Figura 3.3. Principales mecanismos implicados en la patogénesis de la EA

En el cerebro, la acetilcolina (ACh) juega un papel importante, como neurotransmisor y neuromodulador, encontrándose implicada en la memoria, motivación y atención. Existen dos tipos de colinesterasas, la acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE); la función de ambas colinesterasas es la hidrólisis de la ACh, una vez que ha terminado la comunicación entre la neurona y la célula muscular. Dado que una característica común en los enfermos de Alzheimer son la existencia de niveles bajos de la ACh, se planteó el uso de inhibidores de colinesterasas como forma de regular los niveles del neurotransmisor.⁴⁷

43. Hampel, H.; Vassar, R.; De Strooper, B.; Hardy, J.; Willem, M.; Singh, N.; Zhou, J.; Yan, T.; Vanmechelen, E.; De Vos, A.; Nisticò, R.; Corbo, M.; Imbimbo, B. P.; Streffer, J.; Voytyuk, I.; Timmer, M.; Monfared, A. A. T.; Irizarry, M.; Albala, B.; Koyama, A.; Watanabe, N.; Kimura, T.; Yarenis, L.; Lista, S.; Kramer, L.; Vergallo, A. *Biol. Psychiatry*. **2021**, *89*, 745–756.

44. Schedin-Weiss, S.; Inoue, M.; Hromadkova, L.; Teranishi, Y.; Yamamoto, N. G.; Wiehager, B.; Bogdanovic, N.; Winblad, B.; Sandebring-Matton, A.; Frykman, S.; Tjernberg, L. O. *Alzheimers Res. Ther.* **2017**, *9*, 57.

45. Danysz, W.; Parsons, C. G. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 324–352.

46. Ortiz, J. M. P.; Swerdlow, R. H. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 3489–3507.

47. Gao, H.; Jiang, Y.; Zhan, J.; Sun, Y. *Bioorg. Chem.* **2021**, *114*, 105249.

La AChE contiene dos regiones clave, el sitio aniónico catalítico (CAS, *Catalytic Anionic Site*), que permite las interacciones catión- π con el fragmento de amonio cuaternario de la acetilcolina nativa, y el sitio aniónico periférico (PAS, *Peripheral Anionic Site*), enriquecido con residuos de aminoácidos aromáticos, aumentando la probabilidad de que el sustrato avance hacia el sitio activo. Esta región se encuentra ubicada aproximadamente a 20Å de distancia del CAS, a través de una garganta estrecha (**Figura 3.4**).⁴⁸

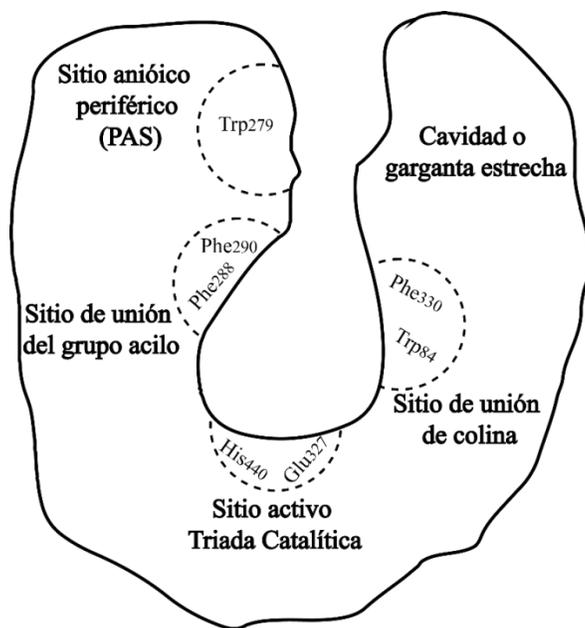


Figura 3.4. Representación esquemática de los sitios de unión de AChE. Adaptado de referencia 48.

La hidrólisis de la ACh se lleva a cabo en el fondo de la cavidad. La región PAS participa en las interacciones catión- π con el grupo amonio cuaternario de la acetilcolina, dirigiendo el sustrato hacia el sitio activo a través de interacciones sucesivas catión- π con los residuos aromáticos en la superficie de la cavidad. Una vez que llega al fondo de la cavidad, el sitio esterático realiza la hidrólisis de la ACh, dando como productos colina y acetato. Los residuos del sitio aniónico aseguran que la ACh esté correctamente orientada (**Figura 3.5**).⁴⁹

48. Kareem, R. T.; Abedinifar, F.; Mahmood, E. A.; Ebadi, A. G.; Rajabi, F.; Vessally, E. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 30781–30797.

49. Moodie, L. W. K.; Sepčić, K.; Turk, T.; Frangež, R.; Svenson, J. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, 1053–1092.

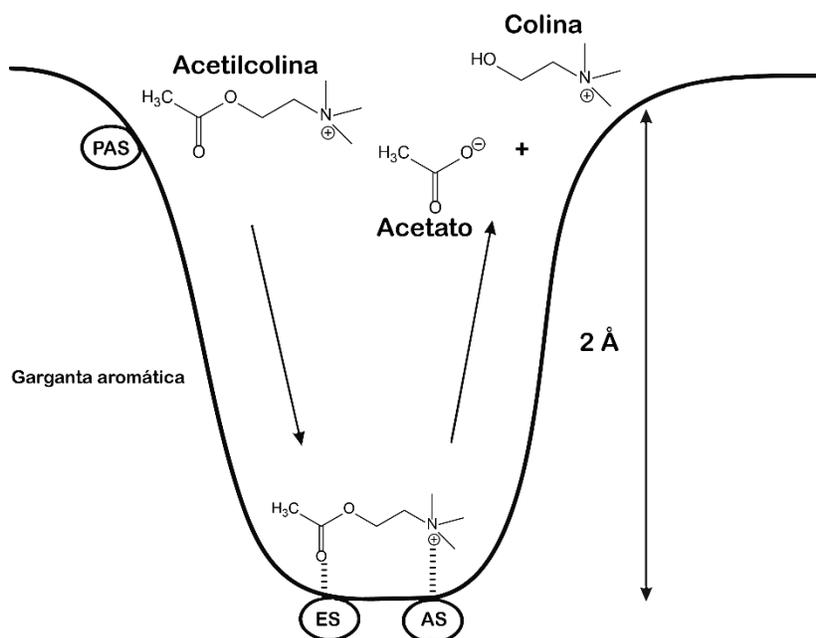


Figura 3.5. Mecanismo de la hidrólisis de ACh catalizada por AChE. Adaptado de referencia 49.

La AChE es la enzima clave en la terapia de la enfermedad de Alzheimer; sin embargo, la BuChE ha llamado la atención ya que se ha mostrado que está altamente relacionada con los depósitos anormales de placas β -amiloide.⁵⁰

Es importante considerar que en el cerebro de pacientes con la EA, los niveles de AChE disminuyen con el transcurso de la enfermedad, mientras que los niveles de BuChE aumentan o no cambian.⁵¹ Por lo que actualmente la inhibición de BuChE es una estrategia interesante para el tratamiento de la EA en estados avanzados.⁵²

La AChE y BuChE presentan un 65% de homología en cuanto a la secuencia de aminoácidos; ambas enzimas tienen una garganta de 20 Å de profundidad, sitio aniónico periférico, y un sitio esterático donde se encuentra la triada.⁵³

50. Macdonald, I. R.; Maxwell, S. P.; Reid, G. A.; Cash, M. K.; DeBay, D. R.; Darvesh, S. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, *58*, 491–505.

51. Nordberg, A.; Ballard, C.; Bullock, R.; Darreh-Shori, T.; Somogyi, M. *Prim. Care Companion CNS Disord.* **2013**, *15*, 12r01412.

52. De Andrade, P.; Matonani, S. P.; Nunes, P. S. G.; Magadán, C. R.; Pérez, C.; Xavier, D. J.; Hojo, E. T. S.; Campillo, N. E.; Matínez, A.; Carvalho, I. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 931–943.

53. Nicolet, Y.; Lockridge, O.; Masson, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Nachon, F. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41141–41147.

Una de las diferencias clave entre AChE y BuChE es la sustitución de los residuos aromáticos en el sitio activo de AChE por alifáticos en BuChE (**Tabla 3.2**); los residuos alifáticos son menos voluminosos y no participan en enlaces π - π fuertes, lo que permite que inhibidores y sustratos de mayor tamaño, tales como la butirilcolina y succinilcolina se unan a BuChE.⁵⁴

Tabla 3.2. Aminoácidos clave en el centro activo de AChE y BuChE

| Regiones | Residuos de aminoácidos involucrados | |
|------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| | AChE | BuChE |
| PAS | Asp74, Tyr72, Tyr124, Trp286 | Asp70, Asn72, Gln124 |
| Subsitio del oxianión | Trp86, Tyr337 | Trp86, Ala337 |
| Subsitio de acilo | Gly118, Gly119, Ala201 | Gly116, Gly117, Ala199 |
| Triada Catalítica | Ser203, His447, Glu327 | Ser198, His438, Glu325 |

Aunque los inhibidores de la colinesterasas no curan la EA, ni reducen su avance, sí mejoran, al menos durante un tiempo, la funcionalidad cognitiva del paciente al restaurar los niveles del neurotransmisor ACh.⁵⁵ A esta aproximación se le conoce como *hipótesis colinérgica*.⁵⁶

La mayoría de los fármacos para EA han sido diseñados como inhibidores de AChE/BuChE. La tacrina (**Figura 3.6**) fue el primer fármaco aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en 1993, siendo un potente inhibidor de la AChE/BuChE; sin embargo, fue retirado poco después debido a los efectos secundarios que presentaban los pacientes, principalmente por su hepatotoxicidad.⁵⁷ Desde entonces se han buscado

54. Ha, Z. Y.; Mathew, S.; Yeong, K. Y. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2020**, *21*, 99–109.

55. Marucci, G.; Buccioni, M.; Ben, D. D.; Lambertucci, C.; Volpini, R.; Amenta, F. *Neuropharmacology*, **2021**, *190*, 108352.

56. Contestabile, A. *Behav. Brain Res.* **2011**, *221*, 334–340.

57. Watkins, P. B.; Zimmerman, H. J.; Knapp, M. J.; Gracon, S. I.; Lewis, K. W. *JAMA.* **1994**, *271*, 992–998.

constantemente nuevos derivados de tacrina no hepatotóxicos, además de diseñar derivados con un modo de acción multidiana.^{58,59}

De los 5 fármacos disponibles actualmente para el tratamiento de la EA, 3 son inhibidores de colinesterasas: galantamina, rivastigmina, donepezilo⁶⁰ (**Figura 3.6**).

La galantamina, debido a su estructura compleja ha sido un gran desafío para la síntesis orgánica. Actualmente son las plantas su principal fuente de producción; por este motivo, se han desarrollado diversas técnicas en el cultivo de tejidos vegetales capaces de optimizar la producción de galantamina como una alternativa más eficaz.⁶¹

Tanto la galantamina como el donepezilo son inhibidores con mayor selectividad hacia la AChE.⁶² Por el contrario, la rivastigmina, aprobada para todas las etapas de EA, es el fármaco que presenta mayor selectividad hacia BuChE.⁶³

58. De los Ríos, C.; Marco-Contelles, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *166*, 381–389.

59. Bautista-Aguilera, Ó. M.; Ismaili, L.; Iriepa, I.; Diez-Iriepa, D.; Chabchoub, F.; Marco-Contelles, J.; Pérez, M. *Chem. Rec.* **2020**, *20*, 1–14.

60. Barthold, D.; Joyce, G.; Ferido, P.; Drabo, E. F.; Marcum, Z. A.; Gray, S. L.; Zissimopoulos, J. *J. Alzheimers Dis.* **2020**, *76*, 579–589.

61. Santos, G. S.; Sinoti, S. B. P.; Almelda, F. T. C.; Silveira, D.; Simeoni, L. A.; Gomes-Copeland, K. K. P. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **2020**, *143*, 13–29.

62. Li, Q.; He, S.; Chen, Y.; Feng, F.; Qu, W.; Sun, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 463–477.

63. Nguyen, J.; Hoffman, H.; Chakkampambal, B.; Grossberg, G. T. *Neurodegener. Dis. Manag.* **2020**, *11*, 35–48.

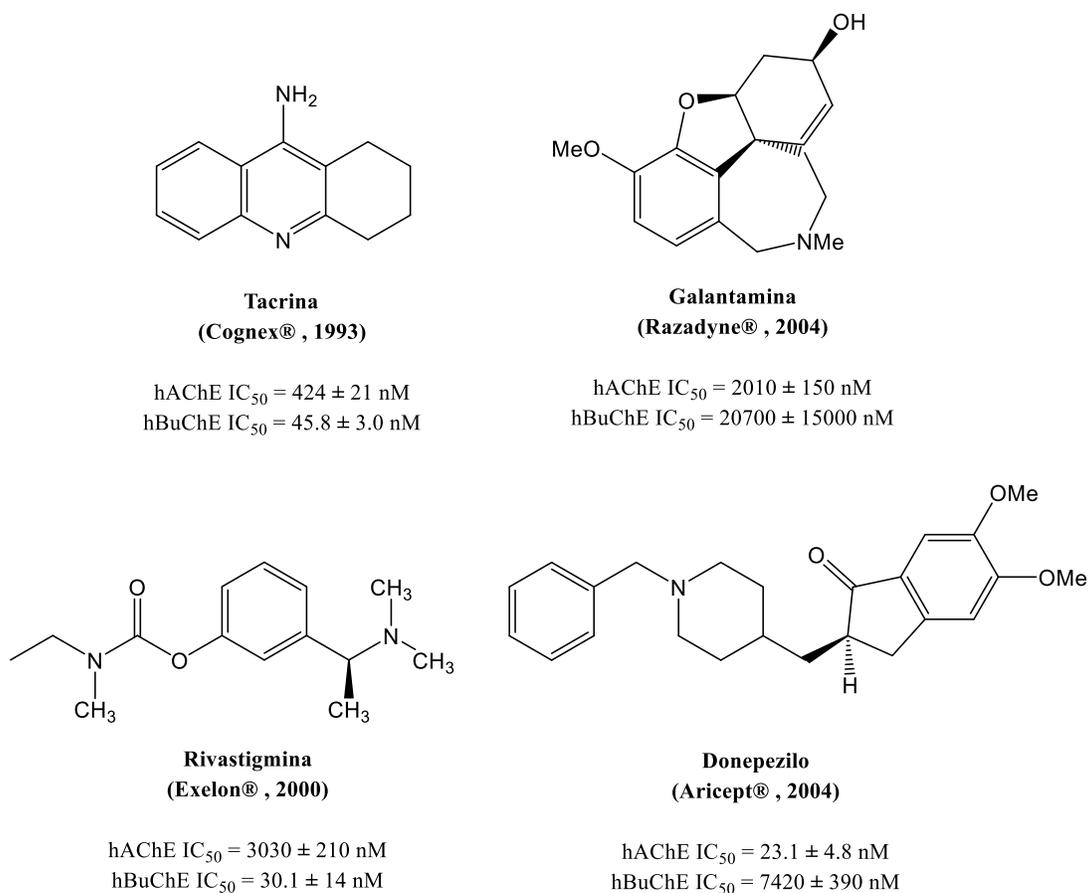


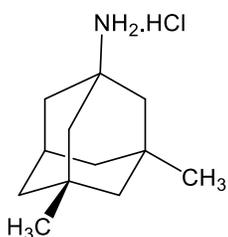
Figura 3.6. Fármacos anti-Alzheimer como inhibidores de colinesterasas y comparación con la tacrina.

Otro fármaco que presenta un mecanismo de acción completamente diferente a los anteriores es la memantina (**Figura 3.7**), un antagonista del receptor del ácido *N*-metil-D-aspartático (NMDAR).⁶⁴ De esta forma, la memantina bloquea la excesiva actividad del receptor de NMDA (*N*-metil- D -aspartato) en el enfermo de Alzheimer sin interrumpir la actividad normal. La memantina también se prescribe para el tratamiento de otros trastornos del Sistema Nervioso Central (SNC), como la enfermedad de Parkinson, epilepsia, o el traumatismo del SCN.⁶⁵ La memantina está indicada para tratar la enfermedad de Alzheimer de moderada a grave.⁶⁶

64. Liu1, J.; Chang, L.; Song, Y.; Li, H.; Wu, Y. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 43.

65 Ivleva, E. A.; Klimochkin, Y. N. *Org. Prep. Proced. Int.* **2017**, *49*, 155–162.

66. Matsunaga, S.; Kishi, T.; Nomura, I.; Sakuma, K.; Okuya, M.; Ikuta, T.; Iwata, N. *Expert Opin. Drug Saf.* **2018**, *17*, 1053–1061.



Hidrocloruro de memantina
(Namenda ®, 2003)
 $IC_{50} = 0.5-3.0 \mu M$

Figura 3.7. Estructura de la memantina

Muy recientemente, la FDA aprobó⁶⁷ Adulhem, a través de la *vía de aprobación acelerada*, para reducir las placas amiloides; esta es la primera terapia lanzada desde 2003, y la primera dirigida hacia la que se piensa es uno de los orígenes de la enfermedad, como son las placas amiloides. El lanzamiento de este fármaco se llevó a cabo con cierta controversia, ya que parte de la comunidad científica duda acerca de los efectos beneficiosos reales en los pacientes.

β -N-acetil-D-hexosaminidasas

Las β -N-acetil-D-hexosaminidasas humanas son enzimas lisosomales que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos en glucanos, glucoproteínas y glucolípidos. Estas se encuentran implicadas en diferentes bioprocesos importantes, como el metabolismo, comunicación celular, proliferación celular, inflamación, la modificación de las glicoproteínas, el metabolismo de los glicoconjugados, reconocimiento de gametos, y la degradación de la quitina en las paredes celulares tanto de hongos como de exoesqueletos de artrópodos.⁶⁸

Las β -N-acetil-D-hexosaminidasas humanas HexA, HexB y O-GlcNAcase (OGA) son de particular interés debido a su potencial como dianas farmacológicas para el desarrollo de fármacos. El funcionamiento anómalo en ellas da como resultado la acumulación de

67. Food and Drug Administration, <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fdas-decision-approve-new-treatment-alzheimers-disease>. Último acceso: 23 de febrero de 2022.

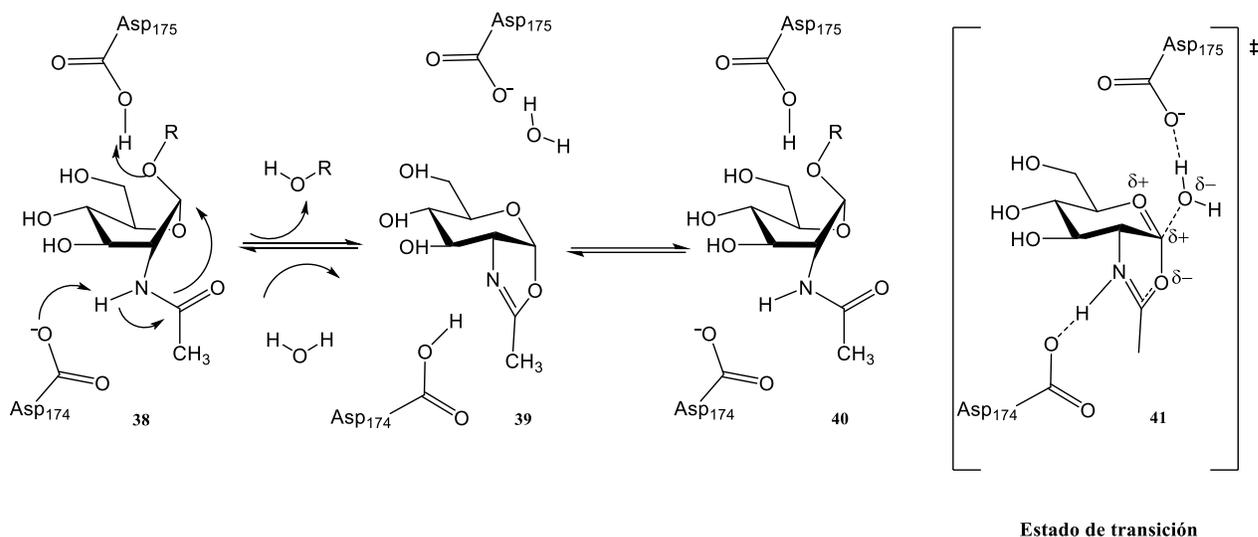
68. Liu, T.; Duan, Y.; Yang, Q., *Biotech. Adv.* **2018**, *36*, 1127–1138.

gangliósidos GM2 dentro de los lisosomas,⁶⁹ lo cual conduce a trastornos neurodegenerativos hereditarios que incluyen enfermedades como el Tay-Sachs o Sandhoff (producidas por la inactivación genética de la Hex A y B).⁷⁰ Es por ello que se ha propuesto que los inhibidores de hexosaminidasas podrían constituir una nueva familia de fármacos para el tratamiento de estas enfermedades.

La O-GlcNAcase (OGA, OGA, EC 3.2.1.169; GH84), junto con la O-GlcNAc transferasa (OGT) son enzimas clave que controlan la modificación postraduccional^{71,72} de una pléthora de proteínas de señalización mitocondriales, citoplasmáticas y nucleares. Mientras que la OGT cataliza la transferencia de *N*-acetil-D-glucosamina del nucleótido UDP-GlcNAc a residuos de Ser/Thr, la OGA, una enzima de 103 kDa⁷³ perteneciente a la familia de hidrolasas de glicósidos 84 (GH84),⁷⁴ ejerce una acción hidrolítica en dicha posición.⁷⁵ Se ha demostrado que en la EA se produce una disminución en la O-GlcNAcificación de la proteína tau, junto con una hiperfosforilación en los residuos libres de Ser/Thr.⁷⁶ En consecuencia, la hiperfosforilación de las proteínas tau y la formación subsiguiente de NFTs patológicos pueden reducirse mediante la inhibición de OGA;⁷⁷ por lo tanto, esta es un área emergente para abordar las taupatías, incluida la EA.⁷⁸

La OGA exhibe un mecanismo de acción asistido por sustrato (**38**), en el cual el grupo acetamido de la posición C-2 actúa como nucleófilo dando lugar a un intermedio de tipo oxazolina (**39**), con un estado de transición con carácter de catión oxocarbenio (**41**);⁷⁴ en este proceso, los residuos catalíticos clave son Asp174 y Asp175 (**Esquema 3.1**).

-
69. Macdonald, J.M.; Tarling, C.A.; Taylor, E.J.; Dennis, R.J.; Myers, D.S.; Knapp, S.; Davies, G.J.; Withers, S.G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2599–2602.
70. Tropak, M. B.; Mahuran, D., *FEBS J.* **2007**, *274*, 4951–4961.
71. Ong, Q.; Han, W.; Yang, X. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 599.
72. McLarty, J. L.; Marsh, S. A.; Chatham, J. C. *Life Sci.* **2013**, *92*, 621–627.
73. Li, X.; Han, J.; Bujaranipalli, S.; He, J.; Kim, E. Y.; Kim, H.; Im, J. H.; Cho, W.-J. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *238*, 114444.
74. Cekic, N.; Heinonen, J. E.; Stubbs, K. A.; Roth, C.; He, Y.; Bennet, A. J.; McEachern, E. J.; Davies, G. J.; Vocadlo, D. J. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 3742–3750.
75. Hart, G. W.; Housley, M. P.; Slawson, C. *Nature* **2007**, *12*, 1017–1022.
76. Gong, C. X.; Liu, F.; Iqbal, F. *Alzheimers Dement.* **2016**, *12*, 1078–1089.
77. Hastings, N. B.; Wang, X.; Song, L.; Butts, B. D.; Grotz, D.; Hargreaves, R.; Hess, J. F.; Hong, K.-L. K.; Huang, C. R.-R.; Hyde, L.; Laverty, M.; Lee, J.; Levitan, D.; Lu, S. X.; Maguire, M.; Mahadomrongkul, V.; McEachern, E. J.; Ouyang, X.; Rosahl, T. W.; Selnick, H.; Stanton, M.; Terracina, G.; Vocadlo, D. J.; Wang, G.; Duffy, J. L.; Parker, E. M.; Zhang, L. *Mol. Neurodegener.* **2017**, *12*, 39.
78. Bartolomé-Nebreda, J. M.; Trabanco, A. A.; Velter, A. I.; Buijnsters, P. *Exp. Opin. Ther. Pat.* **2021**, *31*, 1117–1154.



Esquema 3.1. Mecanismo catalítico de la hidrólisis mediada por OGA humana.

Los inhibidores clásicos de OGA son miméticos de los intermedios de la hidrólisis o del estado de transición similar al catión oxocarbenio.⁷⁹ Entre ellos, algunos ejemplos de inhibidores potentes de OGA (**Figura 3.8**) son el PUGNAc (**42**, *N*-fenilcarbamato de glucopiranosilideno),⁸⁰ las tiazolinas fusionadas con carbohidratos NAG-tiazolina (inhibidor nanomolar, pero no selectivo, **44**),⁸¹ Thiamet-G⁸² (**45**), y sus derivados,^{74,83,84} GlcNAcstatinas (**47**, glucoimidazoles),⁸⁵ junto con moléculas pequeñas no basadas en carbohidratos.⁸⁶

79. Elbatrawy, A. A.; Kim, E. J.; Nam, G. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 1244–1257.

80. Horsch, M.; Hoesch, L.; Vasella, A.; Rast, D. M. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *197*, 815–818.

81. Macauley, M. S.; Whitworth, G. E.; Debowski, A. W.; Chin, D.; Vocadlo, D. J. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 25313–25322.

82. Yuzwa, S. A.; Macauley, M. S.; Heinonen, J. E.; Shan, X.; Dennis, R. J.; He, Y.; Whitworth, G. E.; Stubbs, K. A.; McEachern, E. J.; Davies, G. J.; Vocadlo, D. J. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 483–490.

83. Kiss, M.; Szabó, E.; Bocska, B.; Sinh, L. T.; Fernandes, C. P.; Timári, I.; Hayes, J. M.; Somsák, K.; Barna, T. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *223*, 113649.

84. Selnick, H. G.; Hess, J. F.; Tang, C.; Liu, K.; Schachter, J. B.; Ballard, J. E.; Marcus, J.; Klein, D. J.; Wang, X.; Pearson, M.; Savage, M. J.; Kaul, R.; Li, T.-S.; Vocadlo, D. J.; Zhou, Y.; Zhu, Y.; Mu, C.; Wang, Y.; Wei, Z.; Bai, C.; Duffy, J. L.; McEachern, E. J. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 10062–10097.

85. Dormmueller H. C.; Borodkin, V. S.; Schipl, M.; Aalte, D. M. F. *Biochem. J.* **2009**, *420*, 221–227.

86. Martínez-Vituro, C. M.; Trabanco, A. A.; Royes, J.; Fernández, E.; Tresadern, H.; Vega, J.A.; del Cerro, A.; Delgado, F.; Molina, A. G.; Tovar, F.; Shaffer, P.; Ebneith, A.; Bretteville, A.; Mertens, L.; Somers, M.; Alonso, J. M.; Bartolomé-Nebreda, J. M. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 14017–14044.

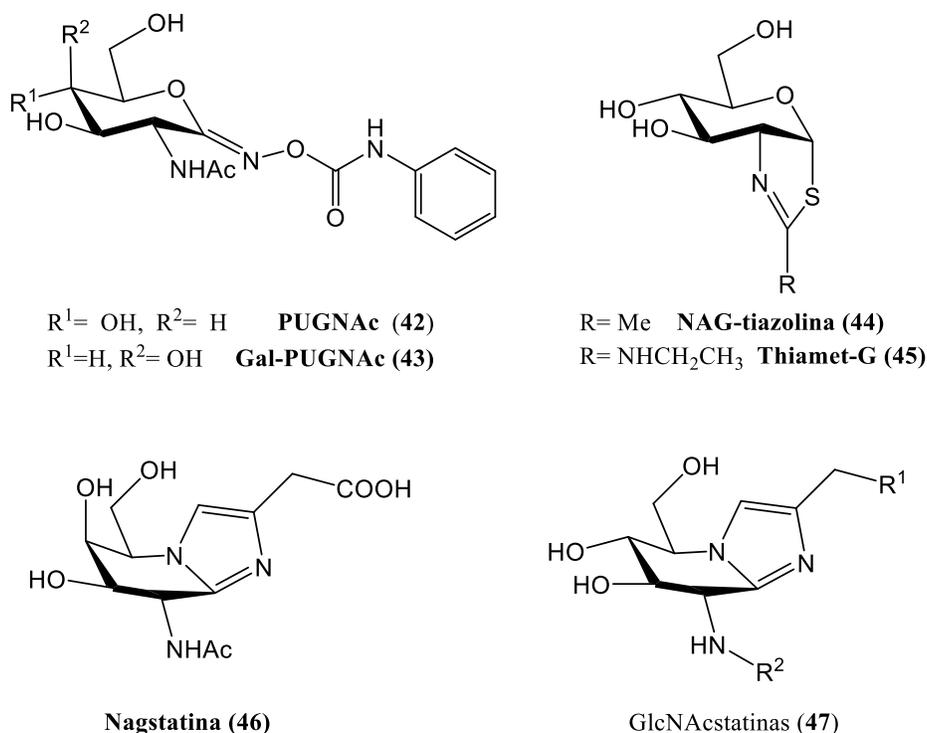


Figura 3.8. Inhibidores de la β -N-acetil-hexosaminidasa NGT Y PUGNAc

PUGNAc (**42**) es un inhibidor no selectivo de O-GlcNAcasa ($K_i = 46$ nM) y de β -hexosaminidasa ($K_i = 36$ nM).⁸⁷ Dado que las Hex A y Hex B pueden procesar tanto la configuración *D-gluco* como *D-galacto*, se ha investigado la actividad del epímero en C-4 de **42**, Gal-PUGNAc (**43**, **Figura 3.8**), que resultó ser un potente inhibidor selectivo frente a ambas hexosaminidasas, con constantes de inhibición $K_i = 18 \pm 1$ nM para la HexB y $K_i = 51 \pm 3$ nM para la HexA.⁸⁸

Las GlcNAcstatinas **47** son otra familia que han mostrado ser potentes inhibidores de hexosaminidasas. Esta familia tiene similitudes estructurales con PUGNAc y la nagstatina natural **46** (**Figura 3.8**). Las GlcNAcstatinas **47a-d** mostraron inhibición de la enzima humana

87. Kong, H.; Chen, W.; Liu, T.; Lu, H.; Yang, Q.; Dong, Y.; Liang, X.; Jin, S.; Zhang, J. *Carbohydr. Res.* **2016**, *419*, 54–61.

88. Stubbs, K. A.; Macauley, M. S.; Vocadlo, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 1300–1303.

en el rango nanomolar y subnanmolar, siendo los derivados **47b** y **47d** los más potentes frente a la inhibición de hOGA con valores de K_i de 0.42 y 0.74 nM respectivamente (**Tabla 3.3**).⁸⁵

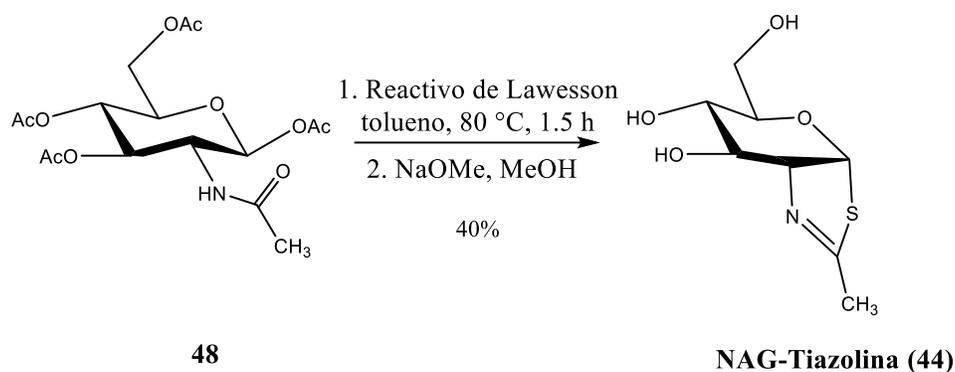
Tabla 3.3. Valores de K_i (nM) de las GlcNAstatins **47** frente a Hex A/B y hOGA

| Compuesto | Hex A/B K_i | hOGA, K_i |
|------------|---------------|-------------|
| 47a | 0.55 ± 0.05 | 4.3 ± 0.2 |
| 47b | 0.17 ± 0.06 | 0.42 ± 0.06 |
| 47c | 550 ± 10 | 4.4 ± 0.1 |
| 47d | 2.7 ± 0.4 | 0.74 ± 0.09 |

No obstante, la inhibición simultánea de OGA y de HexA/B puede conducir a importantes efectos secundarios (ya se ha indicado previamente que la inactivación de Hex A y B conduce a enfermedades de almacenamiento lisosomal). Es por ello que, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la EA, es importante que se diseñen inhibidores selectivos frente a OGA, sin afectar a las otras hexosaminidasas. En este contexto, resultaron de gran interés las 1,3-tiazolinas derivadas de carbohidrato,⁸⁹ como el Thiamet-G (**45**, **Figura 3.8**); será este tipo de estructura el hilo conductor de una parte importante del presente capítulo de Tesis Doctoral.

Knapp y Vocadlo³⁵ describieron la síntesis de NAG-Tiazolina **44**, utilizando el reactivo de Lawesson sobre la *N*-acetil-D-glucosamina **52**; esto condujo a la formación de la correspondiente tioamida, que experimentó una reacción tipo SN2 intramolecular, promovida por calentamiento en tolueno, entre el átomo de azufre de la tioamida y el carbono anomérico, con la expulsión del acetato de dicha posición (**Esquema 3.2**). La desprotección final en condiciones de Zemplen (NaOMe metanólico) condujo a **44**.

89. Stubbs, K. A.; Balcewich, M.; Mark, B. L.; Vocadlo, C. J. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 21382–21391.



Esquema 3.2 Síntesis de NAG-tiazolina (**44**).

La NAG-tiazolina (**44**) resultó ser un potente inhibidor competitivo de *N*-acetilhexosaminidasa de guisantes de Jack, con una $K_i = 280$ nM, uniéndose casi 20 000 veces más firmemente que el azúcar original, la *N*-aceti- β -D-glucosamina ($K_i = 5$ mM).⁹⁰ Aunque menos potente, su actividad puede ser comparada con algunos de los inhibidores más potentes de esta enzima, los iminoazúcares 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina ($K_i = 140$ – 230 nM) y 2-acetamido-2-desoxinojirimicina ($K_i = 1.2$ nM).⁹⁰ Además, es un potente inhibidor de OGA ($K_i = 70$ nM) y de β -hexosaminidasa ($K_i = 70$ nM).

Thiamet-G (**45**), que resulta de la sustitución del grupo 2-metilo en el sistema heterocíclico de **44** por un grupo etilamino resultó ser un inhibidor potente y selectivo de la enzima humana OGA, teniendo una inhibición competitiva con $K_i = 21 \pm 3$ nM;⁸² es importante destacar que frente a la β -hexosaminidasa lisosomal humana exhibió valores de $K_i = 750 \pm 60$ nM. La actividad frente a OGA fue recientemente reestudiada⁷⁴ y refinada, sustituyendo la representación de Lineweaver-Burk por el método de Morrison, que proporciona valores más precisos de constantes de inhibición para el tipo de inhibición mostrado por el compuesto; esto arrojó un valor de K_i 10 veces menor (2.1 nM), por lo que se puede hablar de una selectividad excepcional frente a OGA por parte de Thiamet-G (**45**).

90. Knapp, S.; Vocadlo, D.; Gao, Z.; Kirk, B.; Lou, J.; Withers, S. G., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6804–6805.

Además, es un producto estable en medios acuosos, y un potencial inhibidor permeable a la barrera hematoencefálica.⁸² Se ha descrito que Thiamet-G disminuye la fosforilación de la proteína *tau* *in vitro* e *in vivo*.⁸² Cuando **45** se administró por vía oral (disuelto en el agua ingerida por el animal) en un modelo de ratón tau/APP, donde coexisten las patologías β -amiloide y tau, imitando un estado avanzado de la EA, el Thiamet G incrementó los niveles de *O*-GlcNAc y evitó la disfunción cognitiva.⁹¹ En este caso, esto fue atribuido, no a la modificación de los niveles de hiperfosforilación en la proteína tau, sino a la disminución, o incluso eliminación de péptidos β -amiloides. Posteriormente se demostró⁹² que los inhibidores de la OGA actúan a través de un mecanismo de autofagia, que permite una disminución de los niveles de los péptidos neurotóxicos en el cerebro.

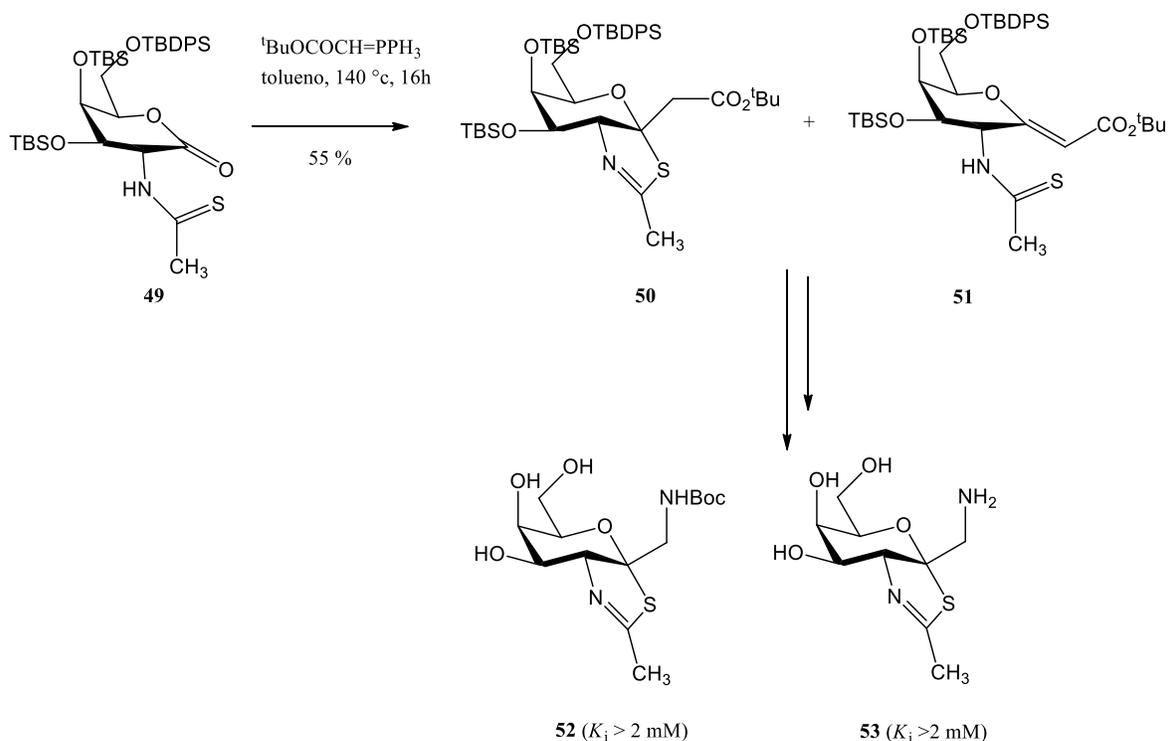
El compuesto **MK-8719**, un derivado fluorado del Thiamet-G resultante de la sustitución del fragmento hidroximetilo exocíclico por un grupo difluorometilo, se diseñó para incrementar la lipofilia del Thiamet-G, y, por tanto, favorecer la penetración al SNC; actualmente se encuentra en fase clínica I.⁸⁴

Amorelli y *col*⁹³ describieron la síntesis de GalNAc-tiazolinas y sus homólogos en C-1 (ej. **52**, **53**), como análogos de GlcNAc-tiazolina (**44**). El paso de esta síntesis es el tratamiento de la lactona **49** con *tert*-butoxicarbonilmetilentrifenilfosforano, dando una mezcla del éster de la tiazolina **50** y el derivado insaturado **51** (**Esquema 3.3**). La posterior desprotección de la mezcla de productos obtenida, seguido de algunas etapas adicionales, condujo a **52** y **53**. Los estudios de inhibición de **52** y **53** frente a SpHex (*N*-acetilhexosaminidasa de *Streptomyces plicatus*) reveló afinidades muy reducidas frente a dicha enzima, en relación con las tiazolinas originales ($K_i = 20 \mu\text{M}$ para GlcNAc-tiazolina y $K_i = 100 \mu\text{M}$ para GalNAc-tiazolina)

91. Yuzwa, A.A.; Shan, X.; Jones, B.A.; Zhao, G.; Woodward, M.L.; Li, X.; Zhu, Y.; McEachern, E.J.; Silverman, M.A.; Watson, N.V.; Gong, C.-X.; Vocadlo, D.J. *Mol. Neurodegener.* **2014**, *9*, 42.

92. Zhu, Y.; Shan, X.; Safarpour, F.; Go, N.R.; Li, N.; Shan, A.; Huang, M.C.; Deen, M.; Holicek, V.; Ashmus, R.; Madden, Z.; Gorski, S.; Silverman, M.A.; Vocadlo, D.J. *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, *9*, 1366–1379.

93. Amorelli, B.; Yang, C.; Rempel, B.; Withers, S. G.; Knapp, S. *Bioorg. Med. Lett.* **2008**, *18*, 2944–2947.

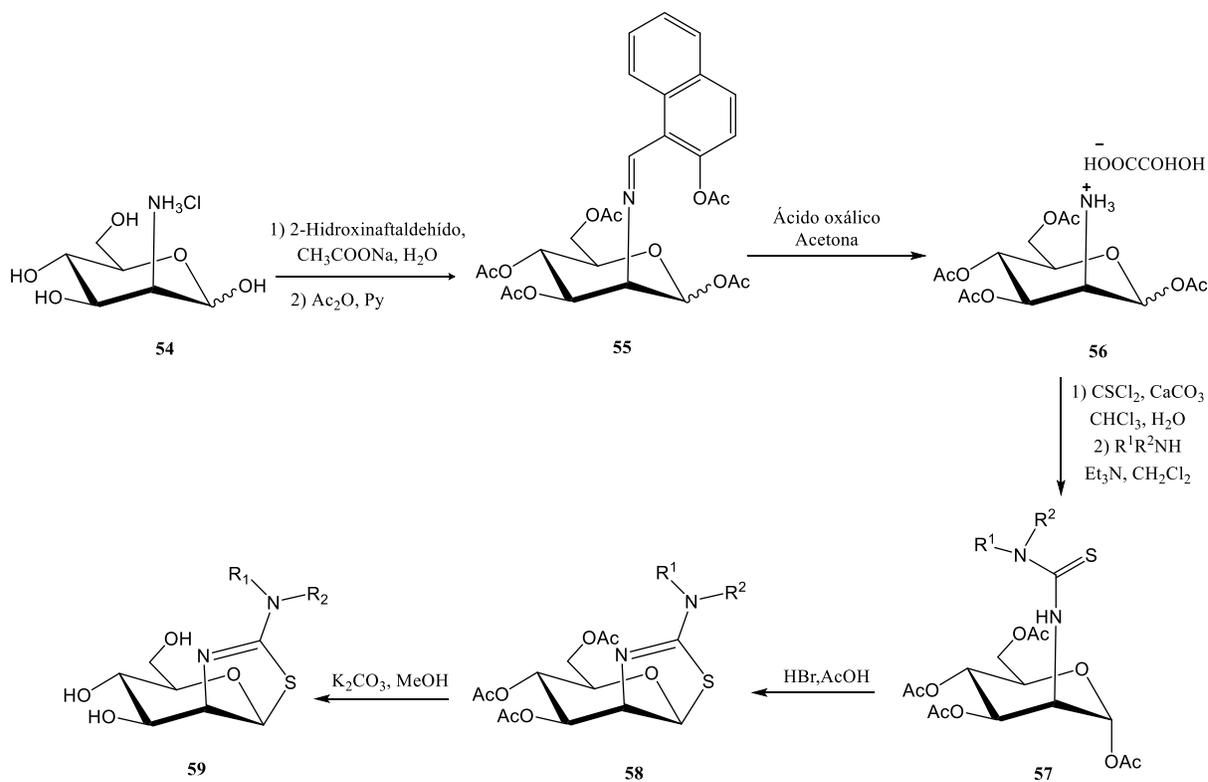


Esquema 3.3. Síntesis de GalNAc-tiazolinas **52** y **53**.

Kong y *col*⁹⁴ describieron la síntesis de una serie de derivados *N*-sustituidos de manotiazolinas; a tal efecto, la síntesis comenzó con el hidrocloreuro de D-manosamina **54**, que se protegió en forma de base de Schiff, seguido de acetilación de los hidroxilos del carbohidrato, y *N*-desprotección en condiciones ácidas suaves, para dar lugar a la manosamina *O*-acetilada **56** (**Esquema 3.4**). El tratamiento de **56** con tiofosgeno para dar el correspondiente isotiocianato, seguido de acoplamiento con aminas, condujo a las tioureas **57**. Para efectuar la ciclación del átomo de azufre de la tiourea sobre el carbono anomérico, en lugar de llevar a cabo la sustitución en condiciones térmicas, **57** se transformó en el correspondiente bromuro de glicosilo (HBr/AcOH), y tras la sustitución nucleófila intramolecular, los acetatos se desprotegeron en medio básico (K_2CO_3), originando las tiazolinas bicíclicas desprotegidas **59** (**Esquema 3.4**). Se comprobó que los derivados que portaran sustituyentes R^1/R^2 con cadenas lineales y de máximo tres átomos de carbono (Me, Et, Pr, Me/Me, Me/Pr), fueron los inhibidores más potentes de la serie frente a hOGA ($K_i =$

94. Kong, H.; Chen, W.; Liu, T.; Yang, Q.; Dong, Y.; Liang, X.; Jin, S.; Zhang, J. *Carbohydr. Res.* **2016**, *429*, 54–61.

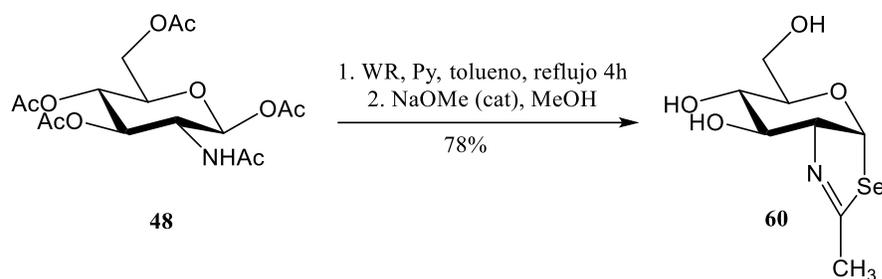
6.4-28.5 μM), y si bien eran inhibidores más modestos que los clásicos tipos NAG-tiazolina o Thiamet-G sí mantenían una buena selectividad frente a HexB ($K_i > 100 \mu\text{M}$).



Esquema 3.4. Síntesis de 2-aminotiazolinas de configuración D-mano.

Por otra parte, Kim y *col.*⁹⁵ describieron la síntesis de que es, hasta la fecha, la única GlcNAc selenazolina; para ello emplearon como materia prima la *N*-acetil- β -D-glucosamina pentaacetilada **48**, que fue tratada con el reactivo de Woollins (WR) para transformarla en la correspondiente selenoamida, seguido de *O*-desacetilación en medio básico, originando así la GlcNAc selenazolina **60** con un rendimiento del 78% (**Esquema 3.5**). Con una $K_i = 0.7 \mu\text{M}$ frente a OGA, el derivado **60** fue significativamente menos activo que las tiazolinas isósteras; se argumentó que quizás, la mayor longitud del enlace C-Se, junto con la menor capacidad de aceptar enlaces de hidrógeno, son responsables de la disminución de dicha actividad.⁹⁵

95. Kim, E. J.; Love, D. C.; Darout, E.; Abdo, M.; Rempel, B.; Withers, S. G.; Rablen, P. R.; Hanover, J. A.; Knapp, S., *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7058–7064.



Esquema 3.5. Síntesis de la GICNAc selenazolina.

Compuestos organoselénicos y cáncer

El cáncer consiste en el crecimiento acelerado de algunas células del cuerpo, que se multiplican sin control y se diseminan a otras partes del organismo, siendo posible que esta patología se desarrolle en cualquier parte del cuerpo humano. El cáncer, una enfermedad tremendamente compleja y de naturaleza multifactorial, es considerado realmente como un conjunto de aproximadamente 100 tipos diferentes de enfermedades, presentado diversas causas y síntomas.⁹⁶

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo (**Figura 3.1**); tan solo en el año 2020 se reportaron alrededor de 10 millones de defunciones. Se calcula que para el año 2040 el número de nuevos casos de cáncer por año aumentará a 29.5 millones, mientras que el número de muertes por cáncer será de 16.4 millones.⁹⁷ El cáncer de mama femenino el más frecuentemente diagnosticado, con aproximadamente 2.3 millones de nuevos casos (11.7% del total), mientras que el cáncer de pulmón es la causa principal de muerte por cáncer, con un valor estimado de 18 millones de muertes (18%).⁹⁸

Los tratamientos actuales contra el cáncer incluyen principalmente quimioterapia, radioterapia, y cirugía. Sin embargo, estos tratamientos a menudo carecen de selectividad y causan toxicidad en los tejidos sanos.⁹⁹ Por lo tanto, existe un gran interés en el descubrimiento de nuevos agentes quimioterapéuticos, con selectividad mejorada.

96. Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>. Último acceso: 3 de Mayo de 2022.

97. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Último acceso: 3 de Mayo de 2022.

98. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249.

99. Ribas, A.; Wolchok, J. D. *Science*, **2018**, *359*, 1350–1355.

En este contexto, el selenio surgió como una aproximación interesante para el desarrollo no sólo de potenciales agentes antitumorales, sino en general, de productos con marcada actividad biológica. Es esta aproximación la que se empleará en este capítulo de la Tesis Doctoral. El selenio se encuentra involucrado en numerosas funciones fisiológicas del cuerpo humano y desempeña un papel importante en la prevención y el tratamiento del cáncer.

El selenio fue descubierto en 1817 por el químico sueco Jöns Jakob Berzelius¹⁰⁰ (padre de la química sueca) y fue considerado un elemento tóxico para humanos y mamíferos durante casi 150 años,¹⁰¹ cuya ingesta en exceso origina selenosis, o envenenamiento por selenio. Sin embargo, en 1957, los beneficios del selenio para humanos y otros mamíferos fueron revelados en estudios llevados a cabo por Schwartz y Foltz, quienes demostraron que el selenio dietético protegía a las ratas frente a la necrosis hepática.¹⁰² Posteriormente el selenio fue reconocido como un nutriente esencial¹⁰³ de los animales y los seres humanos, encontrándose en algunas selenoproteínas;¹⁰⁴ en dichas selenoproteínas se encuentra la selenocisteína, considerada actualmente como el aminoácido número 21, responsable de las numerosas y primordiales funciones biológicas llevadas a cabo por las familias de tipo glutatión peroxidasa (GPx's), tioredoxina reductasas (TRXR's), o yodotironina deiodinasas (DIO's), entre otras.^{105,106,107} En cuanto a los niveles de selenio en el organismo, es cierto que la horquilla entre el límite nutricional, por debajo del cual se desarrollan una serie de enfermedades, y el límite tóxico, por encima del cual puede producirse selenosis.^{108,109} es pequeña. La ingesta diaria de Se recomendada para adultos se establece en 55 µg (0.7 µmol/día). Las personas con una ingesta diaria menor a ~ 15 µg pueden

100. Berzelius, J. J. *Afhandl. Fys. Kemi Mineralogi*. **1818**, 42.

101. Franke, K.W. *J. Nutr.* **1934**, 8, 597–608.

102. Schwarz, K.; Foltz, C.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 3292–3293

103. Iwaoka, M.; Arai, K. *Curr. Chem. Biol.* **2013**, 7, 2–24.

104. Wessjohann, L. A.; Shneider, A.; Abbas, M.; Brandt, W. *Biol. Chem.* **2007**, 388, 997–1006.

105. Bellinger, F. P.; Raman, A. V.; Reeves, M. A.; Berry, M J.; *Biochem. J.*, **2009**, 422, 11–22.

106. Tiekink, E. R. T. *Dalton Trans.* **2012**, 41, 6390–6395.

107. Tinggi, U. *Environ. Health Prev. Med.* **2008**, 13, 102–108.

108. Smrkolj, P.; Pograjc, I.; Hlastan-Rib, C.; Stibilj, V. *Food Chem.* **2005**, 90, 691–697.

109. Peng, X., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Pan, K., Lai, W. and Zhou, Y. *Biol. Trace Elem. Res.*, **2012**, 148, 182–186.

experimentar enfermedades relacionadas con la deficiencia de Se, mientras que aquellos cuya ingesta sea superior a 400 µg/ día son propensos a la toxicidad por Se.¹¹⁰

Los compuestos organoselénicos han mostrado un interés incesante desde los años 70, tanto como intermedios clave en Síntesis Orgánica¹¹¹, como catalizadores¹¹², y por sus numerosas funciones biológicas. En este contexto, numerosos compuestos organoselénicos, tanto naturales, como sintéticos, se comportan como excelentes agentes antioxidantes,¹¹³ útiles en el control del estrés oxidativo; se trata este de un estado celular donde existe una elevada concentración de especies pro-oxidantes, las llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS) o del nitrógeno (RNS).¹¹⁴ Estas sustancias (ej. radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radicales alquilperóxido, óxido nítrico, o peroxinitrito) se generan de manera endógena (especialmente en el proceso de respiración mitocondrial), o son inducidas por agentes exógenos (ej. tabaco, ciertos contaminantes). Cuando existe un desequilibrio entre la formación de estas sustancias, y la acción de los antioxidantes naturales, se produce el estrés oxidativo, que puede provocar la degradación oxidativa de las biomoléculas. El estrés oxidativo está relacionado directamente con procesos de inflamación crónica, y con una amplia variedad de procesos degenerativos, como el envejecimiento celular, daño cardíaco, o enfermedades tipo Parkinson o Alzheimer.¹¹⁵ Además, una concentración excesiva de ROS también se relaciona con los estados iniciales de propagación de numerosos tipos de células tumorales.¹¹⁶

Numerosos compuestos organoselénicos también se comportan como antimicrobianos,¹¹⁷ anti-inflamatorios¹¹⁸ y anticancerígenos, y algunas de estas actividades está relacionada con su marcadas propiedades redox.¹¹⁹ En la **Figura 3.9** se muestran, a

110. Stoffaneller, R.; Morse, N.; *East. Nutrients*. **2015**, *7*, 1494–1573.

111. Ma, Y. T.; Liu, M. C.; Zhou, Y. B.; Wu, H. Y. *Adv. Synth. Catal.* **2021**, *363*, 5386–5406.

112. Cao, H.; Liu, M.; Qian, R.; Zhang, X.; Yu, L.; *Appl. Organometal Chem.* **2019**, *33*, e4599.

113. a) Ibrahim, M.; Hassan, W.; Deobald, A. M.; Braga, A. L.; Rocha, J. B. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *149*, 399–404. b) Bhabak, K. P.; Mughesh, G. *Acc. Chem. Res.*, **2010**, *43*, 1408–1419.

114. Kohen, R.; Nyska, A. *Toxicol. Pathol.* **2002**, *30*, 620–650.

115. a) Li, J.; O, W.; Li, W.; Jiang, Z-G. Ghanbari, H. A. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 24438–24475. b) Costa, V. M.; Carvalho, F.; Duarte, J.A.; Bastos, M. L.; Remião, F. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 1285–1311.

116. Mencialha, A.; Victorino, V. J.; Cecchini, R.; Panis, C. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 1127–1140.

117. Victoria, F. N.; Radatz, C. S.; Sachini, M.; Jacob, R. G.; Alves, D.; Savegnago, L.; Perin, G.; Motta, A. S.; Silva, W. P.; Lenardão, E. J. *Food Control*, **2012**, *23*, 95–99.

118. Uzma, N.; Kumar, S.; Priyadarsini, K. I. *Biol. Trace Elem. Res.*, **2011**, *142*, 723–734.

119. Suzuki, M.; Endo, M.; Shinohara, F.; Echigo, S.; Rikiishi, H. *Cancer. Chemother. Pharmacol.*, **2010**, *66*, 475–484.

modo de ejemplo, algunos compuestos organoselénicos sencillos (**61–64**) con diversas actividades biológicas.

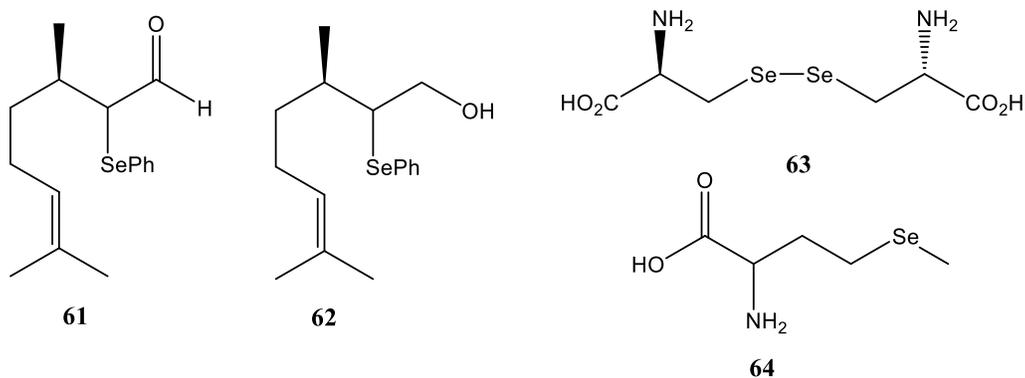


Figura 9. Ejemplos de compuestos organoselénicos bioactivos: Antimicrobianos (**61**, **62**), hepatoprotector, actividad inmunomoduladoras y anti-inflamatorio (**63**), antitumoral (**64**)

Los grupos de investigación donde se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral poseen una amplia experiencia en la síntesis de compuestos organoselénicos con actividad biológica. Se han descrito, por ejemplo, (**Figura 3.10**) la preparación de selenocarbamatos/selenoureas/selenohidantoínas (**65–68**) como agentes antioxidantes, por ejemplo, en cuanto la captación de H_2O_2 o de radicales libres.¹²⁰

120. Merino-Montiel, P.; Maza, S.; Martos, S.; López, Ó.; Maya, I.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48*, 582–592.

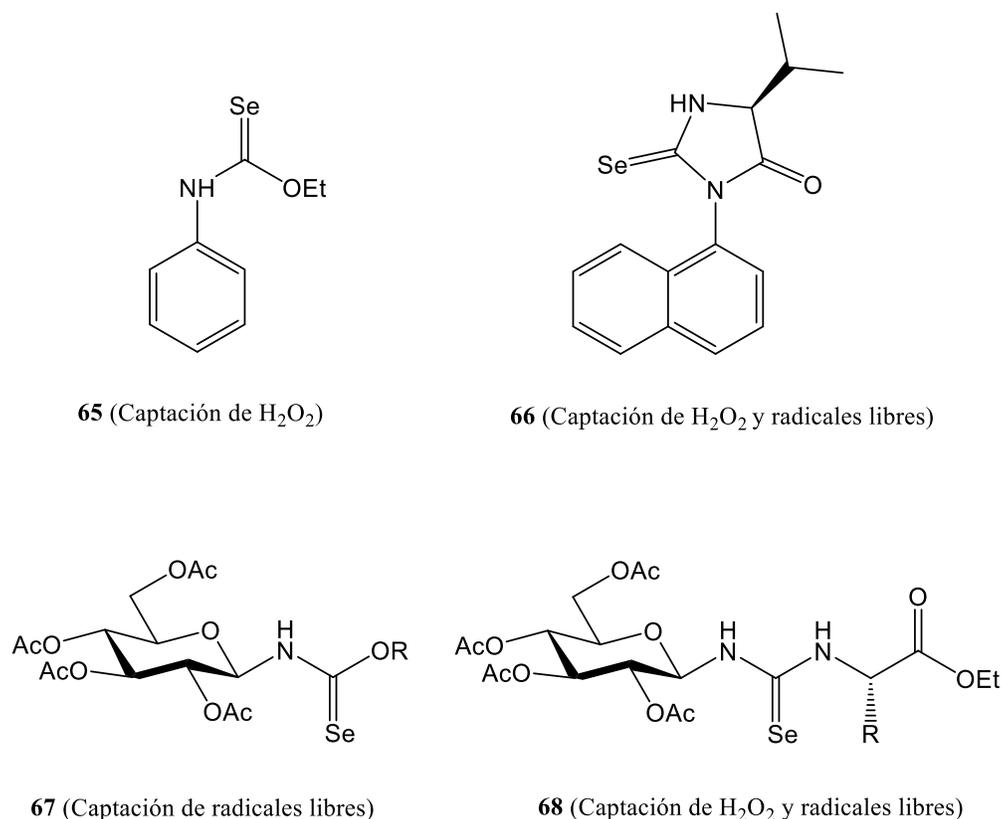


Figura 3.10. Ejemplos de algunos selenocarbamatos, selenoureas y selenohidantoínas como agentes antioxidantes preparados en el grupo de investigación.

Estos mismos grupos han llevado a cabo la síntesis de selenoderivados de polifenoles (**69**)¹²¹⁻¹²³ y esteroides (**70**)^{124,125} como agentes antitumorales, selenoiminoazúcares (**71**)¹²⁶ como inhibidores de enzimas relacionadas con enfermedades de almacenamiento lisosomal

-
121. Begines, P.; Oliete, A.; López Ó.; Maya, I.; Plata, G. B.; Padrón, J. M.; Fernández-Bolaños, J.G. *Future Med. Chem.* **2018**, *10*, 319–334.
122. Maset, A.; Begines, P.; López Ó.; Maya, I.; García-Aranda, N.; Schwartz Jr, S.; Abasolo, I.; Fernández-Bolaños, J.G. *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 2185–2195.
- 123 Calcatierra, V.; López Ó.; Fernández-Bolaños, J.G.; Plata, G. B.; Padrón, J. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *94*, 63–72.
124. Fuentes-Aguilar, A.; Romero-Hernández, L. L.; Arenas-González, A.; Merino-Montiel, P.; Montiel-Smith, S.; Meza-Reyes, S.; Vega-Baez, J. L.; Plata, G. B.; Padrón, J. M.; López Ó.; Fernández-Bolaños, J.G. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 5041–5054.
125. Romero-Hernández, L. L.; Merino-Montiel, P.; Montiel-Smith, S.; Meza-Reyes, S.; Vega-Baez, J. L.; Abasolo, I.; Schwartz Jr, S.; López Ó.; Fernández-Bolaños, J.G. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *99*, 67–81.
126. Olsen, J. I.; Plata, G. B. Padrón, J. M.; López Ó.; Bols, M.; Fernández-Bolaños, J.G. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *123*, 155–160.

y desórdenes neurológicos, y selenoderivados de tacrina (**72**)¹²⁷ como agentes anti-Alzheimer (Figura 3.11).

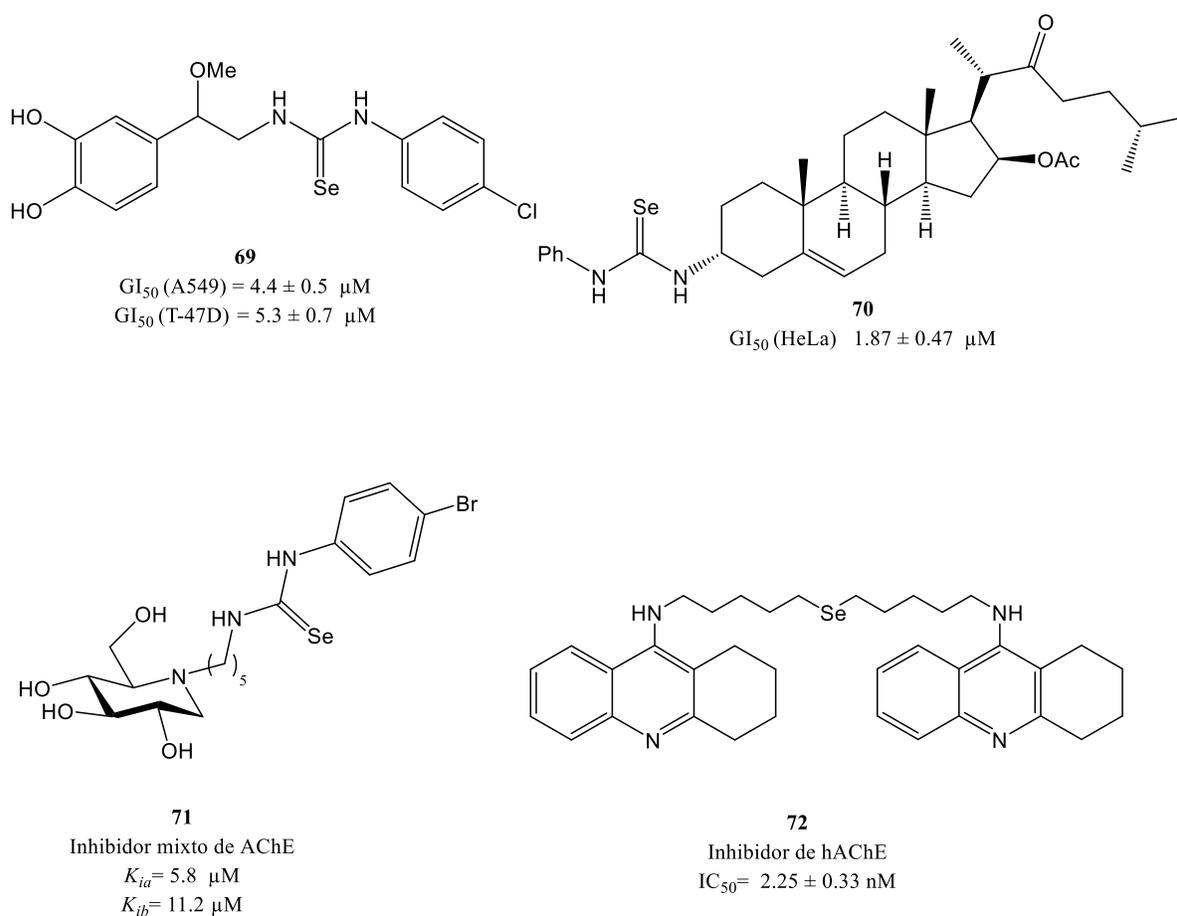


Figura 3.11. Ejemplos de algunos compuestos organoselénicos como agentes antiproliferativos o anti- Alzheimer

Dentro de los numerosos compuestos organoselénicos descritos en la bibliografía, destaca muy especialmente el ebselén (EBS, 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3-(2*H*)-ona, **73**) (Figura 3.12), que ha mostrado una alta capacidad antioxidante, actuando como un mimético de la glutatión peroxidasa,¹²⁸ una enzima que actúa como defensa natural frente al estrés oxidativo. Además, el ebselén se ha estudiado en fase clínica para el trastorno bipolar, como

127. Roldán-Peña, J. M.; Alejandre-Ramos, D.; López Ó.; Maya, I.; Lagunes, I.; Padrón, J. M.; Peña-Altamira, L. E.; Bartolini, M.; Monti, B.; Bolognesi, M. L.; Fernández-Bolaños, J.G. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 761–773.

128. Parnham, M. J.; Sies, H. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *86*, 1248–1253.

mimético del catión Li^+ .¹²⁹ Por otro lado, el etaselén (BBSKE) (2,2'-(1,2-etanodil)bis(1,2-benzoselenazol-3(2*H*)-ona, **74**) ha demostrado tener actividad antioxidante y antiinflamatoria, así como importantes efectos antitumorales en células de pulmón.¹³⁰

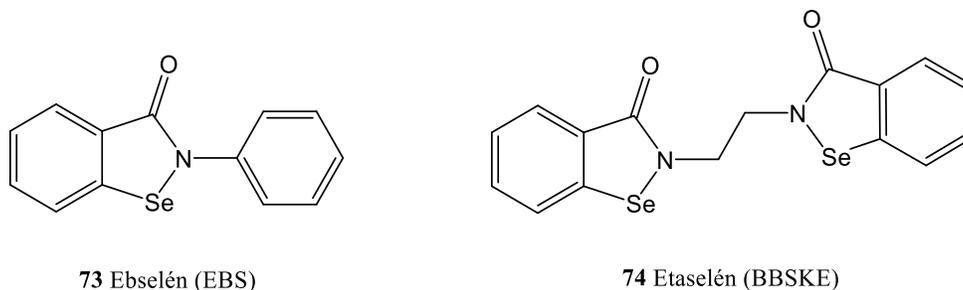


Figura 3.12. Estructuras del ebselén y etaselén

Dentro de las numerosas familias de selenoheterociclos descritos hasta la fecha destacan las 2-selenazolininas, selenazoles, selenadiazoles, o 1,3-selenazinas (**75–78**), entre otros (**Figura 3.13**).

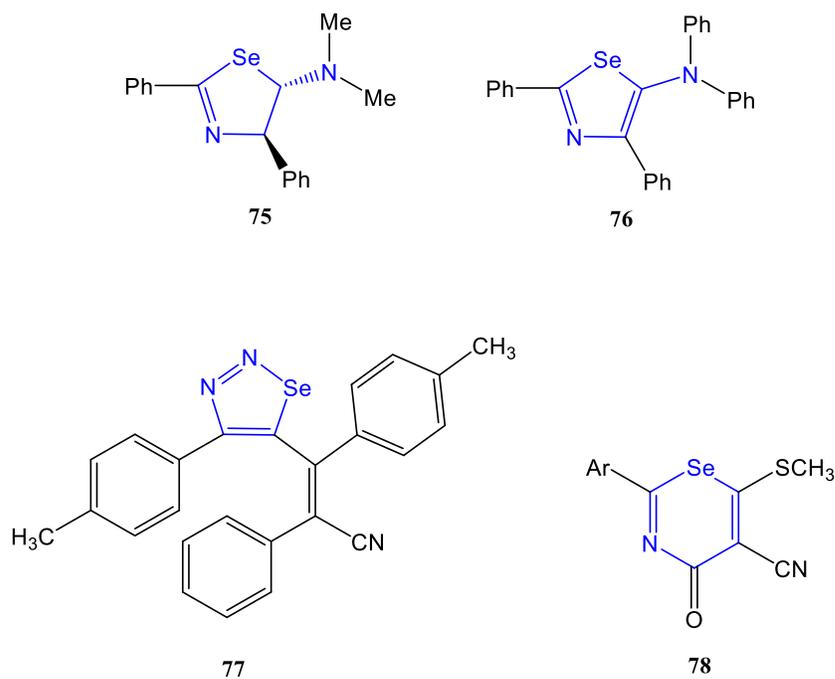


Figura 3.13. Ejemplos de selenoheterociclos.

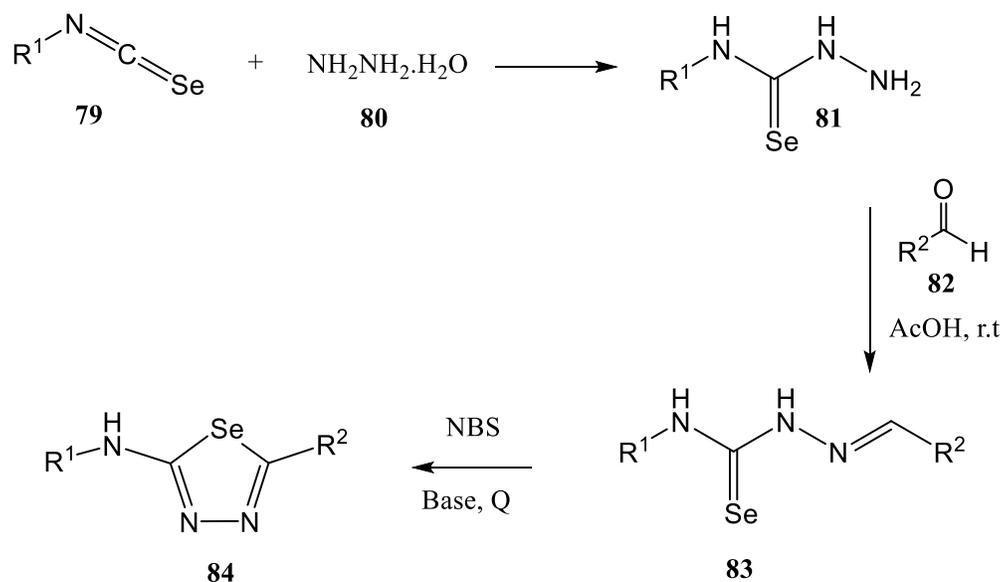
129. Singh, N.; Halliday, A.C.; Thomas, J.M.; Kuznetsova, O.; Baldwin, R.; Woon, E.C.Y.; Aley, P.K.; Antoniadou, I.; Sharp, T.; Vasudevan, S.R.; Churchill, G.C. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1332.

130. Ye, S. F.; Ji, S. M.; Zeng, H. H.; Lu, W. *Acta Pharmacol. Sin.* **2017**, *38*, 223–232.

En este apartado de la Tesis Doctoral se abarcará la síntesis de selenadiazoles derivados de D-glucosa y 2-selenazolininas derivadas de D-glucosamina. Por este motivo, a continuación, se describirán aspectos relevantes en la síntesis de estos selenoheterociclos descritos en la bibliografía.

Li y *et al.*¹³¹ describieron la síntesis de 2-amino-1,3,4-selenadiazoles en un proceso *one-pot* a partir de isoselenocianatos **79**, hidracina monohidratada (**80**) y aldehídos aromáticos (**82**). Este procedimiento les permitió obtener de forma simple diversos 2-aminoselenadiazoles con rendimientos de buenos a moderados (57-82%). En primer lugar, se lleva a cabo la formación de las selenosemicarbazidas **81**, que se obtienen de manera sencilla a partir de los correspondientes isoselenocianatos e hidracina (**Esquema 3.6**).

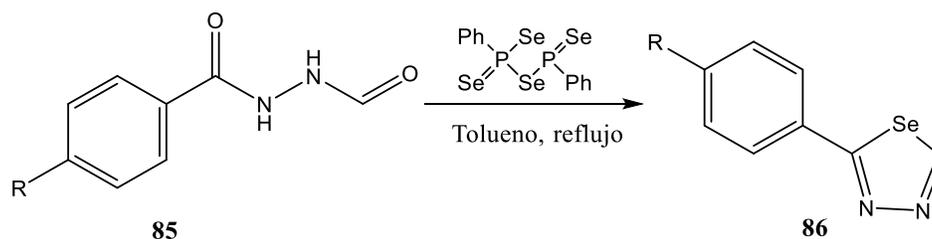
Posteriormente se lleva a cabo el acoplamiento con diferentes aldehídos para dar como resultado las selenosemicarbazonas **83** y finalmente la ciclación intramolecular promovida por NBS, y su posterior aromatización dio como resultado los 2-amino-1,3,4-selenadiazoles **84** (**Esquema 3.6**).



Esquema 3.6. Síntesis de 2-amino-1,3,4-selenadiazoles.

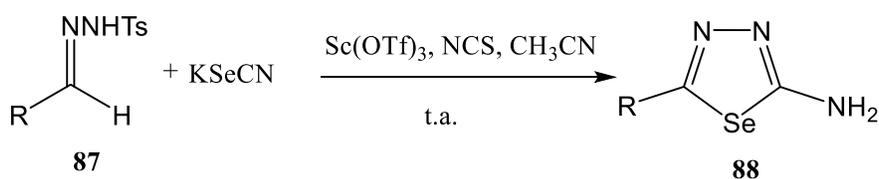
131. Li, X.; Gan, B.; Xie, T.; Yang, P.; Xie, Y.; *J. Chem. Res.* **2016**, *40*, 178–181.

Wojciech y col.¹³² describieron (**Esquema 3.7**) la síntesis de 1,3,4-selenadiazoles **86** a partir de *N,N'*-diacilhidracinas utilizando el reactivo de Woollins (análogo del reactivo de Lawesson, excelente reactivo selenante) para la síntesis. Los productos se obtuvieron con rendimientos moderados (26-57%). El mecanismo de este tipo de reacciones es desconocido, pero es probable que se lleve a cabo la selenación de los grupos carbonilo para la ciclación con desprendimiento de selenuro de hidrógeno.



Esquema 3.7. Síntesis de 1,3,4-selenadiazoles monosustituidos.

Wei y col.¹³³ describieron la síntesis de 2-amino-1,3,4-selenadiazoles **88** con rendimientos moderados a partir de *N*-tosilhidrazona utilizando selenocianato de potasio, a temperatura ambiente. El efecto electrónico sobre el anillo aromático de las *N*-tosilhidrazonas tuvo poca influencia en la reacción (**Esquema 3.8**).

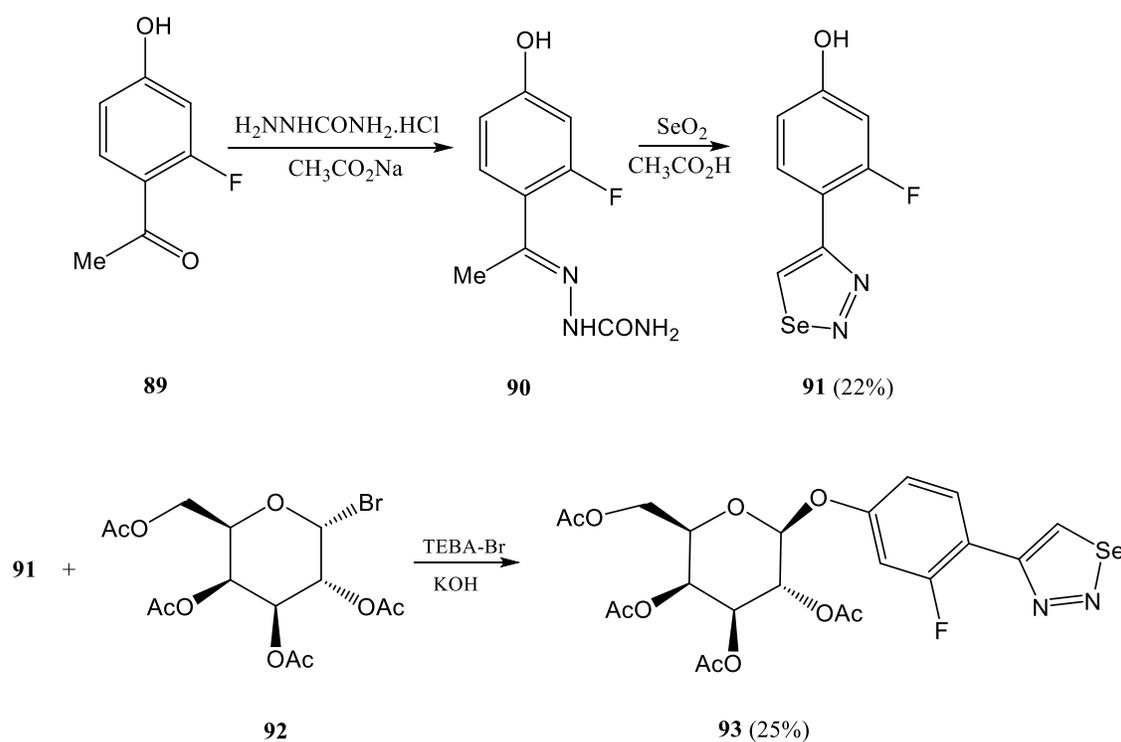


Esquema 3.8. Síntesis de 2-amino-1,3,4-selenadiazoles.

132. Ostrowski, W.; Gierczyk, B.; Frański, R. *J. Heterocycl. Chem.* **2012**, *49*, 1266–1268.

133. Wei, Z.; Zhang, Q.; Tang, M.; Zhang, S.; Zhang, Q. *Org. Lett.* **2021**, *23*, 4436–4440.

Stepanova y col.¹³⁴ describieron la síntesis de un 1,2,3-selenadiazol derivado de carbohidrato a partir de 2-fluoro-4-hidroxiacetofenona **89** (**Esquema 3.9**). Para ello se hizo reaccionar la cetona **89** con el clorhidrato de la semicarbazida en presencia de acetato de sodio, dando la semicarbazona **90** como un solo isómero. Posteriormente se llevó a cabo la oxidación de la semicarbazona con SeO₂, aislándose el compuesto **91** con un rendimiento moderado (22%); el acoplamiento de este con la acetobromogalactosa per-*O*-acetilada **92** condujo al selenoheterociclo **93** (25%).

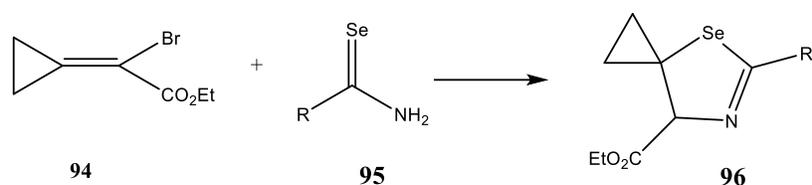


Esquema 3.9. Síntesis de 4-(2-Fluoro-4-hidroxifenil)-1,2,3-selenadiazol.

Huang y col.¹³⁵ describieron la síntesis de las 1,3-selenazolinas espiránicas **96** (**Esquema 3.10**) utilizando 2-bromo-2-ciclo-propilidenacetato de etilo y diversas arilselenoamidas, con excelentes rendimientos (82-88%).

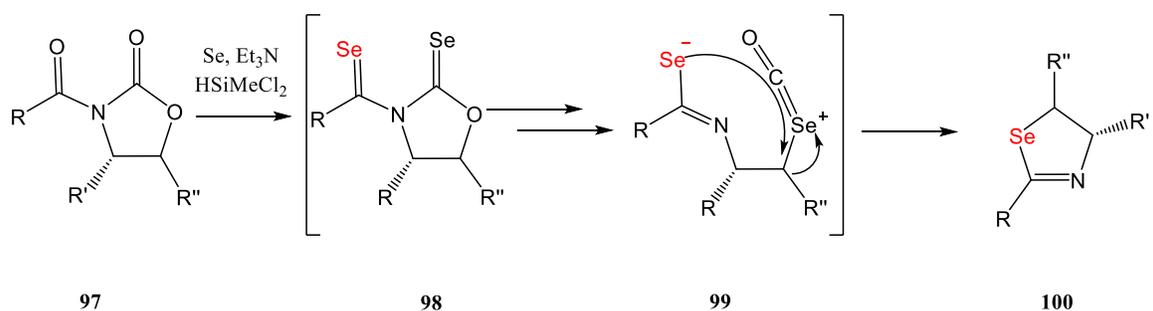
134. Stepanova, O. V.; Pevzner, L. M.; Petrov, M. L.; Stepanova, N. P.; Sokolova, N. B.; Stepanov, A. V. *Russ. J. Gen. Chem.* **2020**, *90*, 1241–1248.

135. Huang, X.; Chen, W. L.; Zhou, H. W. *Synlett.* **2004**, *2*, 329–331.



Esquema 3.10. Síntesis de las selenazolinas **96**.

Shibahara y col.¹³⁶ describieron la obtención selenazolinas quirales **100** a partir de *N*-aciloxazolidinonas (**Esquema 3.11**); la reacción se lleva a cabo mediante un re-ordenamiento selenativo del esqueleto cíclico quiral, en presencia de selenio elemental, un hidroclosilano y una amina; se accedió de esta forma a una amplia gama de productos, aunque de estabilidad reducida.



Esquema 3.11. Reordenamiento selenativo para la obtención de selenazolinas quirales.

136. Shibahara, F.; Fukunaga, T.; Kubota, S.; Yoshida, A.; Murai, T. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 5826–5830.

3.2. Objetivos

El presente capítulo de la Tesis Doctoral describe la preparación de varias familias de derivados organoselénicos con potencial actividad anti-Alzheimer o antiproliferativa que, tal y como se ha indicado en la introducción, son dos de las enfermedades multifactoriales más complejas en la actualidad.

3.3. Discusión de resultados

2-Alquiltio-1,3-oxazolinas bicíclicas derivadas de carbohidrato

En relación a los derivados con actividad anti-Alzheimer, se llevó a cabo la preparación de sistemas bicíclicos derivados de carbohidrato, análogos a las 1,3-tiazolinas desarrolladas por Knapp y Vocadlo (NAG-tiazolina, **44**, y Thiamet-G, **45**).

En primer lugar, se abordó la preparación de 2-alquiltio-1,3-oxazolinas bicíclicas como potenciales inhibidores de la enzima OGA, siendo la estructura general la mostrada en la **Figura 3.14**. Así pues, el sistema bicíclico permitiría mimetizar, si es protonado en condiciones fisiológicas, el estado de transición en la hidrólisis del sustrato natural de la OGA, pudiendo encajar de esta manera en el sitio catalítico de la misma. Por otro lado, la incorporación sobre el átomo de azufre de residuos hidrofóbicos permitiría el establecimiento de interacciones no covalentes con bolsillos hidrofóbicos de la enzima, lo cual podría, a su vez, potenciar la actividad inhibitoria de estos compuestos.

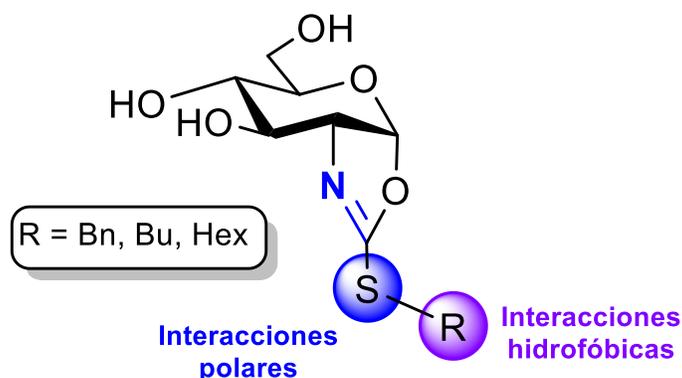
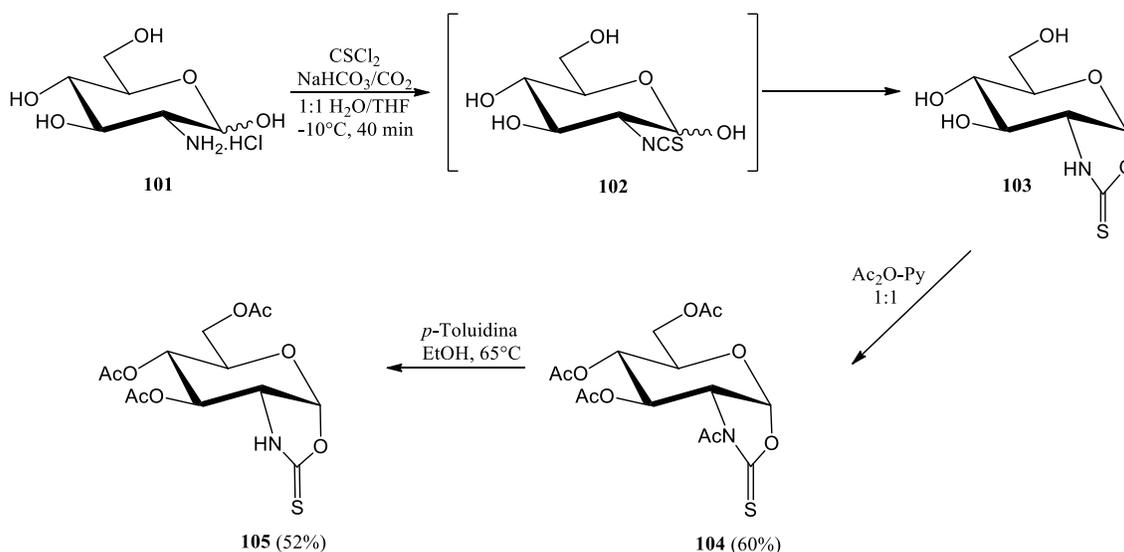


Figura 3.14. Estructura general de las 2-alquiltio-1,3-oxazolinas abordadas.

A tal efecto, la preparación de estos derivados comenzó a partir del hidrocloreto de D-glucosamina **101** como materia prima comercial asequible, que fue transformada en el tiocarbamato bicíclico **105**, siguiendo la metodología indicada en el **Esquema 3.12**. Así pues, su tratamiento con tiofosgeno como agente tionante empleando un buffer de NaHCO₃/CO₂ condujo al isotiocianato **102** no aislado, que experimenta un ataque nucleofílico intramolecular espontáneo del grupo hidroxilo del anómero α sobre el heterocumuleno, dando lugar al tiocarbamato **103**.¹³⁷ Posteriormente se acetiló de manera convencional dicho tiocarbamato con una mezcla 1:1 de Ac₂O/Py, obteniéndose el derivado per-*O*- y *N*-acetilado **104**. Finalmente, el compuesto **104** fue sometido a una desacetilación quimioselectiva del grupo *N*-acetilo utilizando *p*-toluidina en EtOH a 65°C.¹³⁷ De esta manera se obtuvo el derivado **105**, que fue utilizado como materia prima para la formación de las 2-alquitio-1,3-oxazolininas bicíclicas (**Esquema 3.13**).



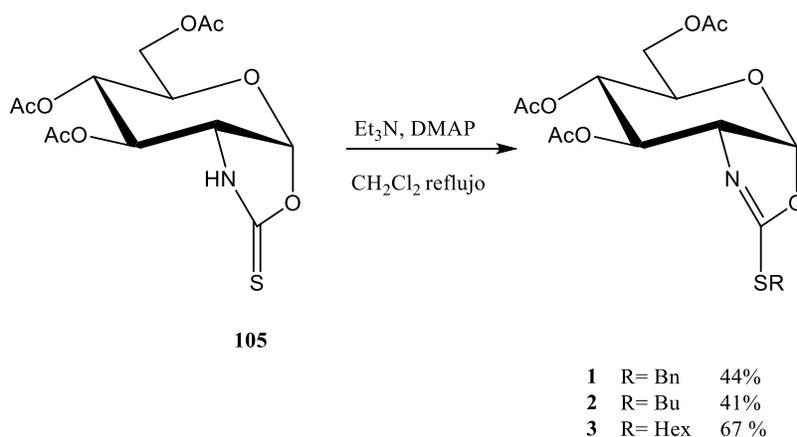
Esquema 3.12. Preparación del tiocarbamato bicíclico **105**.

Para la alquilación del átomo de azufre de **105** se llevó a cabo el tratamiento de dicho compuesto con diferentes bromuros de alquilo (bromuro de bencilo, bromobutano, bromohexano) en condiciones ligeramente básicas (Et₃N) y en presencia de DMAP como

137. López, Ó.; Zafra, E.; Maya, I.; Fuentes, J.; Diáñez, M. J.; Estrada, M. D.; Pérez-Garrido, S.; Fernández-Bolaños, J. G. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 11789–11796.

catalizador; esto proporcionó las correspondientes oxazolininas bicíclicas *S*-alquiladas **1-3**, con rendimientos de moderados a buenos (**Esquema 3.13**). Se emplearon fragmentos hidrofóbicos tanto de tipo alquílico de distinta longitud, como bencílico, con objeto de observar su influencia sobre las propiedades inhibitorias.

La preferencia de la *S*-alquilación sobre la *N*-alquilación podría explicarse atendiendo a la teoría ácido-base duro-blando (HSAB, *Hard-Soft Acid-Base*) de Pearson;¹³⁸ en este contexto, los haluros de alquilo se consideran como especies electrofílicas blandas, a diferencias de los haluros de ácido, que se consideran como especies duras.¹³⁹ Así pues, es el nucleófilo más blando (átomo de azufre del grupo tiona)¹⁴⁰ el que experimenta la reacción de alquilación con los haluros de alquilo, y no el nitrógeno.



Esquema 3.13. Preparación de las 2-alquiltio-1,3-oxazolininas **1-3**.

A modo de ejemplo se muestra el espectro de ¹H-RMN del producto **2** (**Figura 3.15**), en el cual se pueden destacar como señales importantes el metileno unido directamente al átomo de azufre alrededor de 3.0 ppm, claramente apantallado con respecto a una función de tipo éter. Por otro lado, el protón anomérico se encuentra claramente desapantallado, resonando a aproximadamente 6.0 ppm; además, la constante de acoplamiento $J_{1,2}$ es de 7.1 Hz, mostrando claramente una distorsión de la conformación ⁴C₁ de la silla estándar del carbohidrato.

138. Ho, T. L. *Chem. Rev.* **1975**, 75, 1–20.

139. Ach, D.; Reboul, V.; Metzner, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2573–2586.

140. Sambrook, M. R.; Beer, P. D.; Wisner, J. A.; Paul, R. L.; Cowley, A. R.; Szemes, F.; Drew, M. G. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2292–2302.

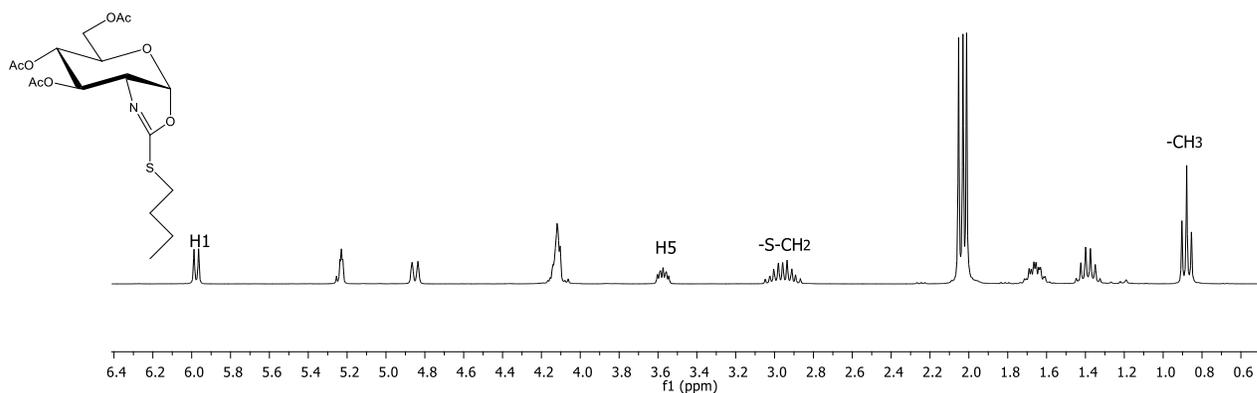


Figura 3.15. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **2**.

Por otra parte, en el espectro de ^{13}C -RMN de **2** (**Figura 3.16**) se puede destacar la presencia de la señal $\text{C}=\text{N}$ en aproximadamente 168 ppm.

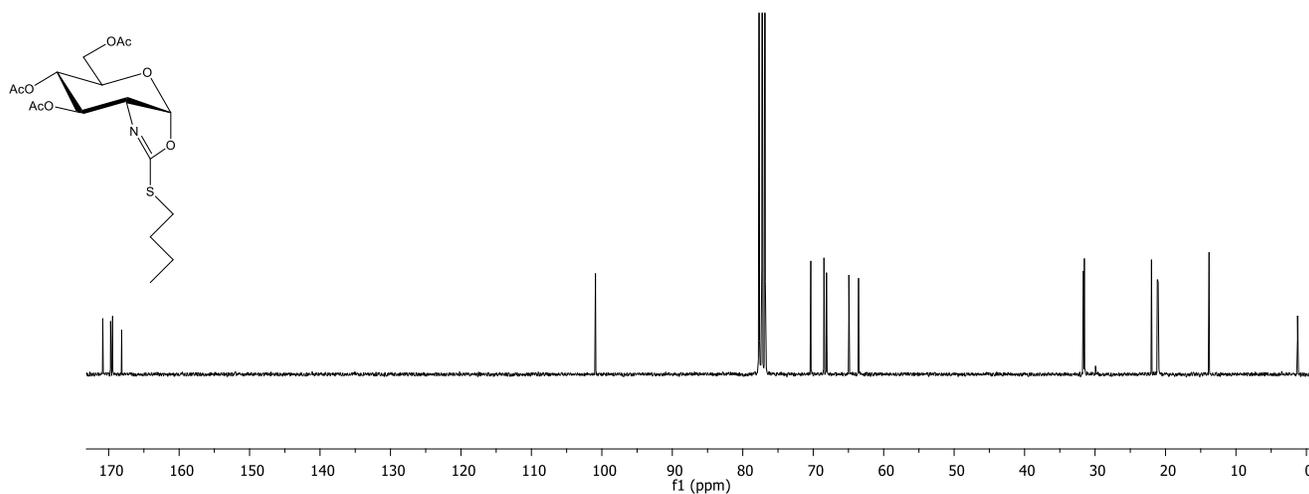


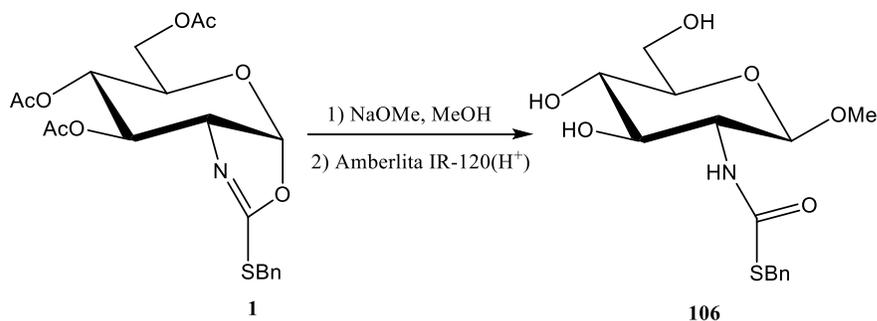
Figura 3.16. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **2**.

A continuación, se muestra (**Tabla 3.4**) una selección de datos espectroscópicos de las 1,3-oxazolinas bicíclicas **1-3**; en concreto, los desplazamientos químicos de H-1, $\text{C}=\text{N}$ y C-1, así como la constante de acoplamiento $J_{1,2}$. Los tres compuestos muestran el mismo comportamiento conformacional con respecto a la distorsión de la silla $^4\text{C}_1$.

Tabla 3.4. Selección de datos de RMN de ^1H y ^{13}C de las oxazolinas bicíclicas **1-3**.

| Compuesto | H-1 (ppm) | $J_{1,2}$ (Hz) | $\delta\text{C}=\text{N}$ (ppm) | $\delta\text{C}-1$ (ppm) |
|-----------|-----------|----------------|---------------------------------|--------------------------|
| 1 | 5.99 | 7.1 | 167.5 | 101.2 |
| 2 | 6.03 | 7.1 | 168.1 | 100.8 |
| 3 | 6.03 | 7.0 | 168.1 | 100.8 |

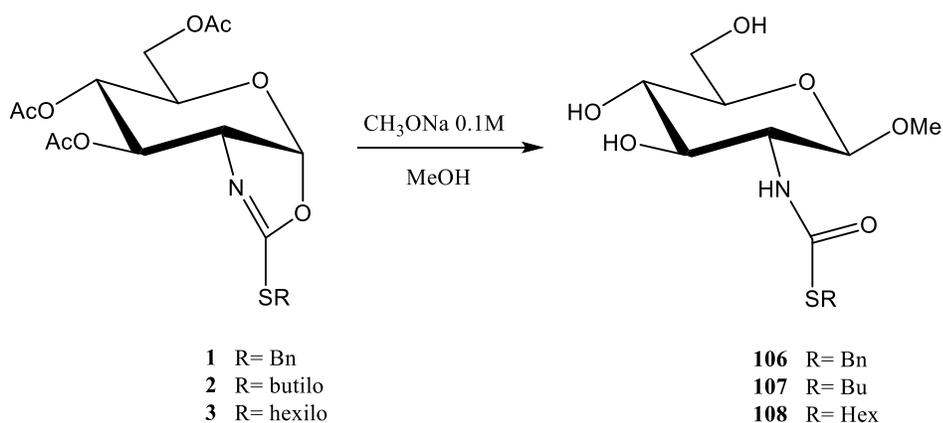
Posteriormente se abordó la desprotección de las 2-alquiltio-1,3-oxazolinas bicíclicas; no obstante, dicha desprotección resultó ser mucho más complicada de lo que podría anticiparse. En un primer ensayo se emplearon las condiciones clásicas de Zemplen (NaOMe en metanol),¹⁴¹ seguido de neutralización con resina ácida Amberlita IR-120(H^+) sobre el producto **1**. No obstante, y de manera inesperada, no se obtuvo el producto bicíclico *O*-desacetilado, sino el derivado **106**, resultante de la apertura del biciclo por el ataque nucleofílico del metóxido sobre el carbono anomérico (**Esquema 3.14**). El espectro de ^1H -RMN (700 MHz, CD_3OD) del crudo de reacción mostró un singulete que integra para 3 protones a 3.47 ppm, correspondiente al grupo metoxilo. Por otro lado, el protón anomérico (4.29 ppm) exhibió una $J_{1,2}$ típica de un derivado de D-glucosa de configuración β (8.4 Hz), y, por tanto, no del sistema bicíclico esperable. De igual manera, el espectro de ^{13}C -RMN (176.1 MHz, CD_3OD) muestra la señal correspondiente al metoxilo en 57.2 ppm.



Esquema 3.14. Intento de desprotección de **1** en condiciones de Zemplen.

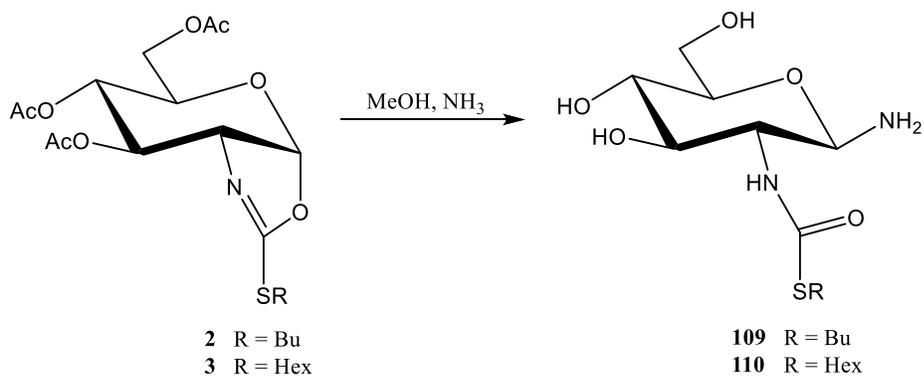
141. Zemplen, G.; Kuntz, A.; *Ber.*, **1924**, 57B, 1357.

Por este motivo se modificaron las condiciones de desprotección; en un segundo ensayo, el producto **1** fue sometido a desprotección utilizando una disolución metanólica de NaOMe (0.1M) sin neutralización posterior, pensando en que la apertura, quizás se encontraba favorecida por la presencia de la resina ácida. En un principio el crudo de reacción en RMN, mostró la desprotección de los grupos acetilos, pero, no obstante, al efectuar lavados con Et₂O, se observó también la apertura del biciclo (**Esquema 3.15**).



Esquema 3.15. Intentos de desprotección de **1-3** en condiciones de Zemplen sin neutralización posterior.

Finalmente, se optó por una desprotección más suave para los productos **2** y **3**, que se hicieron reaccionar con amoníaco metanólico; los espectros de resonancia de los crudos de reacción, no puros, también sugieren la apertura y quizás la formación de los derivados indicados en el **Esquema 3.16**.



Esquema 3.16. Intentos de desprotección de **2** y **3** con NH₃ metanólico.

Estos resultados ponen de manifiesto la gran inestabilidad del sistema heterocíclico de tipo 2-alquiltio-1,3-oxazolina en presencia de especies nucleófilas; aunque no sean útiles para los fines para los que fueron diseñados, quizás pueden ser interesantes para la funcionalización de carbohidratos en las posiciones C-1 y C-2.

2-Alquilamino y 2-alcoxiaminio-1,3-selenazolininas derivadas de carbohidrato

Debido a las dificultades encontradas para el acceso a los 2-alquiltio derivados desprotegidos, se optó por modificar el tipo de sistema bicíclico. Así pues, se abordó la preparación de 2-alkilamino y 2-alcoxiamino 1,3-selenazolininas bicíclicas derivadas de carbohidrato como selenoisómeros de los compuestos previamente descritos por Knapp y Vocadlo; es decir, nuestro siguiente objetivo fue la fusión de las estructuras del Thiamet-G **45** y la selenazolina **60**.

La estructura general se muestra en la **Figura 3.17**; postulamos que este tipo de compuestos podría actuar como inhibidores duales de OGA y colinesterasas, en una aproximación novedosa para fármacos multidiana en el Alzheimer. Por un lado, la estructura bicíclica podría imitar el estado de transición para la hidrólisis del sustrato natural de OGA, que se ha descrito como un catión de tipo oxazolinio.⁷⁹ La incorporación de un residuo de tipo 2-aminoalquil permitiría incrementar la basicidad del heterociclo con respecto al grupo alcoxilo. Esto se observó en el caso del Thiamet-G (fragmento de tipo 2-etilamino), cuando se comparó con 1,3-tiazolininas con residuos de tipo 2-alquilo.⁷⁴ La protonación del heterociclo permitió interacciones iónicas con el residuo catalítico Asp174 de la OGA. Esta hipótesis también se cumplió cuando se comparó la actividad de la NBUgT ($pK_a = 4.65$, $K_i = 230$ nM) y el Thiamet-G ($pK_a = 7.68$, $K_i = 2.1$ nM).⁷⁴ Esta correlación entre pK_a y K_i se cumplió también para otros derivados, demostrando que la protonación del sistema heterocíclico es la fuerza impulsora para interactuar con la enzima.

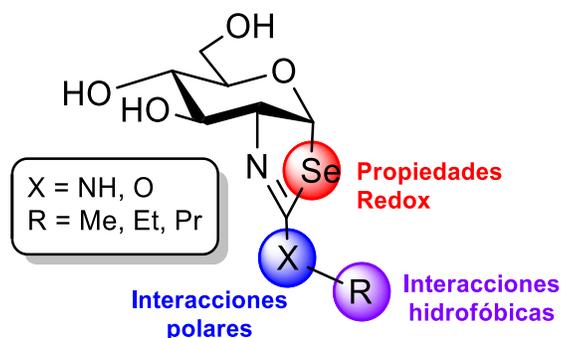


Figura 3.17. Diseño de selenazolininas bicíclicas derivadas de azúcar como potenciales inhibidores duales de OGA y colinesterasas.

El esqueleto central de estos inhibidores es, por tanto, un fragmento de tipo 1,3-selenazolina fusionado a un resto de carbohidrato; la posición C-2 del heterociclo será decorada con fragmentos de tipo alquilamino o alcoxilo, con fragmentos hidrocarbonados cortos. La razón para la elección de estos fragmentos hidrocarbonados de pequeño tamaño (Me, Et, Pr) radica en la observación de que, para 2-alquilamino-1,3-tiazolininas descritas en la bibliografía, la selectividad frente a la enzima OGA humana se incrementa con residuos de hasta 3 átomos de carbono (propilo, propileno), en detrimento de otras hexosaminidasas (HexA, HexB); por otro lado, cadenas residuales de mayor longitud (ej. butilo) condujeron a una reducción importante de la selectividad.⁷⁴ Se argumentó que el incremento del volumen del sustituyente de tipo alquílico por encima del volumen que puede ser acomodado en el sitio activo de la enzima tiene un efecto más negativo en la interacción con la enzima OGA que para las otras hexosaminidasas, con la consecuente disminución de selectividad.⁷⁴ Este hecho se demostró también para el Thiamet-G; con los datos clásicos de inhibición, ya mostraba una selectividad excepcional hacia la OGA (I.S = 37.000);⁸² el refinamiento posterior en el valor de su constante de inhibición permitieron incrementar dicha selectividad en torno a 10 veces.⁷⁴

La presencia de un átomo de selenio podría conferir ventajas adicionales en comparación con los inhibidores de tiazolina clásicos; debido a las diferencias químicas entre ambos átomos de calcógeno;¹⁴² por un lado, puede aumentar la lipofilia de la molécula (menor polaridad y mayor polarizabilidad del Se vs, S) y, por tanto su permeabilidad.¹⁴² Por

142. Hou, W. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 4436–4456.

otro lado, debido a las importantes propiedades redox asociadas a los compuestos organoselénicos,¹⁴³ dichos compuestos podrían contribuir a la modulación de los niveles de ROS y disminuir el estrés oxidativo intrínseco en la EA. Los electrones de la capa de valencia del Se, debido al mayor tamaño de este átomo con respecto al S, se encuentran ligados con menor intensidad, y por consiguiente, participan de manera más eficaz en procesos redox.¹⁴² Además, los derivados que contienen selenio pueden ejercer interacciones no covalentes,¹⁴⁴ incluyendo los enlaces de hidrógeno e interacciones enlazantes de calcógeno (σ -hole)^{145,146} lo que podría conducir a una interacción más fuerte con el sitio activo de la enzima. Las largas distancias de enlace C–Se, a causa del tamaño considerable de este átomo, pueden conferir flexibilidad conformacional al sistema bicíclico para adoptar la pose apropiada dentro de los sitios catalíticos de las enzimas. Es por ello que este tipo de estructuras bicíclicas de Se podrían interaccionar mejor con las regiones clave de las enzimas que las tiazolinas isósteras.

Aunque el uso de fármacos derivados de Se podría considerarse como controvertido, debido a los posibles efectos tóxicos que este tipo de derivados podrían ejercer, deben tenerse en cuenta algunos aspectos importantes. Por un lado, los derivados organoselénicos exhiben, en general, una menor toxicidad y mejores bioactividades en comparación con las formas inorgánicas del selenio, como el selenato o el selenito de sodio,¹⁴⁷ que inducen estrés genotóxico.¹⁴⁸ Por otro lado, los mecanismos responsables de la toxicidad de los derivados de Se dependen enormemente del tipo de grupo funcional en el que se encuentre formando parte.¹⁴⁹ En este contexto, por ejemplo, el ebselén (2-fenil-1,2-benzoselenazol-3 (2H)-ona), el derivado organoselénico más estudiado hasta la fecha, ha sido evaluado en ensayos clínicos frente al derrame cerebral, está siendo evaluado como potencial agente frente al trastorno

143. López, Ó.; Merino, P.; Fernández-Bolaños, J. G. *Synthesis of organoselenium of biological relevance, in Selenium: Chemistry, analysis, function and effects-Food & nutritional components in focus* V. R. Preedy (Ed.), RSC, **2015**, 40–64.

144. Mukherjee, A. J.; Zade, S. S.; Singh, H. B.; Sunoj, R. B. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4357–4416.

145. Young, C. M.; Elmi, A.; Pascoe, D. J.; Morris, R. K.; McLaughlin, C.; Woods, A. M.; Frost, A. B.; de la Houpliere, A.; Ling, K. B.; Smith, T. K.; Slawin, A. M. Z.; Willoughby, P. H.; Cockcroft, S. L.; Smith, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 3705–3710.

146. Pascoe, D. J.; Ling, K. B.; Cockcroft, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15160–15167.

147. Gandin, V.; Khalkar, P.; Braude, J.; Fernandes, A. P. *Biol. Med.* **2018**, *127*, 80–97.

148. Chuai, H.; Zhang, S. Q.; Bai, H.; Li, J.; Wang, Y.; Sun, J.; Wen, E.; Zhang, J.; Xin, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *223*, 113621.

149. Weekley, C. M.; Harris, H. H. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8870–8894.

bipolar e incluso frente a casos moderados y severos de COVID-19. En todos estos estudios se le ha catalogado como un fármaco seguro.¹⁵⁰

La protonación de la 1,3-selenazolina a pH fisiológico podría también permitir que imite al catión amonio de la acetilcolina, el sustrato natural de las colinesterasas (AChE y BuChE) y acomodarse en el sitio activo de dichas enzimas. Por ello, este tipo de compuestos podría inhibir a las colinesterasas mediante el establecimiento de interacciones de tipo catión- π ¹⁵¹ entre el fragmento heterocíclico protonado y el sitio catalíticamente activo de la enzima (CAS, *Catalytic Active Site*). Además, la presencia de grupos hidroxilo del residuo del carbohidrato también podría proporcionar enlaces de hidrogeno con la enzima.

En los grupos de investigación donde se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral se ha descrito recientemente la inhibición eficaz de colinesterasas mediante el uso de iminoazúcares, donde este tipo de interacciones podría ser crucial.¹⁵²⁻¹⁵⁴

Por todo lo anteriormente mencionado, las 1,3-selenazolininas bicíclicas mostradas en la **Figura 3.17** se proponen como nuevos agentes duales en el tratamiento del Alzheimer: inhibidores de OGA y colinesterasas y también potenciales agentes antioxidantes.

Para acceder a dichos compuestos se empleó la metodología mostrada en los **Esquemas 1.17 y 1.18**; a tal efecto se comenzó a partir del hidrocloreto de D-glucosamina (**101**) como materia prima asequible, que fue transformada en 6 etapas en el iselenocianato **115**,¹⁵⁵ el intermediario sintético clave en la preparación de las selenazolininas. Así pues, la protección quimioselectiva con *p*-anisaldehído del grupo amino en forma de imina **111**, que fija la configuración anomérica β en el derivado, seguido de acetilación convencional de los hidroxilos para dar lugar a **112** y su *N*-desprotección final en medio ácido condujo al hidrocloreto de D-glucosamina per-*O*-acetilada **113**. Posteriormente dicho compuesto se hizo

150. Nogueira, C. W.; Barbosa, N. V.; Rocha, J. B. T. *Arch. Toxicol.* **2021**, *95*, 1179–1226.

151. Silmana, I.; Sussman, J. L. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *175*, 3–10.

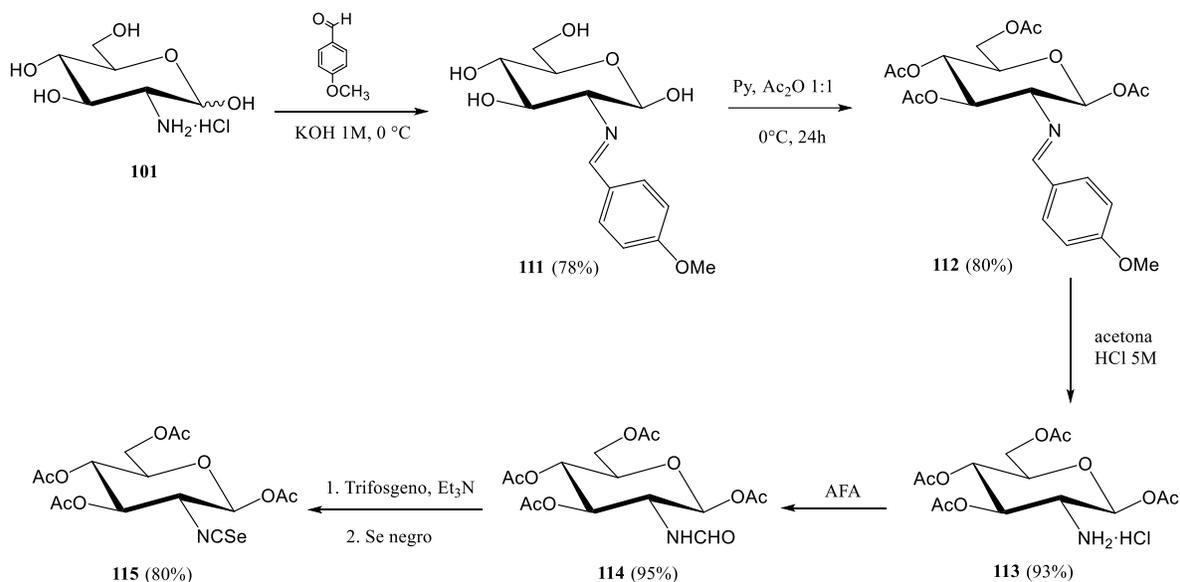
152. Ahuja-Casarín, A. I.; Merino-Montiel, P.; Vega-Baez, J.L.; Montiel-Smith, S.; Fernandes, M.X.; Lagunes, I.; Maya, I. Padrón, J. M.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J.G. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 138–146.

153. Oliveira de Santana, Q. L.; Santos Evangelista, T. C.; Imhof, P.; Ferreira, S. B.; Fernández-Bolaños, J.G.; Sydnes, M.O.; López, Ó.; Lindbäck, E. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 2322–2337.

154. Olsen, J. I.; Plata, G. B.; Padrón, J. M.; López, Ó.; Bols, M.; Fernández-Bolaños, J. G. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *123*, 155–160.

155. López, Ó.; Maza, S.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J. G. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 2556–2566.

reaccionar con anhídrido acético-fórmico (AFA)¹⁵⁶ para dar la formamida correspondiente **114** que posteriormente se utilizó para la formación del isoselenocianato **115**. El acceso a dicho compuesto tiene lugar mediante un proceso *one-pot* en dos etapas: en primer lugar, la deshidratación promovida por trifosgeno, que es considerado como un sustituto seguro del fosgeno, un reactivo gaseoso y peligroso.¹⁵⁷ Por el contrario, el trifosgeno es sólido, fácilmente manejable y estable en las condiciones de uso. La deshidratación conduce a un isocianuro no aislado, que es acoplado *in situ* con selenio negro elemental, dando lugar a la formación de **115** (Esquema 3.17).



Esquema 3.17. Síntesis del isoselenocianato derivado de carbohidrato **115**

Posteriormente, el isoselenocianato **126** se acopló con diferentes aminas alifáticas primarias de pequeña longitud (metilamina, etilamina, propilamina) proporcionando las selenoureas correspondientes **4–6**; el calentamiento a reflujo de estas en tolueno permitió una reacción de tipo S_N2 intramolecular entre el grupo $NH-3$ de la función selenoureado y el carbono anomérico, con la salida de acetato, para dar lugar a las 2-alkilamino-1,3-selenazolininas bicíclicas **7–9** (Esquema 3.18).

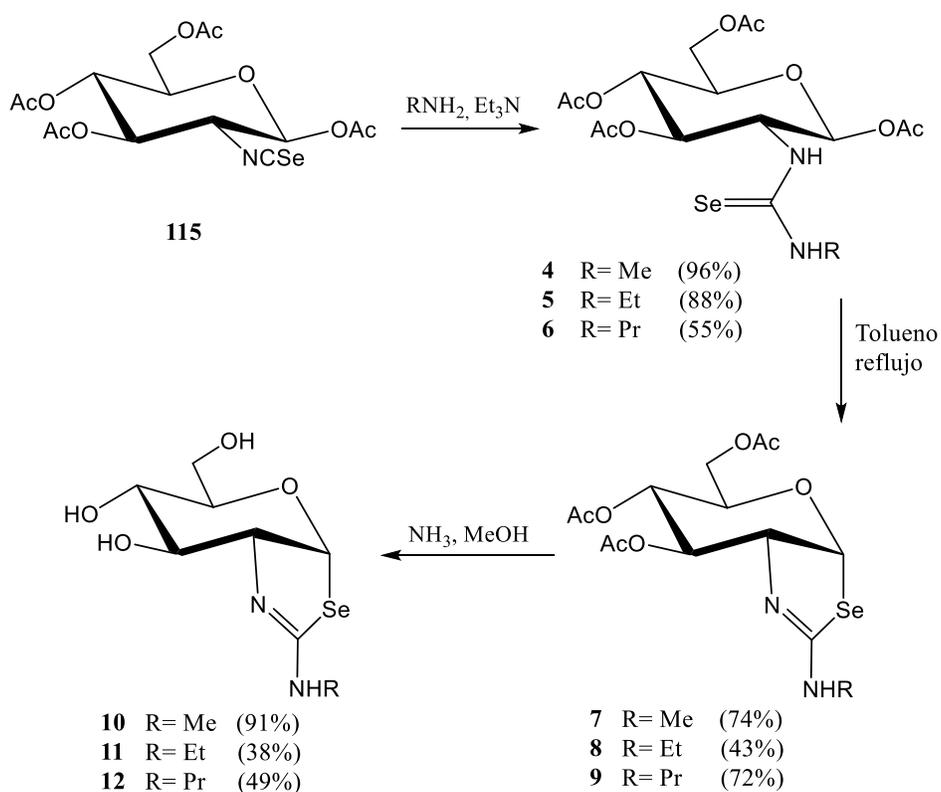
Para la desprotección de las mismas se intentó la desacetilación en condiciones de Zemplén (NaOMe/MeOH); aunque la cromatografía en capa fina mostraba una conversión

156. Strazzolini, P.; Giumanini, A. G.; Caucci, S. *Tetrahedron* **1990**, *76*, 1081–1118.

157. Ganiu, M. O.; Nepal, V.; Van Houten, J. P.; Kartika, R. *Tetrahedron* **2020**, *76*, 131553.

total, el procesado de la reacción resultó ser más problemático de lo esperado. Por un lado, la neutralización con resina Amberlita IR-120(H⁺) conducía a descomposición, probablemente con apertura del anillo bajo las fuertes condiciones ácidas. Por otro lado, la neutralización con AcOH, si bien evitó la descomposición del sistema bicíclico, dificultó la eliminación del NaOAc generado.

Por ello se optó por una desacetilación promovida por amoníaco metanólico. De esta manera, se obtuvieron las selenazolininas *O*-desprotegidas **10–12** (**Esquema 3.18**), con rendimientos de moderados a excelentes (38–91%) tras purificación cromatográfica.



Esquema 3.18. Síntesis de las 2-aminoselenazolininas desprotegidas.

A modo de ejemplo, en la **Figura 3.18** se muestra el espectro de ¹H-RMN de la selenourea **6** donde en el rango 6.3–6.9 ppm se observan dos señales ensanchadas, correspondientes a los NH, lo cual hace evidente la formación del producto. También se observa la resonancia del protón H-1 en 5.8 ppm, y las señales correspondientes al cuerpo

del azúcar alrededor en la zona de 5.3–3.8 ppm. El triplete próximo a 1.0 ppm, que integra para 3H, corresponde al CH₃ del fragmento de propilo.

Cabe destacar que gran parte de las señales del compuesto en el espectro de ¹H-RMN, en especial aquéllas que forman parte de la estructura sacarídica, y muy especialmente las próximas al grupo selenoureido, se encuentran especialmente ensanchadas. Muy probablemente ello se debe a la existencia de conformeros con respecto a la función selenoureido, donde existe un enlace C-N parcialmente doble; la interconversión rotamérica *E-Z* normalmente tiene lugar en la escala de tiempo del RMN, lo que conlleva el ensanchamiento de las señales. Esta situación ha sido ampliamente documentada para los correspondiente tio-isómeros (tioureas).¹⁵⁸

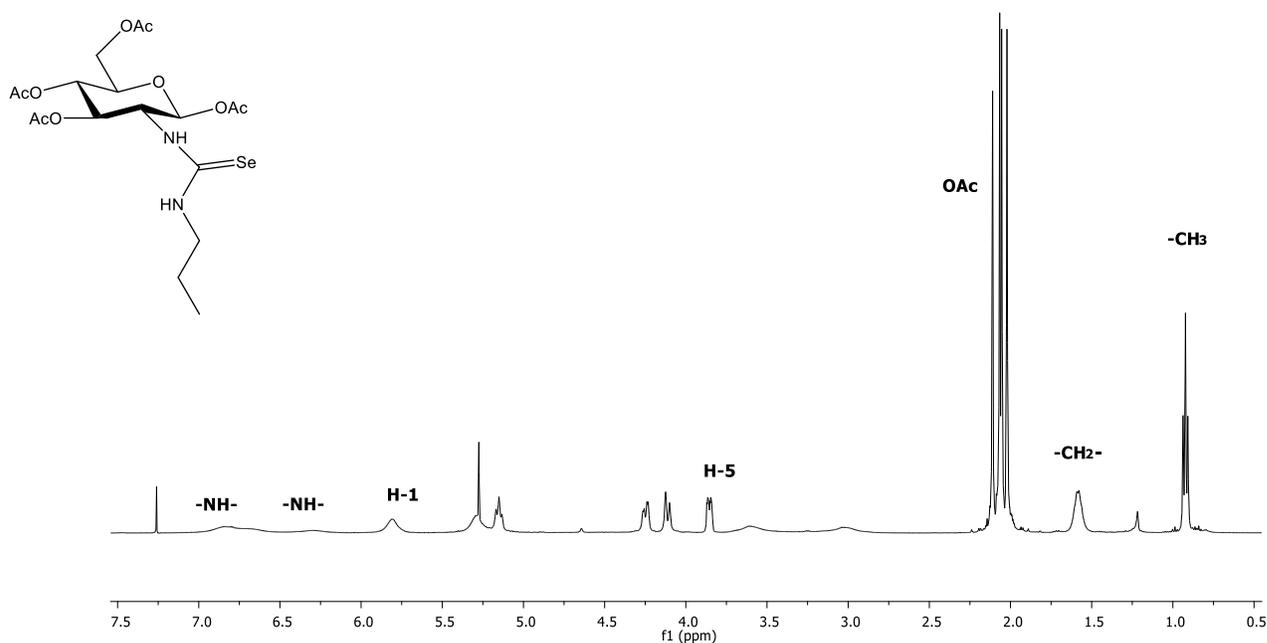


Figura 3.18. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del producto 6.

Por otra parte, el espectro de ¹³C-RMN (**Figura 3.19**) muestra señales importantes de la formación de la selenourea de propilo, como las observada en 11.3 ppm, correspondiente al CH₃ del fragmento de propilo; desafortunadamente el enlace C=Se no se puede apreciar (región 180-185 ppm), probablemente por el ensanchamiento de dicha señal, como

158. García Fernández, J. M.; Mellet, C. O. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2000**, 55, 35–135.

consecuencia del anteriormente mencionado equilibrio conformacional. Incluso dos de las señales de carbonilo de los acetatos experimentan dicho ensanchamiento (región de 170 ppm).

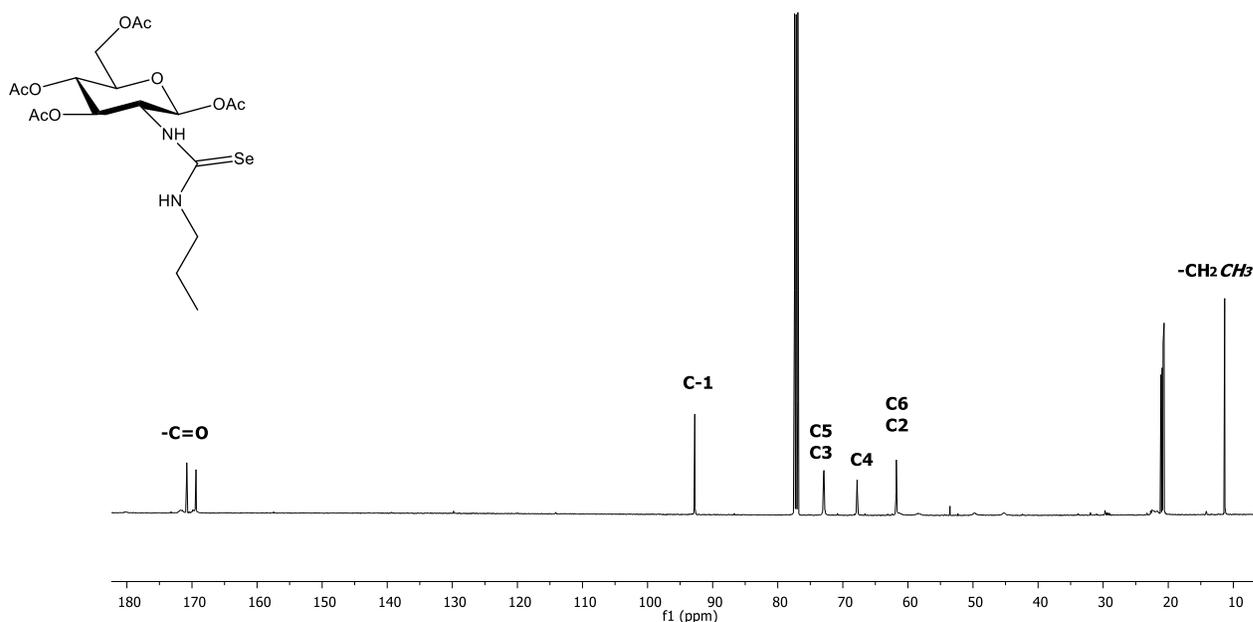
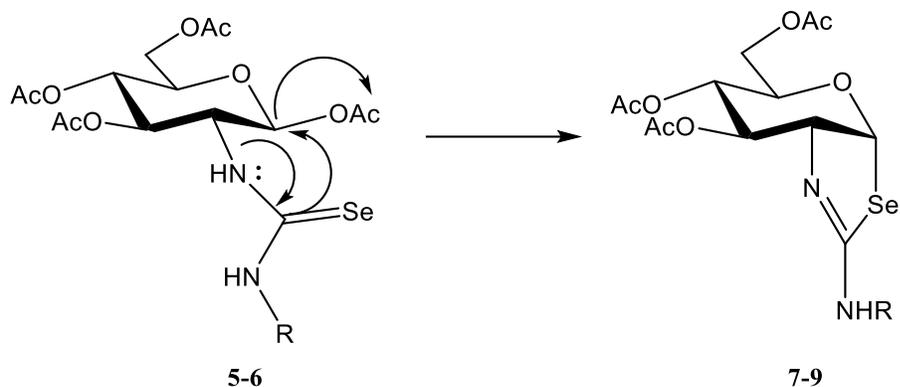


Figura 3.19. Espectro de ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) del producto 6.

Ac continuación se abordó la preparación de los bicíclicos 7–9 (**Esquema 3.18**); la conjugación entre los NH y el grupo selona (C=Se) hacen que exista una cierta densidad de carga negativa sobre dicho átomo, haciéndolo más nucleófilo. Haciendo uso de esta propiedad se promovió una reacción de sustitución nucleofílica biomolecular del átomo de selenio sobre el carbono anomérico del carbohidrato mediante calentamiento, dando como resultado el sistema bicíclico de los derivados 7–9 (**Esquema 3.19**). La mayor reactividad del átomo de selenio con respecto al de azufre en las tioureas isósteras se pone de manifiesto en el hecho de que estas requieren del uso de un catalizador ácido, bien prático, o bien de tipo ácido de Lewis (SnCl₄) para experimentar la ciclación.⁷⁴



Esquema 3.19. Mecanismo de formación de las 2-alkilaminoselenazolininas bicíclicas.

A modo de ejemplo, se muestra el espectro de ^1H -RMN para la selenazolinina **9** (**Figura 3.20**) donde se observa un fuerte desapantallamiento de H-1, cuyo desplazamiento químico cambia de 5.81 ppm a 6.69 ppm comparando **6** y **9**. Además, la constante de acoplamiento $J_{1,2}$ es de 6.6 Hz para el compuesto **9**, mostrando claramente una distorsión de la conformación $^4\text{C}_1$ del residuo de carbohidrato. La pérdida de un grupo acetato, puesto que únicamente se observan tres señales de acetilo, vuelve a confirmar la formación de la selenazolinina.

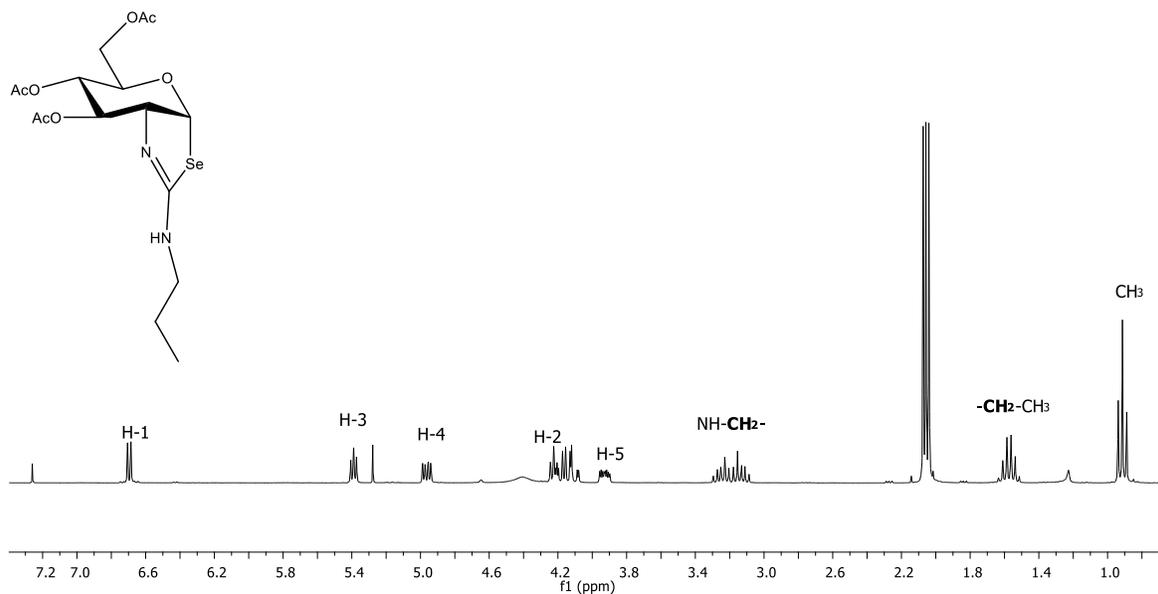


Figura 3.20. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de **9**.

En el espectro de ^{13}C -RMN de **9** (**Figura 3.21**) destaca la resonancia del carbono $\text{N}=\text{C}$, a 158.3 ppm, evidenciando la transformación del sistema sacarídico hacia el biciclo, ya que el grupo selona de las tioureas de partida resuena en torno a 180 ppm. Se observan también las señales en 41.4, 22.8 y 11.3 ppm asignados al fragmento *N*-propilo. Adicionalmente se puede evidenciar la eliminación de un grupo acetato, puesto que únicamente se observan tres señales de tipo acetato, tanto en la región de carbonilo, como en la alifática.

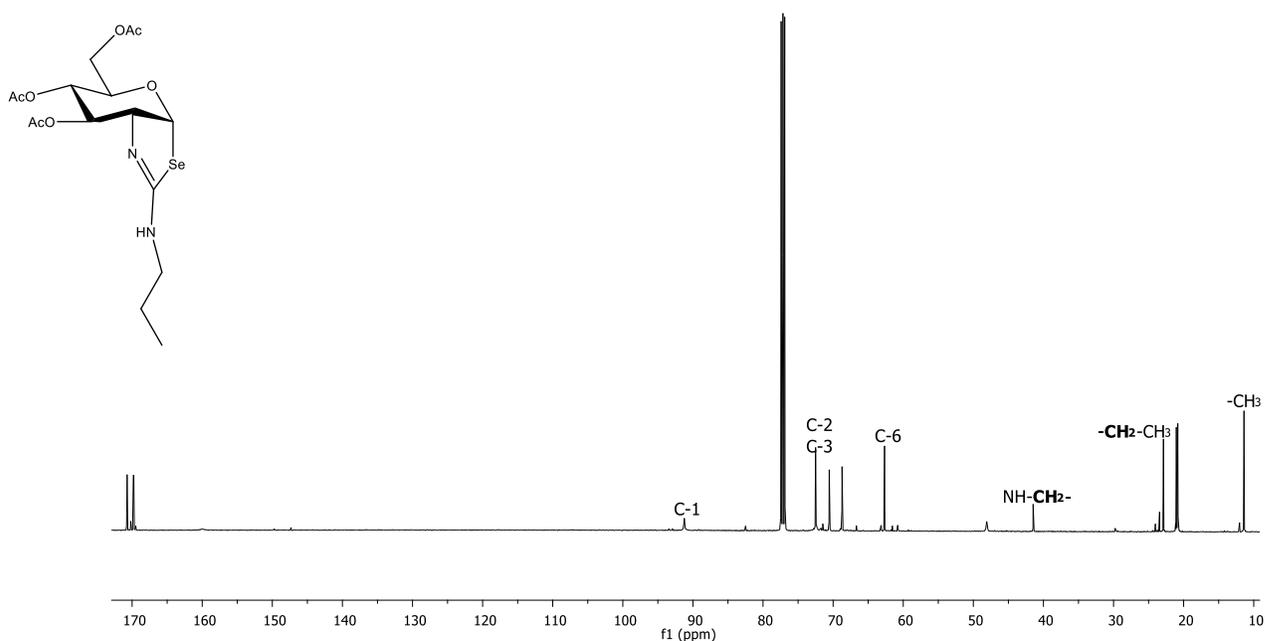


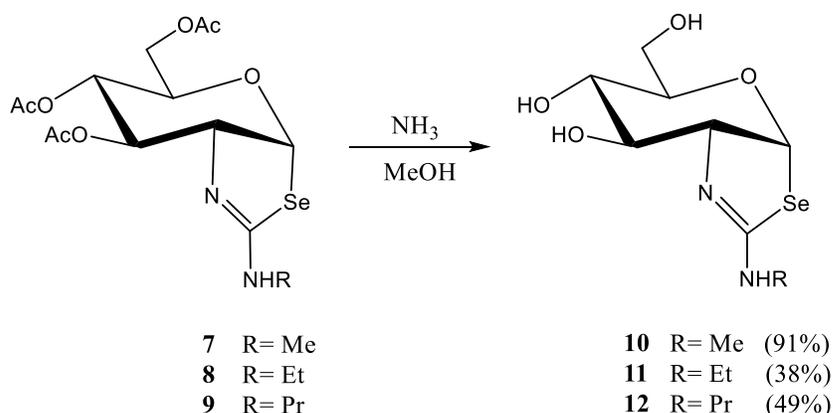
Figura 3.21. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del producto **9**.

A continuación, se muestra una tabla de datos espectroscópicos seleccionados para las 2-alkilaminoselenazolininas **7-9**: desplazamientos químicos de H-1, $\text{C}=\text{N}$ y C-1, así como constante de acoplamiento $J_{1,2}$ (**Tabla 3.5**).

Tabla 3.5. Selección de datos de RMN de ^1H de los selenazolinas **6-8**.

| Compuesto | H-1 (δ , ppm) | $J_{1,2}$ (Hz) | C=N (δ , ppm) | C-1 (δ , ppm) |
|-----------|-----------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| 7 | 6.75 | 6.1 | 157.9 | 92.9 |
| 8 | 6.70 | 6.1 | 158.1 | 91.9 |
| 9 | 6.59 | 6.1 | 160.0 | 91.2 |

Finalmente, las selenazolinas **7-9** se trataron con amoníaco metanólico burbujeando amoníaco sobre una disolución metanólica del compuesto acetilado; bajo estas condiciones se eliminaron por completo los grupos aceto, conduciendo así a las 2-aminoselenazolinas desprotegidas **10-12** (**Esquema 3.20**). Afortunadamente en este caso, y a diferencia de las oxazolinas análogas **1-3**, sí fueron lo suficientemente estables a las condiciones de desprotección en medio básico.



Esquema 3.20. Reacción de desprotección de las selenazolinas **7-9**.

A modo de ejemplo se muestra el espectro de ^1H -RMN para la selenazolinina **12** (**Figura 3.22**) donde se puede comprobar la ausencia de las señales pertenecientes a los acetilos; por otro lado, se siguen observando las señales del grupo *N*-propilo en 3.25 ppm (NH-CH_2), 1.62 ppm (CH_2) y 0.98 ppm (CH_3). La señal que proporciona mayor información es la de H-1, que se encuentra en 6.70 ppm con una constante de acoplamiento de 5.4 Hz, lo cual pone de manifiesto que las condiciones básicas no afectaron al bicyclo formado, a diferencia de las 2-alkil-1,3-tiazolininas descritas al comienzo del capítulo.

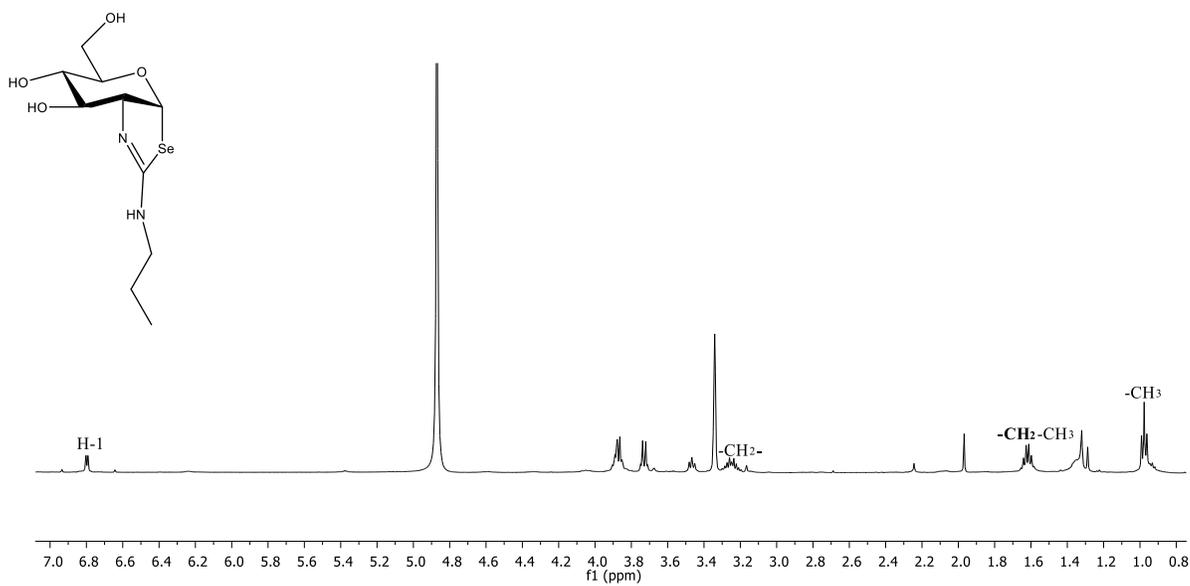


Figura 3.22. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) del producto **12**.

Por otra parte, en el espectro de ^{13}C -RMN (**Figura 3.23**) se puede destacar de nuevo la ausencia de las señales de los acetilos, tanto en la región de los grupos carbonilo, como en la zona alifática.

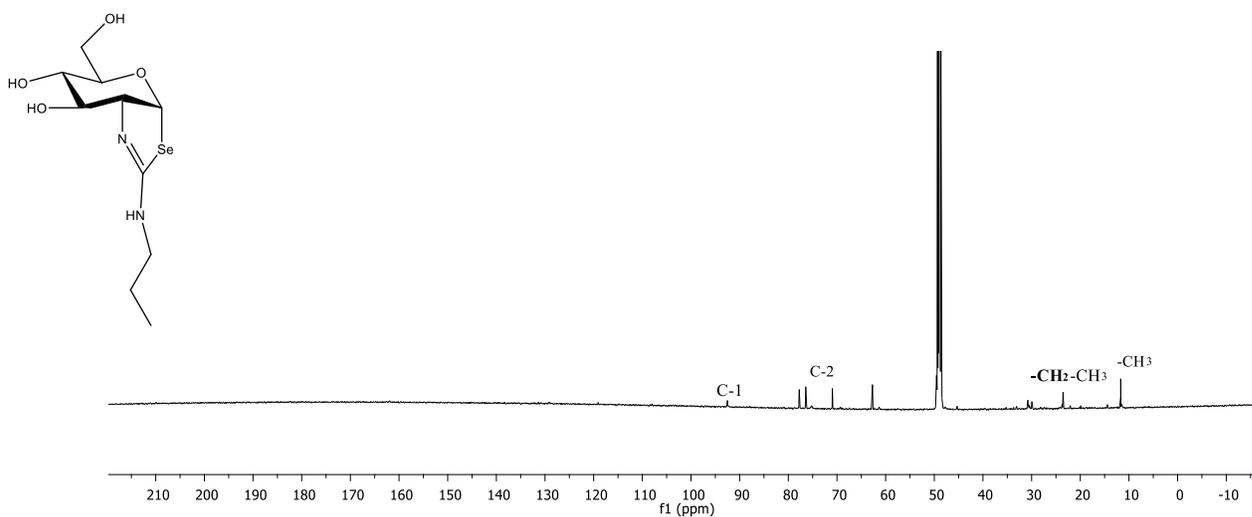


Figura 3.23. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CD_3OD) del producto **12**.

A modo de ejemplo, la **Figura 3.24** muestra el espectro de masas de baja resolución del compuesto **12**, donde se observa claramente la distribución isotópica del átomo de selenio, confirmando la presencia de este en su estructura.

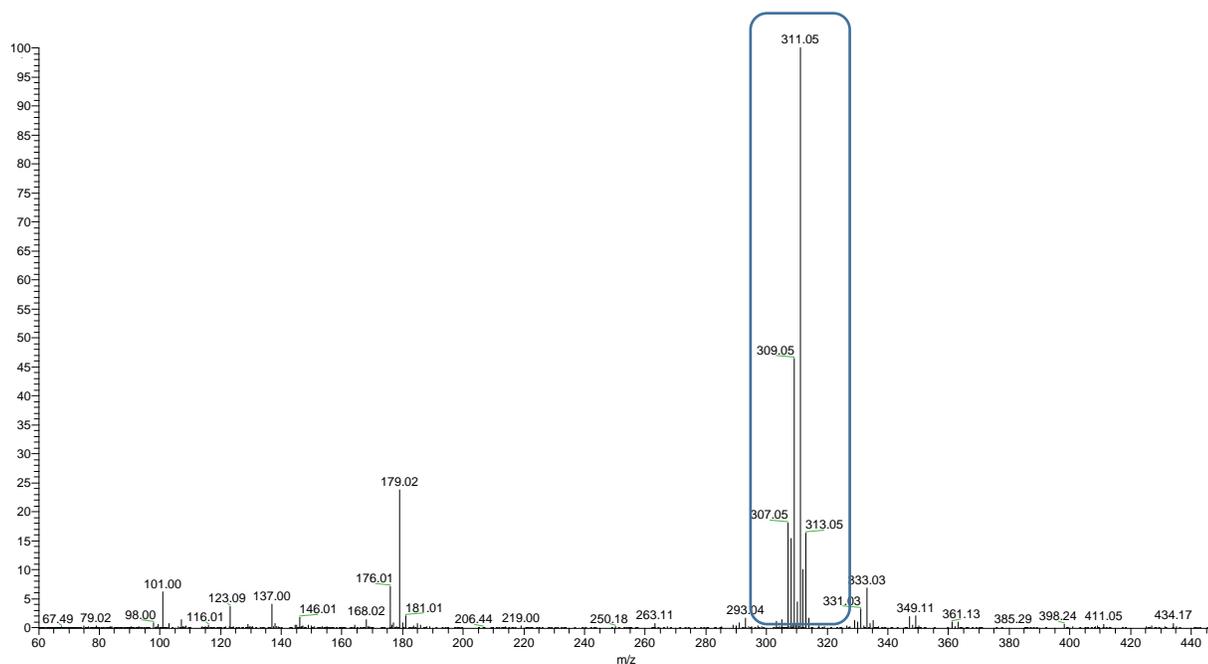


Figura 3.24. Espectrometría de masas de baja resolución (ESI) del producto **12**.

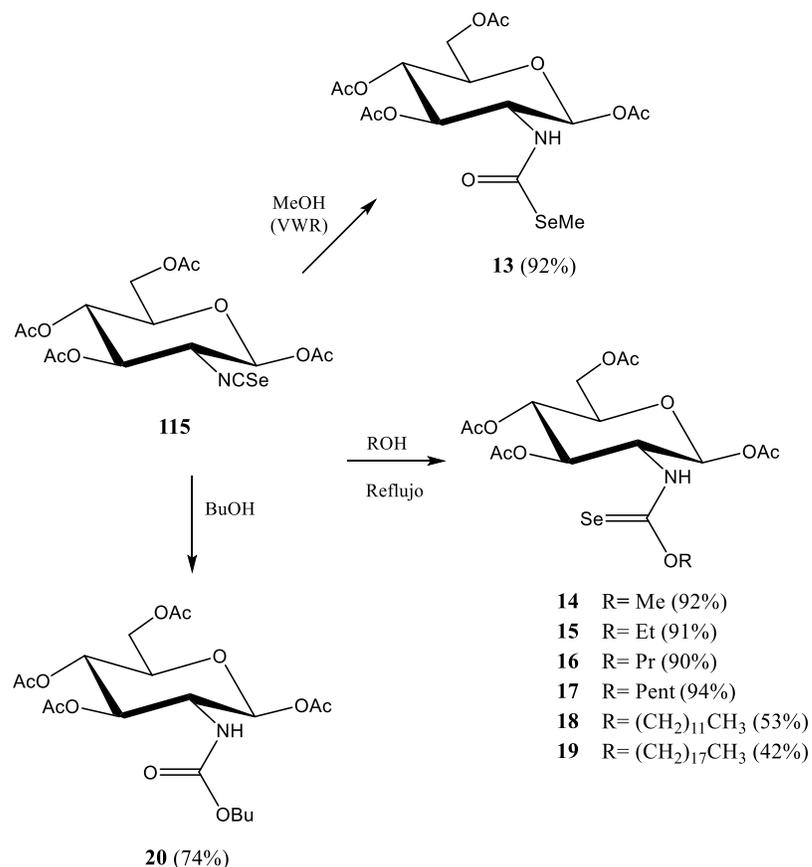
La **Tabla 3.6** muestra una selección de los datos espectroscópicos de las selenazolinas **10-12**: desplazamientos químicos de H-1, C-1 y C-2, así como constante de acoplamiento $J_{1,2}$, observándose un comportamiento totalmente análogo a lo comentado anteriormente.

Tabla 3.6. Selección de datos de RMN de ^1H de los selenazolinas **9-11**.

| Compuesto | H-1 (δ , ppm) | $J_{1,2}$ (Hz) | C-1 (δ , ppm) | C-2 (δ , ppm) |
|--------------------|-----------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| 10 (R = Me) | 6.87 | 6.0 | 91.8 | 72.5 |
| 11 (R = Et) | 6.81 | 5.9 | 91.8 | 73.5 |
| 12 (R = Pr) | 6.79 | 5.4 | 92.5 | 75.2 |

También se abordó la síntesis de 2-alcoxi-1,3-selenazolinasa través de la ciclación intramolecular de un *O*-alquil selenocarbamato; la sustitución isostérica de un grupo NH por un átomo de oxígeno en la posición 2 de la selenazolina permitirá analizar la influencia, tanto de los efectos electrónicos, como estéricos en las propiedades biológicas de los compuestos finales.

A tal efecto, se utilizó de nuevo como materia prima el isoselenocianato **115**, que mediante calentamiento a reflujo en presencia de los correspondientes alcoholes (metanol, etanol, propanol, pentan-1-ol, dodecan-1-ol y octadecan-1-ol), permitió obtener los correspondientes selenocarbamatos **14-19**. Para los selenocarbamatos **18** y **19**, dado que los alcoholes correspondientes son sólidos, se utilizó como disolvente THF y 10.0 equivalentes del alcohol (**Esquema 3.21**).



Esquema 3.21. Síntesis de los selenocarbamatos derivados de carbohidrato **12-19**.

De todos los selenocarbamatos preparados (**Esquema 3.21**), y por los motivos anteriormente argumentados de selectividad, sólo los de cadena más corta (Me, Et, Pr) se emplearán para llevar a cabo la ciclación y las correspondientes selenazolininas, ser evaluadas como potenciales inhibidores de la OGA y colinesterasas, como selenoisómeros del Thiamet-G.

Por otro lado, los selenocarbamatos en su totalidad serán evaluados como potenciales agentes antiproliferativos; estos compuestos conjugan dos unidades estructurales interesantes. Por un lado, la función organoselénica, y por otro lado, el residuo sacarídico. Los carbohidratos juegan un papel fundamental en el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer.¹⁵⁹ Los carbohidratos, sus análogos y miméticos pueden mejorar las propiedades farmacocinéticas del fármaco (ej. incremento de la solubilidad en medios acuosos y biodisponibilidad) mediante la formación de glicoconjugados; en este contexto, están adquiriendo especial importancia los nanotransportadores decorados en su superficie con residuos sacarídicos.¹⁶⁰

Adicionalmente, está ampliamente documentado que las células tumorales, en su mayoría emplean la glicolisis aeróbica para producir ATP, lo que es conocido como el efecto Warbug.¹⁶¹ Esto implica que las células tumorales sobreexpresan receptores sacarídicos (ej. GLUT1, *Glucose Transporter*) para el suministro energético, lo cual puede ser empleado para el acceso selectivo del fármaco a las células tumorales.

Durante la optimización de la síntesis de los selenocarbamatos mostrados en el **Esquema 3.21**, se observó una reacción totalmente inesperada en el intento inicial de formación del selenocarbamato de metilo **14**. Así pues, el calentamiento a reflujo del isoselenocianato **115** en MeOH (**VWR**) mostró la formación de un isómero de **14**; si bien el espectro de masas de alta resolución proporciona la masa exacta y, por consiguiente, la fórmula molecular esperada, los espectros de ¹H y ¹³C-RMN mostraron una variación importante en la resonancia para algunas de las señales esperadas. Así pues, el grupo OMe (que resonaría a aproximadamente 3.70 ppm) mostró un apantallamiento muy significativo

159. Franconetti, A.; López, Ó, Fernandez-Bolaños, J. G.; *Curr. Med. Chem.* **2020**, *27*, 1206–1242.

160. Kang, B.; Opatz, T.; Landfester, K.; Wurm, F. R. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8301–8325.

161. Heiden, V.; Cantley, M. G.; Thompson, L. C. *Science.* **2009**, *324*, 1029–1033.

y anómalo en el espectro de ^1H -RMN, resonando a aproximadamente 2.30 ppm (**Figura 3.25**); de forma análoga, el grupo selona previsible, en lugar de resonar a alrededor de 190 ppm, como se ha observado en selenocarbamatos de azúcar en la posición C-1,¹²⁰ lo hizo en torno a 164 ppm (**Figura 3.26**).

Todos estos datos indican claramente que la estructura del compuesto aislado en estos primeros ensayos no se correspondía con la del *O*-metil selenocarbamato esperado **14**, sino a un isómero donde no existe ni un grupo metoxilo, ni tampoco un grupo selona. En base a todo lo anterior se propone la formación del *N*-alquil-*Se*-metil selenocarbamato **13**. Los datos espectroscópicos de este compuesto concuerdan con los de *N*-aril(alquil)-*Se*-alquil selenocarbamatos descritos en la bibliografía,¹⁶² obtenidos mediante tratamiento de isocianatos de arilo con LiAlHSeH , a su vez preparado por reducción de selenio elemental con LiAlH_4 .¹⁶³

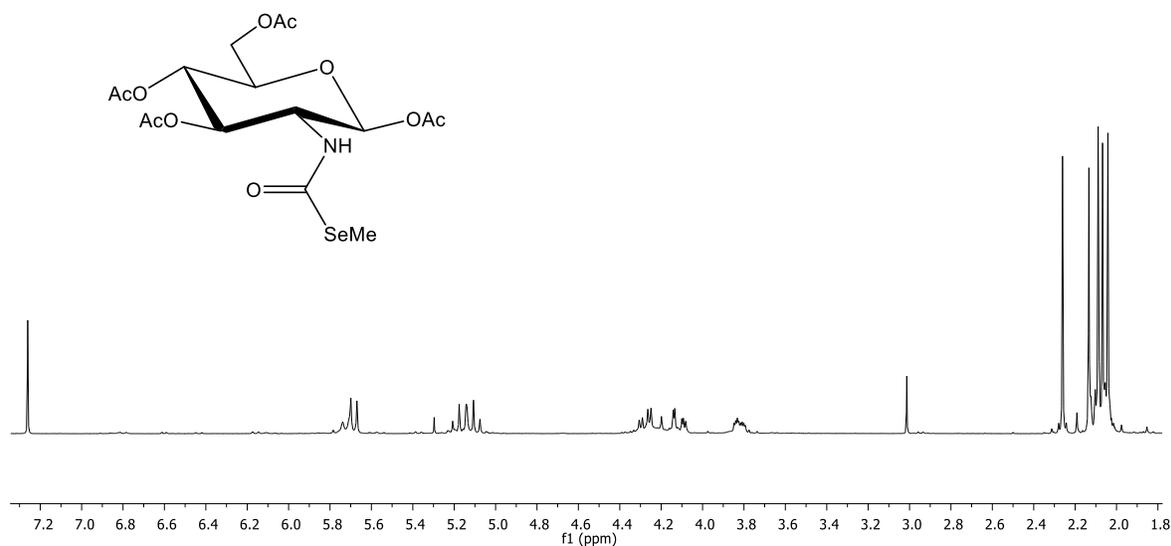


Figura 3.25. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del producto **13**.

162. Koketsu, M.; Ishida, M.; Takakura, N.; Ishihara, H. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 486–490.

163. Ishihara, H.; Koketsu, M.; Fukuta, Y.; Nada, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8408–8409.

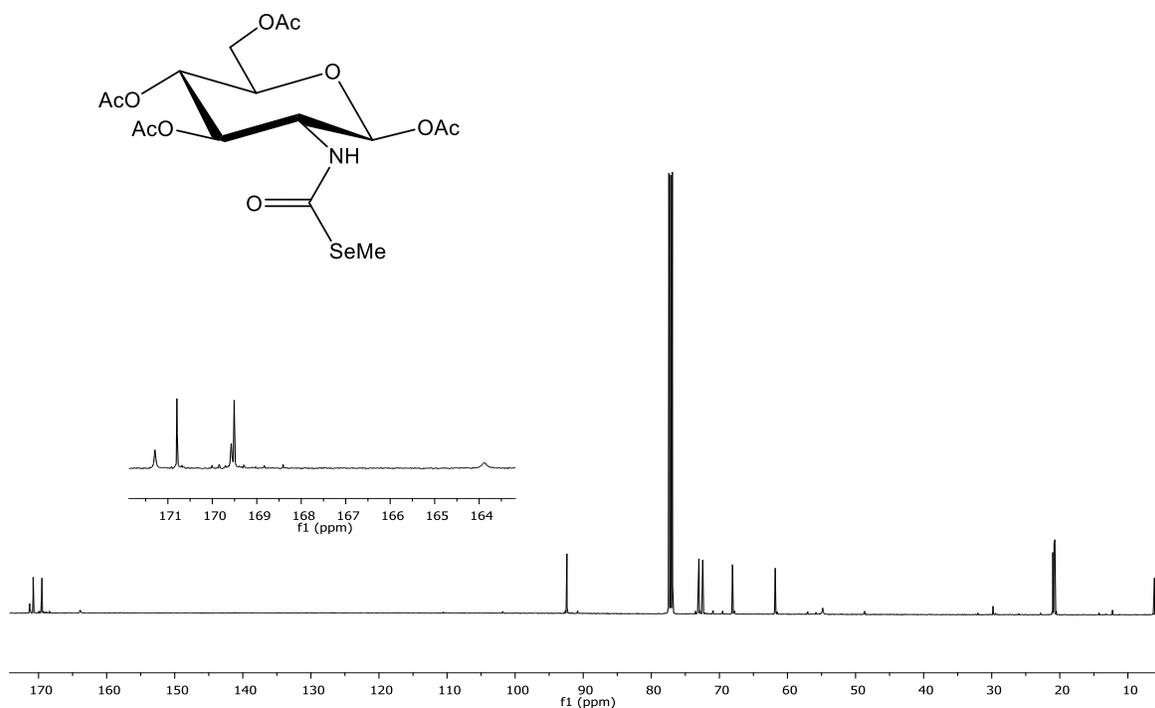


Figura 3.26. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del producto **13**.

En la primera mitad del S. XX se describieron¹⁶⁴ una serie de transposiciones de arilo entre átomos no adyacentes en sistemas de tipo *O*-ariltiocarbamatos (transposición de Newman-Kwart),^{165,166} di-*O*-ariltiocarbonatos (transposición de Schönberg),¹⁶⁷ o hidrazonil aril éteres (transposición de Chapman),¹⁶⁸ donde, en condiciones térmicas, se producía la migración del residuo de arilo desde un átomo de oxígeno a un átomo de azufre o nitrógeno (**Esquema 3.22**).

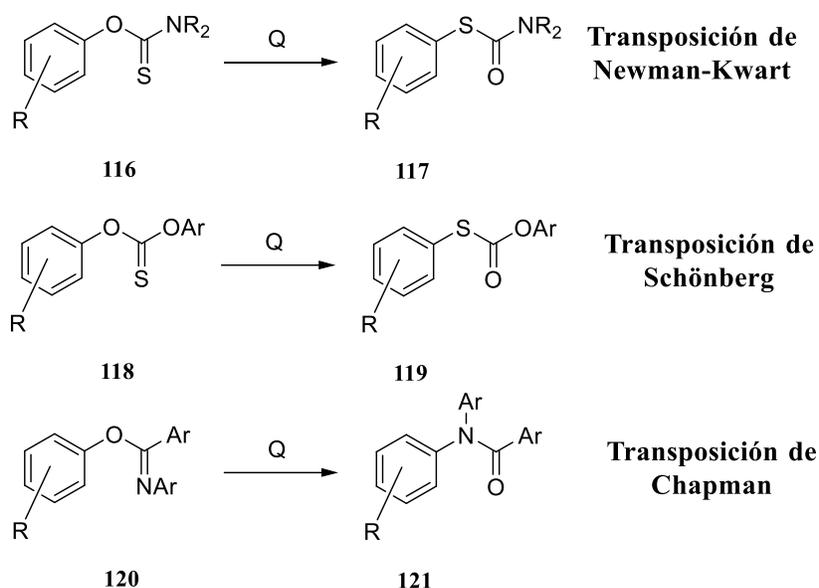
164. Lloyd-Jones, G. C.; Moseley, J. D.; Renny, J. S. *Synthesis*, **2008**, 661–689.

165. Kwart, H.; Evans, E. R. *J. Org. Chem.* **1996**, *31*, 410.

166. Newman, M. S.; Karnes, H. A. *J. Org. Chem.* **1996**, *31*, 3980.

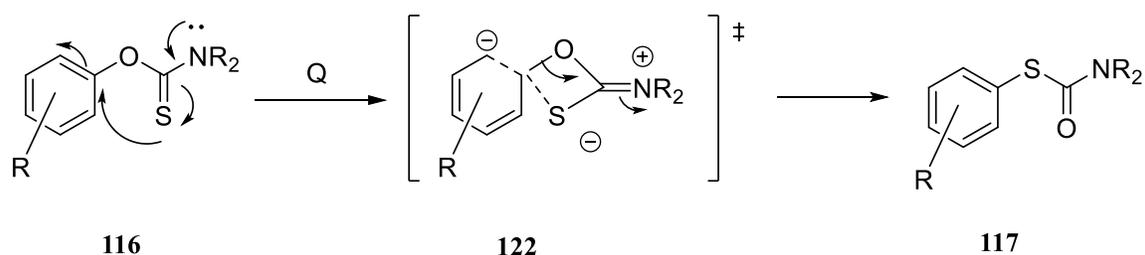
167. Schönberg, A.; Vargha, L. *Chem. Ber.* **1930**, *63*, 178.

168. Chapman, A. W. *J. Chem. Soc.* **1927**, 1743.



Esquema 3.22. Migraciones de arilo en las transposiciones de Newman-Kwart, Schönberg y Chapman

Se postula en esta Tesis Doctoral que la formación del producto inesperado **13** posiblemente tenga lugar a través de un proceso análogo a la transposición de Newman-Kwart. El mecanismo propuesto para esta reacción (**Esquema 3.23**) implica un proceso intramolecular y unimolecular, con cinética de primer orden, donde, a través de una reacción de tipo sustitución aromática nucleófila, el átomo de azufre ataca la posición *ipso* del anillo aromático.¹⁶⁹ Se postula un estado transición cíclico de 4 miembros, de tipo 1,3-oxatietano (**122**) que conduce a la formación del correspondiente *S*-ariltiocarbamato, siendo la fuerza impulsora de la reacción la formación del grupo carbonilo, termodinámicamente más estable que el correspondiente tiocarbonilo original.



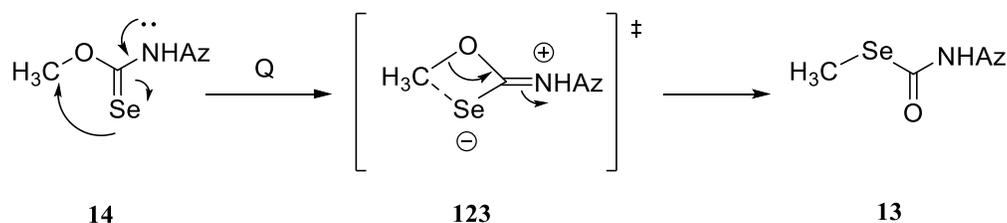
Esquema 3.23. Mecanismo de la transposición de Newman-Kwart

169. Lloyd-Jones, G. C.; Moseley, J. D.; Renny, J. S. *Synthesis*. **2008**, 661–689.

La transposición de Newman-Kwart, que se considera como un acceso interesante a bencenotioles, tras hidrólisis del *S*-aril tiocarbamato correspondiente **117**, fue posteriormente extendida a migraciones de fragmentos alquílicos (ej. bencílicos) y a selenocarbamatos.¹⁷⁰ También se ha descrito la transformación de *O*-glicosil-*N*-metiltiocarbamatos en los correspondientes *S*-glicosilcarbamatos y posterior hidrólisis para dar glicosiltioles.¹⁷¹

Este tipo de transformaciones, además de condiciones térmicas, se han descrito en condiciones ácidas (H₂SO₄,¹⁷² BF₃¹⁷³) y oxidantes (Br₂).¹⁷⁴

En el **Esquema 3.24** se muestra el mecanismo propuesto para la transposición análoga a la de Newman-Kwart en la formación del derivado **13** a partir del selenocarbamato esperado **14**, usando el MeOH comercial (VWR).



Esquema 3.24. Mecanismo propuesto para la formación del *Se*-metil selenocarbamato **xxx**

Los intentos de reproducir la formación del *Se*-metil selenocarbamato **13** a partir del isoselenocianato **115** y MeOH (**Química Rique**) mediante calentamientos prologados, catálisis ácida (ej. sílica) o básica (ej. Et₃N) resultaron infructuosos, ya que en estos casos sólo se obtuvo el *O*-metil selenocarbamato esperable **14** en lugar del producto resultante de la transposición. Estos resultados sugieren que la partida original de MeOH posiblemente contenía una impureza traza desconocida que actuaría como catalizador en la transposición tipo Newman-Kwart.

170. Eriksen, K.; Ulfkjaer, A.; Sjølling, T. I.; Pittelkow, M. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 10786–10797.

171. Komor, R.; Kasprzycka, A.; Pastuch-Gawolek, G.; Szeja, W. *Carbohydr. Res.* **2014**, *396*, 37–42.

172. Tandel, S. K.; Rajappa, S.; Pansare, S. V. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 7479–7486.

173. Dzurilla, M.; Kutschy, P.; Koscik, D.; Toma, S. *Chem. Commun.* **1990**, *55*, 710–717.

174. Iderfield, R. C.; Short, F. W. *J. Org. Chem.* **1953**, *18*, 1092–1103.

Otro hecho inesperado que ocurrió en la preparación de los selenocarbamatos del **Esquema 3.21** tuvo lugar cuando se intentó abordar la preparación del selenocarbamato de *O*-butilo; en lugar de obtener el selenocarbamato esperado, se obtuvo el carbamato **20**. En el grupo de investigación de la Universidad de Sevilla se ha observado una situación análoga en la preparación de tiocarbamatos bicíclicos *cis*-fusionados derivados de carbohidratos, donde se detectó también la formación de los correspondientes carbamatos.¹³⁷ Es posible que la presencia accidental de una cierta cantidad de oxígeno en el medio de reacción, a pesar de que se llevó a cabo en atmósfera inerte, sea la responsable de esta oxidación. Se ha observado previamente que ciertas selenoureas derivadas de carbohidrato pueden experimentar una oxidación lenta con el oxígeno atmosférico de la función selenoureido, con pérdida de H₂Se.¹⁷⁵

Una vez obtenidos los selenocarbamatos del **Esquema 3.21**, bien por evaporación del alcohol de partida, o tras purificación cromatográfica, en todos ellos se observó la presencia de varias familias de señales. A modo de ejemplo, en la **Figura 3.27** se muestra el espectro de ¹H-RMN del *O*-etil selenocarbamato **15**, donde se puede observar la presencia de dos isómeros rotacionales *E/Z*, como consecuencia de que el enlace C–N de la función selenocarbamato tiene un carácter parcialmente doble debido a la resonancia entre el par de electrones del nitrógeno y el grupo selona (**Figura 3.28**). Esta situación es análoga a las encontradas en las amidas y en las selenoureas **4–6**, donde las señales próximas al grupo selenoureido se encuentran ensanchadas por ese motivo. En 7.59 y 6.88 ppm del espectro de **15** (**Figura 3.27**) se observan dos dobletes correspondientes al NH, con una $J_{\text{NH},2} = 9.8$ en ambos casos; el valor de esta constante de acoplamiento sugiere que en ambos conformeros *E/Z* el NH se encuentra en disposición antiperiplana con respecto al H-2 del azúcar (**Figura 28**). Por otro lado, los protones anoméricos (dobletes a 5.8 y 5.7 ppm) muestran una $J_{1,2} = 8.3$ y 8.7 respectivamente, lo cual sigue confirmando la anomería β del compuesto.

175. Fernández-Bolaños, J.G.; López, Ó.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fuentes, J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4081–4084.

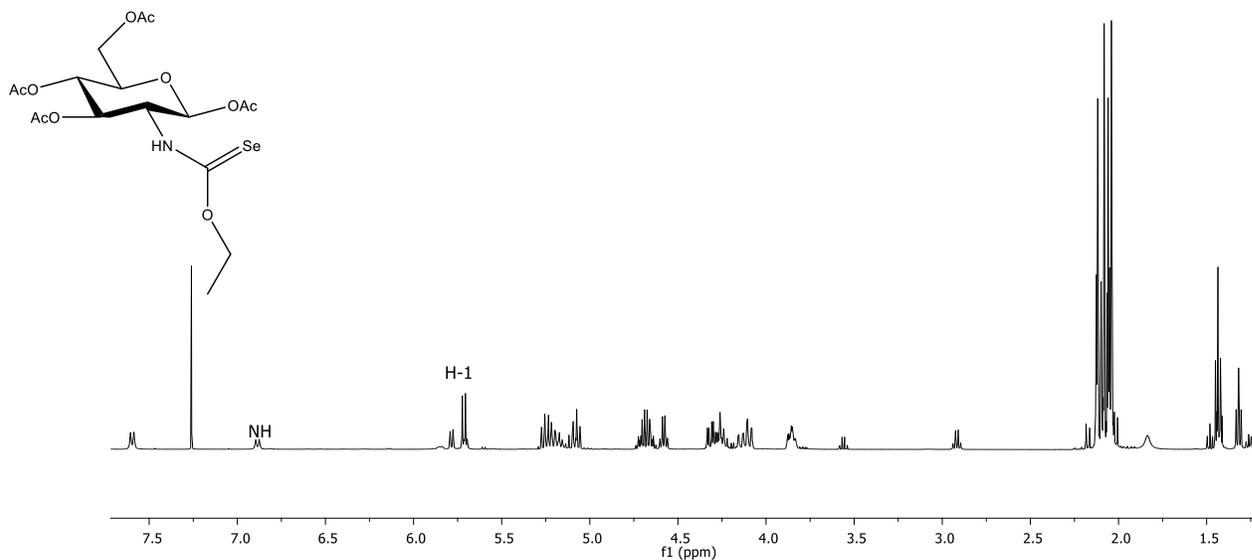


Figura 3.27. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del producto **15**.

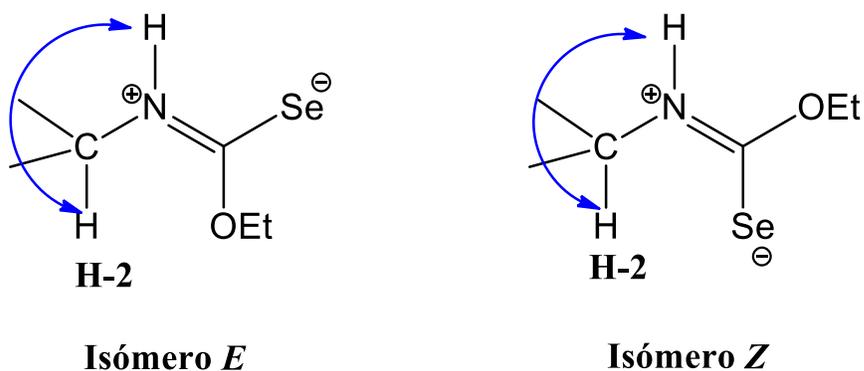


Figura 3.28. Confórmeros *E/Z*

Para confirmar la presencia de confórmeros se llevó a cabo el estudio de ^1H -RMN del producto **15** a temperatura variable en $(\text{CD}_3)_2\text{DO}$ (30°C , 60°C , 90°C) (**Figura 3.29**) donde se puede observar que sólo una de las señales, la que resuena en aproximadamente 5.3 ppm, alcanza la temperatura de coalescencia, confirmando de esta forma, la presencia de los confórmeros.

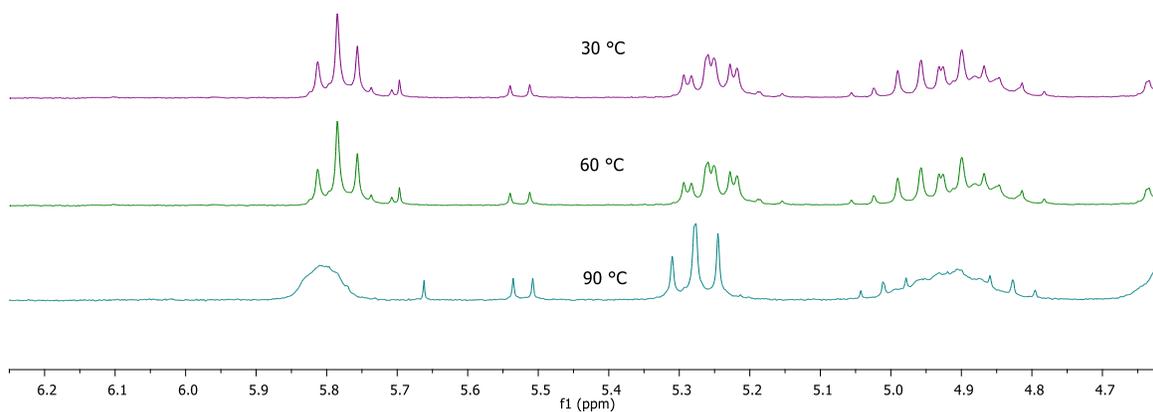


Figura 3.29. Fragmento seleccionado del espectro de ^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) del producto **15** a distintas temperaturas.

Por otro lado, en el espectro de ^{13}C -RMN del producto **15** (**Figura 3.30**), se pueden destacar señales importantes; así pues, en 197.0 y 194.0 ppm existen dos señales, correspondientes al grupo NCSe, lo que confirma de nuevo la presencia de dos conformeros; de igual manera, la presencia de dos carbonos anoméricos en 92.4 y 91.7 ppm; sugiere la misma situación. Adicionalmente, en la región comprendida entre de 55-70 ppm puede observarse que cada una de las señales del cuerpo del azúcar se encuentra doble.

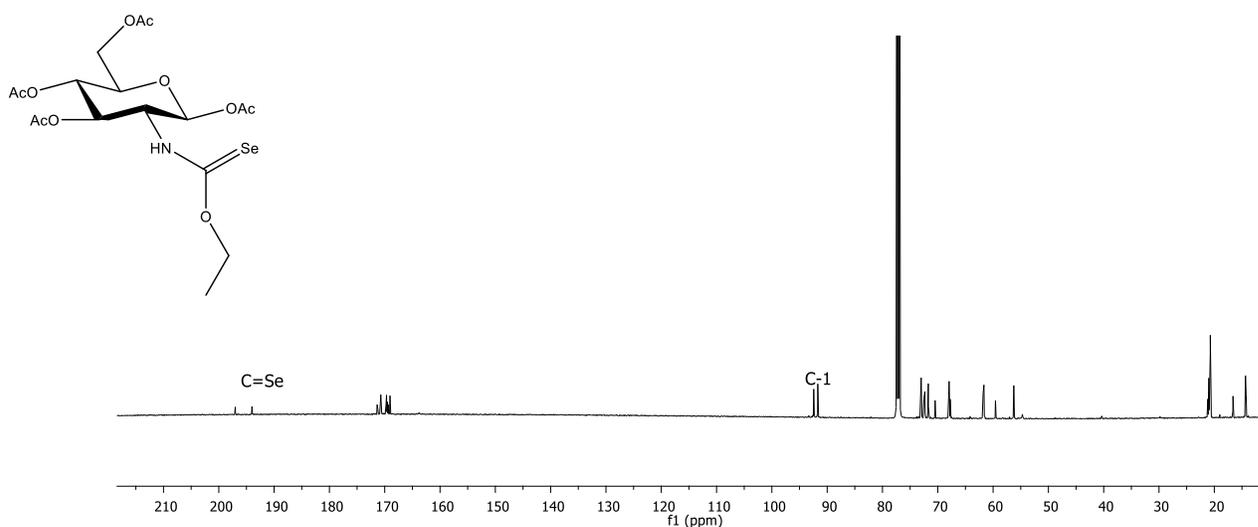


Figura 3.30. Espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) del producto **15**.

En la **Figura 3.31** se muestra el espectro de masas de baja resolución (ESI) que refleja de nuevo la distribución isotópica característica del átomo de selenio.

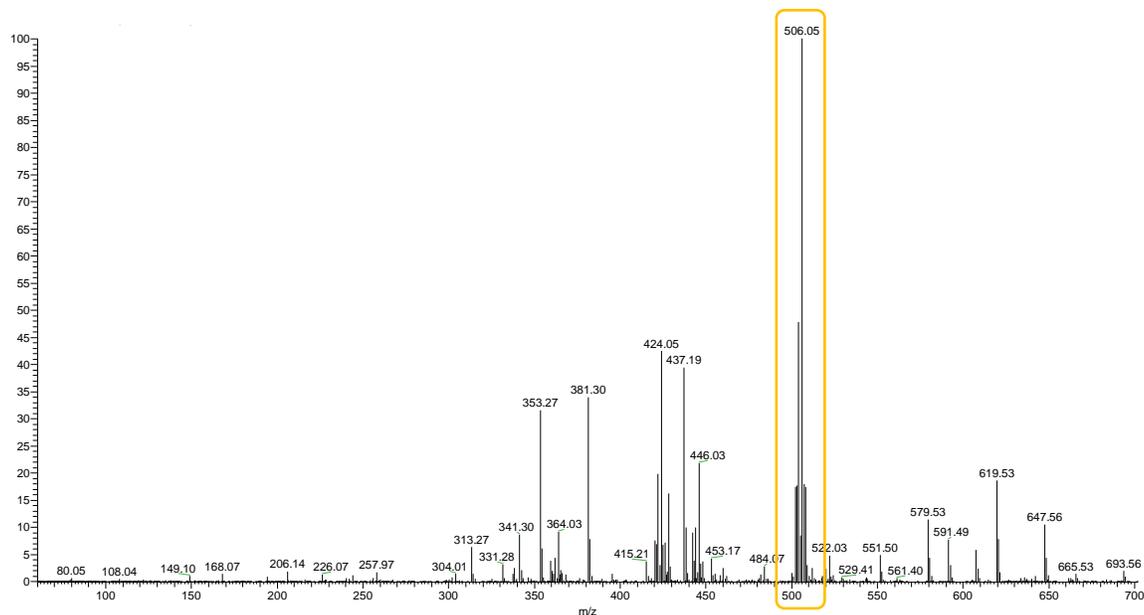


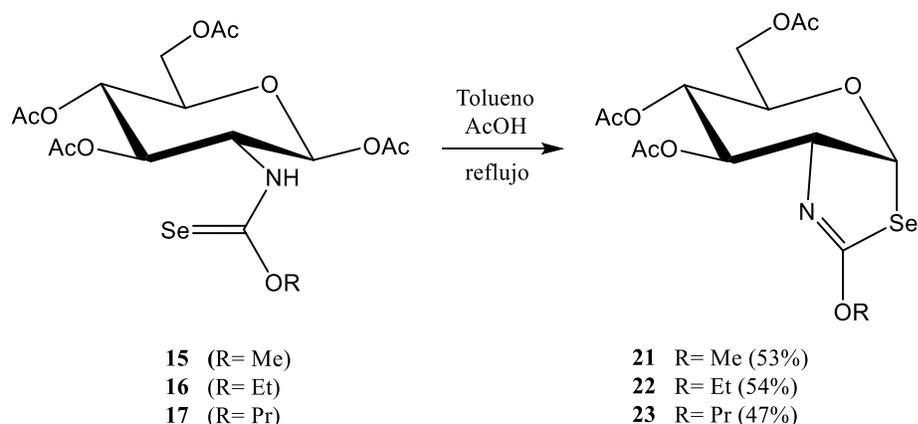
Figura 3.31. Espectrometría de masas de baja resolución (ESI) del producto **15**.

En la **Tabla 3.7** se muestra una selección de datos de ^1H -RMN de los selenocarbamatos **15–19**. Todos los datos mostrados son consistentes con la existencia de una relación antiperiplana entre el H-2 del carbohidrato y el NH del grupo selenocarbamato.

Tabla 3.7. Selección de datos de RMN de ^1H de los selenocarbamatos **15-19**.

| Compuesto | δ_{NH} (ppm) | | $J_{\text{NH},2}$ (Hz) | | $\delta_{\text{H}-1}$ (ppm) | | $J_{1,2}$ (Hz) | |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----|------------------------|-----|-----------------------------|-----|----------------|-----|
| | | | | | | | | |
| 15 (R= Et) | 7.5 | 6.8 | 9.8 | 9.9 | 5.8 | 5.7 | 8.2 | 8.7 |
| 16 (R = Pr) | 7.9 | 7.2 | 9.8 | 9.8 | 5.8 | 5.7 | 8.3 | 8.6 |
| 17 (R = Pent) | 7.8 | 7.0 | 9.9 | 9.8 | 5.7 | 5.8 | 8.1 | 8.7 |
| 18 (R= (CH ₂) ₁₁ CH ₃) | 9.2 | 8.5 | 9.6 | 9.8 | 5.8 | 5.7 | 8.6 | 8.7 |
| 19 (R= (CH ₂) ₁₇ CH ₃) | 7.7 | 6.9 | 9.8 | 9.5 | 5.8 | 5.7 | 7.9 | 8.7 |

A continuación, se llevó a cabo la ciclación de los selenocarbamatos **14-16** mediante catálisis ácida (AcOH), dando lugar a la formación de las 2-alcoxiselenazolininas **21-23** (**Esquema 3.25**). Dada la menor conjugación existente en la función selenocarbamato con respecto a las selenoureas, por la existencia de un solo grupo NH, se hizo necesario el uso de 10 equivalentes de AcOH como catalizador para promover la sustitución nucleófila, mediante protonación del grupo acetoxi saliente; estos resultados contrastan con la formación de los 2-alquilamino isómeros **7-9**, que no requirieron catálisis ácida, sino solamente una ciclación térmica.



Esquema 3.25. Formación de las 2-alcoxiselenazolininas bicíclicas **21-23**.

A modo de ejemplo, en la **Figura 3.32** se muestra el espectro de $^1\text{H-RMN}$ para la 2-alcoxiselenazolinina **23**; al igual que en las 2-aminoselenazolininas, en la región de 2.0 ppm se observa la eliminación de un grupo acetato, puesto que solo hay tres señales de metilo. Se observó un claro despantallamiento del protón anomérico (6.71 vs 5.79 y 5.72 ppm de ambos conformeros del selenocarbamato **16**). Por otro lado, el cambio de una constante de acoplamiento anomérico claramente β (8.3 y 8.6 Hz de ambos conformeros) a $J_{1,2} = 6.3$ Hz sugiere la existencia de una conformación de silla distorsionada, típica de ese sistema bicíclico.

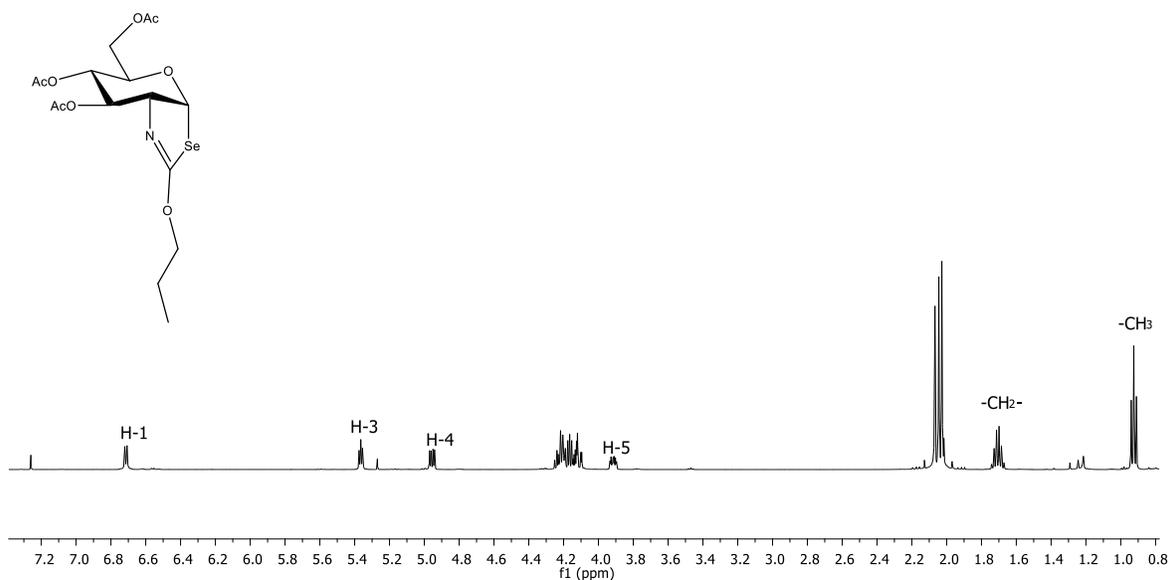


Figura 3.32. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) del producto **23**.

En el espectro de RMN de ^{13}C del producto **23** (**Figura 3.33**), se puede destacar en 163.5 ppm al carbono $\text{N}=\text{C}$, lo cual confirma la formación de la 2-alcoxiselenazolina.

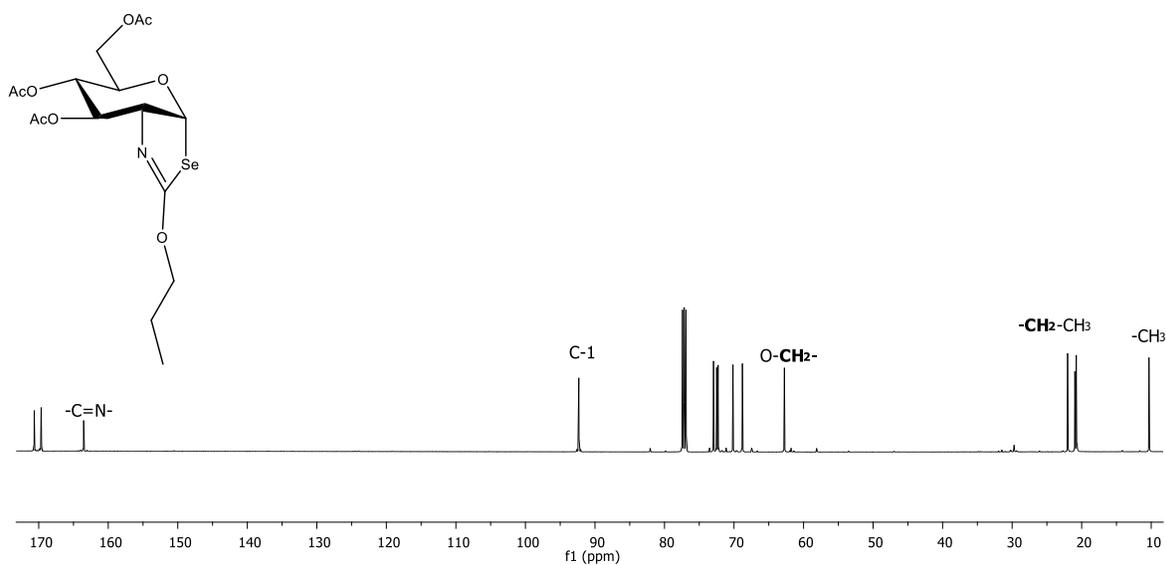


Figura 3.33. Espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3) del producto **23**.

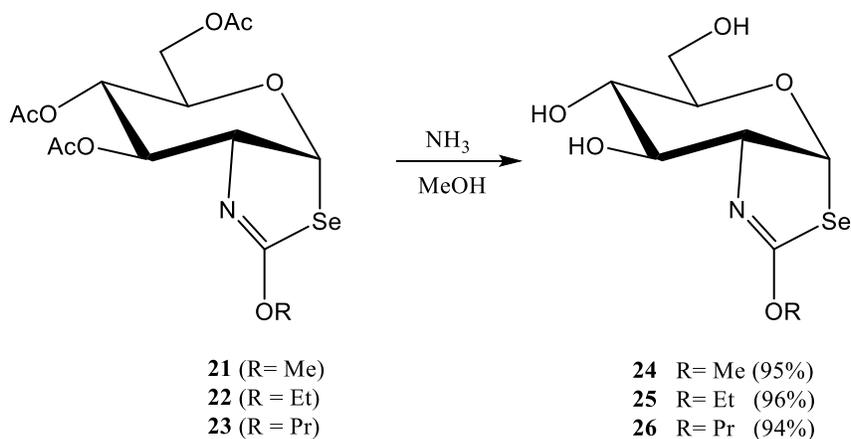
A continuación, se muestra una tabla de datos espectroscópicos seleccionados para las 2-alcoxiselenazolinias **21-23** desplazamientos químicos de H-1, C=N y C-1, así como constante de acoplamiento $J_{1,2}$ (**Tabla 3.8**).

Tabla 3.8. Selección de datos de RMN de ^1H y ^{13}C de las selenazolinas **21-23**.

| Compuesto | $\delta_{\text{H-1}}$ (ppm) | $J_{1,2}$ (Hz) | $\delta_{\text{C=N}}$ (ppm) | $\delta_{\text{C-1}}$ (ppm) |
|--------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 21 (R= Me) | 6.73 | 6.4 | 164.1 | 92.8 |
| 22 (R = Et) | 6.74 | ---* | 163.5 | 92.5 |
| 23 (R = Pr) | 6.71 | 6.4 | 163.5 | 92.3 |

*La señal se observa como multiplete.

Finalmente, las 2-alcoxiselenazolininas **21-23** se desprotegeron en las mismas condiciones que las 2-aminoselenazolininas, en amoníaco metanólico; esto permitió el acceso a las 2-alcoxiselenazolininas desprotegidas **24-26** (Esquema 3.26).



Esquema 3.26. Reacción de desprotección de las 2-alcoxiselenazolininas **21-23**.

A modo de ejemplo se muestra el espectro de ^1H -RMN para la 2-*O*-etoxiselenazolinina **25** (Figura 3.34) donde se puede comprobar la ausencia de las señales pertenecientes a los acetilos; por otro lado, se observan las señales correspondientes al fragmento *O*-etilo en 4.3 y 1.3 ppm. La señal que más información proporciona es la de H-1 en 6.9 ppm con una $J_{1,2}=6.2$ Hz, lo cual indica que las condiciones básicas no afectaron a la 2-alcoxiselenazolinina, no experimentando de esta manera una reacción indeseada de apertura del ciclo.

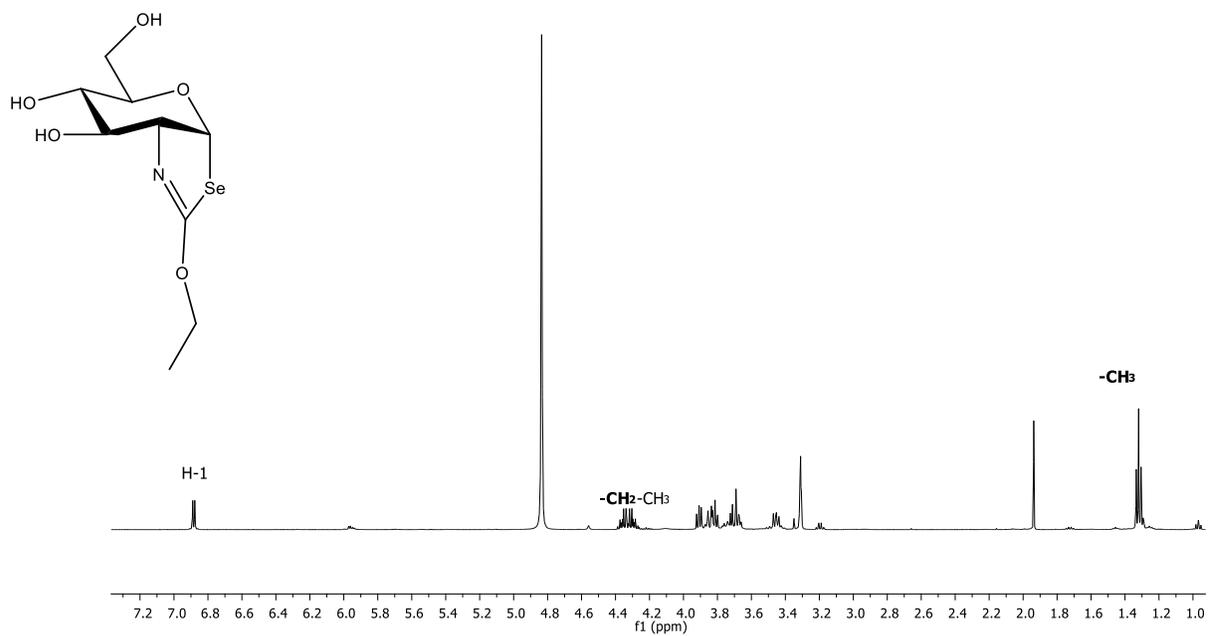


Figura 3.34. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CD_3OD) del producto **25**.

Por otra parte, el espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 3.35**), se puede destacar como señal importante C=N en 165.3 ppm.

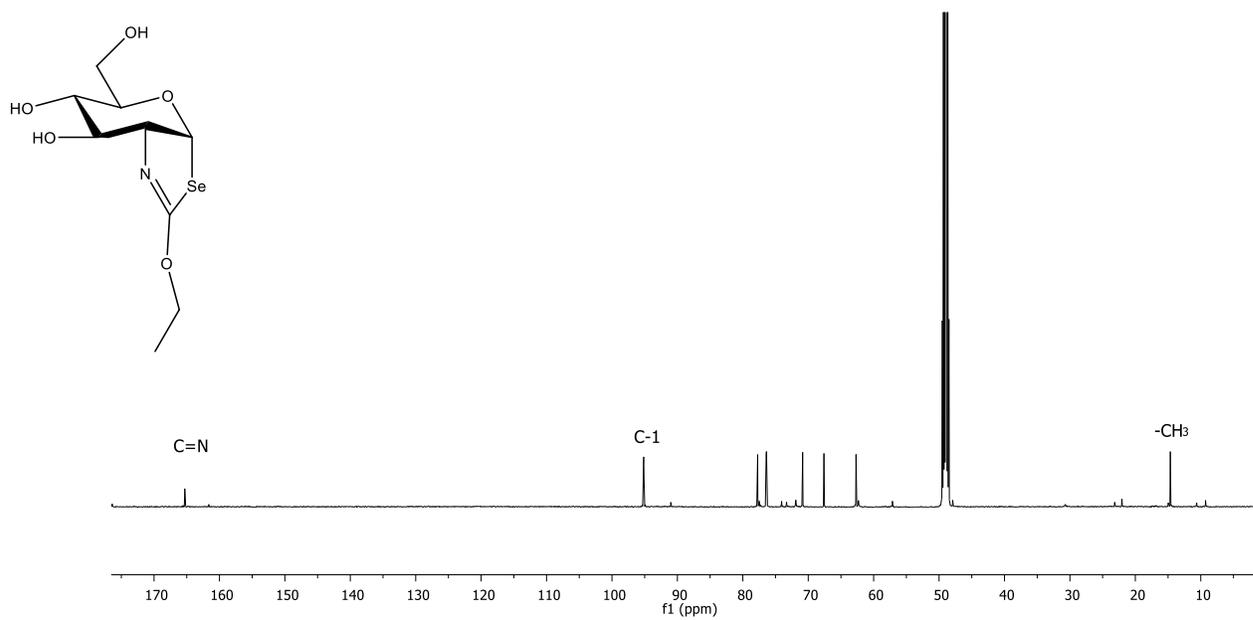


Figura 3.35. Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CD_3OD) del producto **25**.

A continuación, se muestra una tabla de datos espectroscópicos seleccionados para las 2-alcoxiselenazolininas **24-26**: desplazamientos químicos de H-1, C=N y C-1, así como constante de acoplamiento $J_{1,2}$ (**Tabla 3.9**).

Tabla 3.9. Selección de datos de RMN de ^1H de las 2-alcoxiselenazolininas **24-26**.

| Compuesto | $\delta_{\text{H-1}}$ (ppm) | $J_{1,2}$ (Hz) | $\delta_{\text{C=N}}$ (ppm) | $\delta_{\text{C-1}}$ (ppm) |
|--------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 24 (R= Me) | 6.90 | 6.1 | 166.0 | 95.5 |
| 25 (R = Et) | 6.89 | 6.2 | 165.3 | 95.2 |
| 26 (R = Pr) | 6.89 | 6.0 | 165.6 | 95.2 |

Finalmente, y con objeto de tener una visión global de la conformación preferente en disolución de los selenoheterociclos preparados, en la **Tabla 3.10** se muestran los principales valores de constantes de acoplamiento para los bicíclicos **7-12** y **21-26**. De acuerdo con los valores $J_{1,2}$ (5.4–6.4 Hz, **Tabla 3.10**), las selenazolininas bicíclicas deben exhibir una conformación de silla distorsionada. Además, se observa un cambio de conformación en solución cuando se comparan los derivados *O*-protegidos y sus contrapartes desprotegidas. Los valores de las constantes de acoplamiento $J_{2,3}$, $J_{3,4}$ (aproximadamente 5.0 Hz) para los derivados acetilados sugieren la preferencia por una conformación $^{0,3}B$ en solución (**Figura 3.36**), situación previamente observada para algunos tiocarbamatos bicíclicos *cis*-fusionados.¹³⁷ Curiosamente, cuando se eliminan los grupos acetilo, los valores de $J_{2,3}$, $J_{3,4}$ se desplazan a 7.3–8.0 Hz, lo que sugiere la preferencia por una conformación 4C_1 distorsionada.

Tabla 3.10. Constantes de acoplamiento seleccionadas para los compuestos **7–12** y **21–26**.

| | | Compuesto | Constantes de acoplamiento (Hz) | | | |
|---------------|---------------------------|-----------|---------------------------------|-----------|------------------|-----------|
| | | | $J_{1,2}$ | $J_{2,3}$ | $J_{3,4}$ | $J_{4,5}$ |
| X = NH | R² = Ac | 7 | 6.1 | 5.3 | 5.3 | 9.8 |
| | | 8 | 6.1 | 5.2 | 5.2 | 9.8 |
| | | 9 | 6.1 | 5.0 | 5.0 | 9.8 |
| | R² = H | 10 | 6.0 | 8.0 | 8.0 | 8.3 |
| | | 11 | 6.1 | 7.6 | --- ^a | --- |
| | | 12 | 5.4 | --- | 7.5 | 7.5 |
| X = O | R² = Ac | 21 | 6.2 | 5.0 | 5.0 | 9.6 |
| | | 22 | --- | --- | 4.2 | 9.5 |
| | | 23 | 6.4 | 5.0 | 5.0 | 9.7 |
| | R² = H | 24 | 6.1 | 7.6 | 7.5 | 9.2 |
| | | 25 | 6.2 | 7.4 | 7.3 | 9.2 |
| | | 26 | 6.0 | 7.4 | 7.4 | --- |

^a Señales anchas o múltiples.

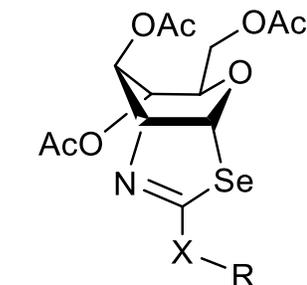


Figura 3.36. Conformación ^{0.3}*B* preferente en disolución de los compuestos **7-9** y **21-23**.

Está documentado que las sales del derivado triacetilado de la NAG-tiazolina exhiben una conformación de tipo bote torcido (0S_2), tanto en disolución, como en estado sólido.¹⁷⁶ El análisis de las constantes de acoplamiento vecinas y experimentos NOE llevados a cabo sobre la NAG-tiazolina sugieren¹⁷⁷ que este compuesto puede existir como una mezcla de conformeros en disolución: 0S_2 como el mayoritario; 4C_1 , 1S_3 , como minoritarios, y 1C_4 , despreciable. Se argumentó que, quizás, las repulsiones estéricas 1,3-diaxiales eran responsables de que la conformación de silla fuera minoritaria en disolución.

Estudios teóricos también sugirieron que no existe mucha penalización en la interconversión de las distintas conformaciones (1-2 kcal/mmol); esto quiere decir que la NAG-tiazolina puede adoptar fácilmente la conformación 4C_1 requerida al interactuar con el sitio activo de la OGA.¹⁷⁷

Por otro lado, cálculos *ab initio* realizados sobre la 2-metil-1,3-selenazolina, el selenoisómero de la NAG-tiazolina predijeron la conformación 4C_1 como la más favorable, quizás con una participación menor de las conformaciones 0S_2 y 1S_3 .⁹⁵

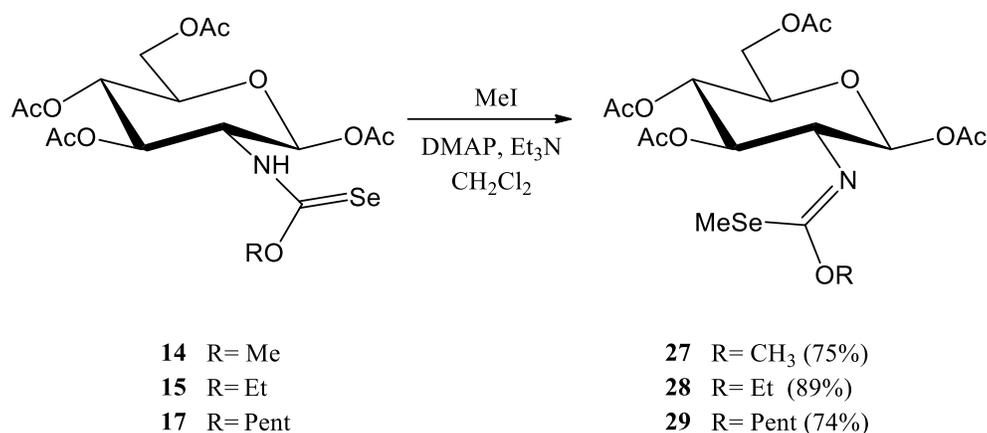
Selenocarbamatos *Se*-metilados en posición C-2 de D-glucosamina

Las excelentes propiedades antiproliferativas (ver sección de actividades biológicas) exhibidas por el *Se*-metil selenocarbamato **13** (**Esquema 3.21**) nos animó a llevar a cabo la preparación de derivados análogos; para ello se procedió a metilar algunos de los selenocarbamatos obtenidos con MeI.

Los selenocarbamatos correspondientes **14** (OMe), **15** (OEt) y **17** (OPent) se hicieron reaccionar con yoduro de metilo como agente alquilante en presencia de DMAP y trietilamina, obteniéndose los productos **27-29** con rendimientos de buenos a excelentes tras purificación cromatográfica (**Esquema 3.27**). En estos compuestos se ha dibujado uno de los posibles isómeros geométricos del doble enlace C=N, pero no se ha determinado la estereoquímica real del mismo.

176. Knapp, S.; Abdo, M.; Ajayi, K.; Huhn, R.A.; Emge, T.J.; Kim, E.J.; Hanover, J.A. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 23212–2324.

177. Knapp, S.; Fash, D.; Abdo, M.; Emge, T.J.; Rablen, P.R. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1831–1836.



Esquema 3.27. Síntesis de *Se*-metil selenocarbamatos derivados de carbohidrato.

En la **Figura 3.37** se muestra, a modo de ejemplo, el espectro de ¹H-RMN del producto **27**, donde alrededor de 2.30 ppm se encuentra la señal de metilo correspondiente al fragmento *Se*-Me, de manera análoga a lo observado anteriormente para el *Se*-metil selenocarbamato **13**. Adicionalmente se observa la señal correspondiente al fragmento OMe alrededor de 3.70 ppm.

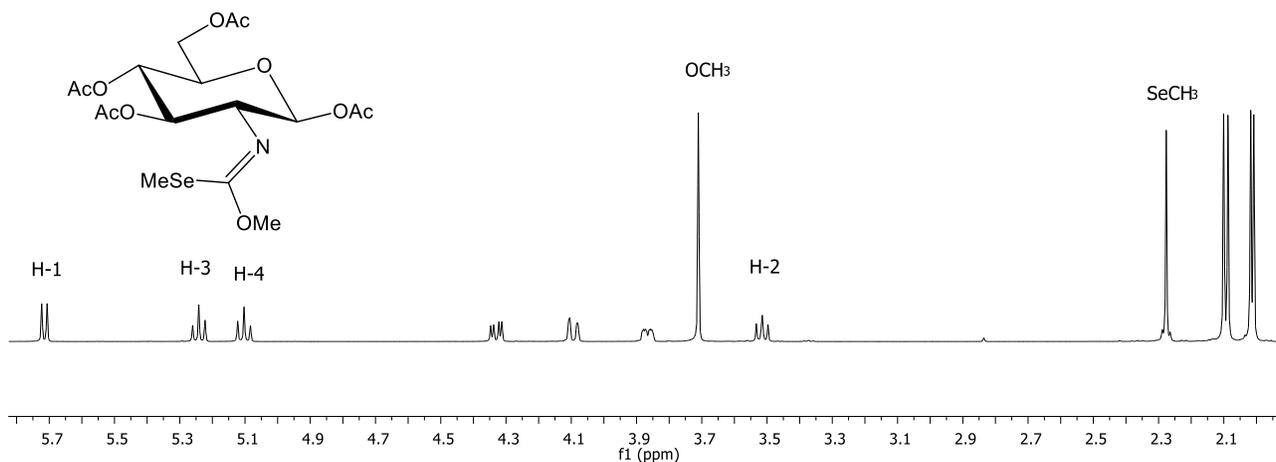


Figura 3.37. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del producto **27**.

Por otra parte, el espectro de ¹³C-RMN (**Figura 3.38**), se pueden destacar dos señales importantes en la formación de este producto; por un lado, la señal que se encuentra alrededor

de 5 ppm, correspondiente al SeCH_3 . Por otro lado, la señal en aproximadamente 158 ppm correspondiente al $\text{C}=\text{N}$; ambas confirman la obtención de este producto.

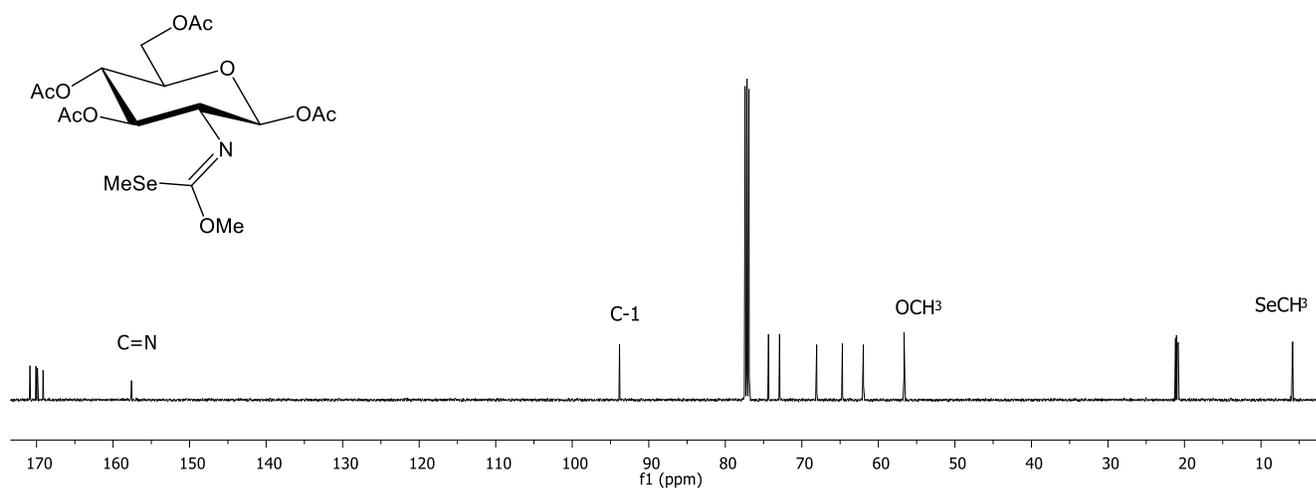


Figura 3.38. Espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) del producto **27**.

En la **Tabla 3.11** se muestra una selección de datos de ^1H - y ^{13}C -RMN de los *Se*-metil derivados **27-29**, tanto desplazamientos químicos de H-1, C=N, C-1, SeCH_3 , como la constante de acoplamiento $J_{1,2}$; esta última muestra claramente el mantenimiento del anómero β en el sistema.

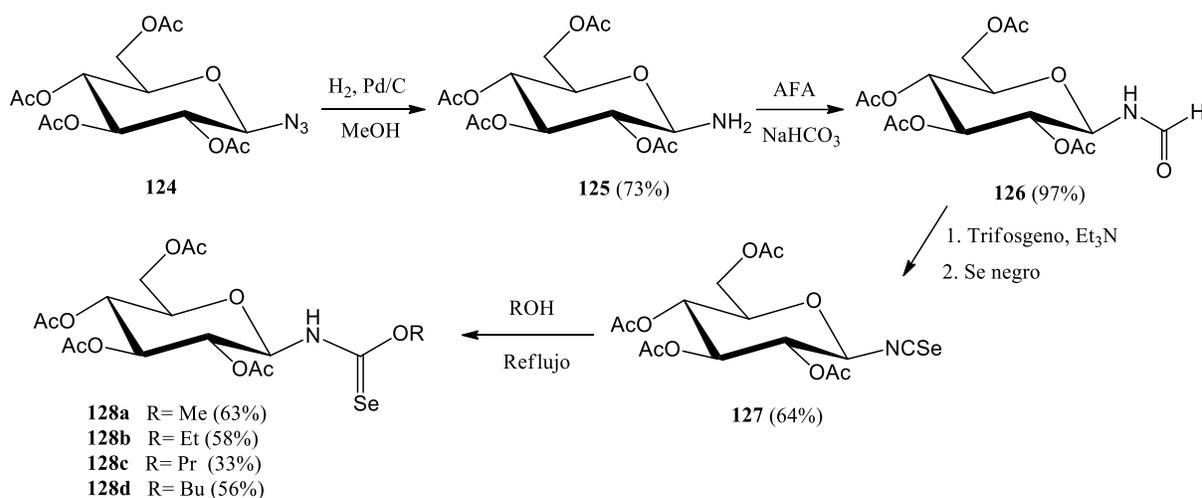
Tabla 3.11. Selección de datos de RMN de ^1H y ^{13}C de los productos **27-29**.

| Compuesto | $\delta_{\text{H-1}}$ (ppm) | $J_{1,2}$ (Hz) | $\delta_{\text{H-2}}$ (ppm) | $\delta_{\text{C=N}}$ (ppm) | $\delta_{\text{C-1}}$ (ppm) | δ_{SeMe} (ppm) |
|----------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 27 (R = OMe) | 5.71 | 8.1 | 3.51 | 157.6 | 93.8 | 5.9 |
| 28 (R= Et) | 5.70 | 8.1 | 3.50 | 156.9 | 93.8 | 5.9 |
| 29 (R = Pent) | 5.70 | 8.1 | 3.50 | 156.9 | 93.8 | 5.9 |

También se efectuó la síntesis de los 4 selenocarbamatos en posición C-1 mostrados en el **Esquema 3.28**. Dichos compuestos fueron descritos previamente por los grupos de investigación donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral,¹²⁰ y evaluados en su momento como agentes antioxidantes, pero no como agentes antiproliferativos.

El objetivo de su preparación ha sido analizar sus propiedades antiproliferativas, en función del tamaño de la cadena en la función alcóxido, y compararlas con la de los análogos en la posición C-2 preparados en esta Tesis Doctoral (compuestos **14-19**).

Se empleó como materia prima esencial el β -D-glucopiranosilisosenocianato per-*O*-acetilado **127**. Dicho compuesto se obtuvo a partir de la correspondiente β -D-glucopiranosilazida **124**, mediante hidrogenación catalítica del grupo azido para dar la correspondiente amina **134**, la cual se hizo reaccionar con anhídrido acético-fórmico (AFA) para dar la formamida **126**. Dicha formamida posteriormente se utilizó para la formación del isosenocianato **127** utilizando trifosgeno como agente deshidratante dando lugar a la formación del correspondiente isonitrilo intermedio no aislado, seguido de adición *in situ* de selenio elemental. El acoplamiento del isosenocianato con diferentes alcoholes (metanol, etanol, propanol, butan-1-ol) permitió obtener los correspondientes selenocarbamatos **128a-d** (Esquema 3.28).



Esquema 3.28. Síntesis de *O*-alquil selenocarbamatos derivados de carbohidrato en posición C-1.

Síntesis de glucofuranoso-imidazolina-2-selonas como potenciales agentes antiproliferativos

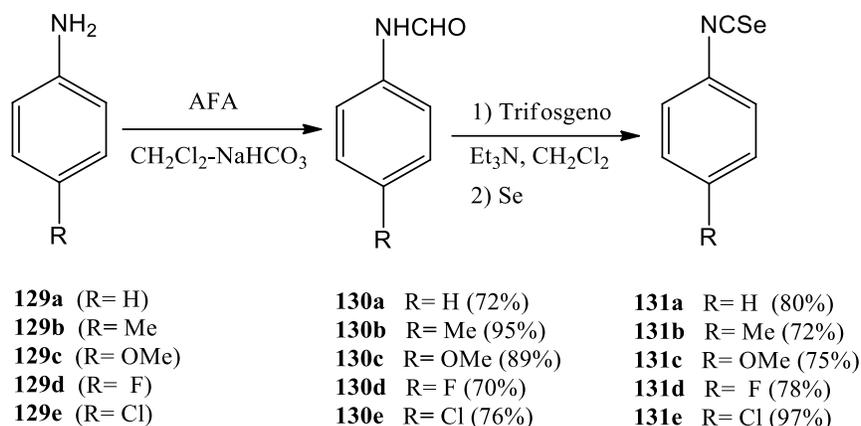
Continuando con la idea de conjugar una función organoselénica con un residuo de carbohidrato, también se abordó la preparación de glucofuranoso-imidazolina-2-selonas bicíclicas (**Esquema 3.30**). Este tipo de pseudonucleósidos *cis*-fusionados, constituido por un anillo de glucofuranosa y una selenourea cíclica, fue preparado por primera vez por el Prof. Fernández-Bolaños *et al.* (compuestos **134a,c**),¹⁷⁸ extendiéndose posteriormente la síntesis a la obtención de derivados de D-manosamina y también a sistemas espiránicos.¹⁷⁹

Este tipo de estructuras presenta un marcado interés desde el punto de vista biológico; por un lado, la presencia de un residuo sacarídico puede permitir alguna de las ventajas anteriormente argumentadas. Por otro lado, la función organoselénica podría aportar actividad antiproliferativa a los derivados, tal como se ha descrito en la introducción de la presente Tesis Doctoral. Se trata, además, de compuestos más estables que los análogos de tipo selenourea acíclica. Por todo ello se decidió abordar la síntesis de un pequeño panel de derivados, modificando la naturaleza esteroelectrónica de los sustituyentes del anillo aromático, y estudiar su actividad como agente antiproliferativo, ya que, hasta la fecha, no se ha evaluado ninguna propiedad biológica de estos compuestos.

Para llevar a cabo la síntesis de las glucofuranoso-imidazolina-2-selonas indicadas en el **Esquema 3.30**, se utilizaron como materia prima clave los isoselenocianatos de arilo **131a-e**. A partir de las anilinas comerciales **129a-e** se llevó a cabo la *N*-formilación con anhídrido acético fórmico previamente preparado (AFA), para dar lugar a las formamidas correspondientes **130a-e** (**Esquema 3.29**). Posteriormente se realizó la deshidratación en presencia de trifosgeno y trietilamina para generar los isonitrilos intermediarios correspondientes, no aislados, y que tras la adición de Se negro elemental *in situ* condujeron a la formación de los isoselenocianatos **131a-e**.

178. Fernández-Bolaños, J. G.; Skrydstrup, T.; López-Castro, A.; Millan, M. J. D.; Estrada de Oya, M. D. *Carbohydr. Res.* **1992**, *237*, 303–311.

179. Maza, S.; López, Ó.; Martos, S.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J. G. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5239–5246.



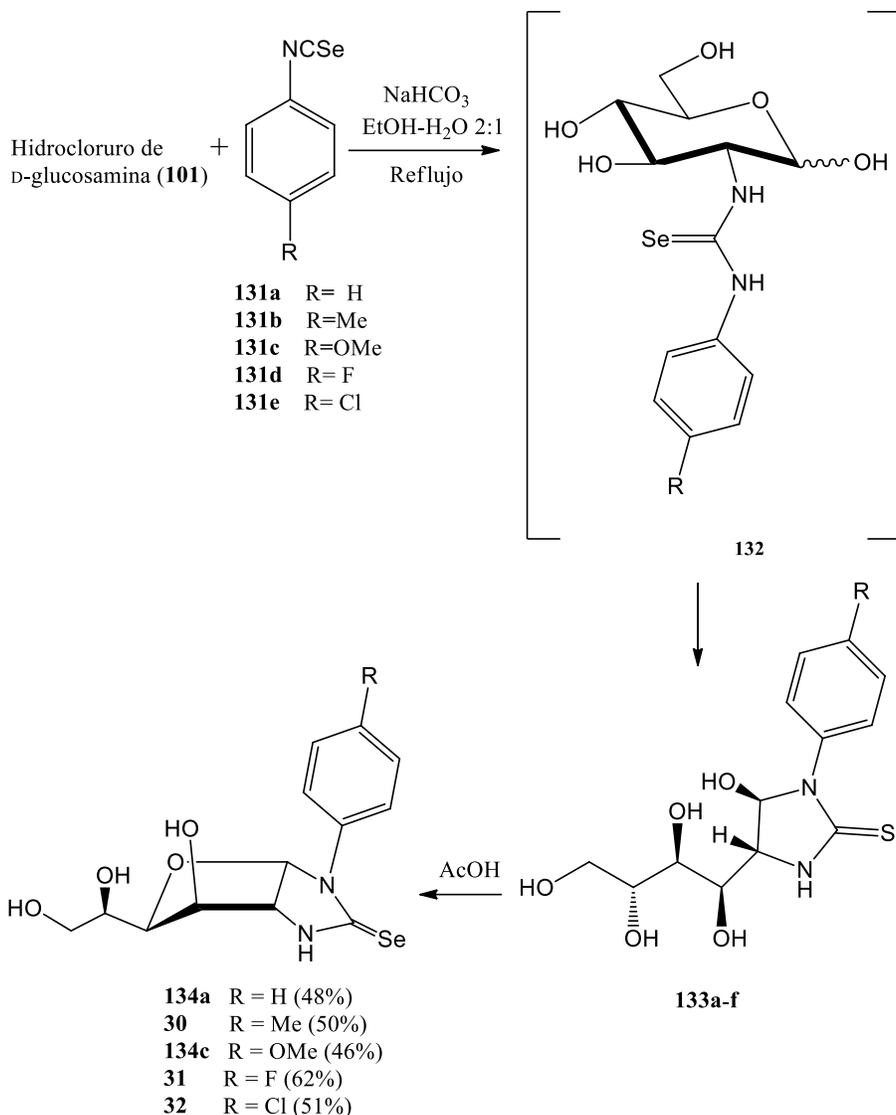
Esquema 3.29. Síntesis de isoselenocianatos de arilo *p*-sustituidos.

Posteriormente se llevó a cabo el acoplamiento de los isoselenocianatos **131a-e** con hidrocloreuro de D-glucosamina comercial **101** en presencia de NaHCO₃ como base. El calentamiento a reflujo origina las 5-hidroxi-4-polihidroxialquil-imidazolina-2-selonas **133a-f**, cuya formación se puede explicar mediante la obtención en primera instancia de la selenourea **132**, seguido de ataque nucleófilo intramolecular espontáneo del grupo NH-3 de esta sobre el grupo carbonilo latente del azúcar reductor.

Para isómeros con azufre se ha descrito¹⁸⁰ que los compuestos análogos a **133** existen en forma de dos epímeros en C-5, siendo el mayoritario en de configuración *5R* cuando se parte de D-glucosamina.

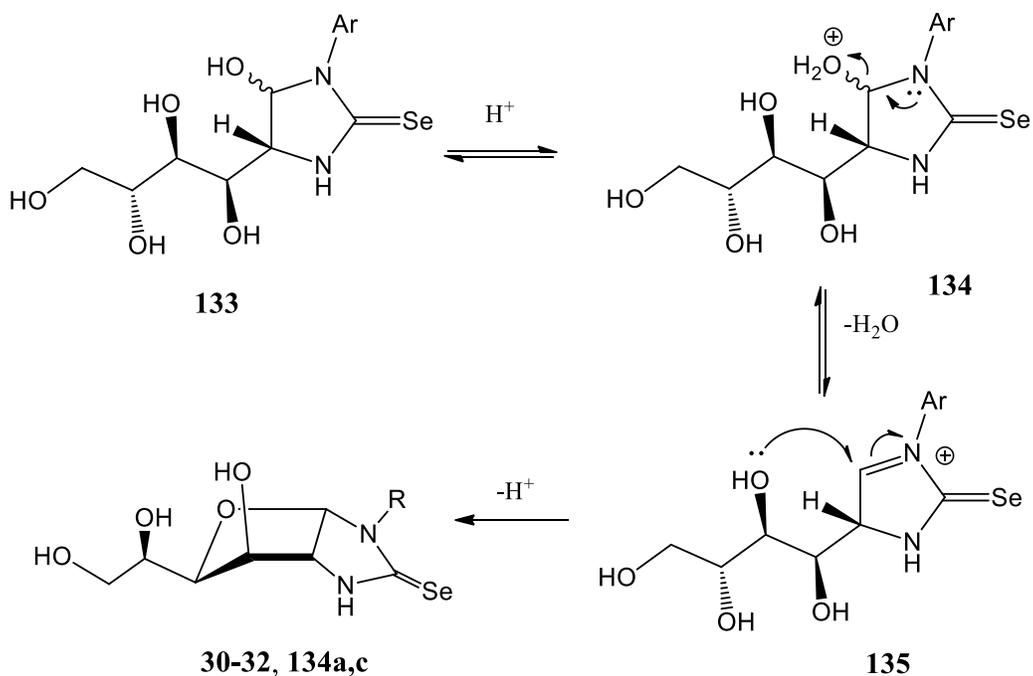
A continuación, se añade en el mismo medio de reacción AcOH y la mezcla se refluje hasta la obtención de las glucofuranoso-imidazolina-2-selonas *p*-sustituidas (**Esquema 3.30**).

180. Fernández-Bolaños, J. G.; Zafra, E.; López, Ó.; Robina, I.; Fuentes, J. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1999**, *10*, 3011–3023.



Esquema 3.30. Síntesis de glucofuranoso-imidazolina-2-selonas.

La formación de los bicíclicos se puede explicar mediante el mecanismo mostrado en el **Esquema 3.31**. La protonación del hidroxilo en C-5 de **133** genera, tras eliminación de una molécula de agua, un carbocatión estabilizado por resonancia, el cual a su vez experimenta el ataque nucleofílico intramolecular del hidroxilo localizado en la posición C-2' de la cadena polihidroxilada.



Esquema 3.31. Mecanismo de formación de los biciclos **30-32, 134a,c**

A modo de ejemplo se muestra el espectro de ^1H -RMN para el producto **31**; en él se pueden destacar señales como importantes de la formación de este producto los protones aromáticos que se encuentran alrededor de 7.4-7.2 ppm. Por otra parte, las constantes $J_{1,2} = 6.4$ Hz, $J_{2,3} \approx 0$ Hz $J_{4,5} = 8.6$ Hz demuestran la conformación E_4 del residuo de carbohidrato, donde los protones H-1 y H-2 se encuentran en orientación relativa *sin*, y los protones H-2 y H-3 en un ángulo próximo a 90° (**Figura 3.39**).

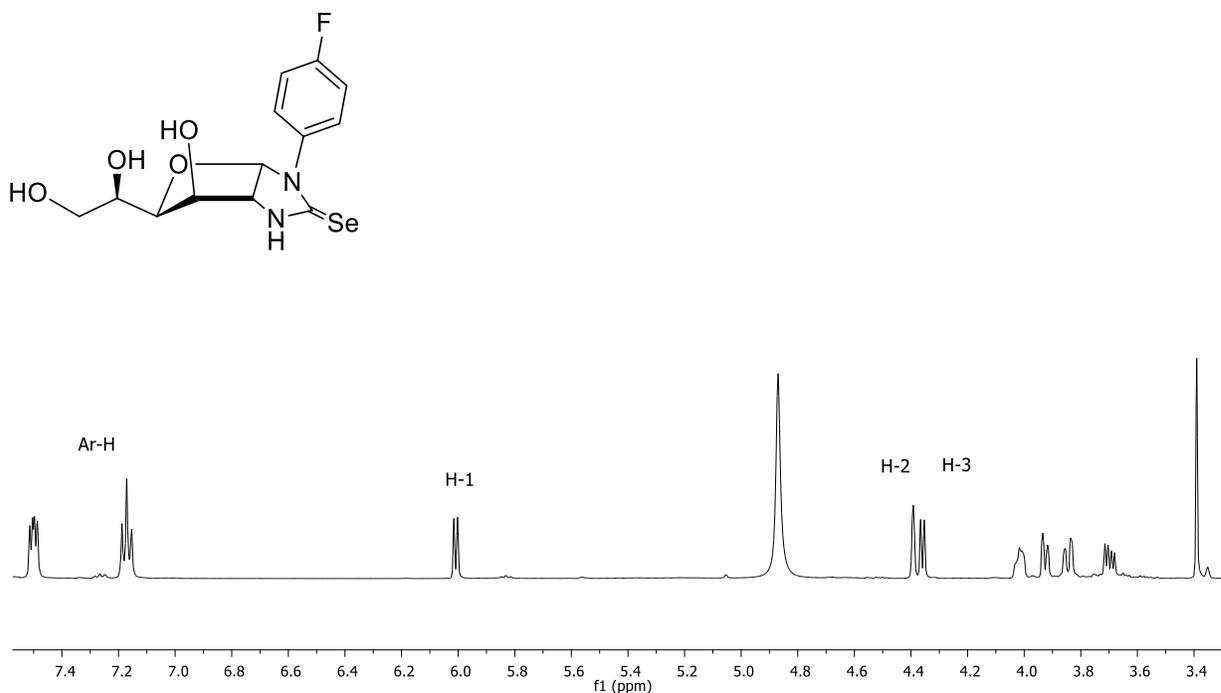


Figura 3.39. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del producto **31**.

Por otra parte, se puede observar el espectro de ¹³C-RMN (**Figura 3.40**) la señal correspondiente al enlace C=Se (≈180 ppm), en la región entre 140-120 ppm, las señales correspondientes al fragmento del arilo y en 96.9 ppm, el carbono anomérico.

Una característica interesante del espectro de ¹³C-RMN del derivado **31** es que, debido a la presencia del átomo de F (activo en RMN, ¹⁹F, I = 1/2), se observan acoplamiento del átomo de flúor con todos los átomos de carbono del anillo aromático, que aparecen como dobletes, tal y como puede apreciarse en la ampliación de la **Figura 3.40**. De esta manera, se tienen las siguientes constantes de acoplamiento: C-1' (δ = 136.4 ppm, ⁴J_{C,F} = 2.8 Hz), C-2' (δ = 131.5 ppm, ³J_{C,F} = 8.8 Hz), C-3' (δ = 116.4 ppm, ²J_{C,F} = 23.0 Hz), C-4' (δ = 163.3 ppm, ¹J_{C,F} = 245.8 Hz).

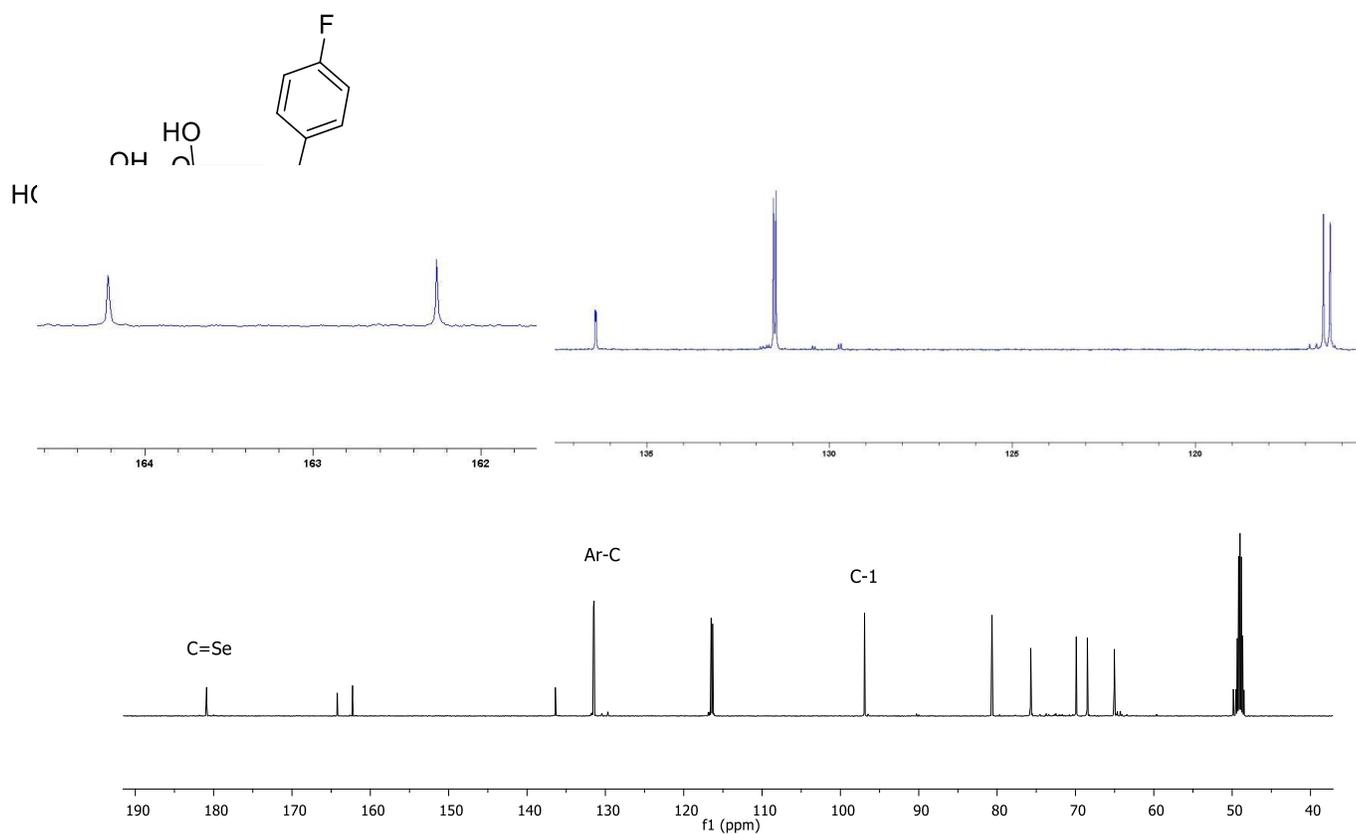


Figura 3.40. Espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) del producto **29**.

A continuación, en la **Tabla 3.12** se muestra una selección de datos espectroscópicos para todas las glucofuranoso-imidazolina-2-selonas obtenidas. Se puede observar que la modificación del sustituyente del anillo aromático no causa ningún efecto sobre las señales de los compuestos, y que en todos ellos se mantiene la conformación anteriormente mencionada, con $J_{1,2}$ en torno a 6.3-6.5 Hz, y $J_{2,3} \approx 0$ Hz.

Tabla 3.12. Selección de datos de RMN de ^1H y ^{13}C de los productos **30-32**. **134a,c**^a

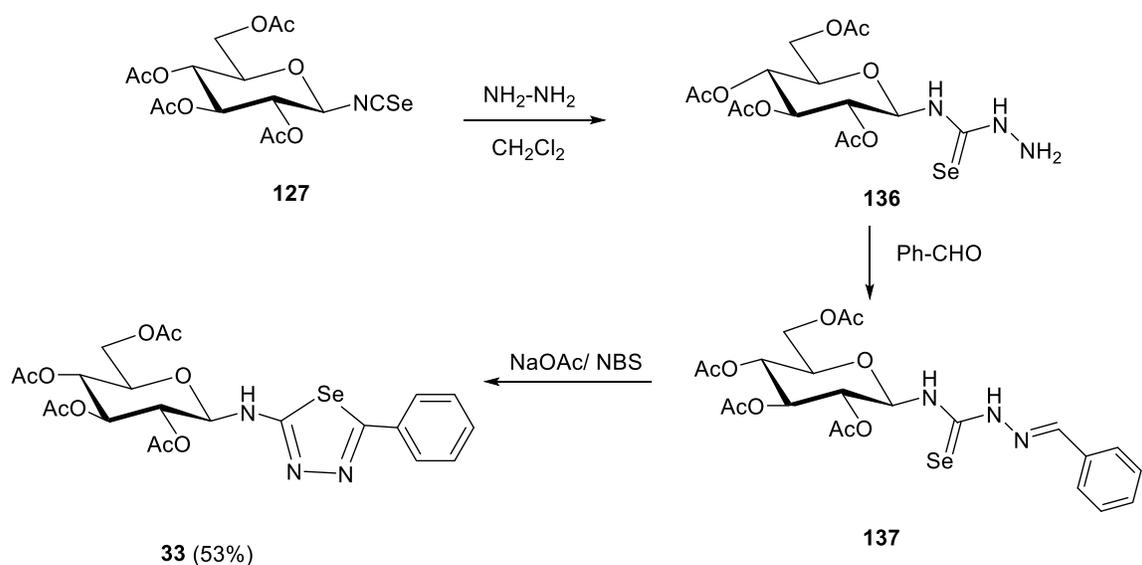
| Compuesto | H-1 | $J_{1,2}$ | C=Se | C-1 |
|---------------------|------|-----------|-------|------|
| 134a (R=H) | 5.96 | 6.4 | 178.2 | 95.0 |
| 30 (R=Me) | 5.90 | 6.3 | 178.3 | 95.0 |
| 134c (R=OMe) | 5.94 | 6.4 | 181.1 | 97.1 |
| 31 (R = F) | 6.01 | 6.5 | 180.9 | 96.9 |
| 32 (R = Cl) | 5.97 | 6.3 | 178.2 | 94.9 |

^aLos datos espectroscópicos de **134a,c** están de acuerdo con los descritos en la bibliografía.¹⁷⁸

Síntesis de 2-amino-1,3,4-selenadiazoles

Debido al interés que suscita el empleo de derivados de carbohidrato en el desarrollo de productos con actividad antitumoral, así como las interesantes propiedades biológicas de los selenoheterociclos, decidimos llevar a cabo la conjugación de 1,3,4-selenadiazoles a un fragmento sacarídico, con objeto de explorar nuevos derivados con potencial actividad antiproliferativa.

Para la síntesis de 2-amino-1,3,4-selenadiazoles, se utilizó la metodología desarrollada por Li *et al.*;¹³¹ para ello, la materia prima clave fue el β -D-glucopiranosilisosenocianato per-*O*-acetilado **127** (**Esquema 28**). El acoplamiento de **127** con hidrazina condujo a la formación de la selenosemicarbazida **136** no aislada; posteriormente la adición de benzaldehído en el mismo medio de reacción, dio como resultado la selenosemicarbazona **137**, que tras el tratamiento con NaOAc y NBS experimentó una ciclación intramolecular para dar lugar al selenadiazol **33** con un 38% de rendimiento global para las tres etapas en una metodología *one-pot* (**Esquema 3.32**).



Esquema 3.32. Síntesis del 2-amino-1,3,4-selenadiazol derivado de carbohidrato **33**.

En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ del compuesto **33** (**Figura 3.41**) se pueden observar las señales características de la estructura: señales aromáticas entre 7.70-7.40 ppm, protón anomérico en 5.17 ppm, con una $J_{1,2} = 9.25$ Hz, así como 4 singuletes (2.04-2.08 ppm), correspondientes a los 4 grupos acetilo.

La desaparición de las señales por encima de 9 ppm en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ (protón imínico de la selenosemicarbazona) justifica la formación de **33**.

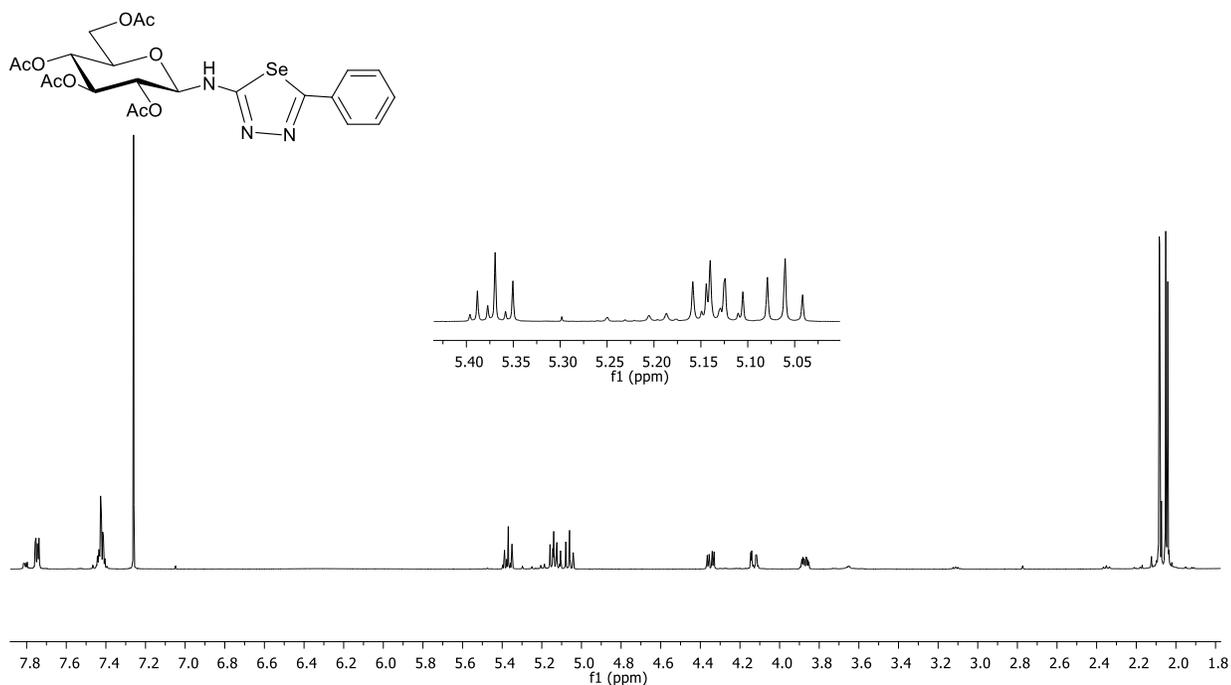


Figura 3.41. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del producto **33**.

El espectro de ¹³C RMN (**Figura 3.42**) nos proporciona información valiosa; por ejemplo, se observan dos señales nuevas pertenecientes al nuevo ciclo del selenadiazol en aproximadamente 165 (C-2) y 169 ppm (C-5).

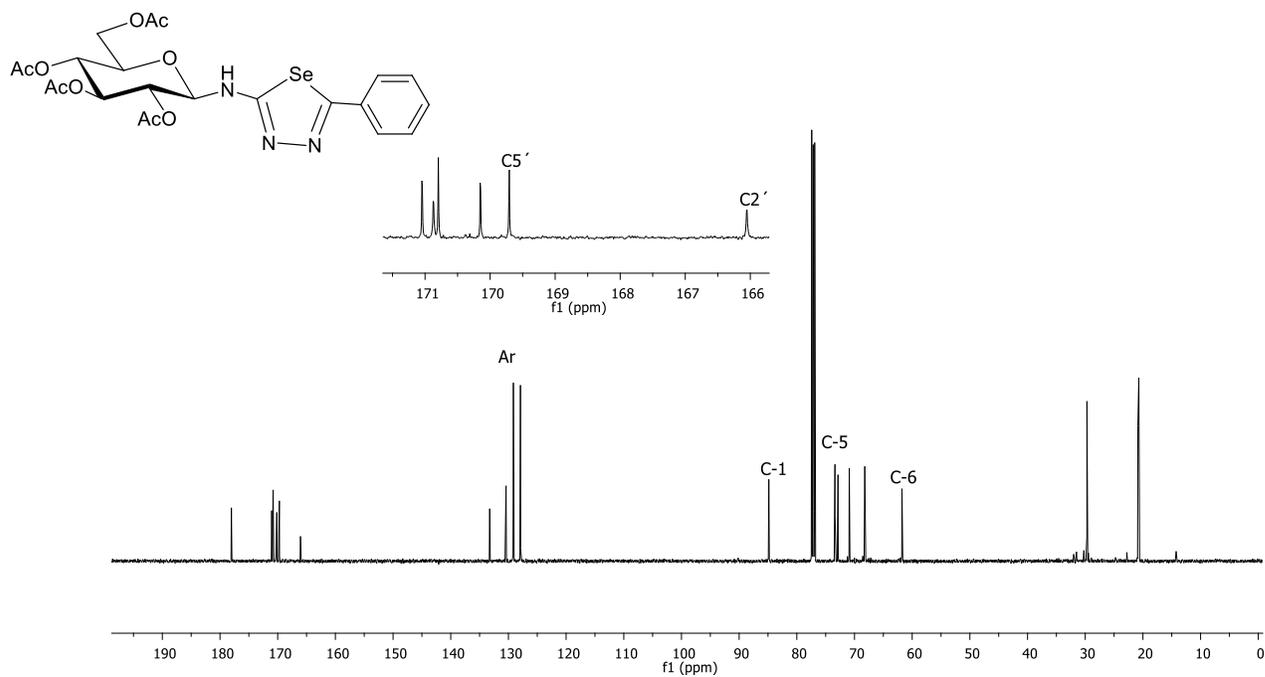


Figura 3.42. Espectro de ^{13}C RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del producto **33**.

Desafortunadamente, la mejora del rendimiento y el acoplamiento con diferentes aldehídos con objeto de extender la serie no se pudo realizar debido a la pandemia provocada por el COVID-19, que obligo a la interrupción de la actividad investigadora en la BUAP en el periodo comprendido entre Marzo de 2020 y de Junio 2021, y a la incorporación escalonada a partir de Julio-Diciembre de 2021.

3.4. Evaluación biológica

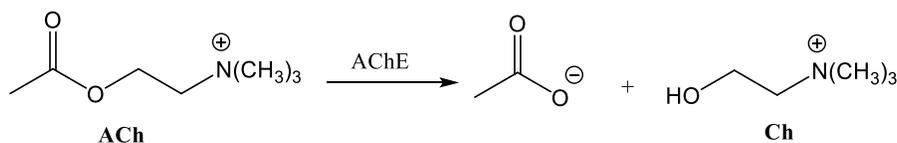
Como se ha comentado en la sección anterior, las 2-aminoalquil y 2-alcoxi-1,3-selenazolininas bicíclicas **10-12** y **24-26**, respectivamente, han sido evaluadas como potenciales inhibidores de colinesterasas (ChE) y OGA, debido a su analogía estructural con inhibidores clásicos como el Thiamet-G. Por otro lado, las otras familias de selenoderivados de carbohidrato sintetizados en este capítulo de la Tesis Doctoral, esto es, las selenoureas **4-6**, el *Se*-metil selenocarbamato **13**, los *O*-alquilselenocarbamatos **14-19**, los *Se*-alquilisoselenocarbamatos **27-29** y el selenadiazol **33** han sido evaluados como agentes antiproliferativos. Se espera poder evaluar en breve en este sentido a las imidazolidina-2-selonas **30-32**, **134a,c**. Los resultados obtenidos hasta la fecha se expondrán a continuación.

3.4.1. Actividad anti-Alzheimer

La potencial actividad anti-Alzheimer de las 1,3-selenazolininas bicíclicas derivadas de carbohidrato **10-12** y **24-26**, se ha evaluado mediante la inhibición de las enzimas clave colinesterasas (AChE, BuChE), así como la OGA, esta última en colaboración con el Dr. Antonio J. Moreno, del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla.

Inhibición de colinesterasas

La acetilcolinesterasa (EC 3.1.1.7) cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh), finalizando la transmisión sináptica en el sistema nervioso central (**Esquema 3.33**); dicha enzima posee una elevada actividad catalítica, siendo capaz de procesar alrededor de 25.000 moléculas de ACh/s.¹⁸¹ La hidrólisis genera acetato y colina (Ch).



Esquema 3.33. Esquema general de la hidrólisis del neurotransmisor ACh mediada por AChE.

181. Čolović, M. B.; Krstić, D. Z.; Lazarević-Pašti, T. D.; Bondžić, A. M.; Vasić, V. M. *Curr. Neuropharmacol.* **2013**, *11*, 315–335.

La AChE exhibe dos regiones cruciales para el diseño de potenciales inhibidores: el sitio activo catalítico (CAS, *Catalytic Active Site*) y la región aniónica periférica (PAS, *Peripheral Active Site*), conectados por una cavidad o garganta estrecha (con una longitud de aproximadamente 20 Å); el PAS, que contiene los residuos Tyr72, Asp74, Tyr124, Trp286, Tyr341, sirve como un punto de unión de baja afinidad para concentrar la ACh en la entrada de la garganta.

A su vez, CAS, la región donde tiene lugar la reacción de hidrólisis de la ACh se puede dividir en cuatro regiones adicionales (**Figura 3.43**): el subsitio esterático (que contiene la triada catalítica, Ser203, His447, Glu334), el subsitio aniónico (que contiene los aminoácidos Trp86, Tyr133, Tyr337 y Phe338, y que estabiliza al grupo amonio de la AChE a través de interacciones catión- π), el subsitio del oxianión (que contiene los aminoácidos Gly121, Gly122, Ala204, que estabilizan la carga negativa del intermedio cargado de la hidrólisis de la AChE), y el subsitio de acilo (que a través de los residuos Phe295 y Phe 297 controla la especificidad hacia el sustrato).¹⁸²

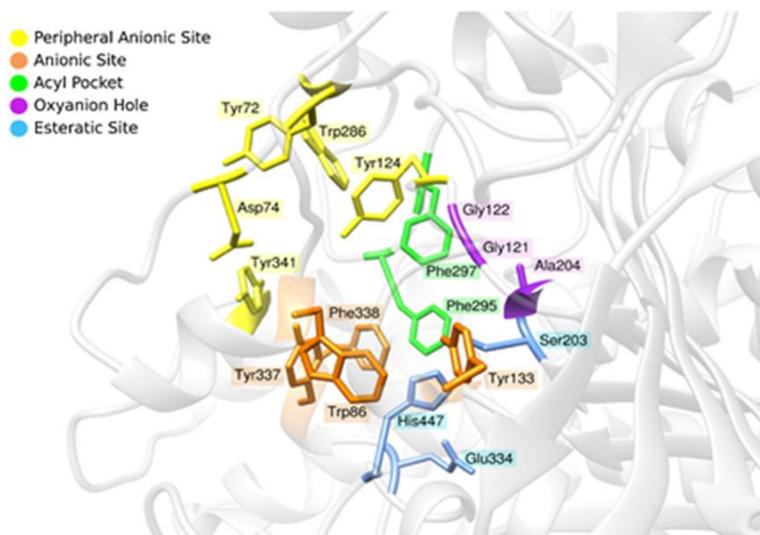


Figura 3.43. Estructura parcial de la AChE humana, mostrando las regiones esenciales. Tomado de referencia 182.

182. Eckroat, T. J.; Manross, D. L.; Cowan, S. C. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5965.

El mecanismo de la AChE implica una reacción tipo S_NAc mediada por el residuo de Ser203, y favorecida por reacciones ácido-base en la que participan el carboxilato del aminoácido Glu334 y el fragmento de imidazol de His447.¹⁸¹

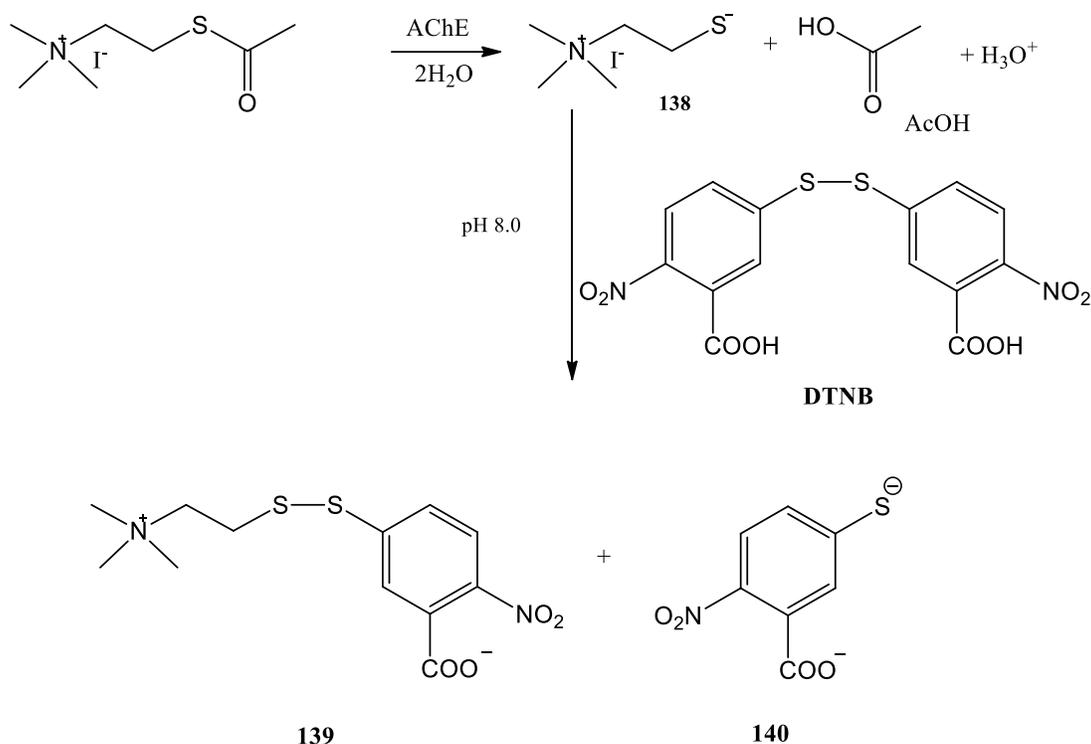
Con respecto a los derivados **10-12** y **24-26**, y tal y como se mencionó anteriormente, el resto de selenazolina incorporado en los compuestos objetivo resultan ser interesantes, debido a su carácter protonable; el correspondiente resto cargado positivamente, que se asemeja al ion de amonio cuaternario de acetilcolina, podría estabilizarse en el sitio aniónico, mediante interacciones catión- π .

Para la evaluación *in vitro* de la inhibición de colinesterasas se utilizaron AChE de *electrophorus electricus* y BuChE de suero equino, que actualmente se consideran buenas enzimas modelo debido a su semejanza estructural con las de mamíferos,¹⁸³ El análisis de la actividad se realizó mediante el ensayo colorimétrico de Ellman,¹⁸⁴ un método indirecto en el que los sustratos modelo (yoduros de acetyl y butiril tiocolina) se someten a hidrólisis realizada por la enzima (pH 8.0), seguida de una reacción *in situ* del producto hidrolizado con DTNB (5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), reactivo de Ellman), para proporcionar 2-nitro-5-tiobenzoato, que absorbe fuertemente a 405 nm (**Esquema 3.34**).¹⁸⁵

183. Bon, S.; Vigny, M.; Massoulie, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 2546–2550.

184. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.

185. Worek, F.; Eyer, P.; Thiermann, H. *Drug Test. Analysys.* **2012**, *4*, 282–291.



Esquema 3.34. Reacciones implicadas en el ensayo de Ellmann.

En las **Figuras 1.44-1.55** y **Tabla 3.13** se presentan los valores de IC₅₀ para la inhibición de AChE y BuChE obtenidos para las selenazolinas **10-12** y **24-26**, es decir, la concentración de los mismos necesaria para reducir la actividad de la enzima al 50% a una concentración fija de sustrato ([S] = 121 μM para AChE, [S] = 112 μM para BuChE). Dichos valores se obtuvieron mediante representación del %I frente al log[Inhibidor], y ajustando a una ecuación de segundo grado. Los experimentos se realizaron por duplicado, y el resultado se expresa como la media ± desviación estándar.

Es importante recordar que un menor valor de IC₅₀ se corresponde con una mayor actividad del compuesto en cuestión. En la comparativa se incluyó también el fármaco galantamina, usado actualmente en el tratamiento del Alzheimer, como control positivo.

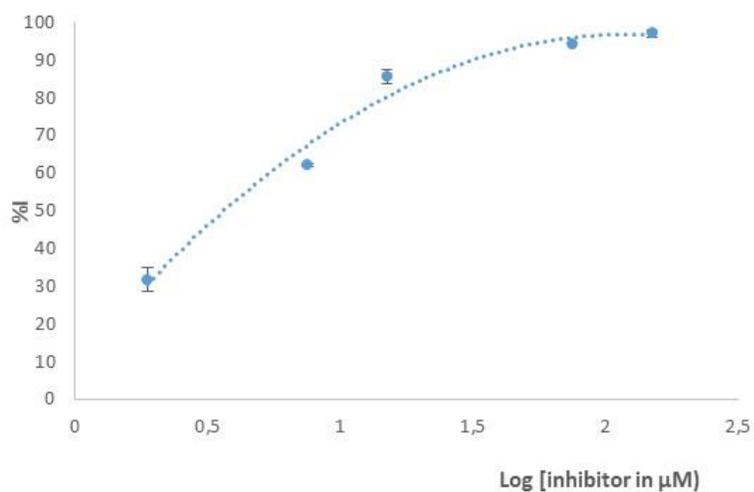


Figura 3.44. Grafica de IC_{50} para la inhibición de AChE del compuesto **10** ($\text{IC}_{50} = 3.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$)

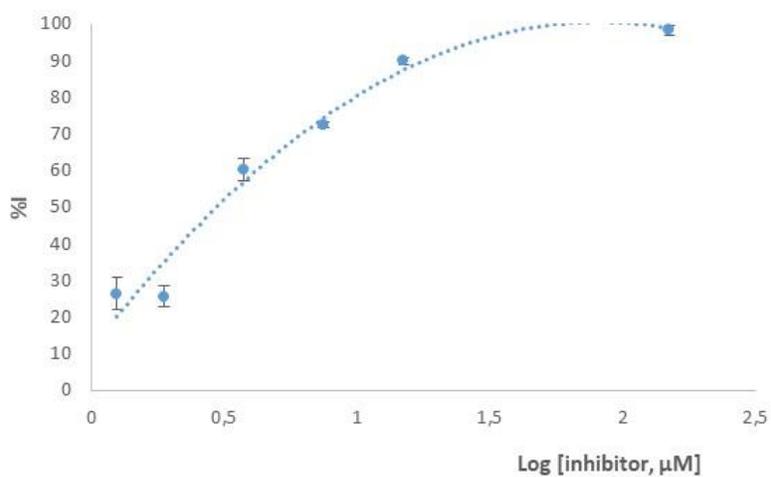


Figura 3.45. Grafica de IC_{50} para la inhibición de AChE del compuesto **11** ($\text{IC}_{50} = 3.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$)

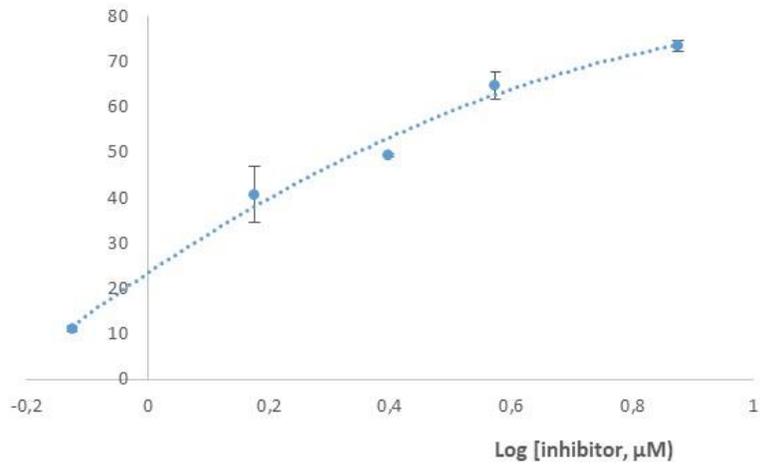


Figura 3.46. Grafica de IC_{50} para la inhibición de AChE del compuesto **12** ($IC_{50} = 2.2 \pm 0.1 \mu M$)

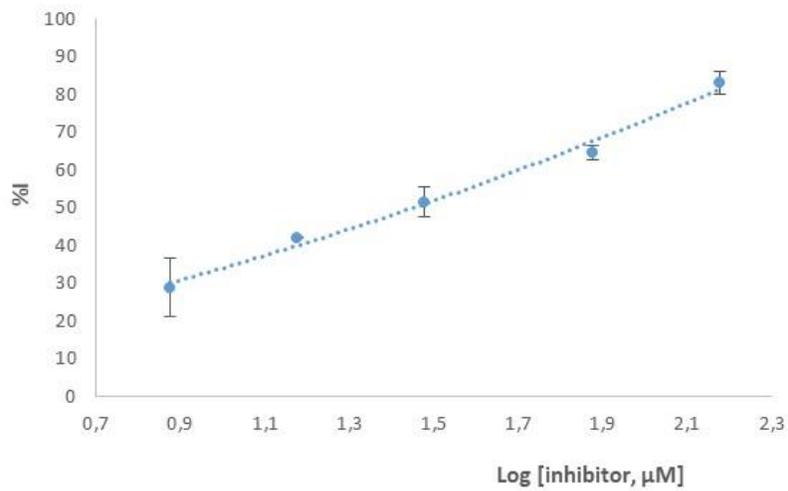


Figura 3.47. Grafica de IC_{50} para la inhibición de AChE del compuesto **24** ($IC_{50} = 28 \pm 1 \mu M$)

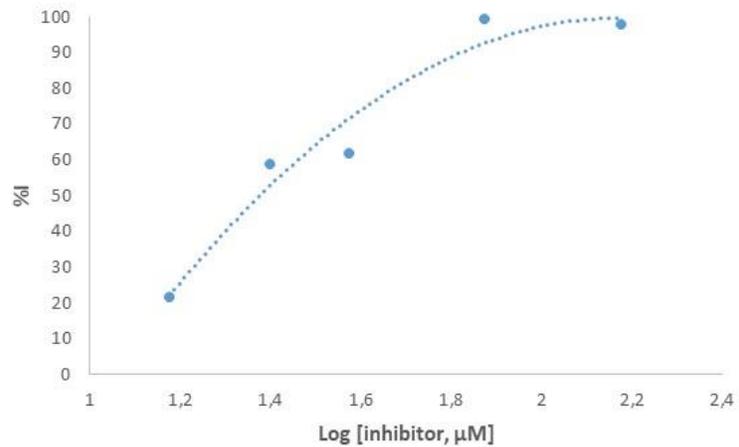


Figura 3.48. Grafica de IC_{50} para la inhibición de AChE del compuesto **25** ($\text{IC}_{50} = 24 \pm 1 \mu\text{M}$)

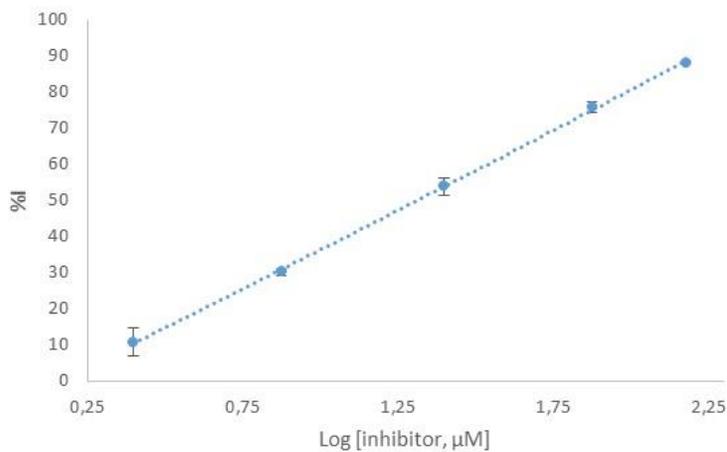


Figura 3.49. Grafica de IC_{50} para la inhibición de AChE del compuesto **26** ($\text{IC}_{50} = 20 \pm 1 \mu\text{M}$)

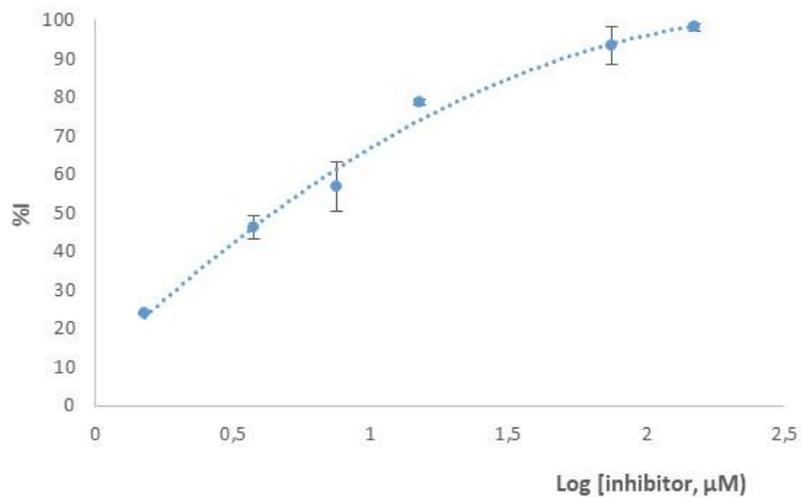


Figura 3.50. Grafica de IC_{50} para la inhibición de BuChE del compuesto **10** ($IC_{50} = 4.5 \pm 0.6 \mu M$)

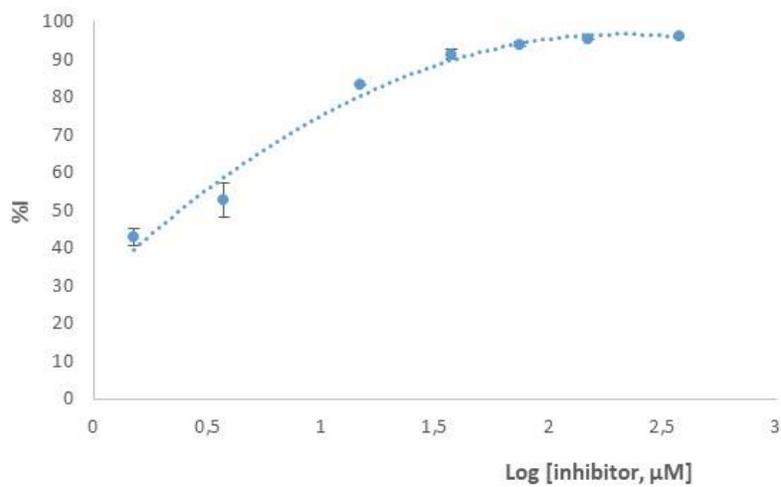


Figura 3.51. Grafica de IC_{50} para la inhibición de BuChE del compuesto **111** ($IC_{50} = 2.4 \pm 0.1 \mu M$)

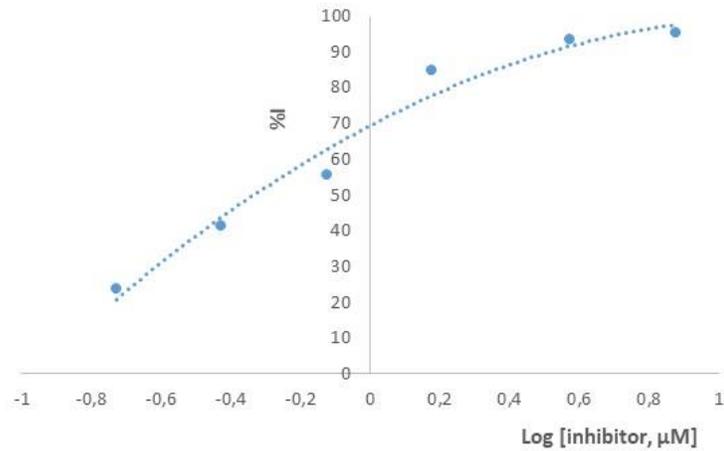


Figura 3.52. Grafica de IC_{50} para la inhibición de BuChE del compuesto **12** ($IC_{50} = 0.46 \pm 0.01 \mu\text{M}$)

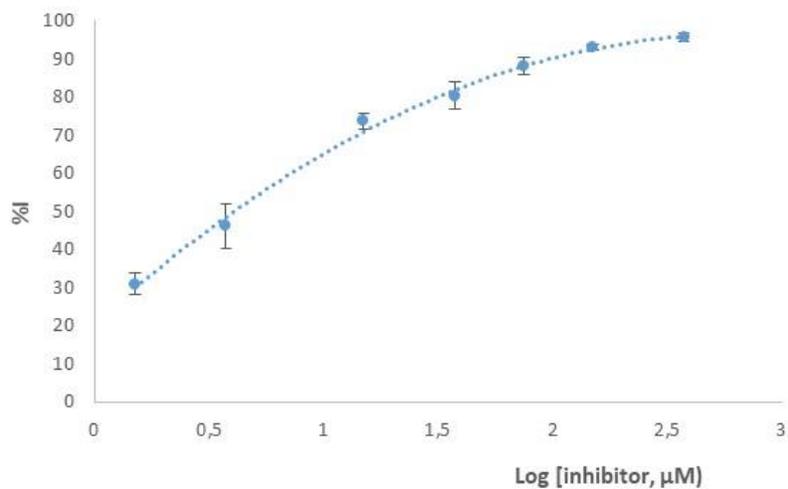


Figura 3.53. Grafica de IC_{50} para la inhibición de BuChE del compuesto **24** ($IC_{50} = 4.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$)

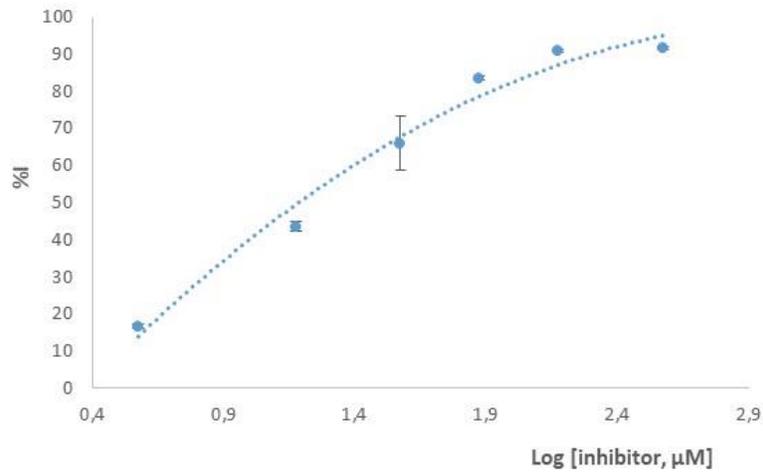


Figura 3.54. Grafica de IC_{50} para la inhibición de BuChE del compuesto **25** ($IC_{50} = 16 \pm 2 \mu\text{M}$)

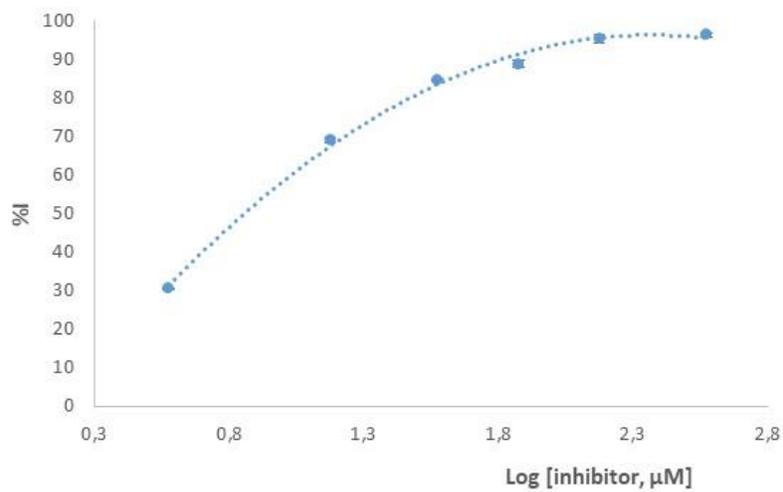
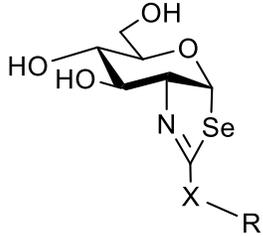


Figura 3.55. Grafica de IC_{50} para la inhibición de BuChE del compuesto **26** ($IC_{50} = 7.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$)

Tabla 3.13. Inhibición de las colinesterasas por los compuestos **10-12, 24-26** (IC_{50} , μM)

| | |  | |
|-----------|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Compuesto | | AChE (<i>Electrophorus electricus</i>) | BuChE (Suero equino) |
| X = NH | 10 (R = Me) | 3.6 ± 0.3 | 4.5 ± 0.6 |
| | 11 (R = Et) | 3.0 ± 0.1 | 2.4 ± 0.1 |
| | 12 (R = Pr) | 2.2 ± 0.1 | 0.46 ± 0.01 Inhibición mixta $K_{ia} = 0.24 \pm 0.03 \mu M$ $K_{ib} = 1.5 \pm 0.2 \mu M$ |
| X = O | 24 (R = Me) | 28 ± 1 | 4.1 ± 0.9 |
| | 25 (R = Et) | 24 ± 1 | 16 ± 2 |
| | 26 (R = Pr) | 20 ± 1 | 7.2 ± 0.1 |
| --- | Galantamina | 1.4 ± 0.1 | 3.9 ± 0.3 |

Los datos indican claramente que las selenazolinas que portan un grupo 2-alquilamino (**10-12**) se comportaron como inhibidores más potentes que sus derivados 2-alcoxi isostéricos (**24-26**, 8-9 veces). Este resultado está de acuerdo con lo indicado al comienzo de la sección de discusión y resultados, acerca de la mayor capacidad de protonación para un resto de tipo 2-alquilamino. Además dicho fragmento puede favorecer las interacciones de enlace hidrogeno con regiones clave de la enzima.

Este comportamiento es más pronunciado en la AChE, conduciendo así para los derivados **10-12** a actividades dentro del rango micromolar bajo, prácticamente igual que el fármaco de referencia utilizado en la presente Tesis (galantamina). Además, se logró una aumentar ligeramente la actividad al aumentar el tamaño de la cadena hidrocarbonada.

Con respecto a la BuChE, el derivado **12** resultó ser un fuerte inhibidor de esta enzima, con actividad dentro del rango submicromolar ($IC_{50} = 0.46 \mu M$) y con un aumento en la actividad de aproximadamente 8.5 veces en comparación con la galantamina (**Tabla 3.13**). Para este compuesto, se encontró una cierta selectividad sobre AChE ($IC_{50} = 2.2$ y $0.46 \mu M$, respectivamente). Es importante resaltar que, mientras que la AChE predomina en cerebros sanos, su actividad disminuye fuertemente con la progresión de la enfermedad, conduciendo a que la BuChE sea la colinesterasa más prominente en las etapas más avanzadas de la EA.¹⁸⁶ Además, considerando que la cavidad del sitio activo es significativamente mayor (aproximadamente 200 \AA^3) en BuChE,¹⁸⁷ se puede deducir que los inhibidores más voluminosos se pueden acomodar mejor en comparación con la AChE, y esta podría ser la razón de la selectividad observada.

El modo de inhibición de **12** frente a BuChE se determinó mediante el método de Cornish-Bowden,¹⁸⁸ que consiste en realizar dos gráficas: $1/V$ vs. $[I]$ y $[S]/V$ vs. $[I]$ (**Figura 3.56**) y se encontró que es un inhibidor mixto (en ambas gráficas, las distintas líneas de cada una de las concentraciones se intersectan en uno de los dos cuadrantes). Por lo tanto, el compuesto puede interactuar con la enzima libre y con el complejo E-S. El cálculo de los parámetros cinéticos (K_M , $K_{M,app}$, V_{max} , $V_{max,app}$) se llevó a cabo utilizando una regresión no lineal, y a

186. Greig, N. H.; Lahiri, D. K.; Sambamurti, K. *Int. Psychogeriatr.* **2002**, *14*, 77–91.

187. Saxena, A.; Redman, A. M. G.; Jiang, X.; Lockridge, O.; Doctor, B. P. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 14642–145651.

188. Cornish-Bowden, A. *Biochem. J.* **1974**, *137*, 143–144.

partir de dichos parámetros se calcularon las constantes de inhibición (K_{ia} para la componente competitiva, es decir, de la interacción con el sitio activo de la enzima libre, y K_{ib} , referente a la interacción con el complejo E-S). Se obtuvieron los siguientes valores para el compuesto **12**: $K_{ia} = 0.24 \mu\text{M}$; $K_{ib} = 1.5 \mu\text{M}$. El menor valor de K_{ia} sugiere una interacción más eficaz a través del mecanismo competitivo que la interacción con la región alostérica (definida por K_{ib}).

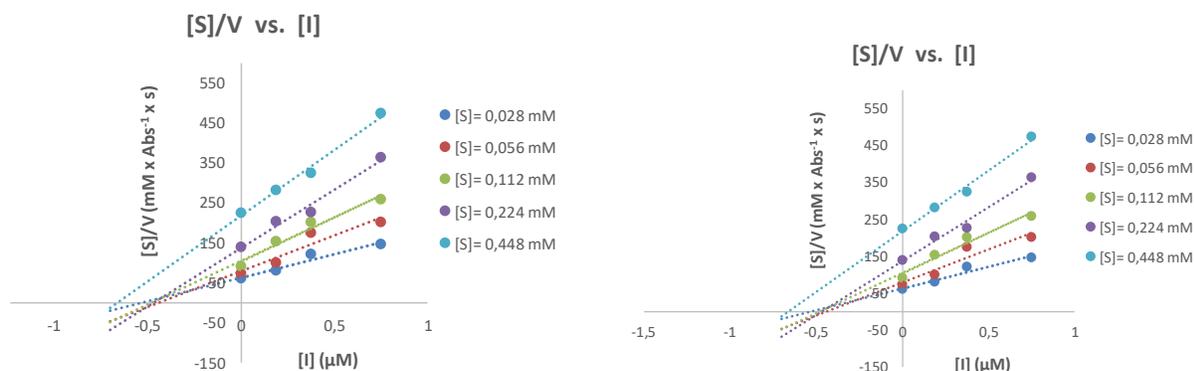


Figura 3.56. Gráficas de Cornish-Bowden de **12** frente a BuChE

Inhibición de hexosaminidasas

La inhibición de la O-GlcNAc hidrolasa nucleocitoplásmica (OGA) mostrada por las selenazolinas **10-12**, **24-26** también se evaluó espectrofotométricamente, utilizando *p*-nitrofenil-2-acetamido-2-desoxi-β-*N*-D-glucopiranosido como sustrato modelo; los valores de IC_{50} se muestran en las **Figuras 1.57-1.61** y en la **Tabla 3.14**.

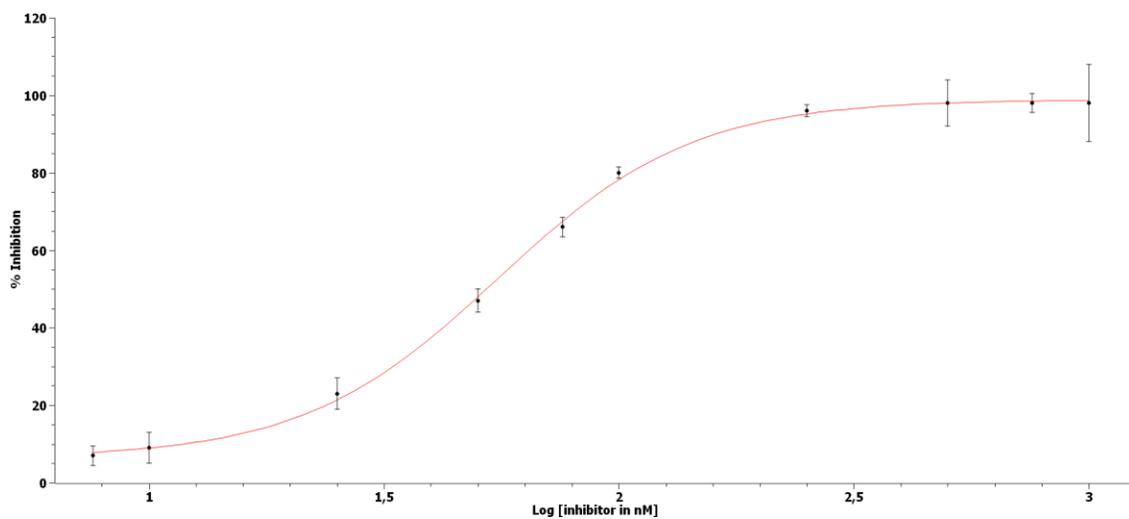


Figura 3.57. Grafica de IC_{50} para la inhibición de OGA humana del compuesto **10** ($IC_{50} = 52.2 \pm 2.1$ nM)

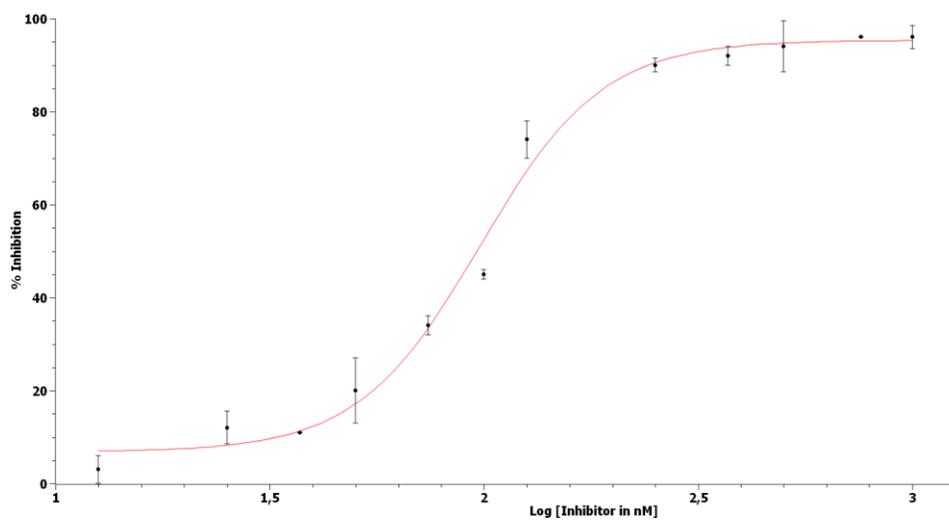


Figura 3.58. Grafica de IC_{50} para la inhibición de OGA humana del compuesto **11** ($IC_{50} = 96.5 \pm 2.1$ nM).

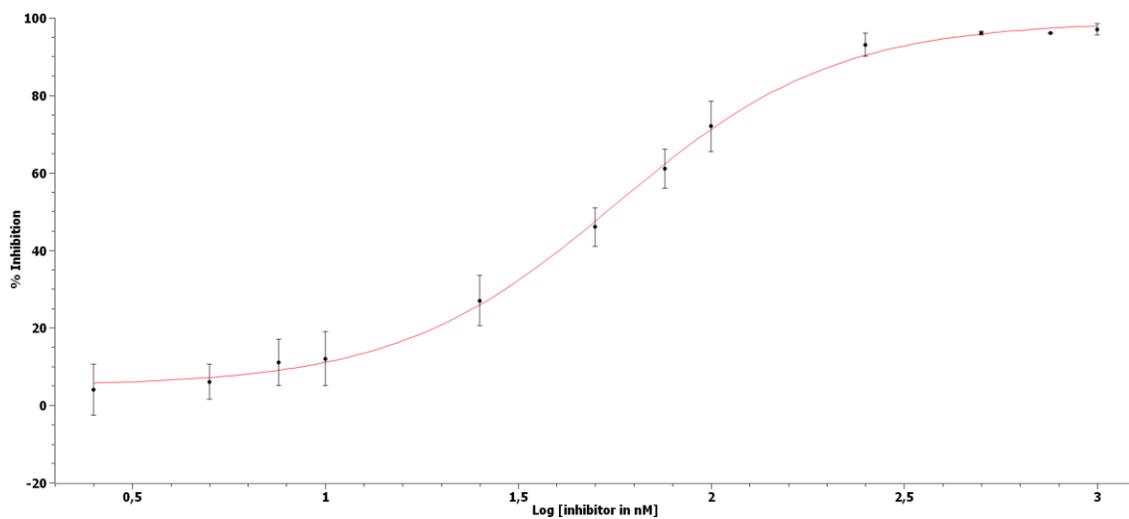


Figura 3.59. Grafica de IC_{50} para la inhibición de OGA humana del compuesto **12** ($IC_{50} = 53.0 \pm 7.1$ nM).

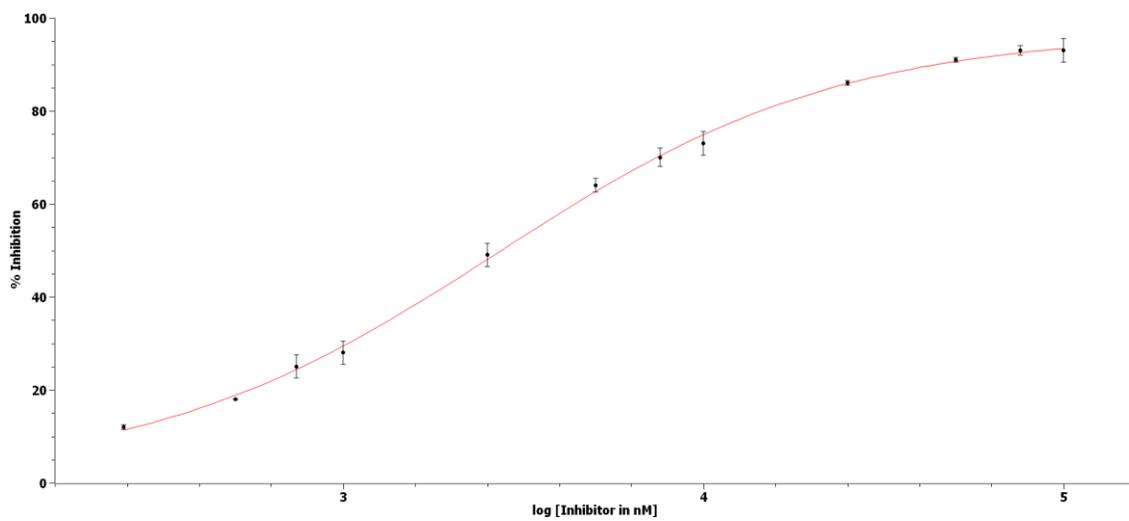


Figura 3.60. Grafica de IC_{50} para la inhibición de OGA humana del compuesto **24** ($IC_{50} = 2721 \pm 221$ nM).

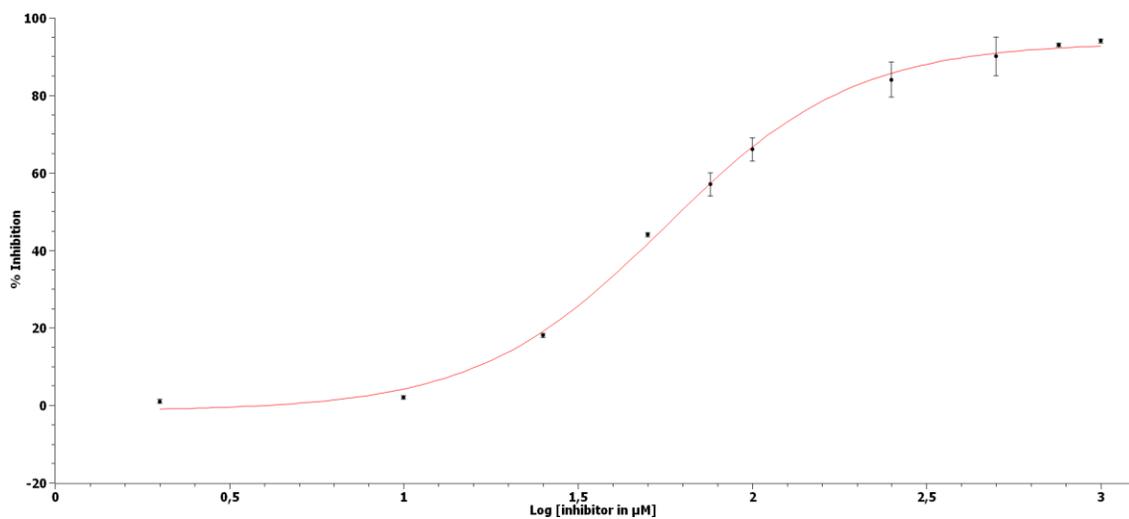


Figura 3.61. Grafica de IC_{50} para la inhibición de HexB humana del compuesto **10** ($IC_{50} = 62.4 \pm 2.8 \mu M$).

Tabla 3.14. Inhibición de hexosamidasa ejercida por los compuestos **10-12, 24-26** (IC_{50} , en μM , K_i en nM)

| Compuesto | | hOGA | hHexB |
|-----------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| X= NH | 10 | 0.052 ± 0.002 Inhibición mixta $K_{ia} = 8.6 \pm 0.6 \text{ nM}$ $K_{ib} = 12.3 \pm 0.4 \text{ nM}$ | 62 ± 3 |
| | 11 | 0.097 ± 0.002 | >100 |
| | 12 | 0.053 ± 0.007 | >100 |
| X= O | 24 | 2721 ± 221 | >100 |
| | 25 | >100 | >100 |
| | 26 | >100 | >100 |

Mientras que las 2-alquilamino selenazolininas **10-12** mostraron actividades sobresalientes frente a la OGA, en el intervalo nanomolar ($IC_{50} = 52-97$ nM), sus isómeros de tipo 2-alcoxi derivados **24-26** se comportaron como inhibidores bastante débiles o prácticamente inactivos (**Tabla 3.14**). Los compuestos **10** y **12** (derivados que contienen metilo y propilo, respectivamente) están dotados prácticamente de la misma actividad. Estos datos sugieren claramente la importancia crucial del fragmento 2-amino funcionalizado en el fragmento de 1,3-selenazolina para la interacción con el sitio activo de OGA. Aunque el uso del resto alcoxi condujo a un claro deterioro de la inhibición de la colinesterasa, el efecto no fue tan pronunciado como para la enzima OGA.

La única selenazolina descrita hasta la fecha como inhibidor de OGA es GlcNAc-selenazolina **60**,⁹⁵ con una $K_i = 0.7$ μ M (inhibición competitiva), aproximadamente 80 veces menos activa que el compuesto **10** aquí mostrado. La inhibición considerablemente menor de la selenazolina descrita en la bibliografía en comparación con sus análogos de azufre (por ejemplo, GlcNAc-tiazolina **44**) se atribuyó a la mayor longitud del enlace C–Se y a la menor capacidad de aceptar enlaces de hidrógeno.⁹⁵ A pesar de ello, la NAG-tiazolina **44** y su selenoisómero **60** tuvieron efectos similares en la Glc-NAc-ilación, lo que se atribuyó a la internalización mejorada de **60** en las células, debido a su mayor lipofilia.⁹⁵ Sin embargo, en nuestro caso, la combinación del átomo de selenio y el fragmento de 2-alquilamino proporcionó un excelente perfil inhibitorio en términos de potencia y selectividad.

Una enzima estrechamente relacionada con OGA es HexB (beta-hexosaminidasa, subunidad beta: EC 3.2.1.52; GH20), una hexosaminidasa lisosomal que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad de Sandhoff,¹⁸⁹ un trastorno de almacenamiento lisosomal. Aunque ambas hexosaminidasas, OGA y HexB, pertenecen a distintas familias CAZy, ambas son enzimas que catalizan la hidrólisis de GlcNac, por lo que en numerosas ocasiones, inhibidores de HexB lo son también de OGA.

Por lo tanto, con el objetivo de evitar efectos secundarios, también se evaluó la posible inhibición de HexB por parte de los compuestos **10-12**, **24-26**, con objeto de analizar la

189. Brekk, O. R.; Korecka, J. A.; Crapart, C. C.; Huebeker, M.; MacBain, Z. K.; Rosenthal, S. A.; Sena-Esteves, M.; Priestman, D. A.; Platt, F. M.; Isacson, O.; Hallett, P. J. *Acta Neuropathol. Commun.* **2020**, *8*, 127.

selectividad frente a la OGA. Como se puede observar en la **Tabla 3.14**, los compuestos son prácticamente inactivos ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$) o son inhibidores bastante débiles (**10**, $IC_{50} = 62 \mu\text{M}$) frente a la enzima HexB. Esto proporcionó una selectividad excepcional para el compuesto cabeza de serie, **12** (S.I. > 1887) hacia OGA.

Como compuesto modelo, se determinó el modo de inhibición para **10** y se encontró que era un inhibidor de tipo mixto (**Figura 3.62**, gráficas de Cornish-Bowden); se calcularon las constantes de inhibición para los mecanismos competitivos y no competitivos (K_{ia} , K_{ib} , respectivamente) y se encontró que estaban en el rango nanomolar bajo (8.6 y 12.3 nM, respectivamente, **Tabla 3.14**). Se demostró de esta manera que el compuesto **12** es aproximadamente 8 veces más activo que NAG-tiazolina.

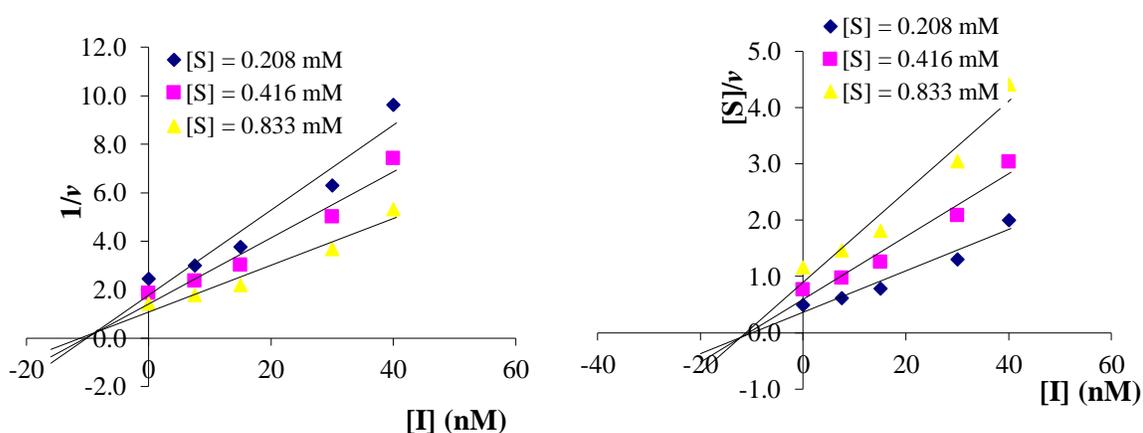


Figura 3.62. Graficas de Cornish-Bowden del compuesto **10** frente a hOGA.

También realizamos un ensayo de cribado para determinar la selectividad frente a un panel de 10 glicosidasas relevantes, con objeto de predecir posibles efectos secundarios: α -L-glucosidasa (homo sapiens), α -galactosidasa (granos de café verde), β -galactosidasa (*E. coli*, *A. orizae*), α -glucosidasa (levadura, arroz), amiloglucosidasa (*A. niger*), β -glucosidasa (almendras), α -manosidasa (judías verdes), β -manosidasa (caracoles), así como una β -N-acetilglucosaminidasa humana (judías verdes). Esta evaluación se realizó en colaboración con el Dr. Antonio J. Moreno, del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla.

En todos estos casos, se observó una falta de actividad relevante a la concentración ensayada ($IC_{50} > 100 \mu M$), lo que indica una destacada selectividad de las 1,3-selenazolininas hacia las enzimas implicadas en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (colinesterasas, OGA). Por lo tanto, no se esperan interferencias no deseadas con otros procesos mediados por glicosidasas, lo que reduce las posibilidades de efectos secundarios.

Estudios de *docking*

Con objeto de obtener una visión más profunda del mecanismo de inhibición ejercido por las selenazolininas bicíclicas, el compuesto cabeza de serie (**12**) se sometió a estudios de *docking* con AChE, BuChE y OGA humanas. Estos estudios se realizaron en colaboración con el Dr. José M. Padrón, de la Universidad de La Laguna (Tenerife, España). En primer lugar, se llevó a cabo la minimización de la energía para los complejos **12**-enzima; los datos se muestran en la **Tabla 3.15**. La energía de unión estimada es considerablemente más baja para OGA en comparación con las colinesterasas; esta observación es compatible con la fuerte potencia encontrada en el ensayo *in vitro* frente a dicha enzima.

Tabla 3.15. Energía de interacción del compuesto **12**-enzima

| Enzima | AChE | BuChE | OGA |
|---------------------------|-------------|--------------|------------|
| Energía (kcal/mol) | -6.6 | -6.5 | -9.9 |

Las predicciones del *docking* en la interacción del compuesto **12** con AChE mostraron interacciones de enlace de hidrógeno con residuos de Asp74, Glu202 y Ser203. Además, establece interacciones de van der Waals con los residuos Gln71, Tyr72, Val73, Trp86, Asn87, Gly120, Gly121, Tyr124, Ser125, Tyr133, Tyr337, Phe338, His447, Gly448 e Ile451. En la **Tabla 3.16** se muestran las regiones de la enzima implicadas en dichas interacciones.

Tabla 3.16. Composición de las regiones clave de la AChE y predicción de las interacción de **12**^a

| Región enzimática | Aminoácidos | | | |
|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Sitio esterático | Ser203 | His447 | Glu334 | |
| Sitio aniónico | Trp86 | Tyr133 | Tyr337 | Phe338 |
| Sitio de unión del oxianión | Gly121 | Gly122 | Ala204 | |
| Sitio de unión del grupo acilo | Phe295 | Phe297 | | |
| Sitio aniónico periférico (PAS) | Tyr72 | Asp74 | Tyr124 | Trp286 |

^a En negrita, aminoácidos implicados en la interacción con **12**

Como se muestra en la **Tabla 3.16**, la selenazolina **12** establece interacciones clave con cuatro regiones de la AChE: el sitio esterático, que soporta la tríada catalítica que normalmente se encuentra en las hidrolasas, el sitio aniónico, que estabiliza el catión amonio del sustrato, el subsitio del oxianión, que estabiliza el intermedio cargado, y el PAS, que concentra el sustrato en la entrada del canal.¹⁸² Es importante destacar que el bloqueo de la región PAS de la AChE con un inhibidor se ha correlacionado con una disminución de la autoagregación de las placas β -amiloide.¹⁹⁰

Con respecto a BuChE, los cálculos de *docking* del compuesto **12** revelaron que establece interacciones de enlace de hidrógeno con los residuos Gly117 e His438. Además, establece interacciones de van der Waals con los residuos Gly78, Ser79, Trp82, Gly115, Gly116, Thr120, Gly121, Tyr128, Glu197, Ser198, Ala328 y Trp430. Análogamente, los datos que se muestran en la **Tabla 11.17** sugieren una interacción del compuesto con el sitio esterático, el sitio aniónico y el subsitio del oxianión de BuChE.¹⁹¹

190. Carvajal, F. J.; Inestrosa, N. C. *Front. Mol. Neurosci.* **2011**, *4*, 19.

191. Bajda, M.; Więckowska, A.; Hebda, M.; Guzior, N.; Sotriffer, C. A.; Malawska, B. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 5608-5632.

Tabla 3.17. Composición de las regiones clave de BuChE y predicción de las interacción de **12**^a

| Región enzimática | Aminoácidos | | |
|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Sitio esteárico | Ser198 | His438 | Glu325 |
| Sitio aniónico | Tyr128 | Phe329 | Trp82 |
| Sitio de unión del oxianión | Val288 | Leu286 | |
| Sitio de unión del grupo acilo | Ala199 | Gly116 | Gly117 |
| Sitio aniónico periférico (PAS) | Asp70 | Tyr332 | |

^a En negrita, aminoácidos implicados en la interacción con **12**

En el caso de OGA humana, **12** establece interacciones de enlace de hidrógeno con residuos clave de la enzima:¹⁹² Trp278, Asn280, Asp285 (entrada al sitio catalítico) y Asn313 (bolsillo del sitio activo). Además, establece interacciones de van der Waals con los residuos Gly67 (bolsillo del sitio activo), Asp174, Asp175 (residuos catalíticos), Tyr219 (región hidrófoba del sitio de unión de acilo), Tyr286 (implicada en la interacción con péptidos GlcNacilado), Phe68, Tyr69, Lys98, Val254, Ala283, Glu677, Pro678 y Trp679. En particular, el grupo NH interactúa con los residuos Asp285 y Tyr286 de OGA.

El fragmento sacarídico de **12** ocupa la región de enlace -1 GlcNAc, próxima a los residuos de Asp174 y Asp175 del dominio catalítico, y el modo de unión predicho fue comparado con las estructuras cristalinas de inhibidores conocidos complejados con OGA. Se comprobó que **12** ocupa la misma región que un inhibidor de PUGNAc derivado de imidazol, o el Thiamet-G en las correspondientes estructuras cristalinas.¹⁹³ Se ha descrito que el Thiamet-G establece interacciones por puente de hidrógeno con Asp285 (OHs en posiciones C-6 y C-4), y con Asn313 (OH en posición C-4).¹⁹³ La estructura cristalina del

192. Elsen, N. L.; Patel, S. B.; Ford, R. E.; Hall, D. L.; Hess, F.; Kandula, H.; Kornienko, M.; Reid, J.; Selnick, H.; Shipman, J. M.; Sharma, S.; Lumb, K. J.; Soisson, S. M. Klein, D. J. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 613-615.

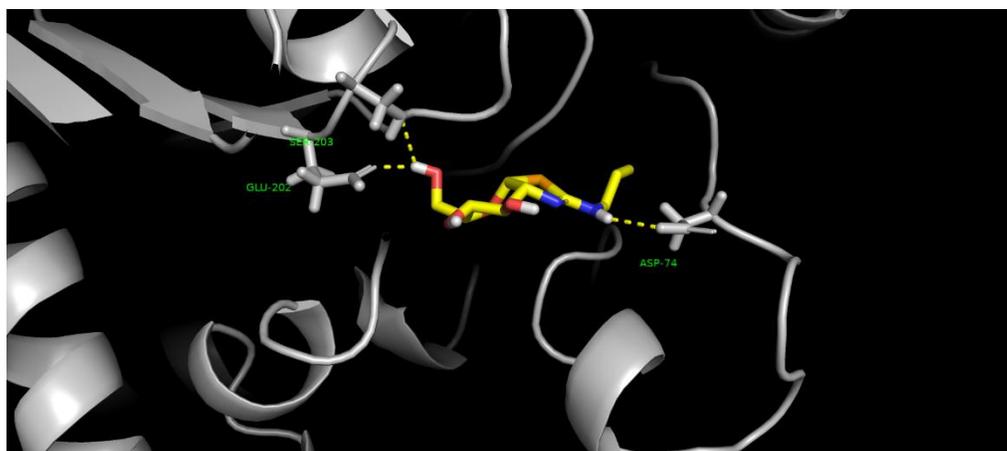
193. Roth, C.; Chan, S.; Offen, W.A.; Hemsworth, G.R.; Willems, L.I.; King, D.T.; Varghese, V.; Britton, R.; Vocadlo, D.J.; Davies, G.J. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 610–612.

complejo OGA-Thiamet-G también reveló que el grupo etilo estaba en una orientación *tipo sandwich* entre los residuos de Tyr285 y Asn313, en una región hidrofóbica de la enzima.¹⁹²

En referencia al derivado **12**, las predicciones de *docking* sugieren el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre el residuo sacarídico y Asn280, Asp285, Asn313. En particular, Asp285 establece una interacción bidentada con los OHs localizados en las posiciones C-3 y C-4, el Asn313 con el OH en C-3, y el Asn280 con el OH en C-6. Se predijo así mismo que el grupo propilo de **12** establece interacciones de tipo van der Waals con Glu677, Glut678 y Trp679. Es importante resaltar que Asp285 ejerce una función primordial en la catálisis mediada por OGA, ya que se ha comprobado que su eliminación en una OGA mutante (Asp285A) tuvo un efecto drástico en la actividad catalítica.¹⁹⁴

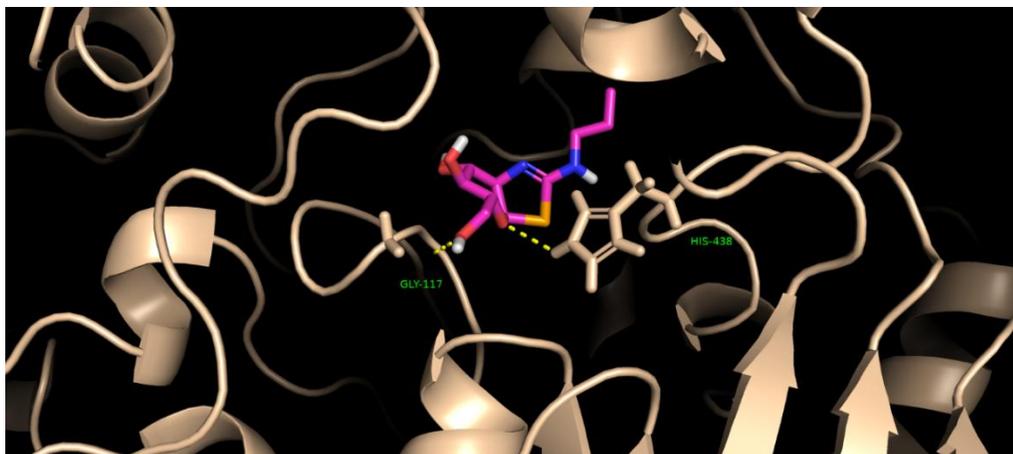
En cuanto a la conformación observada para el fragmento de carbohidrato en la unión a la enzima OGA, Thiamet-G lo hace en una conformación 4C_1 , mientras que **12** adopta una conformación de tipo bote. Quizás el enlace C–Se, más largo en comparación con el C–S del Thiamet-G le permite una mayor flexibilidad conformacional.

Las **Figuras 1.62A-C** muestran las poses más favorables para la interacción de **12** con AChE, BuChE y OGA, respectivamente.

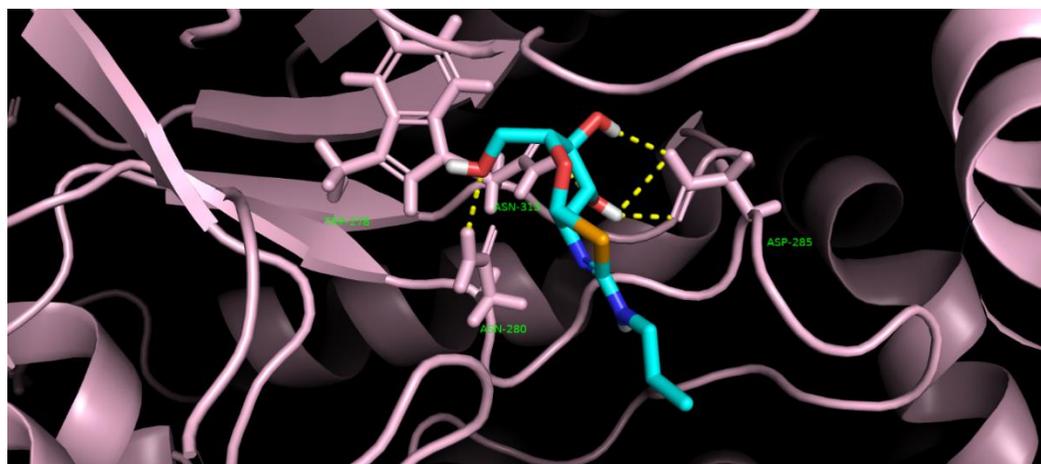


(A)

194. Li, B.; Li, H.; Lu, L.; Jiang. *J. Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 362–369.



(B)



(C)

Figura 3.62. Modos de interacción previstos entre **12** y AChE (A), BuChE (B), OGA (C)

Con objeto de comparar la orientación de la selenazolina **12** y del inhibidor estructuralmente relacionado Thiamet-G en el sitio activo de la OGA, ambas estructuras se han superpuesto. Con tal fin, se utilizó la estructura de la enzima OGA co-cristalizada con Thiamet-G (PDBid 5M7S del *Protein Databank*). La superposición de la estructura modelizada con estudios *docking* de **12** (color rosa) y el Thiamet-G co-cristalizado (color azul) en el sitio activo de la OGA se muestra en la **Figura 3.63**. Como se ha mencionado en esta sección, la fracción sacarídica de ambos inhibidores ocupa la misma región espacial de la enzima (sitio de enlace -1 GlcNAc). Sin embargo, la mayor diferencia entre ambos en la

orientación del grupo 2-alquilamino. En el ligando co-cristalizado, el fragmento *N*-etilo se encuentra dirigido hacia el interior de la enzima, mientras que para la selenazolina **12**, el residuo *N*-propilo está orientado hacia el exterior, hacia el disolvente. El hecho de que **12** no adopte la misma pose que Thiamet-G posiblemente se deba a que el átomo de carbono adicional en la cadena *N*-alquílica posiblemente ejerza repulsiones estéricas si se orienta hacia el interior de la enzima.

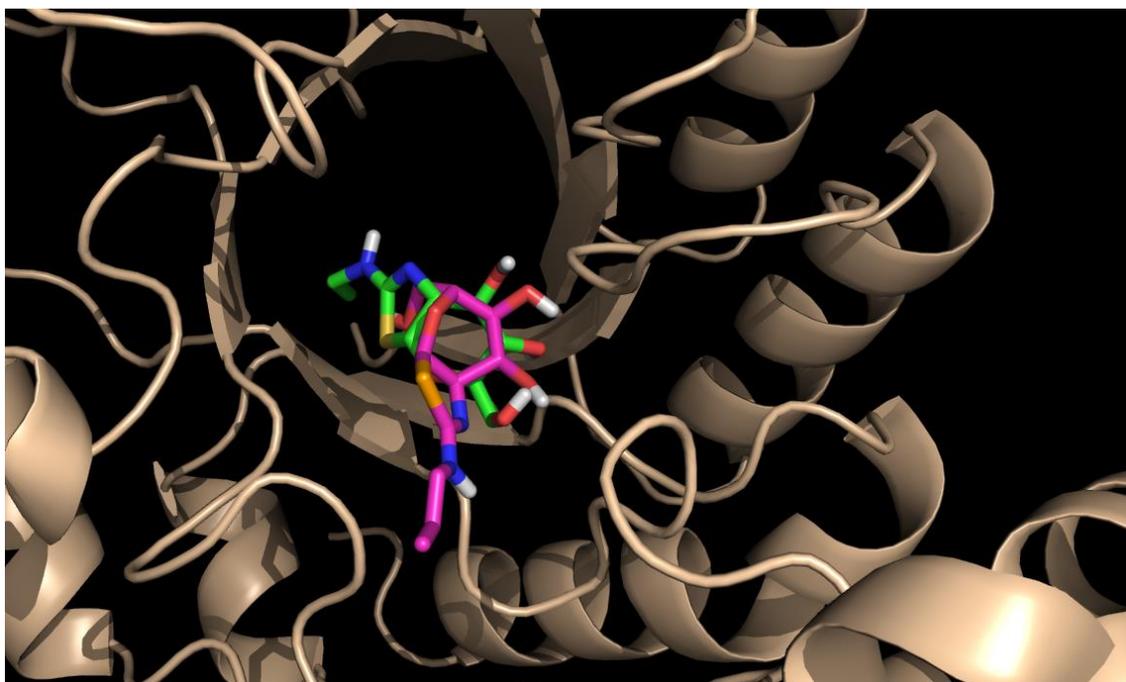


Figura 3.63. Estructuras superpuestas de **12** y Thiamet-G en el sitio activo de hOGA, mostrando la diferente orientación de los residuos de tipo *N*-alquilo.

3.4.2. Actividad antiproliferativa

Las selenazolinas **10–12** y **24–26**, así como las selenoureas **4–6**, los selenocarbamatos en C-2 **14–19**, la urea **20**, el *Se*-metil carbamato **13**, los *Se*-metil isoselenocarbamatos **27–29**, los selenocarbamatos en C-1 **128a–d** y el selenadiazol **33** se evaluaron frente a un panel de

6 líneas de células tumorales (**Tablas 1.18 y 1.19**): A549 (células de pulmón no pequeñas), HBL-100 (mama), HeLa (cuello uterino), SW1573 (células de pulmón no pequeñas) como ejemplos de líneas sensibles a fármacos, y T-47D (mama) y WiDr (colon) como líneas resistentes a multifármaco. En el caso de las selenazolininas **10-12** y **24-26** también se empleó la línea HEK293 (células 293 de riñón embrionario humano), y para el caso del derivado isomerizado **13**, la línea BJ-hTert (fibroblastos humanos), como modelos de líneas no tumorales. Los fármacos 5-fluorouracilo (5-FU) y cisplatino, ampliamente usados en quimioterapia, se incluyen como referencias. Estos ensayos se realizaron en el grupo del Dr. José Manuel Padrón (Universidad de La Laguna, Tenerife, España); para ello, se utilizó el protocolo del Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU. con modificaciones menores.¹⁹⁵

Los compuestos **10,11, 24-26** mostraron una actividad despreciable (**Tabla 3.18**), tanto en las líneas tumorales como en la no tumoral, a la concentración ensayada ($GI_{50} > 100 \mu M$). El derivado **12** exhibió una actividad antiproliferativa bastante débil ($GI_{50} 43 - >100 \mu M$), bastante alejada de las concentraciones terapéuticas requeridas para la interacción con colinesterasas y OGA (**Tablas 1.13 y 1.14**). Por ello no es esperable que las selenazolininas bicíclicas analizadas como nuevos prototipos de agentes anti-Alzheimer ejerzan una influencia negativa en el crecimiento normal de las células, reduciendo de esta manera posibles efectos secundarios.

Tabla 3.18. Valores de GI_{50} (μM) en la actividad antiproliferativa de los productos **10-12** y **24-26**

| Producto | A549 (Pulmón) | HBL-100 (Mama) | HeLa (Cérvix) | SW1573 (Pulmón) | T-47D (Mama) | WiDr (Colon) | HEK 293 (No tumorales) |
|-----------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| 10 | >100 | | | | | | >100 |
| 11 | | | | | | | |
| 12 | 48 ± 10 | 52 ± 3 | 67 ± 33 | >100 | 51 ± 7 | 43 ± 10 | 57 ± 19 |
| 24 | >100 | | | | | | >100 |
| 25 | | | | | | | |
| 26 | | | | | | | |

195. Elshafly, H.; Todorović, T. R.; Nikolić, M.; Lolić, A.; Višnjevac, A.; Hagenow, S.; Padrón, J.M.; García-Sosa, A. T.; Djordjević, I. S.; Grubišić, S.; Stark, H.; Filipović, N. R. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 247.

El resto de derivados organoselénicos se han evaluado como potenciales agentes antiproliferativos; los datos incluidos en la **Tabla 3.19** muestran una serie de interesantes relaciones estructura-actividad (SAR) que se comentarán a continuación:

Las selenoureas **4–6**, localizadas sobre la posición C-2 del carbohidrato, resultaron inactivas a la concentración ensayada ($GI_{50} > 100 \mu M$), a diferencia de otras selenoureas preparadas en el grupo de investigación;¹⁹⁶ posiblemente, la ausencia de sustituyentes aromáticos en **4–6** es la responsable de la ausencia de actividad. Es importante resaltar que los selenocarbamatos isómeros **14–16**, así como los análogos con cadenas de mayor longitud (**17–19**) exhibieron un comportamiento muy distinto; de hecho, los derivados con las cadenas más cortas (**14, 15**) resultaron ser potentes agentes antiproliferativos, con actividades comprendidas en el rango micromolar bajo. Los valores de GI_{50} se incrementan significativamente, y, por tanto, la actividad decae, para los residuos hidrocarbonados de mayor longitud (**18 y 19**). La importancia del selenio se pone de manifiesto en el carbamato obtenido **20**, donde la eliminación del átomo de selenio a la ausencia de la actividad.

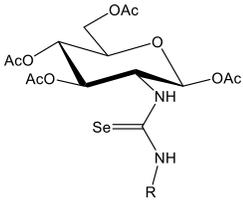
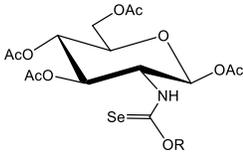
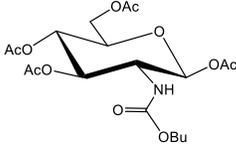
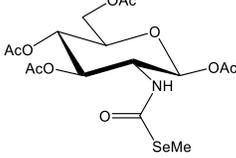
Es curioso que en los isómeros donde el grupo selenocarbamato se encuentra en la posición C-1 del carbohidrato (**137a-d**), la actividad se incrementa al hacerlo el tamaño del grupo alcoxi, siendo máxima para **137c** ($R = Pr$), con actividades comprendidas en el rango micromolar micromolar bajo.

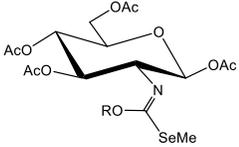
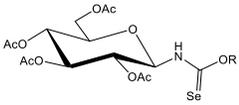
El derivado isomerizado **13** resultó también ser un muy potente agente antiproliferativo, con valores de GI_{50} comprendidos entre $0.48\text{--}1.7 \mu M$, hasta 102 y 52 veces más potentes que los fármacos 5-FU y cisplatino. Este compuesto fue además evaluado frente a las células no tumorales (Bj-hTert), siendo inactivo ($GI_{50} > 100 \mu M$), por lo que presenta una excelente selectividad. Es también destacable que, para los derivados *Se*-metilados (**27-29**), la actividad crece sustancialmente con el tamaño de la cadena, alcanzándose valores en el rango nM para 3 de las 6 líneas celulares evaluadas (hasta 1.0 nM) en el derivado **29** ($R = Pent$); esto implica un incremento de actividad de hasta 5300 veces con respecto al 5-FU y de hasta 4900 con respecto al cisplatino, lo que pone de manifiesto el enorme potencial de este tipo de derivados para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales.

196. Begines, P.; Oliete, A.; López, Ó.; Maya, I.; Plata, G. B.; Padrón, J. M.; Fernández-Bolaños, J. G. *Future Med. Chem.* **2018**, *10*, 319–334.

El selenadiazol **33** (no incluido en la **Tabla 3.19**) resultó inactivo para las 6 líneas tumorales evaluadas ($GI_{50} > 100 \mu\text{M}$); estos resultados ponen de manifiesto que previsiblemente no resultaría interesante extender esta serie con nuevos derivados.

Tabla 3.19. Valores de GI_{50} (μM) para la actividad antiproliferativa de los glicoconjugados derivados de selenoureas, selenocarbamatos e isoselenocarbamatos^a

| Producto | A549 (Pulmón) | HBL-100 Mama) | HeLa (Cérvix) | SW1573 (Pulmón) | T-47D (Mama) | A549 (Pulmón) | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|--------------------|-----------------|------------------|-----------|
|  <p>4 (R= Me)</p> <p>5 (R= Et)</p> <p>6 (R= Pr)</p> | >100 | | | | | | |
| |  <p>14 (R= Me)</p> <p>15 (R= Et)</p> <p>16 (R= Pr)</p> <p>17 (R= Pent)</p> <p>18 (R= (CH₂)₁₁CH₃)</p> <p>19 (R= (CH₂)₁₇CH₃)</p> | 5.6 ± 1.4 | 1.2 ± 0.2 | 6.4 ± 2.2 | 4.4 ± 0.3 | 8.6 ± 1.9 | 6.2 ± 1.5 |
| | | 1.3 ± 1 | 4.2 ± 0.5 | 6.4 ± 1.5 | 4.1 ± 0.1 | 5.0 ± 0.8 | 8.1 ± 1.4 |
| 25 ± 11 | | 24 ± 11 | 13 ± 3 | 22 ± 8 | 31 ± 13 | 26 ± 11 | |
| 9.8 ± 0.5 | | 13 ± 3 | 13 ± 6 | 6.7 ± 2.0 | 9.6 ± 1.5 | 14 ± 0 | |
| 20 ± 2 | | 25 ± 5 | 16 ± 7 | 19 ± 7 | 19 ± 4 | 17 ± 3 | |
| 59 ± 15 | | 66 ± 16 | 39 ± 7 | 91 ± 16 | 79 ± 4 | 86 ± 13 | |
|  <p>20</p> | >100 | | | | | | |
|  <p>13</p> | 1.2 ± 0.2 | 1.7 ± 0.3 | 0.80 ± 0.32 | 0.56 ± 0.15 | 0.55 ± 0.13 | 0.48 ± 0.17 | |

| | | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------|-----------|------------------|----------------|----------------|------------------|
|  | 27 (R = Me) | 79 ± 27 | 44 | 0.89 ± 0.38 | 0.90 ± 0.16 | 1.2 | 0.44 |
| | 28 (R = Et) | 1.7 ± 0.5 | 1.1 ± 0.4 | 0.14 ± 0.05 | 0.34 ± 0.02 | 0.73 ± 0.34 | 0.016 |
| | 29 (R = Pent) | 0.001 ± 0.000 | 6.4 | 0.003 ± 0.000 | 0.062 | 0.57 | 0.014 ± 0.004 |
|  137 | 137a (R = Me) | >100 | >100 | >100 | 28 ± 7 | >100 | >100 |
| | 137b (R = Et) | >100 | >100 | >100 | 17 ± 3 | >100 | >100 |
| | 137c (R = Pr) | 8.7 | 7.9 | 2.7 | 3.0 | 1.6 | 1.5 ± 0.8 |
| | 137d (R = Bu) | 74 ± 6 | 96 ± 6 | >100 | 69 ± 11 | >100 | >100 |
| 5-FU | | 2.2 ± 0.3 | 4.4 ± 0.7 | 16 ± 5 | 3.3 ± 1.2 | 43 ± 16 | 49 ± 7 |
| Cisplatino | | 4.9 ± 0.2 | 1.9 ± 0.2 | 1.8 ± 0.5 | 2.7 ± 0.4 | 17 ± 3 | 25 ± 4 |

^aLos valores sin SD están pendientes de la finalización del triplicado de la medida

3.5. Conclusiones del capítulo 3

PRIMERA

La preparación de las 2-alquiltio-1,3-oxazolinas bicíclicas **1–3** se efectuó mediante una síntesis lineal, teniendo como intermediario clave el tiocarbamato per-*O*-acetilado bicíclico **105**, que mediante tratamiento con diferentes bromuros de alquilo permitió la formación de las 1,3-oxazolinas bicíclicas *S*-sustituidas. Los intentos de desprotección de las mismas resultaron infructuosos.

SEGUNDA

La preparación de 2-amino y 2-alcoxi-1,3-selenazolinas bicíclicas puede llevarse a cabo de una manera eficaz mediante una síntesis lineal, en tres etapas desde el isoselenocianato de D-glucosamina per-*O*-acetilado **115**: formación de la correspondiente selenourea o selenocarbamato por tratamiento con aminas o alcoholes alifáticos, ciclación intramolecular en condiciones térmicas (con catálisis acida en el caso de los selenocarbamatos) y desprotección.

TERCERA

La modificación de algunos de los elementos estructurales clave en las selenazolinas bicíclicas (grupo alquilamino o alcoxi en la posición C-2 del heterociclo, longitud del fragmento hidrocarbonado) provocó cambios importantes en la inhibición de las enzimas evaluadas.

Los derivados de tipo 2-alquilamino **10–12** resultaron ser los más potentes frente a colinesterasas y OGA, lo que demuestra el papel crucial de la función NH.

CUARTA

El compuesto cabeza de serie como agente anti-Alzheimer (**12**), exhibió una actividad submicromolar frente a BuChE, con una actividad aproximadamente 8.5 veces mayor en comparación con la galantamina.

QUINTA

Las 1,3-selenazolininas con un grupo de tipo 2-alkilamino **10–12** resultaron ser inhibidores muy potentes y selectivos de la OGA humana (actividad nanomolar), con solo actividad residual o despreciable frente a HexB y otras 10 glucosidasas. Se mejoró la actividad en comparación con NAG-tiazolina.

SEXTA

los estudios de *docking* permitieron predecir las interacciones del compuesto **12** con las regiones clave de las tres enzimas consideradas (AChE, BuChE y OGA), y comparar el modo de unión con inhibidores estructuralmente relacionados.

SÉPTIMA

Las selenazolininas bicíclicas no mostraron actividad antiproliferativa destacable hasta una concentración de 100 μM , por lo que no se deben esperar efectos perjudiciales en células a las concentraciones terapéuticas.

OCTAVA

La presencia de impurezas desconocidas en una partida de MeOH comercial en el intento de preparación del selenocarbamato de metilo derivado de carbohidrato **14** condujo, de manera inesperada, a una transposición novedosa de tipo Newman-Kwart y a la formación del derivado *Se*-metilado **13**.

NOVENA

Referente a la actividad antiproliferativa, si bien las selenoureas en C-2 resultaron inactivas, los correspondientes selenocarbamatos isómeros mostraron un amplio rango de actividades dependiendo de la posición del grupo selenocarbamato (C-1, C-2), así como de la longitud de la cadena hidrocarbonada, alcanzándose en algunos casos el rango submicromolar.

DÉCIMA

En los selenocarbamatos en posición C-1, la actividad antiproliferativa crece con la longitud de la cadena hidrocarbonada hasta el sustituyente de tipo propilo, mientras que para los selenocarbamatos en la posición C-2 del carbohidrato, la actividad es máxima para los fragmentos más cortos (Me, Et).

UNDÉCIMA

La *Se*-metilación de los selenocarbamatos en posición C-2 condujo a agentes antiproliferativos muy potentes, alcanzándose actividades en el rango nM, y una mejora muy sustancial de la actividad de los fármacos empleados como referencia (5-FU y cisplatino), de hasta 5300 veces.

DUODÉCIMA

Se llevó a cabo la preparación exitosa en tres etapas del primer 2-amino-1,3,4-selenadiazol derivado de carbohidrato empleando el correspondiente β -D-glucopiranosilisoselenocianato per-*O*-acetilado **115** como materia prima clave: formación de la selenocarbazida por tratamiento con hidracina, transformación en selenosemicarbazona mediante condensación con un aldehído aromático y ciclación promovida por NBS. Desafortunadamente resultó inactivo como agente antiproliferativo.

4. NUEVOS GLICOCONJUGADOS DE CUMARINAS COMO POTENCIALES INHIBIDORES DE ANHIDRASAS CARBÓNICAS

4.1. Introducción y antecedentes

En el presente capítulo de la Tesis Doctoral se abordará la preparación de una serie de potenciales agentes antiproliferativos derivados de cumarinas (*2H*-cromen-2-onas, **Figura 4.1**), una extensa familia de compuestos muy abundantes en la naturaleza, tanto como fitoquímicos en el reino vegetal, como en hongos y bacterias.¹⁹⁷ La palabra cumarina procede del termino francés *coumarou*, el nombre vernacular para las haBas de tonka (*Dipteryx odorata* Wild), de donde fue aislada por primera vez en 1820.¹⁹⁸ Cabe destacar que, hasta la fecha, se han aislado más de 1300 cumarinas en la naturaleza.¹⁹⁹

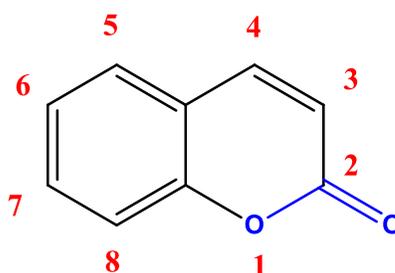


Figura 4.1. Estructura general de una cumarina con el sistema de numeración.

Aunque las cumarinas pueden prepararse a partir de una amplia variedad de reacciones,²⁰⁰ como la reacción de Perkin, condensación de Knoevenagel, reacciones de Wittig, Baylis-Hilman, Vilsmeier-Haack, transposición de Claisen o acoplamiento cruzado de Suzuki, sin duda alguna, la metodología sintética más clásica y más ampliamente utilizada es la llamada condensación de Pechmann.²⁰¹ Dicho proceso consiste en la reacción entre

197. Annunziata, F.; Pinna, C.; Dallavalle, S.; Tamborini, L.; Pinto, A. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4618.

198. Vogel, A. *Ann. Phys.* **1820**, *64*, 161–166.

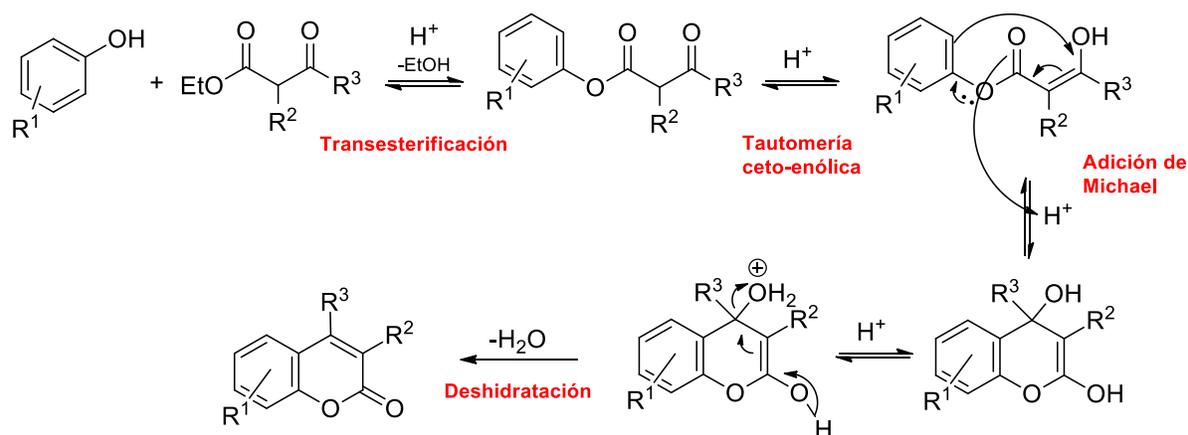
199. Stefanachi, A.; Leonetti, F.; Pisani, L.; Catto, M.; Carotti, A. *Molecules.* **2018**, *23*, 250.

200. Lončarić, M.; Gašo-Sokač, D.; Jokić, S.; Molnar, M. *Biomolecules.* **2020**, *10*, 151.

201. Zambare, A. S.; Khan, A. K. F.; Zambare, S. P.; Shinde, S. D.; Sangshetti, J. N. *Curr. Org. Chem.* **2016**, *20*, 798–828.

fenoles y β -cetoésteres, materias primas de fácil acceso, empleando catálisis ácida, tanto en forma de ácido de Brønsted (ej. H_2SO_4 , TsOH), como un ácido de Lewis (ej. AlCl_3). Esto ha permitido el acceso a un elevado número de cumarinas sustituidas en las posiciones C-3 y/o C-4. El ácido cataliza tanto la reacción de transesterificación inicial entre el hidroxilo fenólico y el éster, como la tautomerización ceto-enólica del producto transesterificado (**Esquema 4.1**). A continuación, tiene lugar una adición de Michael, que genera el esqueleto de la cumarina, seguido de re-aromatización y pérdida de una molécula de agua catalizada por ácido.

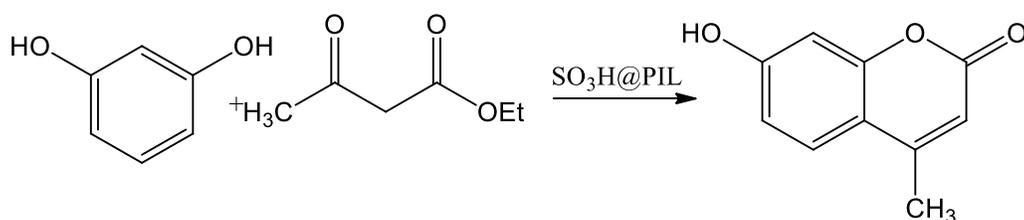
Aunque este es quizás el mecanismo más aceptado en la actualidad, todavía existe una cierta controversia acerca del orden real de las tres etapas principales del proceso: transesterificación, adición de Michael (sustitución aromática electrófila) y deshidratación. Un estudio reciente²⁰² mediante RMN de ^{19}F en la reacción entre fenoles activados y 4,4,4-trifluoroacetoacetato de etilo parece sugerir que la primera etapa sería la adición de Michael; no obstante, no está claro aún si esto es extensivo a todas las cumarinas sintetizadas mediante este procedimiento.



Esquema 4.1. Mecanismo más aceptado para la formación de cumarinas mediante condensación de Pechmann.

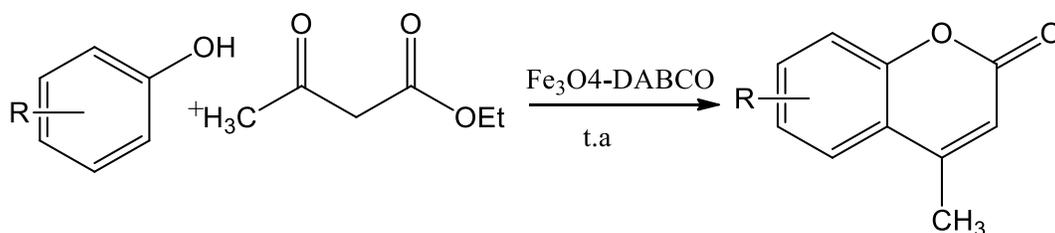
202. Tyndall, S.; Wong, K. F.; VanAlstine-Parris, M. A. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 8951–8953.

En la bibliografía existen numerosas variantes de las condiciones originales de la condensación de Pechmann, por ejemplo, modificando la naturaleza del catalizador ácido. Así pues, a modo de ejemplo, Jafari *et al.*²⁰³ describieron la preparación de cumarinas mediante un catalizador al que denominaron SO₃H@PIL, consistente en H₂SO₄ inmovilizado en líquido poliiónico (SPIL); dicho catalizador pudo ser reutilizado en al menos tres ciclos sin pérdida significativa de actividad y eficiencia catalítica. En las condiciones óptimas (7% mol de catalizador, 130 °C, ausencia de disolvente y 1 h de reacción), se obtuvo la cumarina mostrada en el **Esquema 4.2**, con un 94% de rendimiento.



Esquema 4.2. Preparación de cumarinas usando SO₃H@PIL

Por otro lado, Nasserri y Sadehzadeh²⁰⁴ describieron el uso de un catalizador basado en nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄-DABCO), que pueden ser preparadas de manera eficaz a partir de materias primas de fácil acceso. Su recuperación resultó sencilla mediante el empleo simplemente de un imán externo. Las mejores condiciones experimentales resultaron ser en ausencia de disolvente, y los rendimientos fueron excelentes (86-97%) para sustituyentes de tipo OH y NH₂ en varias posiciones del esqueleto de la cumarina.



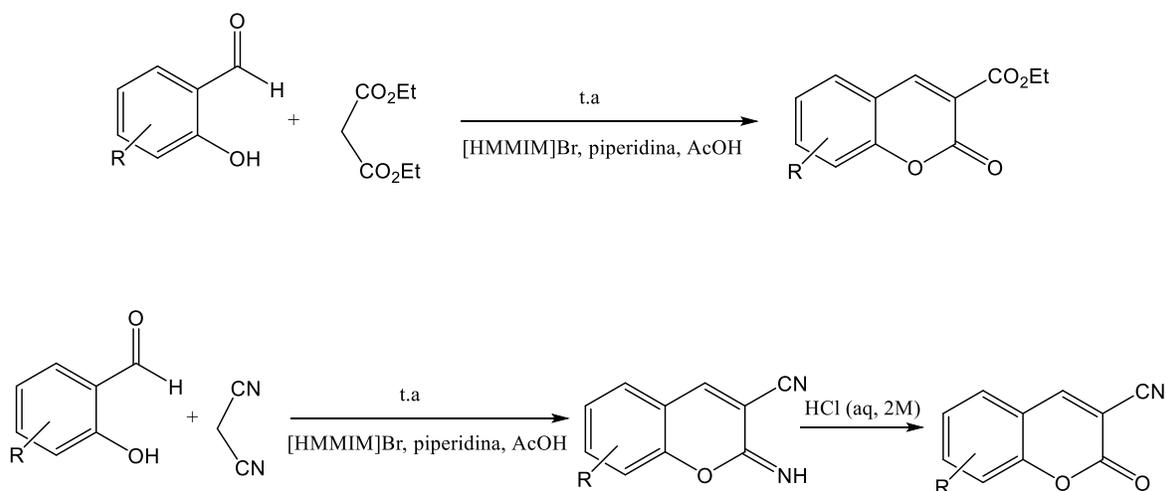
Esquema 4.3. Preparación de cumarinas mediante catálisis con nanopartículas magnéticas.

203. Jafari, E.; Farajzadeh, P.; Akbari, N.; Karbakhshzadeh, A. *Chem. Rev. Lett.* **2019**, *2*, 123–129.

204. Nasserri, M. A.; Sadeghzadeh, S. M. *J. Iran Chem. Soc.* **2014**, *11*, 23–33.

Bouasla *et al.*²⁰⁵ describieron la síntesis de cumarinas utilizando resorcinol y acetoacetato de etilo como reactivos modelo en la reacción de condensación de Pechmann en microondas sobre catalizadores ácidos sólidos heterogéneos (Amberlita-15, zeolita β y sílice funcionalizada con un ácido sulfónico) y en ausencia de disolvente. Los mejores rendimientos (97%) se obtuvieron para la Amberlita-15.

Con respecto al uso de la condensación de Knoevenagel para la preparación de cumarinas, Dinparast *y col.*²⁰⁶ describieron del uso de líquidos iónicos como medio de reacción eficaz en presencia de piperidina y AcOH; en concreto utilizaron el bromuro de 1-hexil-3-metilimidazolio ([HMIM]Br). Las reacciones transcurrieron rápidamente a t.a., con excelentes rendimientos (>90%) inmediatamente después de la adición de salicilaldehído (**Esquema X**).

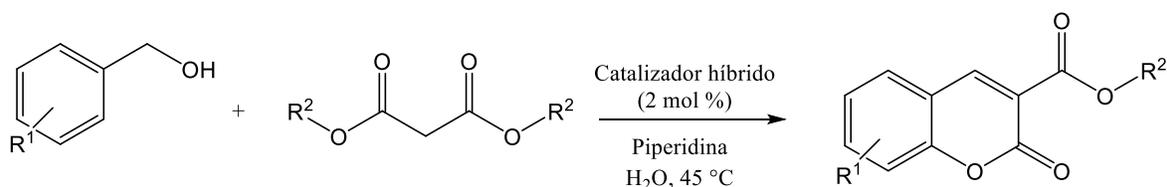


Esquema 4.4. Preparación de cumarinas en un medio de líquidos iónicos

205. Bouasla, S.; Amaro-Gahene, J.; Esquivel, D.; López, M. I.; Jiménez-Sanchidrián, C.; Teguche, M.; Romero-Salguero, F. J. *Molecules* **2017**, *22*, 2072.

206. Dinparast, L.; Hemmati, S.; Zengin, G.; Alizadeh, A. A.; Bahadori, M. B.; Kafil, H. S.; Dastmalchi, S. *ChemistrySelect*, **2019**, *4*, 9211–9215.

Mogharabi-Manzari *et al.*²⁰⁷ describieron un catalizador híbrido entre una enzima (Lacasa) y TEMPO soportados en sílice mesoporosa para la síntesis de cumarinas a través de la condensación de Knoevenagel. La reacción transcurrió en medio acuoso, utilizando diferentes salicilatos (**Esquema 4.5**).



Esquema 4.5. Preparación de cumarinas mediante reacción de Knoevenagel y catalizador híbrido enzima-TEMPO.

Con respecto a las numerosas propiedades biológicas exhibidas por las cumarinas, se deben a su estructura especial. Tal y como se ha indicado al comienzo de la introducción, poseen un fragmento de α -pirona fusionado con un anillo de benceno, resultando un sistema π altamente conjugado; esta estructura, totalmente plana, le permite establecer interacciones no covalentes intensas, tanto a través de la lactona (enlaces de hidrogeno, interacciones dipolo-dipolo), como a través del sistema aromático (interacciones π - π y catión- π). Como consecuencia, las cumarinas pueden establecer interacciones con un elevado número de receptores biológicos, en la mayor parte de los casos, mediante la inhibición de enzimas clave.^{208,209} Es por ello que las cumarinas presentan, un sinnúmero de propiedades biológicas,²¹⁰ y por este motivo, han sido catalogadas como *estructuras privilegiadas* en la Química Medicinal.²¹¹ Se han descrito numerosos ejemplos de derivados de cumarinas con

207. Mogharabi-Manzari, M.; Amini, M.; Abdollahi, M.; Khoobi, M.; Bagherzadeh, G.; Faramarzi, M. A. *ChemCatChem*, **2018**, *10*, 1542–1546.

208. Abdizadeh, T.; Kalani, M. R.; Abnous, K.; Tayarani-Najaran, Z.; Khashyarmansh B. Z.; Abdizadeh, R.; Ghodsi, R.; Hadizadeh, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *132*, 42–62.

209. Hng, Y.; Lin, M. H.; Lin, T. S.; Liu, I. C.; Lin, I. C.; Lu, Y.L.; Chang, C.N.; Chiu, P. F.; Tsai, K. C.; Chen, M. J.; Liang, P. H. *Bioorg. Chem.* **2020**, *96*, 103618.

210. Medina, F. G.; Marrero, J. G.; Macías-Alonso, M.; González, M. C.; Córdova-Guerrero, I.; Teissier, G. A. G.; Osegueda-Robles, S. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 1472–1507.

211. Stefanachi, A.; Leonetti, F.; Pisani, L.; Catto, M.; Carotti, A. *Molecules*. **2018**, *23*, 250.

propiedades antioxidantes,²¹² anti-inflamatorias,²¹³ antimicrobianas,²¹⁴ anti-Alzheimer,²¹⁵ o antiproliferativas.²¹⁶

Las cumarinas ejercen su actividad antitumoral, el objeto de este capítulo, a través de una amplia variedad de mecanismos,²¹⁷ como son la inhibición de quinasas (responsables de la proliferación, apoptosis, migración y diferenciación celular), regulación de la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis (ej. caspasas), inhibición de la resistencia a multifármaco (MDR, *Multidrug Resistance*), inhibición de la angiogénesis (creación de nuevos vasos sanguíneos), o regulación de la especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), entre otros.

Otra de las familias de enzimas a las que inhiben las cumarinas, y que son objeto del presente capítulo de la Tesis Doctoral, son las anhidrasas carbónicas (CAs, EC 4.2.1.1), un grupo de metaloenzimas ampliamente distribuidas en todas las formas de vida, y codificadas en 8 familias genéticas, identificadas mediante letras griegas:²¹⁸ α (vertebrados, protozoos, algas, citoplasma de plantas verdes, bacterias Gram-negativas), β (bacterias, hongos, algas, algunas arqueas, cloroplastos de plantas mono- y dicotiledóneas), δ (la mayoría de las bacterias), ϵ , ζ (diatomeas marinas), η (protozoos) y θ (diatomeas marinas), ι (fitoplancton marino y bacterias), las últimas de las cuales se descubrió muy recientemente.²¹⁹

Las anhidrasas carbónicas catalizan una reacción tremendamente sencilla, a la par que esencial, que es la hidratación reversible del CO₂ para dar lugar a bicarbonato y un protón.²²⁰ La reacción no catalizada no es lo suficientemente rápida como para satisfacer la demanda fisiológica; por un lado, concentraciones elevadas de CO₂ son perjudiciales para los organismos, mientras que la regulación homeostática del pH, ejercida por las CAs, es esencial

212. Kostova, I.; Bhatia, S.; Grigorov, P.; Balkansky, S.; Parmar, V. S.; Prasad, A. K.; Saso, L. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3929–3951.

213. Miao, Y.; Yang, J.; Yun, Y.; Sun, Y.; Wang, X. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 450–461.

214. Hu, Y.; Shen, Y.; Wu, X.; Tu, X.; Wang, G. X. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 958–969.

215. Jiang, N.; Huang, Q.; Liu, J.; Liang, N.; Li, Q.; Li, Q.; Xie, S. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *146*, 287–298.

216. Al-Warhi, T.; Sabt, A.; Elkaeed, E. B.; Eldehna, W. M. *Bioorg. Chem.* **2020**, *103*, 104163.

217. Wu, Y.; Xu, T.; Liu, Y.; Zeng, Y.; Wu, G. *Front. Oncol.* **2020**, 592853.

218. Angeli, A.; Carta, F.; Supuran, C. T. *Catalysts.* **2020**, *10*, 1008.

219. a) Jensen, E. L.; Clement, R.; Kosta, A.; Maberly, S. C.; Gontero, B. *ISME J.* **2019**, *13*, 2094–2106.

b) Nocentini, A.; Supuran, C. T.; Capasso, C. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 1988–1995.

220. Boone, C. D.; Pinard, M.; McKenna, R.; Silverman, D. *Subcell. Biochem.* **2014**, *75*, 31–52.

en numerosos procesos biológicos,²²¹ tales como la respiración (al disolver el CO₂ en la sangre en forma de HCO₃⁻),²²² secreción de electrolitos, lipogénesis,²²³ gluconeogénesis,²²⁴ o ureagénesis.²²⁵ Las CAs exhiben valores de k_{cat} comprendidos entre 10⁴ – 10⁹,²²⁶ lo que las convierte en una de las enzimas de mayor actividad catalítica descritas hasta la fecha.

Aunque se han identificado varios metales como grupos prostéticos en el centro activo de las CAs, tales como Cd(II), Co(II), Fe(II), Mn(II), el más frecuente es el Zn(II).²²⁷

Tal y como se muestra en la **Figura 4.2**, en su esfera de coordinación, el Zn(II) se encuentra coordinado con los anillos imidazol de His 94, 96 y 119, así como con una molécula de agua.²²⁸

221. Ali, M.; Bozdog, M.; Angeli, A.; Carta, F.; Capasso, C.; Farooq, U.; Supuran C. T. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 2444–2447.

222. Geers, C.; Gros, G. *Physiol Rev.* **2000**, *80*, 681–715.

223. Wang, Y.; Liu, F.; Wang, M.; Moejes, F. W.; Bi, Y. *Psychol Res.* **2019**, *68*, 90–97.

224. Nocentini, A.; Donald, W. A.; Supuran, C. T, editors. *Carbonic Anhydrases* Elsevier **2019**.

225. Supuran, C. T. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2018**, *28*, 709–712.

226. Nocentini, A.; Supuran, C. T.; Capasso, C. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 1988–1995.

227. Supuran, C. T. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 2023–2032.

228. Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3467–3474.

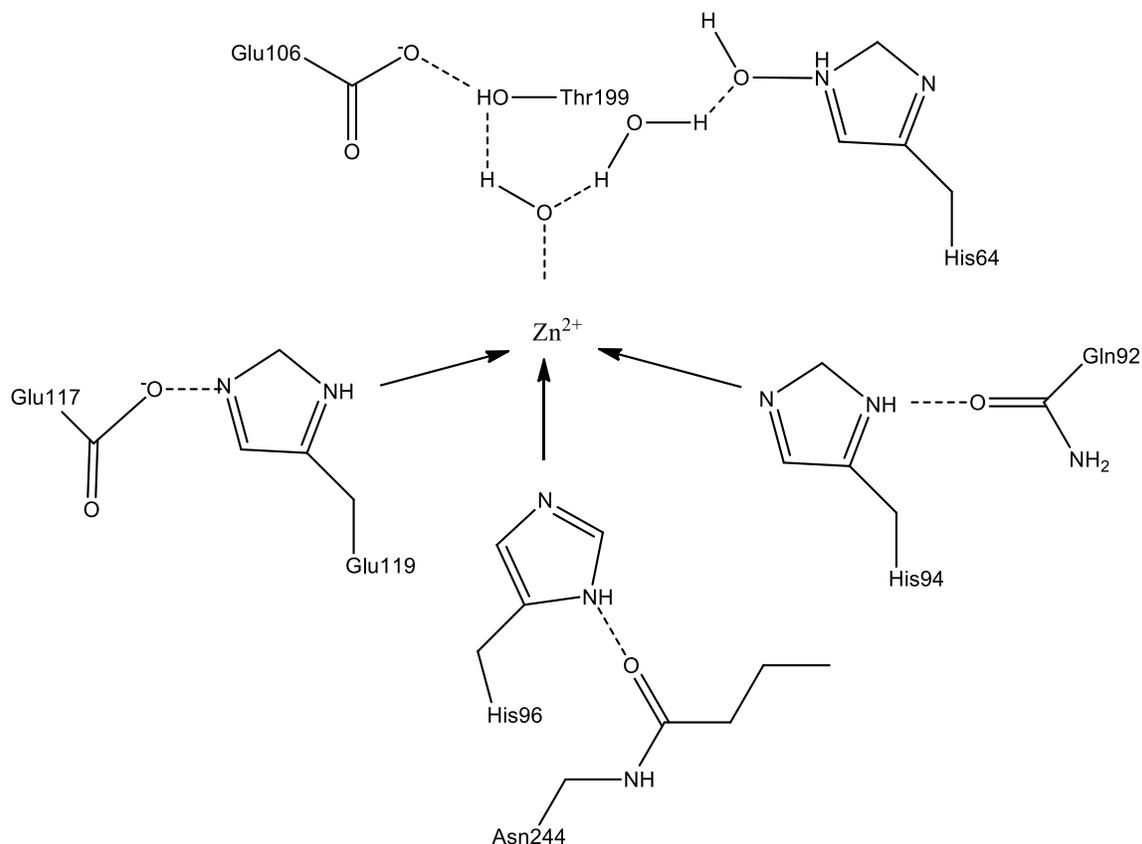
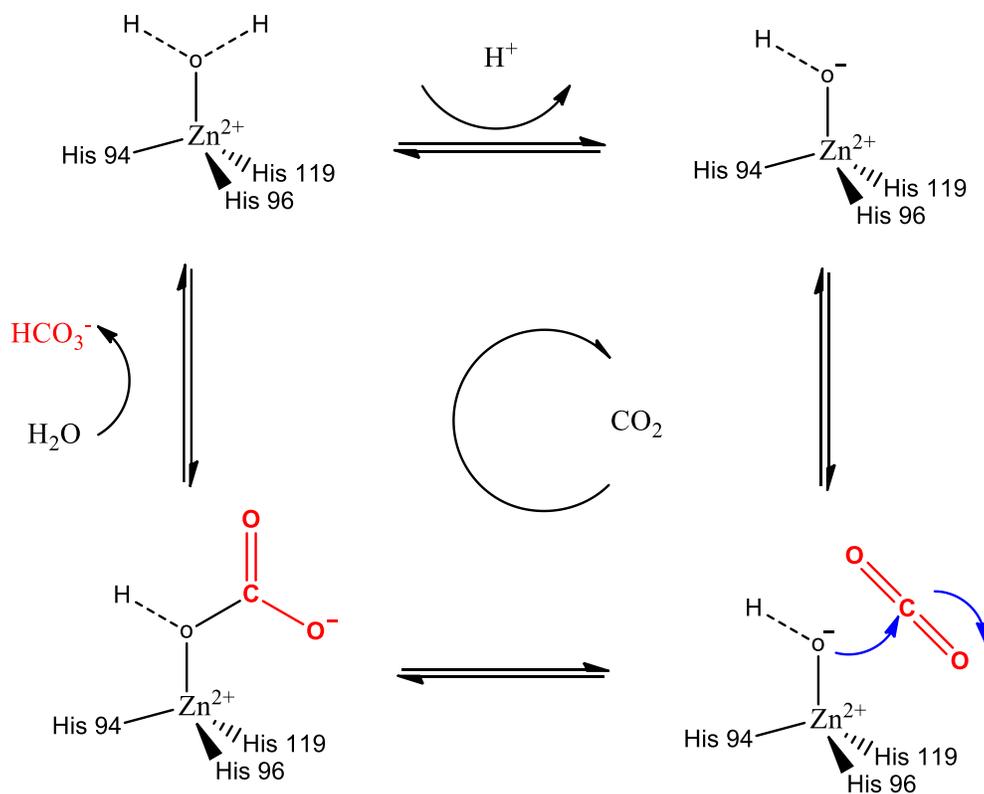


Figura 4.2. Representación de la esfera de coordinación del Zn(II) en las CAs.

En el proceso catalítico mediado por las CAs, la molécula de agua coordinada al Zn(II) es una fuente de ion hidróxido, que es el que ataca nucleofílicamente a la molécula de CO_2 , que se acumula en un bolsillo hidrofóbico de la enzima constituido por tres residuos de histidina (His94, His96, His119). Dicho ataque nucleofílico origina el bicarbonato, coordinado al Zn(II).

El ataque posterior de una molécula de agua libera al ion bicarbonato, y tras una transferencia de protón se regenera la especie activa de la enzima, que continúa con un nuevo ciclo catalítico (**Esquema 4.6**).



Esquema 4.6. Mecanismo de hidratación del CO₂ catalizado por las CAs.

De entre las ocho familias genéticas de CAs, en esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en las α -CAs, las que se encuentran en mamíferos, y en particular, en humanos. Actualmente se han identificado y caracterizado quince isoformas de α -CAs en humanos, localizadas en diferentes tejidos y con diferentes funciones:²²⁹ las CAs humanas, I, II, III, VII, VIII, X, XI, y XIII se encuentran en el citosol; la CA IV en una proteína anclada en glicosilfosfatidilinositol; las CAs VA y VB se encuentran en la matriz mitocondrial; la CA VI se secreta en saliva y leche materna, y las CAs IX, XII y XIV son enzimas trans-membrana (**Tabla X**). DE todas ellas, solo para las CAs VIII, X y XI se desconoce su función biológica, y se denominan CARPs (*Carbonic anhydrase-Related Proteins*).²³⁰

229. Nocentini, A.; Donald, W. A.; Supuran, C. T *Academic Press*. **2019**, 151–185

230. Aspatwar, A.; Tolvanen, M. E. E.; Parkkila, S. J. *Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, 28, 1129–1142.

Los niveles o actividades anormales de cada una de las isoformas están asociadas con diferentes enfermedades humanas (**Tabla 4.1**).²³¹⁻²³⁴

Tabla 4.1. Enfermedades relacionadas con las diferentes isoformas de CAs.

| Isoforma | Localización | Enfermedad en la que está involucrada |
|----------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| CA I | Citosol | Edema de retina/ cerebral |
| CA II | | Glaucoma, Edema, epilepsia |
| CA III | | Estrés oxidativo |
| CA IV | Membrana de las células basales | Glaucoma |
| CA VA | Mitocondria | Obesidad |
| CA VB | | |
| CA VI | Secretada en saliva y leche materna | Cariogénesis |
| CA VII | Citosol | Epilepsia |
| CA IX | Núcleo y membrana celular | Cáncer |
| CA XII | Membrana | Cáncer y glaucoma |
| CA XII | Citosol | Esterilidad |

Es por esto que actualmente las CAs se consideran como una diana terapéutica de interés, con ciertos fármacos ya comercializados para el tratamiento de alguna de las enfermedades anteriormente mencionadas.²³⁵ Así pues, la búsqueda de inhibidores selectivos

231. Gao, B. B.; Chen, X.; Timothy, N.; Aiello, L. P.; Feener, E. P. *J. Proteome Res.* **2008**, *6*, 2516–2525

232. Kalinin, S.; Valtari, A.; Ruponen, M.; Toropainen, E.; Kovalenko, A.; Nocentini, A.; Gureev, M.; Dar'in, D.; Urtti, A.; Supuran, C. T.; Krasavin, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 115086–115106.

233. Di Fiore, A.; Monti, D. M.; Scaloni, A.; De Simone, G.; Monti, S. M. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *1*, 1–9.

234. Hsin, M.C.; Hsien, Y. H. Hsiao, Y. H.; Chen, P. N.; Wang, P. H.; Yang, S. F. *Cancers.* **2021**, *13*, 1174–1187.

235. Kumar, S.; Rulhania, S.; Jaswal, S.; Monga, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112923.

de las CAs es un área de especial interés en la Química Medicinal, con objeto de reducir los efectos secundarios.

A continuación, se mencionan los posibles usos de los inhibidores de anhidrasas carbónicas:

- Glaucoma, una de las principales causas de ceguera irreversible a nivel mundial. La CA II participa principalmente en la regulación de la concentración del bicarbonato en los ojos, y su inhibición se puede usar para reducir la presión intraocular relacionada con el glaucoma.²³⁶
- Obesidad, un problema de salud mundial, del cual pueden derivar otras enfermedades como la hipertensión. La inhibición de CA VA puede resultar de interés para el control de la obesidad, así como de otros trastornos metabólicos.²³⁷
- Anti-convulsionantes. Se descubrió que las CAs desempeñan un papel crucial en el manteniendo adecuado del pH en el cerebro, y en particular, el control del sistema buffer $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ se puede aprovechar para controlar las convulsiones, ya que la alcalosis potencia la propagación de las convulsiones al aumentar la excitabilidad neuronal. La inhibición de las isoformas II, VII y XIV puede regular de forma eficaz las actividades eléctricas no controladas.^{238, 239}
- Agentes antibacterianos. Algunas α - y β -CAs se encuentran en bacterias, donde son responsables, por ejemplo, de la viruela de ciertas bacterias patógenas. A modo de ejemplo, *L. pneumophila* es una bacteria que puede provocar enfermedades en humanos, causando neumonía que a menudo es mortal, por lo que la búsqueda efectiva de su inhibición es primordial.²⁴⁰
- Agentes anticancerígenos. Las células tumorales han desarrollado la capacidad de funcionar en ambientes más ácidos que las células sanas, y para ello, muestran una sobreexpresión en muchos casos de las CAs IX y XII, cuya inhibición

236. Khan, A.; Khan, M.; Halim, S. A.; Khan, Z. A.; Shafiq, Z.; Al-Harrasi, A. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 1135–1147.

237. Das Mahapatra, A.; Queen, A.; Yousuf, M.; Yousuf, M.; Khan, P.; Hussain, A.; Rehman, Md. T.; Alajmi, M. F.; Datta, B.; Hassan, Md. I. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, *40*, 3144–3154.

238. Thiry, A.; Dogné, J. M.; Supuran, C. T.; Masereel, B. *Curr Top Med Chem.* **2007**, *7*, 855–864.

239. Diaz, J. R. A.; Camí, G. E.; Liu-González, M.; Vega, D. R.; Vullo, D.; Juárez, A.; Pedregosa, J. C.; Supuran, C. T. *J Enzyme Inhib Med Chem.* **2015**, *31*, 1102–1110.

240. Supuran C. T. *Pathogens.* **2016**, *5*, 44–60.

constituye una diana interesante.²⁴¹ El estudio de estos mecanismos representa una nueva estrategia en el descubrimiento de fármacos eficaces contra el cáncer.²⁴²

Se ha observado que una característica común en las células cancerosas es una desregularización en el pH, ya que a comparación las células sanas, tienen un pH intracelular aumentado (pHi) y un pH extracelular reducido (pHe). Esta desregularización influye sobre todo en la proliferación, metástasis, adaptación metabólica y la tumorigénesis.²⁴³ El bloqueo del aumento del pHi puede atenuar el comportamiento de las células cancerígenas.^{236,244}

Hasta la fecha se han descrito 5 tipos distintos de inhibición de CAs:²⁴⁵

- Complejación del catión Zn(II) por parte de agentes quelatantes. A este grupo pertenecen las sulfonamidas (el grupo más ampliamente estudiado, y del que existen unos 20 fármacos en el mercado), y sus isómeros sulfamatos, así como ditiocarbamatos, carboxilatos e hidroxamatos.
- Inhibidores que se anclan a la molécula de agua/ion hidroxilo que se encuentra en la esfera de coordinación del Zn(II). Son ejemplos de este tipo los fenoles, carboxilatos, poliaminas, sulfocumarinas y 2-tioxocumarinas.
- Inhibidores que experimentan una transformación química mediada por la CA que conduce a la obtención de un derivado que ocluye la entrada al sitio activo. Son ejemplos las cumarinas, que serán comentadas a continuación, al ser el objetivo del presente capítulo de la Tesis Doctoral.
- Inhibidores que interaccionan con la región externa al sitio activo (se describió un derivado de ácido carboxílico con este mecanismo).
- Mecanismo desconocido. Son ejemplos las sulfonamidas secundarias y terciarias, así como los fármacos imatinib y nilotinib.

241. Lee, S. H.; Griffiths, J. R. *Cancers* **2020**, *12*, 1616.

242. Neri, D.; Supuran, C. T. *Nat Rev Drug Discov.* **2011**, *10*, 767–777.

243. Sarnella, A.; Ferrara, Y.; Auletta, L.; Albanese, S.; Cerchia, L.; Alterio, V.; De Simone, G.; Supuran, C.T.; Zannetti, A. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**, *41*, 122.

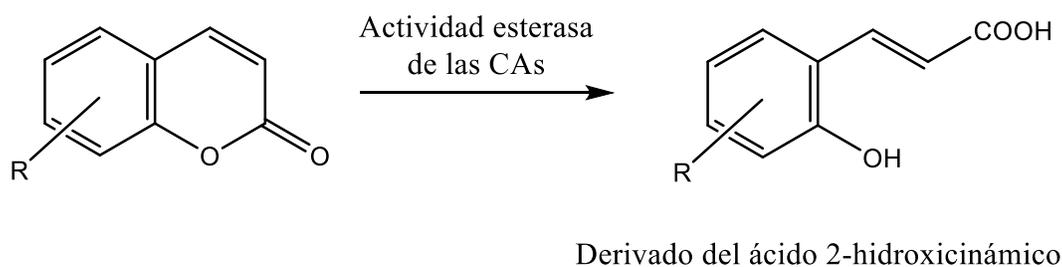
244. White, K. A.; Grillo-Hill, B. K.; Barber, D. L. *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 663–669.

245. Supuran, C. T. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 345–360.

En este contexto, se descubrió que las cumarinas constituyen una nueva clase de inhibidores de CAs,²⁴⁶ con un mecanismo totalmente distinto al exhibido por los inhibidores más clásicos, las sulfonamidas (que actúan quelatando al Zn(II), evitando la entrada del sustrato), tal y como se ha expresado anteriormente.

De hecho, a las cumarinas, en relación con la inhibición de las CAs, muestran una inhibición lenta en comparación con las sulfonamidas,²⁴⁷ lo cual sugirió que podrían realmente comportarse como *inhibidores suicidas*, y actuar como profármacos,²⁴⁸ lo que fue demostrado mediante estudios cinéticos, cristalográficos y computacionales.²⁴⁹

Ello es debido a que las CAs, además de catalizar la hidratación del CO₂, poseen actividad esterasa, permitiendo de esta manera hidrolizar la lactona característica de las cumarinas, originando un derivado del ácido 2-hidroxicinámico (presumiblemente de configuración *E*, más estable), que ocluye la entrada al sitio activo (**Esquema 4.7**).



Esquema 4.7. Mecanismo de inhibición de las CAs por parte de las cumarinas

Por lo anteriormente expuesto, en la actualidad existe un interés creciente en la obtención de nuevos derivados de cumarinas como inhibidores de CAs, tanto naturales²⁴⁶ como sintéticos. Así pues, numerosos fragmentos aromáticos/heteroaromáticos y espaciadores han sido incluidos en diversas posiciones del esqueleto de las cumarinas

246. Supuran, C. T. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*,1462–1470.

247. Maresca, A.; Temperini, C.; Vu, H.; Pham, N. B.; Poulsen, S. A.; Scozzafava, A.; Quinn, R. J.; Supuran, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3057–3062.

248. Supuran, C.T. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*, 1462–1470.

249. Maresca, A.; Temperini, C.; Pochet, L.; Masereel, B.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 335–344.

(Figura 4.3): C-3 (híbridos sulfonamidas-cumarinas **A** y **B**,²⁵⁰ tiazolidinona-pirazoles **C**),²⁵¹ C-6 (triazoles **D**,²⁵² tioureas **E**²⁵³), C-7 (2-aminobenzoxazoles **F**)²⁵⁴ y C-8 (piperazinas **G**).²⁵⁵ Además, tanto el oxígeno endocíclico, como el grupo carbonilo característicos de las cumarinas, han sido sustituidos por fragmentos isósteros, como NHR, S, Se o Te (compuesto **H**).²⁵⁶ En la **Figura 4.3** se muestran además las constantes de inhibición de las CAs I, II humanas (consideradas como *off-targets*), así como de las CAs relacionadas con procesos tumorales (IX, XII). En muchos de estos ejemplos se lograron actividades en el rango nanomolar bajo, así como excelentes selectividades, con un perfil mejorado con respecto a la acetazolamida (AAZ), el fármaco usado como referencia (CA I: 250 nM; CA II: 12.1 nM; CA IX: 25.8 nM; CA XII: 5.7 nM)

-
250. Abdelrahman, M. A.; Ibrahim, H. S.; Nocentini, A.; Eldehna, W. M. ; Bonardi, A.; Abdel-Aziz, H. A.; Gratteri, P.; Abou-Seri, S. M.; Supuran, C. T. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112897.
251. Thacker, P. S.; Goud, N. S.; Argulwar, O. S.; Soman, T.; Angeli, A.; Alvala, M.; Arifuddin, M.; Supuran, C. T. *Bioorg. Chem.* **2020**, *104*, 104272.
252. Thacker, P. S.; Tiwari, P. L.; Angeli, A.; Srikanth, D.; Swain, B.; Arifuddin, M.; Supuran, C. T. *Metabolites*, **2021**, *11*, 225.
253. Bouasla, S.; Amaro-Gahene, J.; Esquivel, D.; López, M. I.; Jiménez-Sanchidrián, C.; Teguiche, M.; Romero-Salguero, F. J. *Molecules*, **2017**, *22*, 2072.
254. Fuentes-Aguilar, A.; Merino-Montiel, P.; Montiel-Smith, S.; Meza-Reyes, S.; Vega-Báez, J. L.; Puerta, A.; Fernandes, M. X.; Padrón, J. M.; Petreni, A.; Nocentini, A.; Supuran, C. T.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J. G. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *37*, 168–177.
255. Buran, H.; Bua, S.; Poli, G.; Bayram, F. E. Ö.; Tuccinardi, T.; Supuran, C. T. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1208.
256. Angeli, A.; Trallori, E.; Carta, F.; Mannelli, L. D.; Ghelardini, C.; Supuran, C. T. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 947–951.

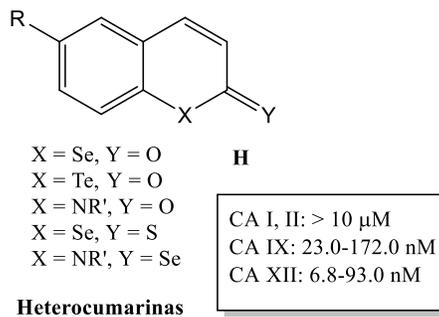
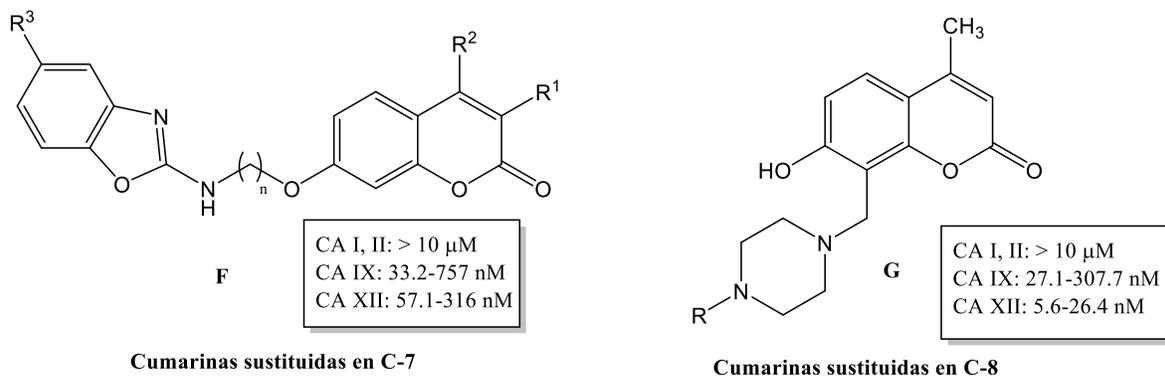
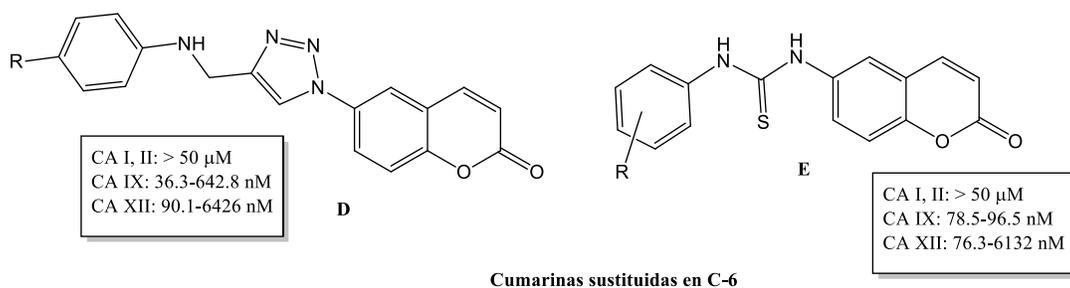
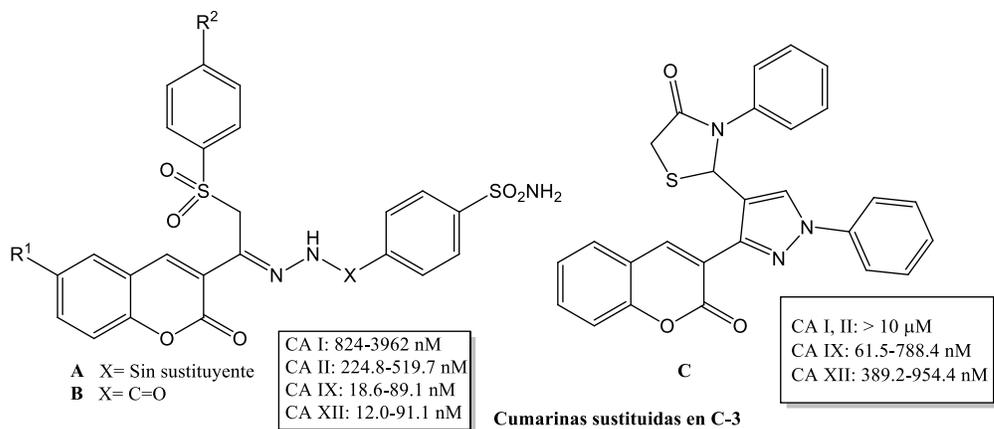


Figura 4.3. Algunos ejemplos de cumarinas sustituidas como inhibidores de CAs.

Con el objeto de incrementar la selectividad de los inhibidores de CAs frente a las CA IX y XII en un posible uso clínico, algunos inhibidores, tanto de tipo sulfonamida, como cumarina, se han conectado a un residuo sacarídico. Dado que las isoformas CAs IX y XII son enzimas transmembrana que poseen su sitio activo dirigido hacia el medio extracelular, y que los carbohidratos son moléculas con una alta polaridad, que no podrían atravesar dicha membrana, la conexión de estos a un farmacóforo orientado a la inhibición de CAs puede mejorar la selectividad del inhibidor.²⁵⁷

A modo de ejemplo, en la **Figura 4.4** se muestra la estructura de tioureas derivadas de arilsulfonamidas **141**,²⁵⁸ y de glicósidos derivados de cumarinas **142**²⁵⁹ diseñados con este fin. Se ha modificado la configuración del carbohidrato (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, D-xilosa, L-arabinosa, L-ramnosa), empleándose incluso disacáridos (maltosa), así como la distintos sustituyentes en los grupos hidroxilo (R= H, Ac).

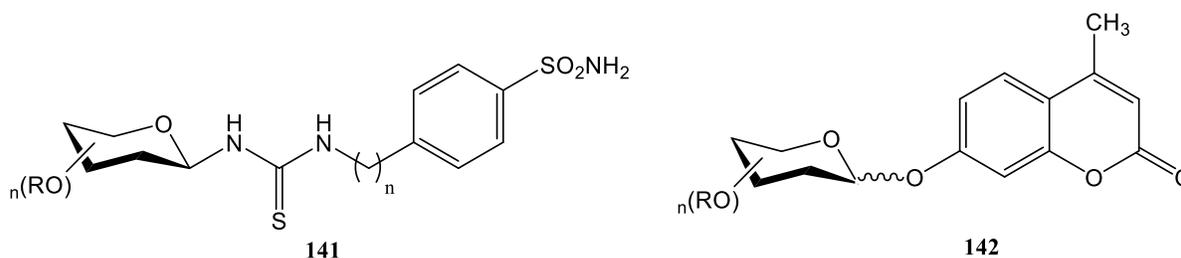


Figura 4.4. Estructura general de glicoconjugados y glicósidos derivados de arilsulfonamidas y cumarinas **141** y **142**-

El líder mundial indiscutible en la investigación de las CAs, sus inhibidores e implicaciones farmacológicas, es el Profesor Claudiu T. Supuran (Universidad de Florencia, Italia), con casi 1900 publicaciones en este contexto, y en cuyo laboratorio están siendo evaluados los productos preparados en este capítulo de la Tesis Doctoral.

257. Cuffaro, D.; Nuti, E.; Rossello, A. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*, 1906–1922.

258. Mogharabi-Manzari, M.; Amini, M.; Abdollahi, M.; Khoobi, M.; Bagherzadeh, G.; Faramarzi, M. A. *ChemCatChem* **2018**, *10*, 1542–1546.

259. Touisni, N.; Maresca, A.; McDonald, P. C.; Lou, Y.; Scozzafava, A.; Dedhar, S.; Winum, J. Y.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8271–8277.

4.2. Objetivos

En este capítulo hemos abordado la preparación de nuevos derivados de cumarina con residuos de carbohidrato, con objeto de obtener compuestos que pudieran exhibir selectividades mejoradas frente a las CAs IX y XII en un posible uso clínico.

4.3. Discusión de resultados

A tal efecto, se han funcionalizado diversas cumarinas en la posición C-7, con objeto de incorporar un espaciador hidrocarbonado de distintas longitudes y conectar el carbohidrato a través de una función tioureido. Adicionalmente también se han modificado las posiciones C-3 y C-4 del esqueleto de cumarina. La estructura general de los derivados preparados en este capítulo se muestra en la **Figura 4.5**.

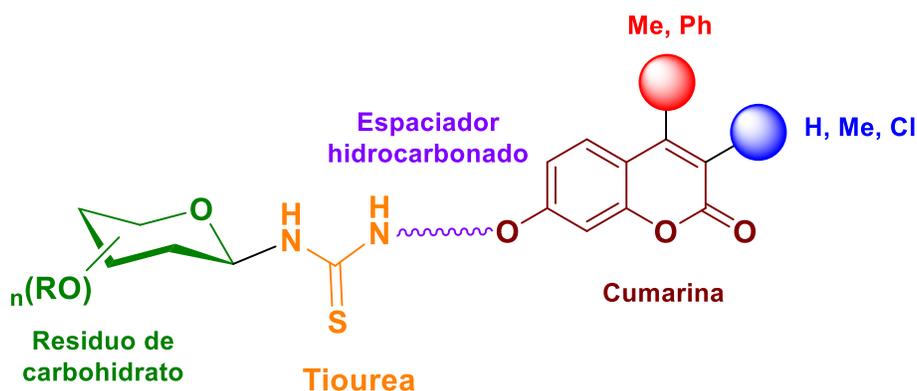
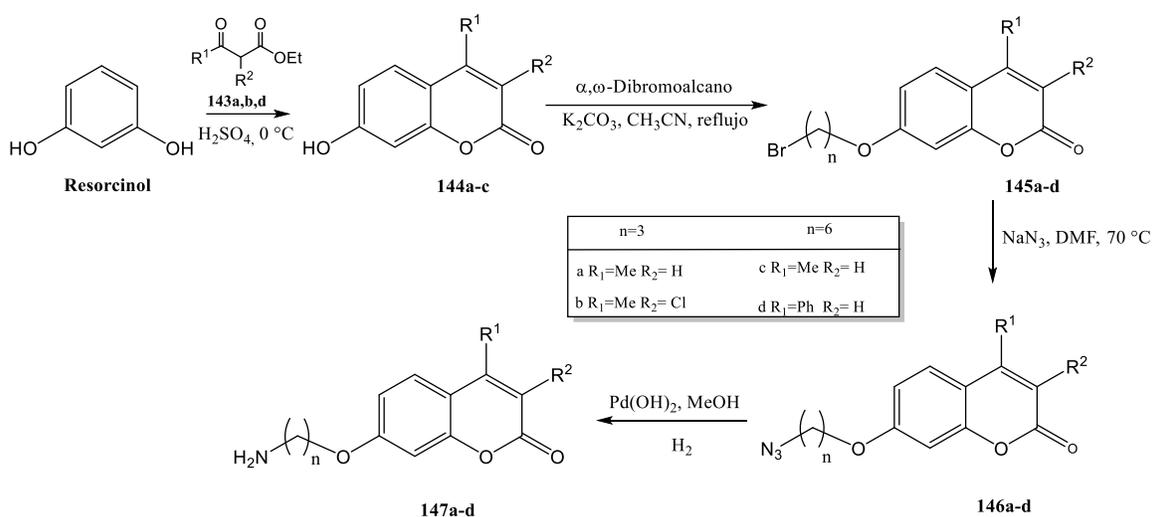


Figura 4.5. Estructura general de las glicocumarinas abordadas en este capítulo

La síntesis para la obtención de las glico-cumarinas, se llevó a cabo usando los aminoderivados de cumarina **147a-d** como intermediarios claves. Estos compuestos se obtuvieron fácilmente mediante la condensación de Pechmann entre el resorcinol y β -cetoesteres sustituidos, empleando las condiciones clásicas con catálisis de H_2SO_4 . Esto permitió obtener las cumarinas **144a-d** sustituidas en las posiciones C-3 y/o C-4.

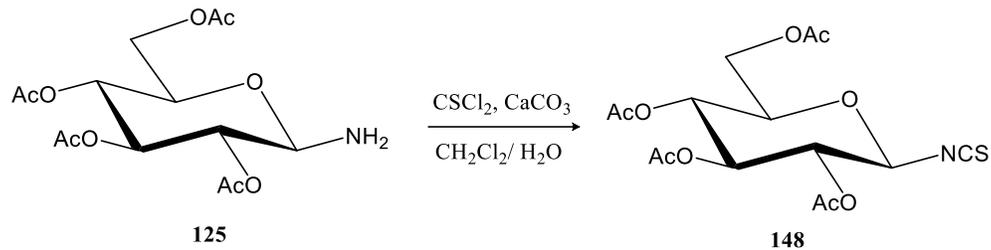
Posteriormente el grupo hidroxilo de la posición C-7 se alquiló mediante una síntesis de Williamson, para lo cual se hizo reaccionar con un exceso de α,ω -dibromoalcanos (1,3-dibromopropano y 1,6-dibromohexano) en medio básico (K_2CO_3), originando los productos monosustituídos **145a-d**; dichos compuestos a su vez fueron sometidos a una reacción de tipo S_N2 con NaN_3 seguido de hidrogenación catalítica, para originar los amino-derivados **147a-d** (**Esquema 4.8**). Estos compuestos fueron los intermediarios clave para reaccionar con isotiocianatos derivados de carbohidrato.



Esquema 4.8. Preparación de los amino-precursos derivados de cumarina **147a-d**.

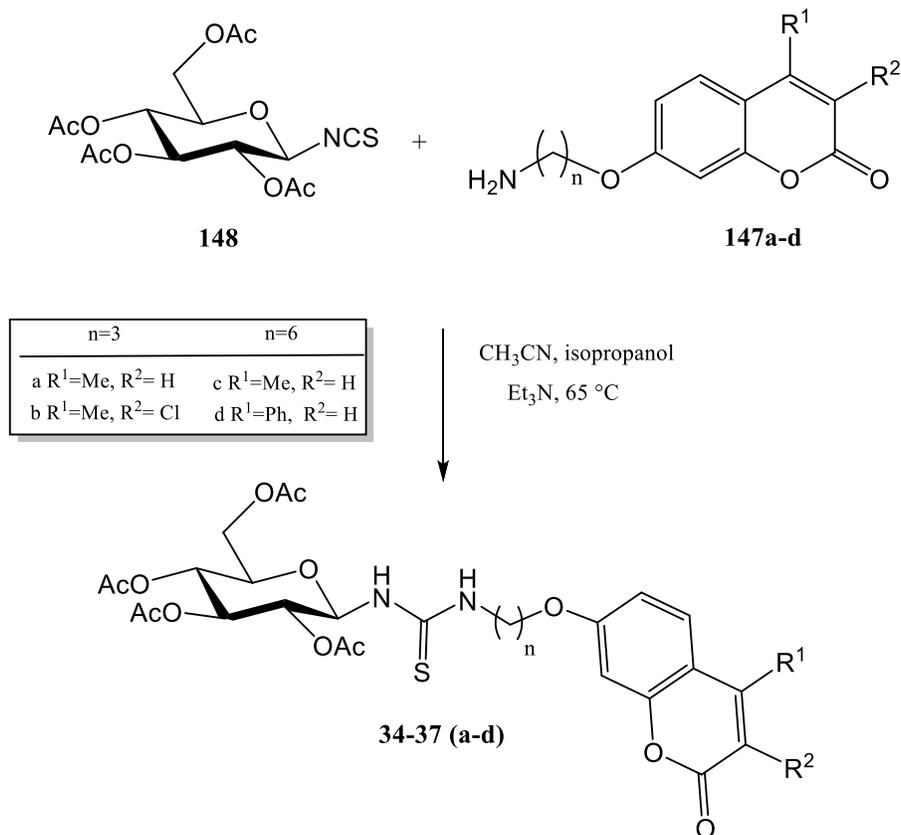
Para llevar a cabo la síntesis de las glico-cumarinas se planteó como compuesto intermedio clave el β -D-glucopiranosilisotiocianato per-*O*-acetilado **148**; dicho compuesto se preparó mediante el tratamiento de la β -D-glucopiranosilamina per-*O*-acetilada **125** con tiofosgeno como agente tionante, en un medio trifásico (H_2O , CH_2Cl_2 , $CaCO_3$) (**Esquema 4.9**). Camarasa *et al.*²⁶⁰ han descrito que este tipo de compuestos también puede prepararse mediante tratamiento de un haluro de glicosilo per-*O*-acetilado con $KSCN$ en presencia de un catalizador de transferencia de fase.

260. Camarasa, M. J.; Fernández-Resca, P.; García-López, M. T.; De las heras, F. G.; Méndez-Castrillón, P. P.; Sam Felix, A. *Synthesis*, **1984**, 6, 509–510.



Esquema 4.9. Preparación del β -D-glucopiranosilisotiocianato per-*O*-acetilado **148**.

Finalmente, el acoplamiento entre la amina de las cumarinas **147a-d** y el isotiocianato **148** se efectuó mediante calentamiento en una mezcla acetonitrilo/isopropanol, en medio básico (Et_3N), dando como resultado los productos **34-37** (**Esquema 4.10**).



Esquema 4.10. Preparación de las glicocumarinas **34-37**.

A continuación, se muestra el espectro de RMN de ^1H del producto **35** (Figura 4.6), donde se observa la presencia de las señales pertenecientes a los acetilos correspondientes al azúcar alrededor de 2.0 ppm. Puede comprobarse además que todas las señales del compuesto se encuentran muy ensanchadas; ello es debido, al igual que se mostró en el capítulo anterior para los selenocarbamatos, a la presencia de diversos isómeros conformacionales *E/Z* (con distinta estabilidad) para cada enlace C-N del fragmento de pseudo-tioamida. Se ha descrito¹⁵⁸ que en los espectros de glicosiltioureas en CDCl_3 en el enlace Azúcar-NH-CS, el protón anomérico y el protón del grupo NH adoptan una orientación antiperiplana, que estaría de acuerdo con el triplete en torno a 5.8 ppm asignado a H-1 ($J_{1,2} = J_{1,\text{NH}} = 9.3$ Hz).

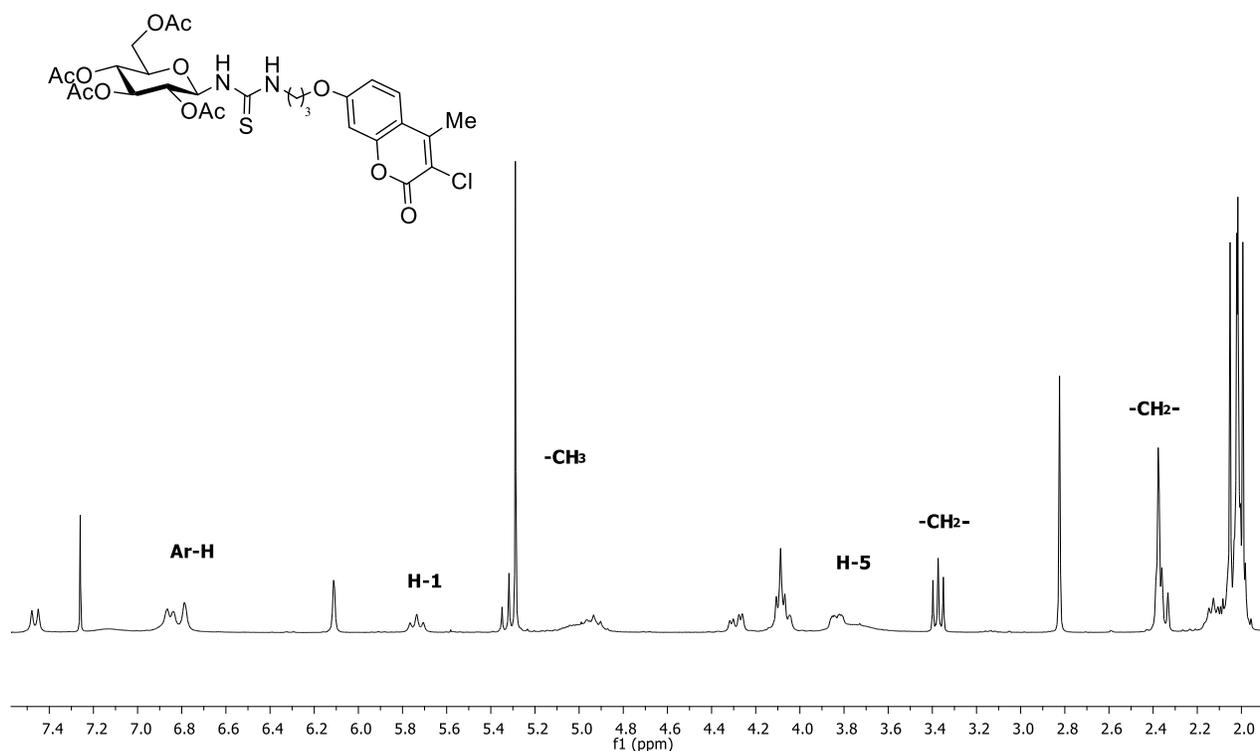


Figura 4.6. Espectro ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del producto **35**.

Por otra parte, en el espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 4.7**), se puede destacar como señal importante de la formación de este producto la señal del grupo tioureido aproximadamente en 184 ppm; la señal correspondiente al carbono anomérico se observa como una señal ancha y muy pequeña en 82 ppm.

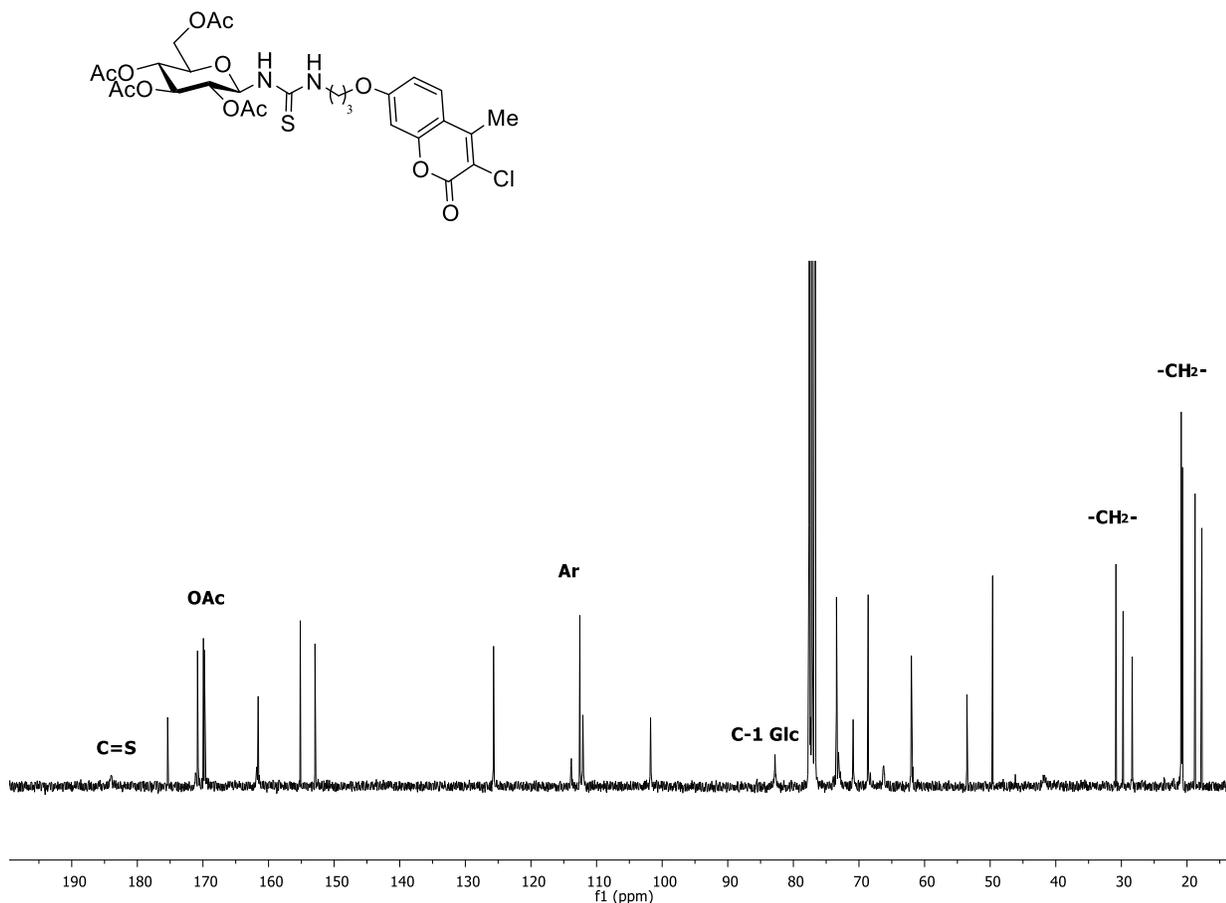


Figura 4.7. Espectro de ^{13}C -RMN (7.5 MHz, CDCl_3) del producto 35.

Estaba prevista la realización de una serie más amplia de derivados, con otras cadenas espaciadoras, el uso de otros carbohidratos (e.j. galactosa, e incluso disacáridos, como la maltosa), así como la comparación de las bioactividades entre los productos *O*-acetilados y sus correspondientes derivados desprotegidos. No obstante, el largo confinamiento en la BUAP, a raíz de la pandemia provocada por el COVID-19, impidió la culminación de dicha serie de derivados.

Los compuestos preparados en este capítulo se han enviado al laboratorio del Dr. Claudiu T. Supuran (Universidad de Florencia), para ser estudiados como posibles inhibidores de isoformas de CAs relacionadas con procesos tumorales (CA IX y XII). Así mismo, también se han enviado al laboratorio del Dr. José Manuel Padrón (Universidad de la Laguna, España) para ser evaluados como potenciales agentes antiproliferativos.

4.4. Conclusiones del capítulo 4

PRIMERA

Se ha abordado con éxito la preparación de nuevos derivados glicoconjugados de cumarina con una función de tipo tioureido.

SEGUNDA

El grupo tioureido se incorporó mediante reacción satisfactoria entre el β -D-glucopiranosilisotiocianato per-*O*-acetilado **125** y amino-derivados de cumarina **144a-d**.

TERCERA

La condensación de Pechmann resultó un procedimiento versátil para el acceso a una pequeña librería de cumarinas.

CUARTA

Los espectros de RMN confirman la existencia de isómeros conformacionales alrededor del grupo tioureido (función de tipo pseudo-tioamida), con orientación antiperiplana del protón anomérico y del grupo NH.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Métodos generales

Para la cromatografía en capa fina (c.c.f.) se han utilizado láminas de aluminio de gel de sílice (Merck 60 F₂₅₄), de 0.25 mm de espesor. Como fase móvil se utilizaron sistemas de elución AcOEt/ciclohexano, así como CH₂Cl₂/MeOH. Para el revelado se empleó luz ultravioleta de onda corta ($\lambda = 254$ nm, lámpara de UV-G-54) y/o mediante calcinación de las placas empapadas con ácido sulfúrico etanólico al 10%, vainillina etanólica al 10% o ninhidrina etanólica al 0.1%.

Las purificaciones por cromatografía en columna se realizaron utilizando una fase estacionaria de gel de sílice (Merck 60, tamaño de partícula de 40 a 63 μm), eluyendo por gravedad o con una presión suave. Los eluyentes utilizados se indican en cada caso.

Los espectros de RMN se registraron en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS), utilizando Bruker Avance III 300 (300.1 MHz para ¹H, 75.5 MHz para ¹³C) y Bruker Avance III 500 (500.1 MHz para ¹H, 125.7 MHz para espectrómetros ¹³C). También en el Instituto de Ciencias BUAP (ICUAP), Bruker 500 (500.1 MHz para ¹H, 125.7 MHz para espectros de ¹³C).

Se han empleado como disolventes deuterados CDCl₃, CD₃OD, DMSO-*d*₆. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y los valores de las constantes de acoplamiento (*J*), se dan en Hz. Los espectros se calibran usando tetrametilsilano ($\delta = 0$) o las señales del disolvente como referencias internas. La multiplicidad de las señales de los diferentes espectros de ¹H están asignadas de la siguiente manera s (señal simple), d (señal doble), dd (doble de dobles), ddd (doble de dobles de dobles) m (señal múltiple).

La asignación de las señales de ¹H-RMN se ha realizado mediante experimentos de COSY (Correlated Spectroscopy). La asignación de las señales de ¹³C se ha realizado mediante técnicas de correlación heteronuclear 2D ¹H-¹³C: HSQC (¹H detection mode Heteronuclear single- quantum correlation) y HMBC (heteronuclear multiple bond correlation).

Los espectros de masas se registraron con un espectrómetro Q Exactive™, con ionización por electropulverización (ESI), y se calibraron con la solución de calibración de iones positivos Pierce™ LTQ Velos ESI (ThermoFisher Scientific).

Estudios de inhibición con glicosidasas comerciales y enzimas humanas (HexB y OGA)

Un panel de once glucosidasas comerciales (α -L-fucosidasa de *Homo sapiens*, α -galactosidasa de granos de café, β -galactosidasas de *Escherichia coli* y *Aspergillus oryzae*, α -glucosidasas de levadura y arroz, amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*, β -glucosidasa de almendras, α -manosidasas de habichuelas, β -manosidasa de caracol, β -N-acetilglucosaminidasas de habichuelas (JB-GlcNAc) y dos glucosidasas humanas (HexB y OGA) se evaluaron utilizando un espectrofotómetro Asys Expert 96.

La actividad inhibitoria (% de inhibición) hacia la glucosidasa correspondiente se determinó por cuadruplicado en presencia de la concentración deseada del inhibidor en el pocillo. Cada ensayo enzimático (volumen final 0.12 mL) contiene 0.01–0.5 unidades/mL de la enzima (con calibración previa) y una solución acuosa del *p*-nitrofenil glicopiranosido (sustrato) tamponado al pH óptimo de la enzima.

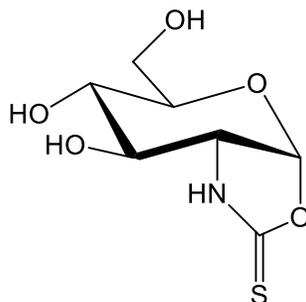
La enzima y el inhibidor se preincubaron durante 5 min a temperatura ambiente y la reacción comenzó mediante la adición del sustrato. Después de 20 min de incubación a 37 °C, la reacción se detuvo mediante la adición de 0.1 mL de una solución de pH 10. El *p*-nitrofenolato formado se midió mediante espectroscopia de absorción visible a 405 nm. En estas condiciones, el *p*-nitrofenolato liberado dio lugar a densidades ópticas lineales tanto con el tiempo de reacción como con la concentración de la enzima. El valor IC₅₀ (concentración de inhibidor necesaria para una inhibición del 50 % de la actividad enzimática) se determinó a partir de gráficos de % de inhibición frente a log [concentración de inhibidor]. Cada punto del gráfico es el promedio de cuatro medidas.

La desviación estándar para cada punto también se ha representado en el gráfico. Además, para OGA humana, el modo de inhibición fue sugerido por el diagrama de Dixon donde la velocidad recíproca (1/V) se representa frente a la concentración de inhibidor [I]; [S] = 0.21, 0.42 y 0.83 mM; K_M = 0,34 mM. También se representó el gráfico de Cornish-Bowden complementario ([S]/V frente a [I] a diferentes concentraciones de sustrato) para

confirmar el modo de inhibición competitiva. Los K_i se determinaron por duplicado (< 10 % de diferencia) y se expresaron como la media \pm SD.

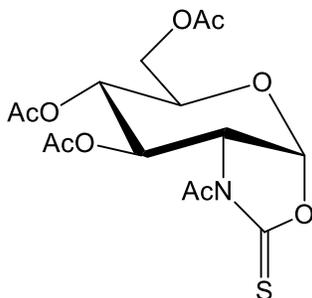
5.2. Materias primas

5.2.1. (1,2-Didesoxi- α -D-glucopiranosos)[2,1-*d*]tiazolidin-2-tiona (103)



A una solución de hidrocloreto de glucosamina **101** (500 mg g, 2.32 mmol) en 5 mL de H₂O y 5 mL de THF a 0° C se añade NaHCO₃ (640 mg, 7.62 mmol); la mezcla se mantiene con agitación hasta disolución total del azúcar. Posteriormente se añade tiofosgeno (0.21 mL, 2.74 mmol, 1.2 equiv.). La reacción se deja con agitación vigorosa por 30 minutos. Pasado este tiempo se evapora el disolvente en alto vacío. El residuo se utiliza sin ninguna purificación adicional.

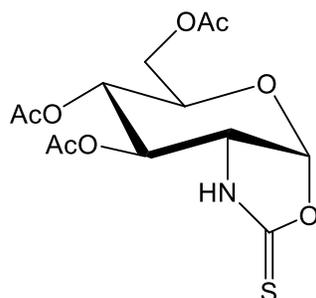
5.2.2. *N*-Acetil-(3,4,6-tri-*O*-acetil-1,2-dideoxi- α -D-glucopiranosos)[2,1-*d*]tiazolidin-2-tiona (104)



El crudo del biciclo obtenido en la Sección 5.2.1 se disuelve en una mezcla 1:1 de Ac₂O/Py (10 mL), y se mantiene a t.a con agitación vigorosa durante 24 h. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se vierte sobre H₂O-hielo, hasta la precipitación del producto; el producto precipitado se disuelve en DCM (20 mL) y se lava con HCl 2M (2x50 mL), NaHCO₃ (aq) sat. (1x50 mL) y H₂O (1x50 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se

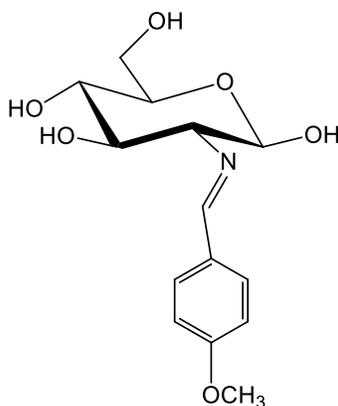
filtra y el filtrado se concentra a sequedad, usándose directamente para la siguiente etapa, sin ninguna purificación cromatográfica. Rendimiento: 542 mg (60%, 2 etapas).

5.2.3. (3,4,6-tri-*O*-acetil-1,2-didesoxi- α -D-glucopiranosos)[2,1-*d*]tiazolidin-2-tiona (105)



A una disolución de **104** (400 mg, 1.03 mmol) en EtOH (50 mL) se añade *p*-toluidina (221.9 mg, 2.06 mmol, 2.0 equiv.). La disolución se calienta a 65 °C durante 24 h; transcurrido ese tiempo, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 80:1) para dar **105** como un sirupo. Rendimiento: 186 mg (52%).

5.2.4. 2-Desoxi-2-(*p*-metoxibencilidenamino)- β -D-glucopiranososa (111)

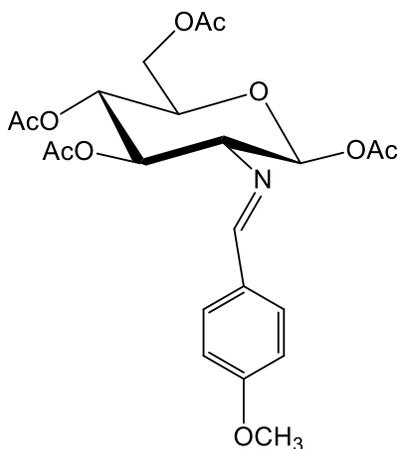


Se obtiene siguiendo el procedimiento descrito por Bergman y Zervas.²⁶¹ Una suspensión del hidrocloreto de 2-amino-2-desoxi-D-glucosa (4.0 g, 18.5 mmol) y

261. Bergmann, M.; Zervas, L. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1931**, 64B, 975–980.

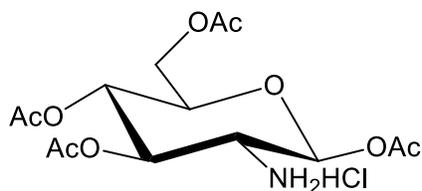
anisaldehído (2.25 mL, 37.1 mmol) en KOH 1M (20 mL) se agita vigorosamente a 0 °C hasta la formación de una masa cristalina. Se mantiene a esa temperatura durante 3 h y a continuación se filtra y se lava sucesivamente con H₂O a 0 °C, EtOH y Et₂O, se seca y se usa directamente para la siguiente reacción. Rendimiento: 4.3 g, 78%

5.2.5. 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetil-2-desoxi-2-(*p*-metoxibencilidenamino)-β-D-glucopiranososa (112)



Se prepara según el procedimiento descrito por Bergman y Zervas.²⁶² Una disolución de **111** (6.8 g, 22.8 mmol), en Ac₂O-Py 1:1 (68 mL) se mantiene a 0 °C durante 24 h. A continuación, se vierte sobre agua-hielo, precipitando un sólido que se filtra, se lava con agua y se seca. Las aguas madres se lavan con CH₂Cl₂ (30 mL), se separa la fase orgánica y se lava con HCl 1M (2 X 30mL), NaHCO₃ (aq.) saturado (1x30 mL) y agua (1x30 mL), se seca sobre MgSO₄ anhidro y se concentra a sequedad. Rendimiento: 8.3 g, 78%.

5.2.6. Hidrocloruro de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi-β-D-glucopiranososa (113)

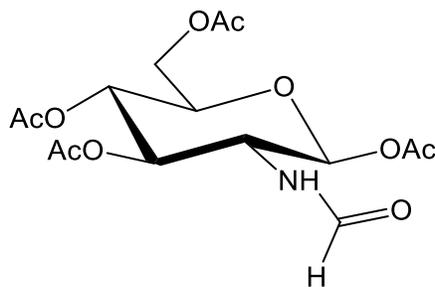


Se prepara según una modificación del procedimiento descrito por Medgyes *et al.*²⁶² Una suspensión **112** (4.0 g, 8.5 mmol) en acetona (18 mL) se calienta a ebullición hasta disolución total. Fuera de la fuente de calor se adiciona HCl 5M (1.86 mL), formándose una masa cristalina que se agita con Et₂O (10 mL), se filtra y se lava con el mismo disolvente. Rendimiento: 2.5g, 76%.

5.2.7. Método general para la formación de las formamidas **114**, **126**.

Se prepara según el método descrito por López *et al.*²⁶³ A una disolución del hidrocloreuro **113** o la glucopiranosilamina **125** (1.0 equiv.), en una mezcla 1:1 de CH₂Cl₂-NaHCO₃ (aq) saturado, con agitación vigorosa y enfriada a 0°C, se adiciona AFA (3.0 equiv.). La agitación se mantiene a t.a durante 2.5 h y transcurrido ese tiempo se separa la capa acuosa, que se extrae con CH₂Cl₂. Las fracciones orgánicas se unen, se secan sobre MgSO₄ anhidro y se concentra a sequedad. El residuo se recrystaliza de Et₂O.

5.2.7.1. 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetil-2-desoxi-2-formamido- β-D-glucopiranososa (**114**)



Se emplea el hidrocloreuro **113** (900 mg, 2.34 mmol) y AFA (0.94 mL, 7.02 mmol), en una mezcla 1:1 de CH₂Cl₂- NaHCO₃ (aq) saturado (36 mL). Rendimiento: 840 mg, 95%.

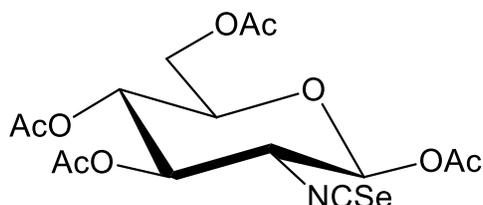
262. Medgyes, A.; Farkas, E.; Lipták, A.; Pozsgay, V. *Tetrahedron* **1997**, 53, 4159–4178.

263. López, Ó.; Maza, S.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J. G. *Tetrahedron*. **2009**, 65, 2556–2655.

5.2.8. Método general para la formación de isoselenocianatos **115** y **127**

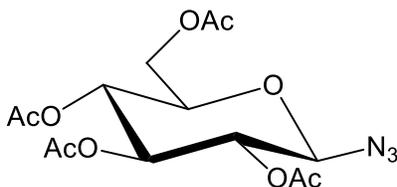
Se prepara según una modificación del método descrito por López *et al.*²⁶³ A una disolución de la formamida **114** o **126** (0.85 mmol) y Et₃N (5.1 equiv.) en tolueno seco a 0°C, con tamiz molecular de 4 Å y bajo atmosfera de Ar, se adiciona gota a gota durante 30 min una disolución de trifosgeno (0.84 equiv.) en tolueno seco. Tras la adición, la mezcla se mantiene con agitación a 0 °C durante 15 min y a continuación se calienta a 90°C durante 7 h dando lugar al correspondiente isocianuro no aislado. A este medio de reacción se adiciona Se negro (1.5 equiv.), manteniéndose la mezcla en la oscuridad a 90°C durante 15 h. A continuación, se filtra sobre un lecho de Celita y el filtrado se concentra a sequedad. El residuo se trata con Et₂O para eliminar las sales insolubles y el filtrado se purifica mediante cromatografía en columna (hexano → hexano– Et₂O 1:1).

5.2.8.1. 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetil-3-desoxi-2-isoselenocianato-β-D-glucopiranososa (**115**)



Se utiliza la formamida **114** (320 mg, 0.85 mmol) y Et₃N (0.610 mL, 4.37 mmol) en tolueno seco (8 mL), trifosgeno (212 mg, 0.71 mmol) en tolueno seco (8 mL) y Se negro (102 mg, 1.29 mmol). Rendimiento: 200 mg, 61%.

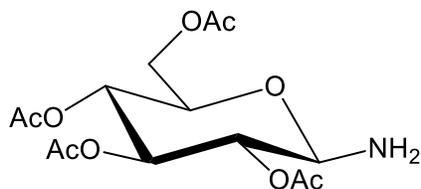
5.2.9. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosilazida (**124**)



A una solución de glucosa per-*O*-acetilada (4.33 g, 11.09 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (40 mL) se añadió TMSN₃ (1.61 mL, 12.2 mmol) y SnCl₄ (0.79 mL, 6.75 mmol) en agitación y bajo atmosfera inerte. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 24 h. Pasado este tiempo se lavó con salmuera (2x20 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró

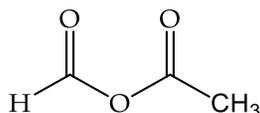
a sequedad. El producto se purificó mediante cromatografía en columna (7:3 hexano-AcOEt).
Rendimiento: 3.82 g (92 %).

5.2.10. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosilamina(125)



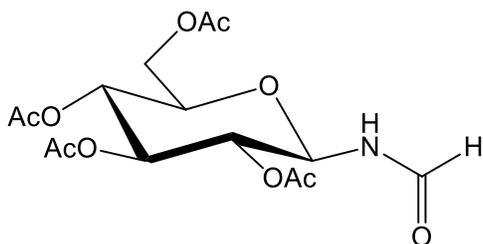
A una solución de la azida **124** (3.50 g, 9.38 mmol) en MeOH anhidro (40 mL), bajo atmósfera de Argón, se agrega Pd/C (0.6 g); la mezcla se hidrogena de forma convencional a t.a. y presión atmosférica durante 1 h. El crudo de reacción se filtra sobre Celita®; la fase orgánica se concentra a sequedad y se utiliza sin purificación en el siguiente paso de reacción. Rendimiento: 3.00 g, 92%.

5.2.11. Anhídrido acético-fórmico (AFA)



Se sigue el procedimiento recogido en el review de Strazzolini *et al.*²⁶⁴ Una disolución de Ac₂O (10 mL, 0.11 mol) y ácido fórmico (4 mL, 0.11 mol) se calienta a 45 °C durante 1 h, formándose una mezcla que contiene el anhídrido mixto como producto mayoritario. El crudo de reacción se usa directamente sin ninguna purificación adicional.

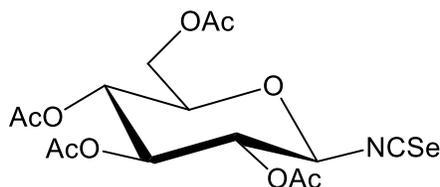
5.2.12. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil-*N*-formil- β -D-glucopiranosilamina (126)



264. Strazzolini, P.; Giumanini, A. G.; Cauci, S. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 1081–1118.

Se sigue el procedimiento de la **Sección 5.2.7**. Se emplea la amina **125** (0.50 g, 1.17 mmol) y AFA (0.47 mL, 3.51 mmol), en una mezcla 1:1 de CH₂Cl₂- NaHCO₃ (aq) saturado (18 mL). Rendimiento: 0.390 g, 89%.

5.2.13. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosil isoselenocianato (**127**)

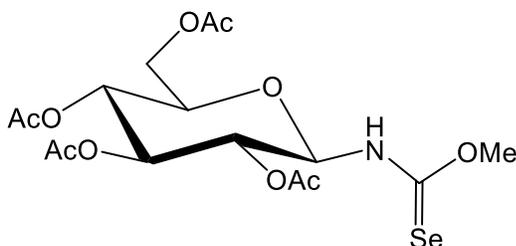


Se sigue el procedimiento de la **Sección 5.2.8**. Se emplea la formamida **126** (150 mg, 0.40 mmol) y Et₃N (0.285 mL, 2.04 mmol) en tolueno seco (4 mL), trifosgeno (100.3 mg, 0.34 mmol) en tolueno seco (4 mL) y Se negro (47.4 mg, 0.6 mmol). Rendimiento: 106 mg, 60%.

5.2.14. Método general para la preparación de los *O*-alquilselenocarbamatos **128**

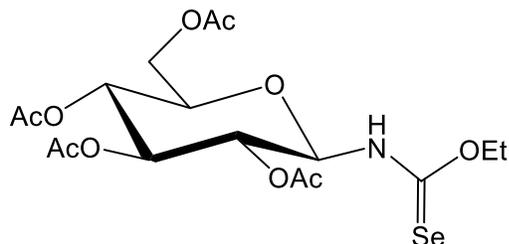
Una disolución del isoselenocianato **127** (50 mg, 0.11 mmol) en el alcohol correspondiente (5 mL) se calienta a 70 °C bajo atmósfera inerte y en la oscuridad durante 4 h. Transcurrido ese tiempo se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 40:1).

5.2.14.1. *O*-Metil-*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosil)selenocarbamato (**128a**)



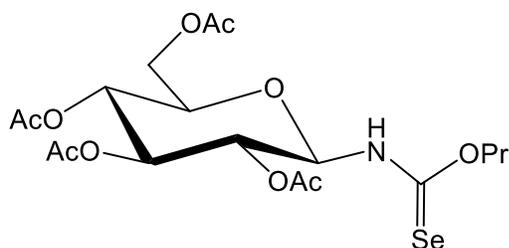
Se empleó metanol. Rendimiento: 32.5 mg (63%).

5.2.14.2. *O*-Etil-*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)selenocarbamato (128b)



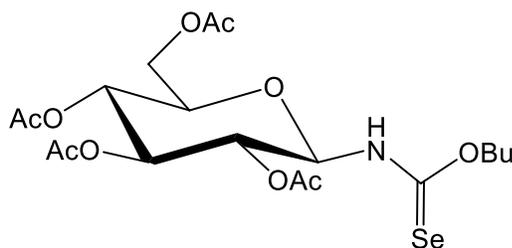
Se empleó etanol. Rendimiento: 30.8 mg (58%).

5.2.14.3. *O*-Propil-*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)selenocarbamato (128c)



Se empleó propanol. Rendimiento: 18.0 mg (33%).

5.2.14.4. *O*-Butil-*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)selenocarbamato (128c)



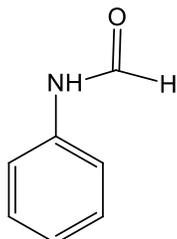
Se empleó butanol. Rendimiento: 31.4 mg (56%).

5.2.15. Método general para la formación de las formamidas 130

A una disolución de las correspondientes anilinas (1.5 g), en una mezcla 1:1 de CH_2Cl_2 - NaHCO_3 (aq) saturado (60 mL), con agitación vigorosa y enfriada a 0°C , se adiciona AFA. La agitación se mantiene a t.a durante 2.5 h y transcurrido ese tiempo se separa la capa

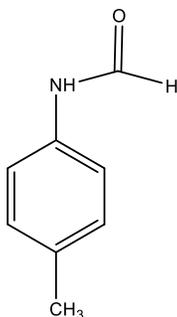
acuosa que se extrae con CH_2Cl_2 . Las fracciones orgánicas se unen, se seca sobre MgSO_4 anhidro y se concentra a sequedad. El residuo se lleva a la siguiente reacción sin purificación adicional.

5.2.15.1. *N*-Fenilformamida (130a)



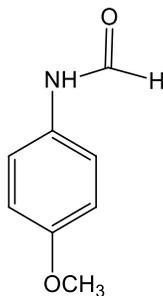
Se empleó anilina (1.5 g, 16.11 mmol) y AFA (6.4 mL). Rendimiento: 1.40 g (72%).

5.2.15.2. *N*-(*p*-metilfenil)formamida (130b)



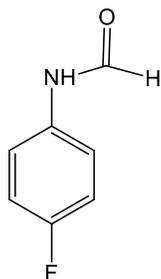
Se empleó *p*-toluidina (1.5 g, 14.0 mmol) y AFA (5.6 mL). Rendimiento: 1.80 g (95%).

5.2.15.3. *N*-(*p*-metoxifenil)formamida (130c)



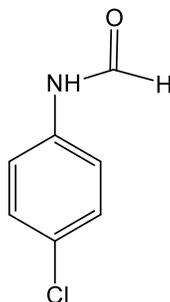
Se empleó *p*-metoxianilina (1.5 g, 12.18 mmol) y AFA (4.8 mL). Rendimiento: 1.60 g, (89%).

5.2.15.4. *N*-(*p*-Fluorofenil)formamida (130d)



Se empleó *p*-fluoroanilina (1.5 g, 13.50 mmol) y AFA (3.5 mL). Rendimiento: 1.5 g (80%).

5.2.15.4. *N*-(*p*-clorofenil)formamida (130e)

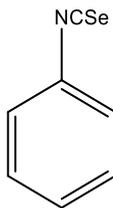


Se empleó *p*-cloroanilina (1.5 g, 11.80 mmol) y AFA (4.7 mL). Rendimiento: 1.40 g (76%).

5.2.16. Método general para la formación los isoselenocianatos 131

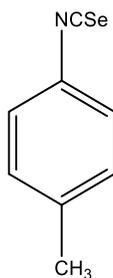
Una disolución de trifosgeno (0.53 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (30 mL) se le añade gota a gota durante 1 h sobre una disolución a reflujo de la *N*-(*p*-metilfenil)formamida (1.0 equiv.) y Et_3N (4.3 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (15 mL), en presencia de tamiz molecular de 4 Å y bajo atmósfera inerte. Finalizada la adición, la mezcla se calienta a reflujo durante 2.5 h, se añade Se negro (2.0 equiv.) y se calienta a reflujo en la oscuridad durante 12 h. A continuación, se filtra sobre Celita, el filtrado se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (hexano)

5.2.16.1. Isoselenocianato de fenilo (131a)



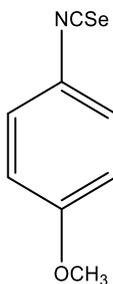
Se empleó *N*-feniformamida **130a** (1.4 g, 11.56 mmol), trifosgeno (1.81 g, 6.1 mmol), Et₃N (6.97 mL, 50.06 mmol), Se negro (1.81 g, 23.01 mmol). Rendimiento: 1.70 g (80%).

5.2.16.2. Isoselenocianato de *p*-metilfenilo (131b)



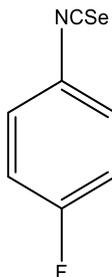
Se empleó *N*-(*p*-metilfenil)formamida **130b** (13.32 mmol), trifosgeno (2.08 g, 7.0 mmol), Et₃N (8.0 mL, 57.08 mmol), Se negro (2.0 g, 26.5 mmol). Rendimiento: 1.90 g, 72%.

5.2.16.3. Isoselenocianato de *p*-metoxifenilo (131c)



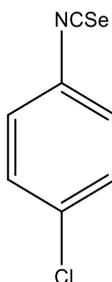
Se empleó *N*-(*p*-metoxifenil)formamida **130c** (1.8 g, 11.91 mmol), trifosgeno (1.86 g, 6.29 mmol), Et₃N (7.81 mL, 51.57 mmol), Se negro (1.87 g, 23.71 mmol). Rendimiento: 1.90 (75%).

5.2.16.4. Isoselenocianato de *p*-fluorofenilo (131d)



Se empleó la *N*-(*p*-fluorofenil)formamida **130d** (1.5 g, 10.78 mmol), trifosgeno (1.18 g, 3.98 mmol), Et₃N (4.58 mL, 32.85 mmol), Se negro (1.19 g, 15.12 mmol). Rendimiento: 1.53 g (71%).

5.2.16.5. Isoselenocianato de *p*-clorofenilo (131e)

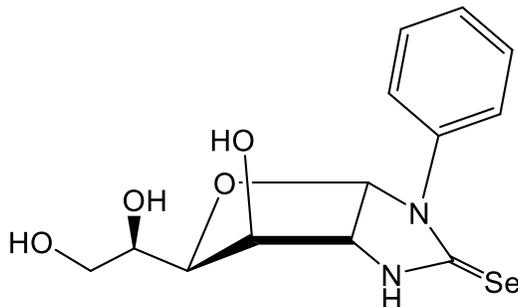


Se empleó la *N*-(*p*-clorofenil)formamida **130e** (1.4 g, 9.03 mmol), trifosgeno (0.99 g, 3.34 mmol), Et₃N (5.45 mL, 39.10 mmol). Se negro (1.41 g, 17.97 mmol). Rendimiento: 1.5 g (97%).

5.2.17. Método general para la síntesis de glucofuranoso-imidazolina-2-selonas **134**

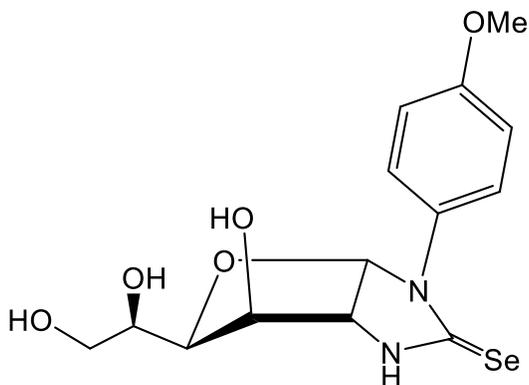
Una suspensión de clorhidrato de D-glucosamina (1.0 equiv.), el isoselenocianato **131** correspondiente (1.2 equiv.) y NaHCO₃ (1.0 equiv.) en EtOH-H₂O 2:1 (6 mL) se refluxe durante 2 h. Posteriormente se añade AcOH (0.8 mL) y se calienta a refluxo durante 1 h. La reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂-MeOH 10:1).

5.2.17.1. -Fenil-(1,2-didesoxi- α -D-glucofuranoso)[2,1-*d*] imidazolidina-2-selona (134a)



Se empleó glucosamina (100 mg, 0.46 mmol). Rendimiento: 76 mg (48%).

5.2.17.2. 1-(*p*-Metoxifenil)-(1,2-didesoxi- α -D-glucofuranoso)[2,1-*d*] imidazolidina-2-selona

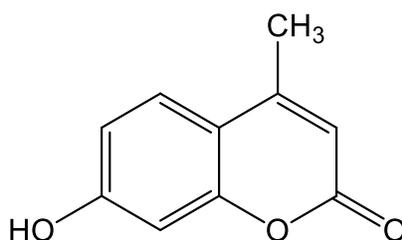


Se empleó glucosamina (100 mg, 0.46 mmol). Rendimiento: 79 mg (46%).

5.2.18. Método general para la formación de las cumarinas 144a-c

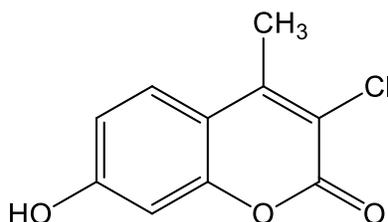
A una solución de resorcionol (1.0 g, 9.1 mmol) en 23 mL de H₂SO₄ al 60% a 0°C, se añade gota a gota el acetoacetato correspondiente (9.1 mmol). La mezcla de reacción se mantiene a t.a por 60 h. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se vierte sobre hielo y agua hasta la obtención de un precipitado. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna utilizando un sistema 6:1 Hex/AcOEt.

5.2.18.1. 7-Hidroxi-4-metilcumarina (144a)



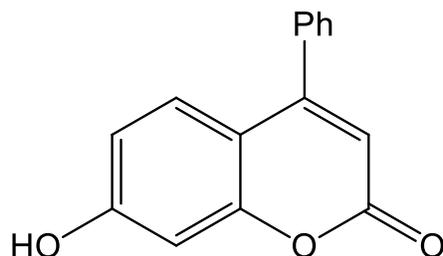
Se empleó acetoacetato de etilo (1.4 mL, 9.1 mmol). Rendimiento: 1.14 g (71%).

5.2.18.2. 3-Cloro-7-hidroxi-4-metilcumarina (144b)



Se empleó 2-cloroacetoacetato de etilo (1.3 mL, 9.1 mmol). Rendimiento: 1.60 g (84%).

5.2.18.3. 4-Fenil-7-hidroxicumarina (144c)

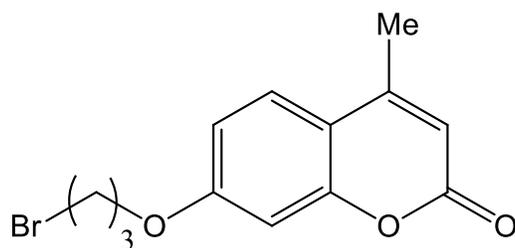


Se empleó fenilacetoacetato de etilo (1.0 mL, 9.1 mmol). Rendimiento: 1.8 g (83%).

5.2.19. Método general para la formación de los bromoalquil derivados de cumarina 145a-d

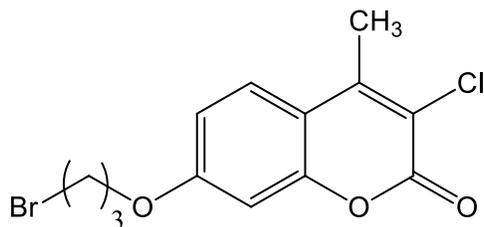
A una solución de las correspondientes cumarinas (0.500 g, 2.1 mmol) en CH₃CN anhidro (20 mL) se añade K₂CO₃ (0.579 g, 4.2 mmol) y el correspondiente α,ω -dibromoalcano (20 equiv.). La reacción se mantiene a 65 °C por 5 h. Pasado este tiempo la reacción es evaporada y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna utilizando un sistema 2:1 Hex/AcOEt.

5.2.19.1. 7-O-(3'-Bromopropil)oxi-4-metilcumarina (145a)



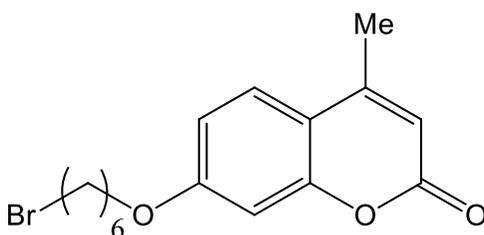
Se empleó la cumarina **144a** (0.400 g, 2.27 mmol) y 1,3 dibromopropano (4.61 mL). Rendimiento: 0.531 g (79%).

5.2.19.2. 7-*O*-(3'-Bromopropil)oxi-3-cloro-4-metilcumarina (145b)



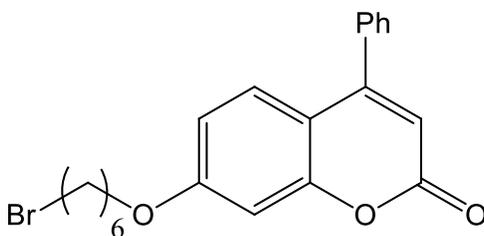
Se empleó la cumarina **144b** (0.500 g, 2.1 mmol) y 1,3 dibromopropano (4.26 mL).
Rendimiento: 0.557 g (74%).

5.2.19.3. 7-*O*-(6'-Bromohexil)oxi-4-metilcumarina (145c)



Se empleó la cumarina **144a** (0.650 g, 3.00 mmol) y 1,6 dibromohexano (9.43 mL).
Rendimiento; 1.10 g (90%).

5.2.19.4. 7-*O*-(6'-Bromohexil)oxi-4-fenilcumarina (145d)



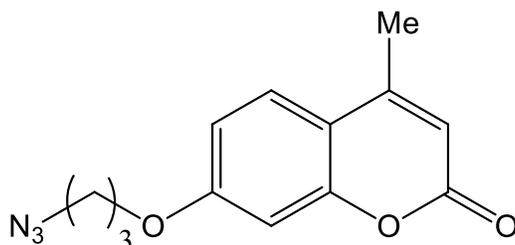
Se empleó la cumarina **144c** (0.730 g, 3.00 mmol) y 1,6 dibromohexano (9.43 mL).
Rendimiento; 1.10 g (90%).

5.2.20. Método general para la obtención de las azidas derivadas de cumarinas 146a-d

A una solución de los correspondientes derivados bromados **145** (11.09 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (20 mL) se añadió NaN₃ (10 equiv.) en agitación y bajo

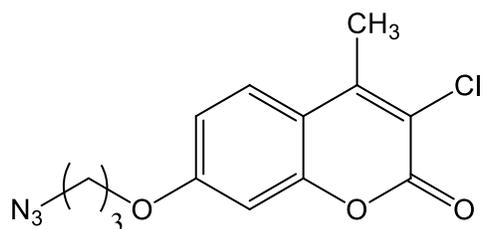
atmosfera inerte. La mezcla de reacción se calentó a 50 °C durante 5 h. Pasado este tiempo se concentró a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (7:3 Hexano-AcOEt).

5.2.20.1. 7-O-(3'-Azidopropil)oxi-4-metilcumarina (146a)



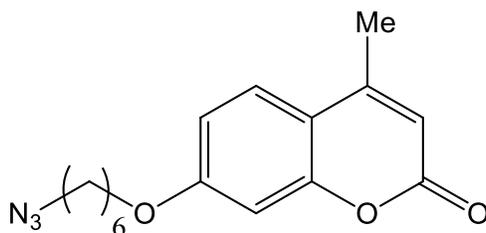
Se empleó la cumarina **145a** (1.01 g, 3.41 mmol) y NaN₃ (2.21 g). Rendimiento: 0.570 g (64%).

5.2.20.2. 7-O-(3'-Azidopropil)oxi-3-cloro-4-metilcumarina (146b)



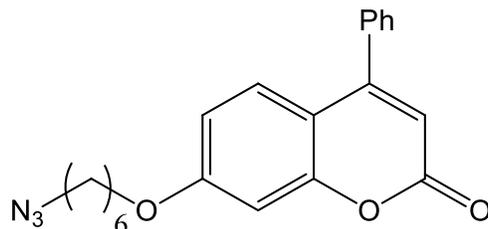
Se empleó la cumarina **145b** (0.531 g, 1.60 mmol) y NaN₃ (1.04 g). Rendimiento: 0.430 g (91%).

5.2.20.3. 7-O-(6'-Azidohexil)oxi-4-metilcumarina (146c)



Se empleó la cumarina **145c** (0.600 g, 1.77 mmol) y NaN₃ (1.15 g). Rendimiento: 0.470 g, (88%).

5.2.20.4. 7-O-(6'-Azidohexil)oxi-4-fenilcumarina (146d)

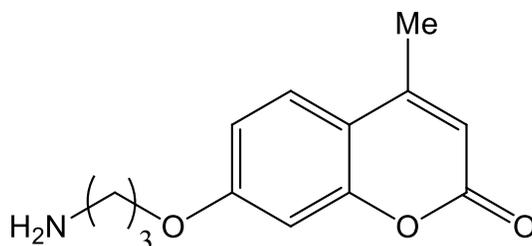


Se empleó la cumarina **145d** (0.980 g, 2.44 mmol) y NaN_3 (1.59 g). Rendimiento: 630 g (71%).

5.2.21. Método general para la obtención de las aminas 147a-d

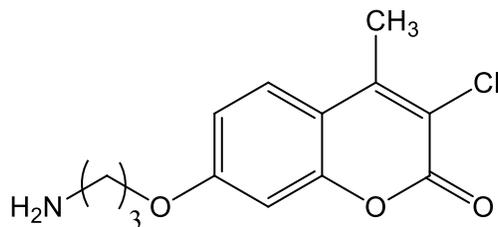
Una suspensión de la azida y Pd/C (0.2 g) en MeOH anhidro (40 mL), se hidrogena en condiciones estándar a t.a. y presión atmosférica durante 1 h. El crudo de reacción se filtra sobre Celita®, se concentra a sequedad y el residuo se utiliza directamente para la siguiente reacción, sin ninguna purificación adicional.

5.2.21.1. 7-O-(3'-Aminopropil)oxi-4-metilcumarina (147a)



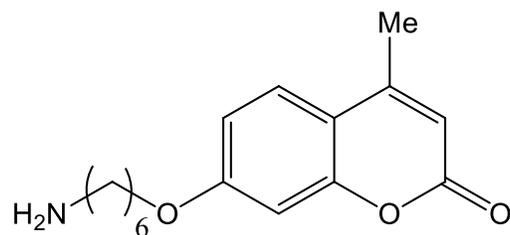
Se empleó la cumarina **146a** (0.530 g, 1.40 mmol). Rendimiento: 0.470 g (quant.)

5.2.21.2. 7-O-(3'-Aminopropil)oxi-3-cloro-4-metilcumarina (147b)



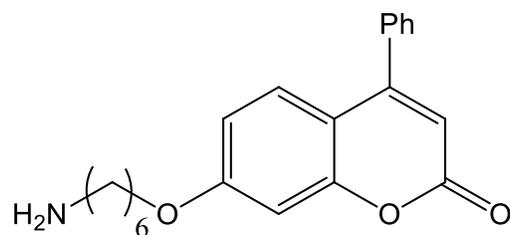
Se empleó la cumarina **146b** (0.400 g, 1.36 mmol). Rendimiento: 0.320 g (88 %).

5.2.21.3. 7-O-(6'-Aminohexil)oxi-4-metilcumarina (147c)



Se empleó la cumarina **146c** (0.460 g, 1.52 mmol). Rendimiento: 0.381 g (92 %).

5.2.20.4. 7-O-(6'-Aminohexil)oxi-4-fenilcumarina (147d)



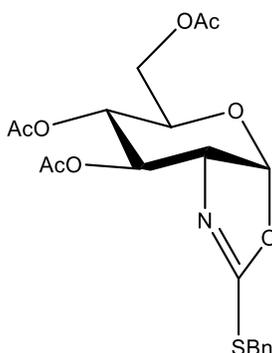
Se empleó la cumarina **146d** (0.510 g, 3.00 mmol). Rendimiento: 0.410 g (87 %).

5.3. Nuevas investigaciones

5.3.1. Método general para la obtención de 2-alquitio-1,3-oxazolinas bicíclicas (1–3)

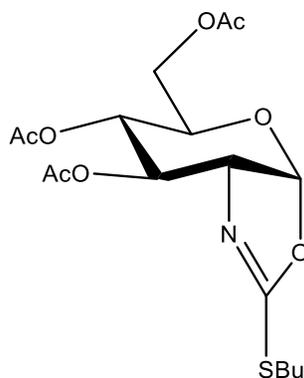
A una solución de **105** (1.0 equiv.) en CH₂Cl₂ (10 mL) se le añadió DMAP (10 mg) y Et₃N (3.0 equiv.), y posteriormente el correspondiente bromuro de alquilo (4.32 mmol, 3.0 equiv.). La reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 12 h. Pasado este tiempo el crudo de reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂–MeOH 10:1).

5.3.1.1. 2-*S*-bencil-(3',4',6'-tri-*O*-acetil-1',2'-didesoxi- α -D-glucopiranosio)[2,1-*d*]oxazolina (1)



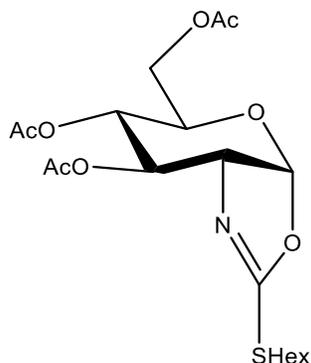
Se emplea **105** (492 mg, 1.44 mmol), BnBr (512 μ L, 4.32 mmol), Et₃N (602 μ L, 4.32 mmol). Rendimiento: 268 mg (44%); $[\alpha]_D^{21} +8$ (*c* 0.6, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.26 (m, 5H, Ar-H), 5.99 (d, 1H, $J_{1,2}=7.1$ Hz, H-1), 5.24 (t, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}=2.5$ Hz, H-3), 4.86 (dt, 1H, $J_{4,5}=9.2$ Hz, H-4), 4.20 (s, 2H, SCH₂Ph), 4.13 (ddd, 1H, H-2), 4.08 (m, 2H, H6a, H6b), 3.52 (m, 1H, $J_{5,6a}=J_{5,6b}=4.1$ Hz, H-5), 2.05, 2.02, 2.00 (3s, 3H cada uno, 3OAc) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.7, 169.6, 169.4 (3 CH₃CO), 167.5 (C=N), 136.6, 129.1, 128.8, 127.9 (Ar-C), 101.2 (C-1), 70.5 (C-3), 68.4 (C-4), 68.0 (C-5), 65.0 (C-2), 63.2 (C-6), 36.2 (SCH₂Ph), 21.1, 21.0, 20.9 (3CH₃CO) ppm; HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₀H₂₄NO₈S ([M+H]⁺): 438.1217, encontrado: 438.1212.

5.3.1.2. 2-S-butil-(3',4',6'-tri-O-acetil-1',2'-didesoxi- α -D-glucopiranosos)[2,1-d]oxazolina (2)



Se emplea **105** (0.402 mg, 1.21 mmol), bromobutano (0.40 mL, 3.63 mmol), Et₃N (506 μ L, 3.63 mmol). Rendimiento: 334 mg (41%); $[\alpha]_D^{22}$ -2 (c 0.76, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6.03 (d, 1H, $J_{1,2}$ =7.1 Hz, H-1), 5.29 (t, 1H, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ =2.3 Hz, H-3), 4.91 (m, 1H, $J_{4,5}$ =9.1 Hz, H-4), 4.17 (m, 1H, H-6a, H-6b, H-2), 3.63 (m, 1H, H-5), 3.06 (m, 1H, SCHa), 2.97 (m, 1H, SCHb), 2.11, 2.09, 2.07 (3s, 3H cada uno, 3OAc), 1.71 (m, 2H, SCH₂CH₂), 1.44 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.94 (t, 3H, $J_{H,H}$ = 7.3 Hz, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.7, 169.6, 169.3 (3 CH₃CO), 168.1 (C=N), 100.8 (C-1), 70.2 (C-3), 68.4 (C-4), 68.0 (C-5), 64.8 (C-2), 63.5 (C-6), 31.6 (SCH₂), 31.4 (SCH₂CH₂), 21.9 (CH₂CH₃), 21.1, 21.0, 20.9 (3 CH₃CO), 13.7 (CH₃) ppm; HRESI-MS m/z calc. para C₁₇H₂₆NO₈S ([M+H]⁺): 404.1374, encontrado: 404.1368.

5.3.1.3. 2-S-hexil-(3',4',6'-tri-O-acetil-1',2'-didesoxi- α -D-glucopiranosos)[2,1-d]oxazolina (3)



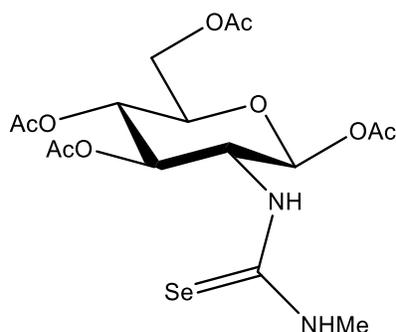
Se emplea **105** (498 mg, 1.43 mmol), bromohexano (0.60 mL, 4.29 mmol), Et₃N (598 μL, 4.29 mmol). Rendimiento: 460 mg (67%); $[\alpha]_D^{22}$ -1 (c 0.75, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6.03 (d, 1H, $J_{1,2}=7.0$ Hz, H-1), 5.30 (t, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}=2.6$ Hz, H-3), 4.92 (m, 1H, $J_{4,5}=9.1$ Hz, H-4), 4.18 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-2), 3.64 (m, 1H, H-5), 3.06 (m, 1H, SCHa), 2.96 (m, 1H, SCHb) 2.11, 2.09, 2.07 (3s, 3H cada, 3OAc), 1.78-1.67 (m, 2H, CH₂), 1.46-1.37 (m, 2H, CH₂), 1.32-1.28 (m, 4H, 2 CH₂), 0.89 (t, 3H, $J_{H,H}=7.3$ Hz, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.7, 169.6, 169.4 (3 CH₃CO), 168.1 (C=N), 100.8 (C-1), 70.3 (C-3), 68.4 (C-4), 68.0 (C-5), 64.9 (C-2), 63.4 (C-6), 31.9, 31.4, 29.3, 28.5, 22.6 (CH₂), 21.1, 20.9, 20.9 (3 CH₃CO), 14.1 (CH₃) ppm; HRESI-MS m/z calc. para C₁₉H₃₀NO₈S ([M+H]⁺): 432.1687, encontrado: 491.1681.

5.3.2. Método general para la formación de las selenoureas 4–6

A una solución del isoselenocianato **115** (150 mg, 0.34 mmol) en MeOH (5 mL) se le añadió Et₃N (145 μL, 1.04 mmol, 3.0 equiv.) y posteriormente se añade la correspondiente alquilamina (1.5 equiv.). La mezcla correspondiente se agitó en la oscuridad a t.a durante 2 h. A continuación, la reacción se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (ciclohexano → ciclohexano–AcOEt 7:3) para dar las selenoureas 4–6.

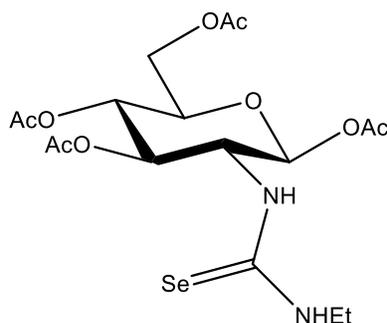
5.3.2.1. *N*-Metil-*N'*-(1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi-β-*D*-glucopiranos-2-il)selenourea

(4)



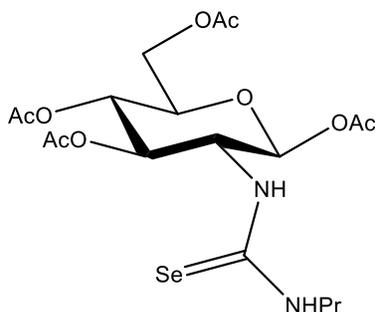
Se empleó clorhidrato de metilamina (35 mg, 0.52 mmol). Rendimiento: 155 mg, (98%). $[\alpha]_D^{27} +5$ (*c* 1.09, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6.81 σ (sa, 1H, H-1), 5.90 (sa, 1H, H-3), 5.34 (sa, 1H, H-2), 5.18 (ta, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.4$ Hz, H-4), 4.31 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.5$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, H-6a), 4.13 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 1.5$ Hz, H-6b), 3.89 (m, H-5), 3.13–2.97 (m, 3H, NHCH₃), 2.15, 2.10, 2.08, 2.05 (4s, 3H cada uno, 4OAc) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 171.5, 170.8, 169.6, 169.4 (4 CH₃CO), 92.8 (C-1), 72.9 (C-3, C-5), 67.7 (C-4), 63.2 (C-2), 61.8 (C-6), 29.8 (NHCH₃), 21.3, 21.1, 20.9, 20.7 (4CH₃CO); HRESI-MS *m/z* calc. para C₁₆H₂₄N₂NaO₉⁸⁰Se ([M+Na]⁺): 491.0539, encontrado: 491.0542.

5.3.2.2. *N*-Etil-*N'*-(1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi-β-*D*-glucopiranos-2-il)selenourea (5)



Se empleó clorhidrato de etilamina (42 mg, 0.52 mmol). Rendimiento: 144 mg (88%). $[\alpha]_D^{27} +3$ (*c* 1.15, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 6.68 (sa, 1H, H-1), 5.83 (sa, 1H, H-3), 5.31 (sa, 1H, H-2), 5.16 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.4$ Hz, H-4), 4.26 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.4$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, H-6a), 4.12 (da, 1H, H-6b), 3.87 (m, 1H, H-5), 3.64 (sa, 1H, NHCH_a), 3.22 (sa, 1H, NHCH_b), 2.13, 2.08, 2.07, 2.03 (4s, 3H cada uno, 4OAc), 1.20 (ta, 3H, $J_{H,H} = 6.6$ Hz, CH₂-CH₃); ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 171.6, 170.8, 169.6, 169.4 (4 CH₃CO), 92.8 (C-1), 73.0, 72.9 (C-3, C-5), 67.8 (C-4), 61.8 (C-6), 59.6 (C-2), 58.3 (C-2*), 43.1 (NHCH₂), 21.2, 21.0, 20.8, 20.7 (4CH₃CO), 14.2 (CH₃); HRESI-MS *m/z* calc. para C₁₇H₂₆N₂NaO₉⁸⁰Se ([M+Na]⁺): 505.0696, encontrado: 505.0691.

5.3.2.3. N-Propil-N'-(1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-desoxi-β-D-glucopiranos-2-il)selenourea (6)

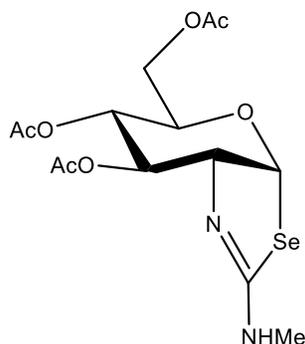


Se empleó propilamina (41.7 μ L, 0.52 mmol). Rendimiento: 92 mg (55%). $[\alpha]_D^{22} +7$ (c 1.15, CH_2Cl_2); $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 6.78 (sa, 1H, H-1), 5.79 (sa, 1H, H-3), 5.28 (m, 1H, H-2), 5.13 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.3$ Hz, H-4), 4.25 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.5$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, H-6a), 4.10 (da, 1H, H-6b), 3.86 (ddd, 1H, $J_{5,6b} = 4.4$ Hz, H-5) 3.60 (sa, 1H, NHCHa) 3.03 (SA, 1h, CHb), 2.11, 2.07, 2.06, 2.02 (4s, 3H cada uno, 4OAc), 1.59 (q, 2H, $J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, CH_2CH_3), 0.91 (t, 3H, CH_3) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 171.8, 170.8, 169.7, 169.4 (4 CH_3CO), 92.8 (C-1), 73.0, 72.9 (C-3, C-5), 67.8 (C-4), 61.8 (C-6), 61.3 (C-2), 58.5 (C-2*), 49.8 (NHCH_2), 45.3 (NHCH_2^*), 22.4 (CH_2CH_3), 21.7 (CH_2CH_3^*), 21.1, 20.9, 20.7, 20.6 (4 CH_3CO), 11.3 (CH_3) ppm; HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{NaO}_9^{80}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 519.0852, encontrado: 519.0847.

5.3.3. Método general para la formación de las 2-alkilamino-1,3-selenazolinias O-protegidas (7-9)

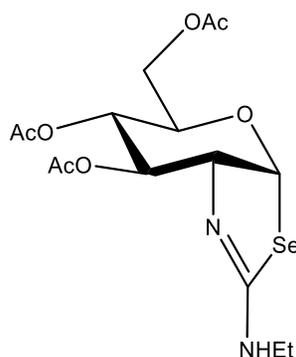
Una disolución de las selenoureas 4-6 en tolueno (15 mL), se refluó bajo atmosfera de Ar en la oscuridad durante 5 h. A continuación, se concentró a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (ciclohexano \rightarrow ciclohexano-AcOEt 7:3) obteniéndose las 2-aminoselenazolinias correspondientes 7-9.

5.3.3.1. 2-Metilamino-(3',4',6'-tri-*O*-acetil-1,2-didesoxi- α -D-glucopiranosos)[2,1-*d*]selenazolina (7).



Se empleó la selenourea **4** (100 mg, 0.21 mmol). Rendimiento: 64 mg (75%). $[\alpha]_D^{26} - 26$ (*c* 1.1, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 6.75 (d, 1H, $J_{1,2}=6.1$ Hz, H-1), 5.42 (t, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}= 5.3$ Hz, H-3), 5.00 (dd, 1H, $J_{4,5}=9.8$ Hz, H-4), 4.26 (t, 1H, H-2), 4.22 (dd, 1H, $J_{5,6a}= 5.4$ Hz, $J_{6a,6b}= 12.4$ Hz, H-6a), 4.13 (dd, 1H, $J_{5,6b}= 2.5$ Hz, H-6b), 3.98 (ddd, 1H, H-5), 2.91 (s, 3H, NHCH₃), 2.10, 2.08, 2.07 (3s, 3H cada uno, 3OAc) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 170.8, 169.9, 169.8 (3 CH₃CO), 157.9 (C=N), 92.9 (C-1), 74.9 (C-2), 73.1 (C-3), 70.3 (C-5), 69.1 (C-4), 62.8 (C-6), 31.7 (NHCH₃), 21.1, 21.0, 20.9 (3CH₃CO) ppm; HRESI-MS *m/z* calc. para C₁₄H₂₁N₂O₇⁸⁰Se ([M+H]⁺): 409.0508, encontrado: 409.0500.

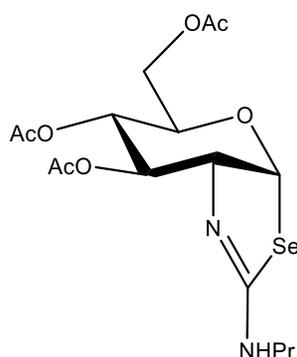
5.3.3.2. 2-Etilamino-(3',4',6'-tri-*O*-acetil-1,2-didesoxi- α -D-glucopiranosos)[2,1-*d*]selenazolina (8)



Se empleó la selenourea **5** (150 mg, 0.31 mmol). Rendimiento: 56 mg (43%). $[\alpha]_D^{24} - 11$ (*c* 1.2, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 6.71 (d, 1H, $J_{1,2}=6.1$ Hz, H-1), 5.40 (t, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}= 5.2$ Hz, H-3), 4.97 (dd, 1H, $J_{4,5}=9.8$ Hz, H-4), 4.65 (sa, 1H, NH), 4.23 (t, 1H, H-2), 4.19 (dd, 1H, $J_{5,6a}= 5.5$ Hz, $J_{6a,6b}= 12.4$ Hz, H-6a), 4.11 (dd, 1H, $J_{5,6b}= 2.6$ Hz, H-6b),

3.94 (ddd, 1H, H-5), 3.32 (m, 1H, CHa), 3.24 (m, 1H, CHb), 2.08, 2.06, 2.04 (3s, 3H cada uno, 3OAc), 1.20 (t, 3H, $J_{H,H} = 7.3$ Hz, NHCH_2CH_3); ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3): δ 170.7, 169.8, 169.8 (3 CH_3CO), 158.1 (C=N), 91.9 (C-1), 73.6 (C-2), 72.7 (C-3), 70.3 (C-5), 68.9 (C-4), 62.7 (C-6), 40.6 (NHCH_2CH_3), 21.0, 20.9, 20.8 (3 CH_3CO), 14.9 (NHCH_2CH_3) ppm; HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_7^{80}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 423.0665, encontrado: 423.0658.

5.3.3.3. 2-Propilamino-(3',4',6'-tri-*O*-acetil-1,2-didesoxi- α -D-glucopiranosio)[2,1-*d*]selenazolina (9)

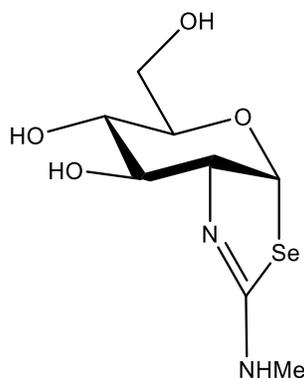


Se empleó la selenourea **6** (81 mg, 0.16 mmol). Rendimiento: 50 mg (72%). $[\alpha]_D^{25} - 13$ (c 1.0, CH_2Cl_2); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 6.70 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.1$ Hz, H-1), 5.39 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 5.0$ Hz, H-3), 4.96 (dd, 1H, $J_{4,5} = 9.8$ Hz, H-4), 4.40 (sa, 1H, NH), 4.22 (t, 1H, H-2), 4.19 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 5.3$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, H-6a), 4.10 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 2.9$ Hz, H-6b), 3.93 (ddd, 1H, H-5), 3.25 (m, 1H, NHCH_a), 3.13 (m, 1H, NHCH_b), 2.07, 2.06, 2.04 (3s, 3H cada uno, 3OAc), 1.57 (sext, 2H, $J_{H,H} = 7.3$ Hz, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.91 (t, 3H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ppm, ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3): δ 170.6, 169.7, 169.7 (3 CH_3CO), 159.9 (C=N), 91.1 (C-1), 72.4 (C-2,C-3), 70.5 (C-5), 68.6 (C-4), 62.6 (C-6), 41.4 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 22.8 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 21.0, 20.8, 20.7 (3 CH_3CO), 11.3 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ppm; HRESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_7^{80}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 437.0821, encontrado: 437.0811.

5.3.4. Método general para la desprotección de las selenazolininas 7–9

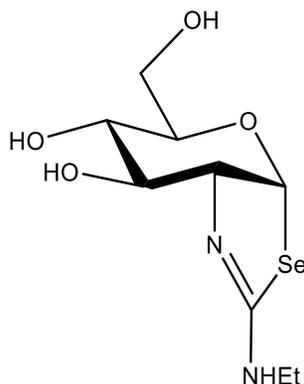
A una disolución de las 2-aminoselenazolininas 7–9 en MeOH (10 mL) a 0 °C se burbujea amoníaco; la mezcla se mantiene en la oscuridad durante 2 horas. Pasado este tiempo se concentra a sequedad y el residuo se lava con Et₂O frío, obteniéndose las 2-alquilaminoselenazolininas *O*-desprotegidas 10–12.

5.3.4.1. 2'-Metilamino-(1,2-didesoxi- α -D-glucopiranoso)[2,1-*d*]selenazolina (10)



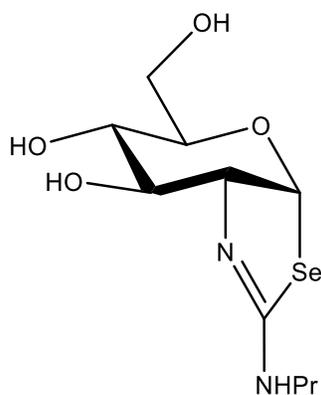
Se empleó la selenazolina 7 (33 mg, 0.081 mmol). Rendimiento: 20 mg (88%). $[\alpha]_D^{21} + 16$ (*c* 1.0, MeOH); ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 6.95 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.0$ Hz, H-1), 4.02 (dd, 1H, $J_{2,3} = 8.0$ Hz, H-2), 3.90 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 1.5$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.6$ Hz -6a), 3.89 (t, 1H, $J_{3,4} = 8.0$ Hz, H-3), 3.76-3.70 (m, 2H, H-6b, H-5), 3.48 (ta, 1H, $J_{4,5} = 8.3$ Hz, H-4), 3.03 (s, 3H, NHCH₃) ppm; ¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD) δ 170.5 (C=N), 89.9 (C-1), 79.0 (C-5), 75.5 (C-3), 68.8 (C-4), 68.3 (C-2), 62.2 (C-6), 32.0 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calc. para C₈H₁₅N₂O₄⁸⁰Se ([M+H]⁺): 283.0192, encontrado: 283.0193.

5.3.4.2. 2'-Etilamino-(1,2-didesoxi- α -D-glucopiranosio)[2,1-*d*]selenazolina (11)



Se empleó la selenazolina **8** (47.9 mg, 0.11 mmol). Rendimiento: 12.4 mg (38%). $[\alpha]_D^{21} +18$ (*c* 0.76, MeOH); $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 6.81 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.1$ Hz, H-1), 3.89 (dd, 1H, $J_{2,3} = 7.6$ Hz, H-2), 3.85 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 3.6$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.0$ Hz, H-6a) 3.84 (m, 1H, H-3), 3.71 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 6.1$ Hz, H-6b), 3.69 (m, 1H, H-5), 3.47–3.43 (m, 1H, H-4), 3.38–3.26 (m, 2H, NHCH_2), 1.20 (t, 3H, $J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 163.7 (C=N), 91.9 (C-1), 78.1 (C-5), 76.2 (C-3), 73.5 (C-2), 70.7 (C-4), 62.6 (C-6), 40.9 (NHCH_2), 14.5 (CH_3) ppm; HRESI-MS *m/z* calc. para $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4^{80}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 297.0348, encontrado: 297.0349.

5.3.4.3. 2'-Propilamino-(1,2-dideoxy- α -D-glucopiranosio)[2,1-*d*]selenazolina (12)



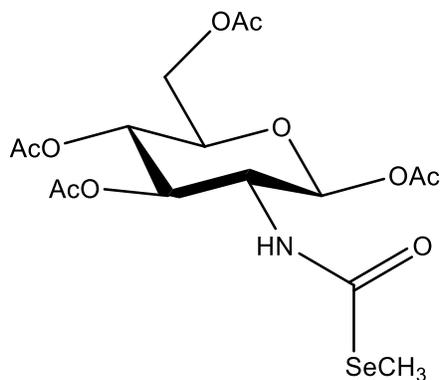
Se empleó la selenazolina **12** (15.9 mg, 0.037 mmol). Rendimiento: 5.6 mg (49%). $[\alpha]_D^{24} +21$ (*c* 0.28, MeOH); $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 6.77 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.4$ Hz, H-1), 3.87–3.80 (m, 3H, H-2, H-6a, H-3), 3.72–3.68 (m, 2H, H-6b, H-5), 3.44 (ta, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 7.5$ Hz, H-4), 3.27–3.18 (m, 2H, OCH_2), 1.59 (sext, 2H, $J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, CH_2CH_3), 0.93 (t, 3H,

CH₃) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 92.9 (C-1), 77.6 (C-4), 76.5 (C-3), 76.2 (C-2), 71.1 (C-5), 62.8 (C-6), 30.7 (NHCH₂), 23.6 (CH₂CH₃), 11.7 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calc. para C₁₀H₁₉N₂O₄⁸⁰Se ([M+H]⁺): 311.0505, encontrado: 311.0504.

5.3.5. Método general para la formación de selenocarbamatos 14–19

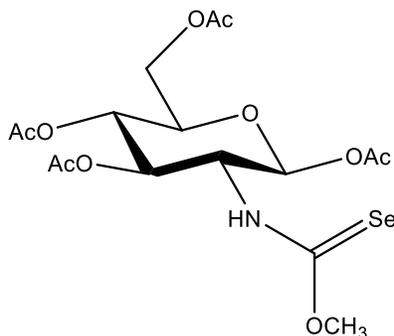
Una solución del isoselenocianato **115** en el alcohol correspondiente (15 mL) se refluxe durante 5 h en la oscuridad y bajo atmósfera inerte. A continuación, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (ciclohexano–AcOEt 7:3) obteniéndose el selenocarbamato correspondiente como un aceite.

5.3.5.1. *Se*-Metil-*N*-(1,3,4,6-Tetra-*O*-acetil-β-*D*-glucopiranos-2-il)selenocarbamato (**13**)



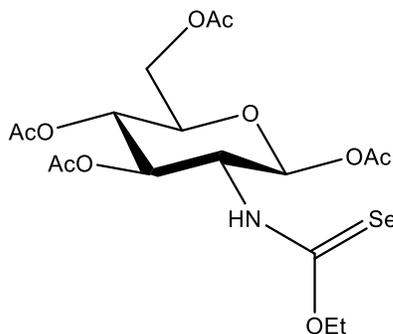
Se empleó **115** (100 mg, 0.23 mmol) y MeOH (VWR, 15 mL). Rendimiento: 98 mg (92%). $[\alpha]_D^{24} +25$ (c 1.01, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.92 (da, 1H, *J*_{NH,1}= 9.2 Hz, NH), 5.68 (d, 1H, *J*_{1,2}= 8.7 Hz, H-1), 5.19 (t, 1H, *J*_{2,3}=*J*_{3,4}= 9.4 Hz, H-3), 5.09 (t, 1H, *J*_{4,5}= 9.8 Hz, H-4), 4.27 (dd, 1H, *J*_{5,6a}= 4.6 Hz, *J*_{6a,6b}= 12.3 Hz, H-6a), 4.27 (m, 1H, H-2), 4.12 (dd, 1H, *J*_{5,6b}= 2.1 Hz, H-6b), 3.84 (ddd, 1H, H-5), 2.25 (s, 3H, SeCH₃), 2.13, 2.08, 2.07, 2.04 (4s, 3H cada uno, 4OAc) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 171.3, 170.8, 169.6, 169.5 (4 CH₃CO), 163.9 (Se-C=O), 92.4 (C-1), 73.0 (C-3), 72.4 (C-5), 68.1 (C-4), 61.8 (C-6), 54.8 (C-2), 21.0, 20.9, 20.8, 20.7 (4CH₃CO), 6.1 (SeCH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₁₆H₂₃NNaO₁₀Se: 492.0379, encontrado: 492.0374.

5.3.5.2. *O*-Metil-*N*-(1,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranos-2-il)selenocarbamato (14)



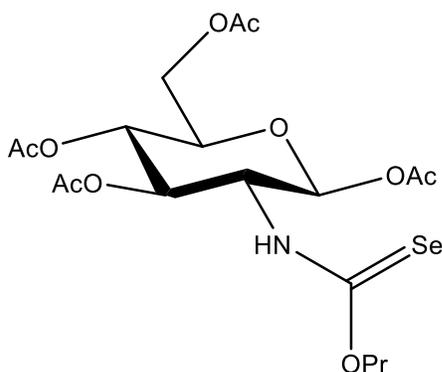
Se empleó **115** (100 mg, 0.23 mmol) y MeOH (Química Rique, 15 mL). Rendimiento: 98 mg (92%). Se observan dos isómeros en proporción 1*:1.6. $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.06 (sa, 1H, NH), 7.07 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 10.0$ Hz, NH*), 5.80 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.8$ Hz, H-1*), 5.72 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.7$ Hz, H-1), 5.30 (m, 2H, H-3, H-3*), 5.17 (t, 1H, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, H-4*), 5.12 (qa, 1H, $J_{2,\text{NH}} = J_{2,3} = 9.4$ Hz, H-2*), 5.04 (t, 1H, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, H-4), 4.26 (m, 3H, H-2, H-6a, H-6a*), 4.16 (s, 3H, OMe), 4.12 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 1.3$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.6$ Hz, H-6b*), 4.07 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 2.0$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.6$ Hz, H-6b), 4.05 (s, 3H, OMe*), 3.89–3.85 (m, 2H, H-5, H-5*), 2.13, 2.12, 2.10, 2.08, 2.06, 2.05, 2.04, 2.04 (8s, 3H cada uno, 4OAc, 4OAc*) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, CDCl_3): δ 198.2 (CSe*), 195.3 (CSe), 171.5, 170.9 (CO*), 170.8, 170.7 (CO), 169.9 (CO*), 169.7 (CO), 169.4 (CO*), 169.2 (CO), 92.3 (C-1*), 91.6 (C-1), 73.1 (C-3*), 72.9 (C-3), 72.5 (C-5*), 71.7 (C-5), 67.8 (C-4), 67.7 (C-4*), 62.1, 61.7, 61.6, 60.9 (C-2, C-2*, C-6, C-6*), 59.9 (OMe*), 56.4 (OMe), 21.2, 21.0, 20.9, 20.9, 20.9, 20.8, 20.7 (4CH₃CO, 4CH₃CO*) ppm; HRESI-MS m/z calcd. para C₁₆H₂₃NNaO₁₀Se: 492.0379, encontrado: 492.0370.

5.3.5.3. *O*-Etil-*N*-(1,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranos-2-il)selenocarbamato (15)



Se empleó **115** (200 mg, 0.56 mmol) y EtOH (15 mL). Rendimiento: 134.7 mg (60%). $[\alpha]_D^{24} +12$ (*c* 0.34, CH₂Cl₂). Se observan tres isómeros en proporción 0.48: 1*:1.8. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 2 isómeros mayoritarios): δ 7.59 (d, 1H, *J*_{NH,2}= 9.5 Hz, NH), 6.88 (d, 1H, *J*_{NH,2}= 9.2 Hz, NH*), 5.78 (d, 1H, *J*_{1,2}= 8.8 Hz, H-1*), 5.71 (d, 1H, *J*_{1,2}= 8.7 Hz, H-1), 5.24 (m, 2H, H-3, H-3*), 5.17 (m, 1H, H-2*), 5.10 (t, 1H, *J*_{3,4}= 9.8 Hz, H-4*), 5.07 (t, 1H, *J*_{3,4}= 9.8 Hz, H-4), 4.61 (m, 2H, CH₂), 4.58 (m, 2H, CH₂*), 4.31 (dd, 1H, *J*_{5,6}= 4.7 Hz, *J*_{6a,6b}= 12.6 Hz, H-6a), 4.28-4.22 (m, 2H, H-2, H-6a*), 4.14 (dd, 1H, *J*_{5,6b}= 2.4 H, *J*_{6a,6b}= 13.4 Hz, H-6b*), 4.09 (dd, 1H, *J*_{5,6b}= 2.0 Hz, H-6b), 3.88-3.82 (m, 2H, H-5, H-5*), 2.13, 2.12, 2.20, 2.07, 2.06, 2.05, 2.04, 2.03 (OAc, OAc*), 1.43 (t, 1H, *J*_{H,H}= 6.9 Hz, CH₃), 1.32 (t, 1H, *J*_{H,H}= 7.1 Hz, CH₃*) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 197.0, 194.0 (CSe, CSe*). 171.4, 171.2, 170.8, 170.7, 170.6, 169.7, 169.6, 169.5, 169.3, 169.0 (CO, CO*), 92.4 (C-1*), 91.6 (C-1), 73.1, 73.0 (C-5, C-5*), 72.5, 72.4 (CH₂, C-3*), 71.7 (C-3), 70.5 (CH₂*), 67.9, 67.7 (C-4, C-4*), 61.8, 61.6 (C-6, C-6*), 59.6 (C-2*), 56.2 (C-2), 21.2, 21.0, 20.8, 20.7 (OAc, OAc*), 14.4 (CH₃), 14.2 (CH₃*) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₁₇H₂₅NNaO₁₀Se: 506.0536, encontrado: 506.0535.

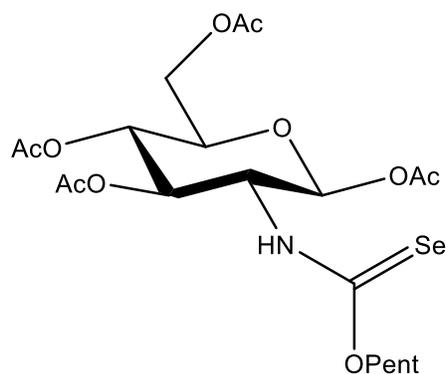
5.3.5.4. *O*-Propil-*N*-(1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-*D*-glucopiranos-2-il)selenocarbamato (**16**)



Se empleó **115** (300 mg, 0.69 mmol) y PrOH (20 mL). Rendimiento: 308.2 mg (90%). $[\alpha]_D^{24} +11$ (*c* 0.93, CH₂Cl₂). Se observan varios isómeros, con señales complejas. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, isómero mayoritario): δ 5.6.9 (da, 1H, *J*_{1,2}= 7.7 Hz, H-1), 5.20-5.08 (m, 2H, H-3, H-4), 4.28 (m, 2H, H-2, H-6a), 4.12 (dd, 1H, *J*_{5,6b}= 2.0 H, *J*_{6a,6b}= 12.1 Hz, H-6b), 3.80 (ddd, 1H, *J*_{4,5}= 9.7 Hz, H-5), 2.17, 2.13, 2.09, 2.05, 0.97 (t, 3H, *J*_{H,H}= 7.0 Hz, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 170.6, 169.4 (CO), 92.4 (C-1), 73.1 (C-3), 72.9, 72.5, 72.3,

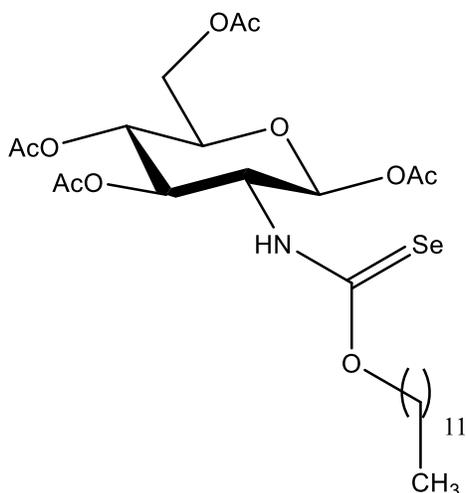
67.8 (C-4), 61.8, 61.7 (C-2, C-6), 29.8 (CH₂), 20.7, 20.8, 20.7 (OAc), 14.3 (CH₃) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₁₈H₂₇NNaO₁₀Se: 520.0692, encontrado: 520.0683.

5.3.5.5. *O*-Pentil-*N*-(1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-*D*-glucopiranos-2-il)selenocarbamato (17)



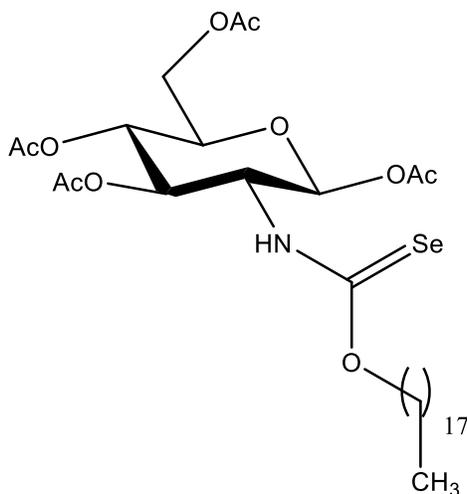
Se empleó **115** (63.7 mg, 0.15 mmol) y pentan-1-ol (5 mL). Rendimiento: 72.0 mg (90%). [α]_D²⁴ +9 (*c* 1.07, CH₂Cl₂). Se observan dos isómeros en proporción 1*:1.99. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, 2 isómeros mayoritarios): δ 7.84 (d, 1H, *J*_{NH,2}= 9.9 Hz, NH), 7.07 (d, 1H, *J*_{NH,2}= 9.4 Hz, NH*), 5.78 (d, 1H, *J*_{1,2}= 8.0 Hz, H-1*), 5.72 (d, 1H, *J*_{1,2}= 8.7 Hz, H-1), 5.30-5.14 (m, 3H, H-3, H-3*, H-2*), 5.04, (t, 1H, *J*_{3,4}= 9.7 Hz, H-4), 4.65-4.48 (m, 2H, CH₂, CH₂*), 4.29 (dd, 1H, *J*_{5,6}= 4.3 Hz, *J*_{6a,6b}= 12.4 Hz, H-6a), 4.24 (m, 2H, H-2, H-6a*), 4.09 (m, 2H, H-6b, H-6b*), 3.86 (m, 2H, H-5, H-5*), 1.79 (m, 2H, CH₂), 1.67 (m, 2H, CH₂*), 1.38-1.25 (m, 4H, 2CH₂, 2CH₂*), 0.89 (m, 3H, CH₃, CH₃*) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 197.1 (CSe*), 193.9 (CSe), 171.4, 170.8, 170.7, 170.6, 169.7, 169.3, 169.1 (CO, CO*), 92.3 (C-1*), 91.6 (C-1), 76.4, 74.5*, 73.0, 72.9, 72.4, 71.7, 68.0, 67.7, 61.8*, 61.6, 59.5 (C-2*), 56.1 (C-2), 28.3, 28.0, 27.8*, 27.0* (2CH₂, 2CH₂*), 22.3, 21.0, 20.8, 20.7 (OAc, OAc*), 14.0 (CH₃, CH₃*) ppm; HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₀H₃₁NNaO₁₀Se: 548.1005, encontrado: 548.0995.

5.3.5.5. *O*-Dodecil-*N*-(1,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranos-2-il)selenocarbamato (18)



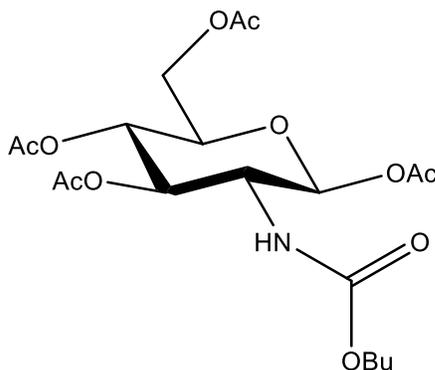
Se empleó **115** (50 mg, 0.11 mmol) y dodecan-1-ol (205 mg, 1.1 mmol, 10. equiv.) disueltos en THF (5 mL). Rendimiento: 36.3 mg (53%). Se observan dos isómeros en proporción 1*:2.3. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.54 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 8.9$ Hz, NH), 6.78 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 10.9$ Hz, NH*), 5.72 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, H-1*), 5.64 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.9$ Hz, H-1), 5.22-5.12 (m, 3H, H-3, H-3*, H-2*), 5.01, (t, 1H, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-4), 4.60-4.44 (m, 2H, CH₂, CH₂*), 4.29-4.00 (m, 5H, H-2, H-6a, H-6a*, H-6b, H-6b*), 3.79 (m, 2H, H-5, H-5*), 2.06, 2.05, 2.04, 1.99, 1.98, 1.96, 1.95 (OAc, OAc*), 1.74-1.19 (m, 20H, CH₂, CH₂*), 0.81 (t, 3H, $J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, CH₃, CH₃*) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 197.7 (CSe*), 194.1 (CSe), 171.3, 170.8, 170.7, 169.7, 169.3, 169.0, 168.8 (CO, CO*), 92.4 (C-1*), 9.17 (C-1), 74.7*, 73.0, 72.4, 67.9, 61.7, 59.6, 56.3, 30.0, 29.8, 29.7, 29.5, 25.9 (CH₂), 22.0, 21.1, 20.9, 20.8, 20.7 (OAc, OAc*), 14.2 (CH₃, CH₃*) ppm.

5.3.5.7. *O*-Octadecil-*N*-(1,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranos-2-il)selenocarbamato (19)



Se empleó **115** (60.2 mg, 0.14 mmol) y octadecan-1-ol (373 mg, 1.4 mmol, 10. equiv.) disueltos en THF (5 mL). Rendimiento: 41.6 mg (42%). Se observan dos isómeros en proporción 1*:1.71. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.47 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 9.9$ Hz, NH), 6.75 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 9.2$ Hz, NH^*), 5.77 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.1$ Hz, H-1*), 5.69 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, H-1), 5.26-5.17 (m, 3H, H-3, H-3*, H-2*), 5.07, (t, 1H, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, H-4), 4.64-4.50 (m, 2H, CH_2 , CH_2^*), 4.34-4.07 (m, 5H, H-2, H-6a, H-6a*, H-6b, H-6b*), 3.84 (m, 2H, H-5, H-5*), 2.16, 2.12, 2.11, 2.10, 2.08, 2.05, 2.04 (OAc, OAc*), 1.83-1.64 (m, 4H, CH_2 , CH_2^*), 1.25 (m, 28 H, CH_2 , CH_2^*), 0.87 (m, 3H, CH_3 , CH_3^*) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ 197.2 (CSe*), 194.2 (CSe), 171.2, 170.8, 170.7, 170.5, 169.8, 169.7, 169.6, 169.0 (CO, CO*), 92.4 (C-1*), 9.17 (C-1), 74.7*, 73.2, 73.0, 72.5, 71.7, 67.9, 67.6, 61.7, 59.0, 56.3, 32.0, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.7, 25.9 (CH_2), 22.8, 20.9, 20.8, 20.7 (OAc, OAc*), 14.2 (CH_3 , CH_3^*) ppm.

5.3.5.8. *O*-Butil-*N*-(1,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranos-2-il)carbamato (20)

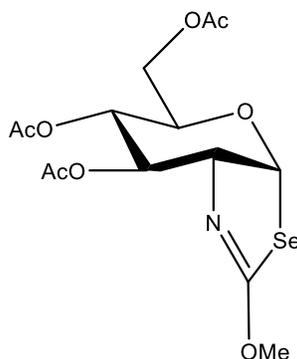


Se empleó **115** (90 mg, 0.21 mmol) y BuOH (15 mL). Rendimiento: 79 mg (74%).
[α]_D²⁴ +18 (c 1.08, CH₂Cl₂). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.69 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7.8 Hz, H-1), 5.17 (t, 1H; $J_{3,4}$ = 8.8 Hz, H-3), 5.07 (t, 1H, $J_{4,5}$ = 9.7 Hz, H-4), 4.94 (d, 1H, $J_{2,NH}$ = 8.8 Hz, NH), 4.26 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ = 4.4 Hz, $J_{5,6b}$ = 12.5 Hz, H-6a), 4.08 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ = 1.9 Hz, H-6b), 4.02 (m, 2H, CH₂), 3.90 (m, 1H, H-2), 3.80 (ddd, 1H, H-5), 2.09, 2.05, 2.01, 2.00 (4s, 3H cada uno, 4OAc), 1.53 (m, 2H, CH₂), 1.31 (m, 2H, CH₂), 0.8 (t, 3H, $J_{H,H}$ = 7.4 Hz, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 170.9, 170.7, 169.4 (CO), 156.1 (CO-NH), 92.7 (C-1), 72.8 (C-5), 72.5 (C-3), 68.1 (C-4), 65.3 (CH₂), 61.8 (C-6), 54.9 (C-2), 31.0, 20.9, 20.8, 31.0, 20.9, 2p.8, 20.7, 20.0, 19.0 (OAc, CH₂), 13.7 (CH₃) ppm.

5.3.6. Método general para la formación de las 2-alcoxi-1,3-selenazolininas *O*-protegidas 21–23

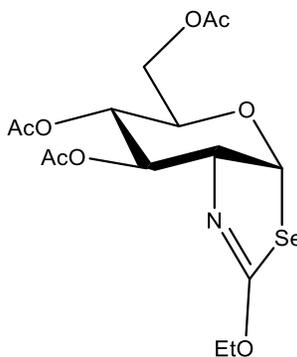
A una disolución de los selenocarbamatos correspondientes **15–17** en tolueno (15mL) se añade ácido acético (2.0 equiv.); la reacción se mantiene a reflujo durante 7h en la obscuridad. A continuación, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (ciclohexano \rightarrow ciclohexano/ AcOEt 7:3) obteniéndose las 2-alcoxi-1,3-selenazolininas **21–23** como un aceite.

5.3.6.1. 2-Metoxi-(3,4,6-tri-*O*-acetil-1,2didesoxi- α -D-glucopiranosos)[2,1-*d*]selenazolina (21)



Se empleó el selenocarbamato **15** (77.7 mg, 0.19 mmol). Rendimiento: 42 mg (53%). $[\alpha]_D^{23}$ -25 (*c* 1.05, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6.76 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 6.2 Hz, H-1), 5.39 (t, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}$ = 5.0 Hz, H-3), 4.98 (dd, 1H, $J_{4,5}$ =9.6 Hz, H-4), 4.23 (t, 1H, H-2), 4.22 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ = 5.4 Hz, $J_{6a,6b}$ = 12.3 Hz, H-6a), 4.13 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ = 2.6 Hz, H-6b), 3.95 (ddd, 1H, H-5), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 2.09, 2.07, 2.05 (3s, 3H c/u, 3OAc) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): σ 170.7, 169.7 (x2) (3 CH₃CO), 164.1 (C=N), 92.8 (C-1), 72.5, 72.4 (C-2, C-3), 70.3 (C-5), 68.7 (C-4), 62.7 (C-6), 57.9 (OCH₃), 21.0, 20.8, 20.7 (3CH₃CO) ppm; HRESI-MS *m/z* calc. para C₁₄H₁₉O₈NNaSe ([M+H]⁺): 432.0168, encontrado: 432.0162.

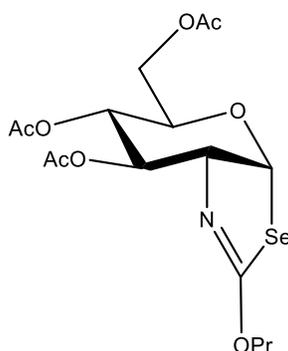
5.3.6.2. 2-Etoxi-(3,4,6-tri-*O*-acetil-1,2didesoxi- α -D-glucopiranosos)[2,1-*d*]selenazolina (22)



Se empleó el selenocarbamato **16** (73.7 mg, 0.15 mmol). Rendimiento: 34.5 mg (54%). $[\alpha]_D^{24}$ -14 (*c* 1.09, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6.74 (sa, 1H, H-1), 5.40 (sa, 1H, H-3),

4.99 (dd, 1H, $J_{3,4}=4.2$ Hz, $J_{4,5}=9.5$ Hz, H-4), 4.39-4.29 (m, 2H, OCH₂), 4.24-4.11 (m, 3H, H-2, H-6a, H-6b), 3.94 (ddd, 1H, $J_{4,5}=9.0$ Hz, $J_{5,6a}=2.4$ Hz, $J_{5,6b}=5.9$ Hz), 2.10, 2.07, 2.05 (3s, 3H c/u, 3OAc), 1.34 (t, 1H, $J_{H,H}=6.9$ Hz) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.7, 169.7 (x2) (3 CH₃CO), 163.5 (C=N), 92.5 (C-1), 72.6, 72.3(C-2, C-3), 70.2 (C-5), 68.9 (C-4), 67.5 (OCH₂), 62.8 (C-6), 21.1, 20.9 (x2) (3CH₃CO), 14.4 (OCH₂CH₃) ppm; HRESI-MS m/z calc. para C₁₅H₂₁NNaO₈⁸⁰Se ([M]⁺): 446.0325, encontrado: 446.0314.

5.3.6.3. 2-Propoxi-(3,4,6-tri-*O*-acetil-1,2didesoxi- α -D-glucopiranosos)[2,1-*d*]selenazolina (23)

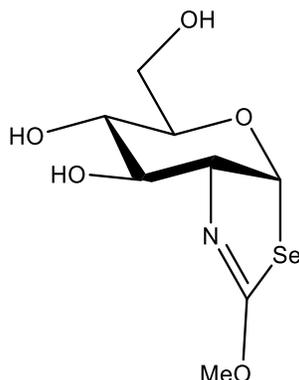


Se empleó el selenocarbamato **17** (83.0 mg, 0.17 mmol). Rendimiento: 26.7 mg (37%). $[\alpha]_D^{24} -15$ (c 1.08, CH₂Cl₂); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.71 (d, 1H, $J_{1,2}=6.4$ Hz, H-1), 5.36 (t, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}=5.0$ Hz, H-3), 4.96 (dd, 1H, $J_{4,5}=9.7$ Hz, H-4), 4.25-4.09 (m, 5H, H-2, H-6a, H-6b, OCH₂CH₂CH₃), 3.91 (ddd, 1H, $J_{5,6a}=5.5$ Hz, $J_{5,6b}=2.5$ Hz, H-5), 2.07, 2.05, 2.03 (3s, 3H each, 3OAc), 1.71 (sext, 2H, $J_{H,H}=7.4$ Hz, OCH₂CH₂CH₃), 0.92 (t, 3H, OCH₂CH₂CH₃) ppm; ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃) δ 170.6, 169.6 (x2) (3 CH₃CO), 163.5 (C=N), 92.3 (C-1), 72.9 (C-2), 72.5 (OCH₂CH₂CH₃), 72.3 (C-3), 70.1 (C-5), 68.8 (C-4), 62.8 (C-6), 22.0 (OCH₂CH₂CH₃), 21.0, 20.8 (x2) (3CH₃CO), 10.3 (OCH₂CH₂CH₃) ppm; HRESI-MS m/z calc. para C₁₆H₂₄NO₈Se ([M+H]⁺): 438.0662, encontrado: 438.0654.

5.3.7. Método general para la desprotección de 2-alcoxi-1,3-selenazolininas 24-26

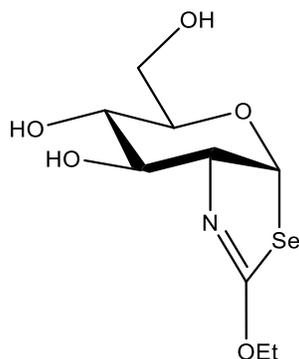
A una disolución de las 2-alcoxi-1,3-selenazolininas en MeOH (10 mL) se burbujea amoníaco a 0 °C durante 5 minutos; a continuación, la mezcla se mantuvo en la oscuridad durante 2 horas. Pasado este tiempo se concentra a sequedad y el residuo es lavado con Et₂O frío para obtener así las 2-alcoxi-1,3-selenazolininas desprotegidas correspondientes.

5.3.7.1. 2-Metoxi-(1,2-didesoxi- α -D-glucopiranosos)[2,1-*d*]selenazolina



Se empleó la selenazolina **21** (56.8 mg, 0.14 mmol). Rendimiento: 37.6 mg (95%). $[\alpha]_D^{23} +74$ (*c* 0.53, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 6.90 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.1$ Hz, H-1), 3.92 (dd, 1H, $J_{2,3} = 7.6$ Hz, H-2), 3.91 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.85 (dda, 1H, $J_{5,6a} = 2.1$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.9$ Hz, H-6a), 3.81 (ta, 1H, $J_{3,4} = 7.5$ Hz, H-3), 3.70 (m, 2H, H-6b, H-5), 3.46 (dd, 1H, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, H-4) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CD_3OD) δ 166.1 (C=N), 95.5 (C-1), 77.8 (C-5), 76.4, 76.3 (C-3, C-2), 70.7 (C-4), 62.6 (C-6), 57.8 (OCH_3) ppm; HRESI-MS *m/z* calc. para $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}_5^{80}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 284.0032, encontrado: 284.0032.

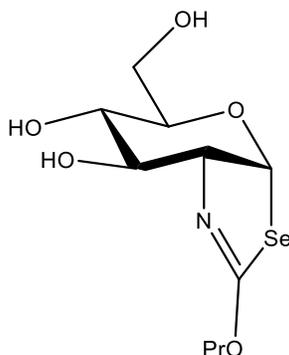
5.3.7.2. 2-Etoxi-(1,2-didesoxi- α -D-glucopiranosos)[2,1-*d*]selenazolina (**25**)



Se empleó la selenazolina **22** (17.5 mg, 0.041 mmol). Rendimiento: 11.7 mg (96%). $[\alpha]_D^{23} +110$ (*c* 1.17, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 6.89 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.2$ Hz, H-1), 4.36 (m, 1H, OCH_a), 4.30 (m, 1H, OCH_b), 3.90 (dda, 1H, $J_{2,3} = 7.4$ Hz, H-2), 3.85 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 1.7$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.9$ Hz, H-6a), 3.81 (t, 1H, $J_{3,4} = 7.3$ Hz, H-3), 3.73–3.66 (m, 2H, H-6b, H-5), 3.46 (dda, 1H, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, H-4), 1.32 (t, 3H, $J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, CH_2CH_3) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CD_3OD) δ 165.3 (C=N), 95.1 (C-1), 77.7 (C-5), 76.4 (x2) (C-3, C-2),

70.8 (C-4), 67.6 (C-6), 62.7 (OCH₂), 14.6 (CH₃) ppm; HRESI-MS m/z calc. para C₉H₁₆NO₅⁸⁰Se ([M+H]⁺): 298.0188, encontrado: 298.0186.

5.3.7.3. 2'Propoxi-(1,2-didesoxi- α -D-glucopiranosos)[2,1-*d*]selenazolina (26)

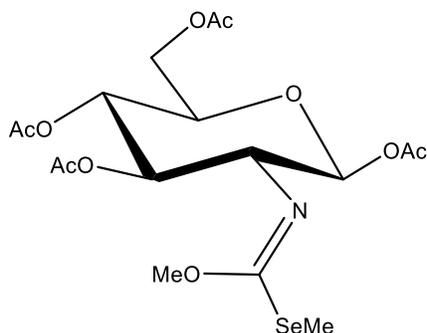


Se empleó la selenazolina **23** (57.9 mg, 0.13 mmol). Rendimiento: 38.5 (95%). $[\alpha]_D^{22} +74$ (c 1.08, MeOH); ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 6.89 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.0$ Hz, H-1), 4.28 (m, 1H, OCHa), 4.20 (m, 1H, OCHb), 3.91 (dda, 1H, $J_{2,3} = 7.4$ Hz, H-2), 3.85 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 1.5$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.3$ Hz, H-6a), 3.81 (t, 1H, $J_{3,4} = 7.4$ Hz, H-3), 3.71 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 5.9$ Hz, H-6b), 3.68 (m, 1H, H-5), 3.49–3.43 (m, 1H, H-4), 1.72 (sext, 2H, $J_{H,H} = 7.4$ Hz CH₂CH₃), 0.97 (t, 3H, CH₂CH₃) ppm; ¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 165.6 (C=N), 95.2 (C-1), 77.7 (C-5), 76.4, 76.3 (C-3, C-2), 73.3 (C-4), 70.8 (C-6), 62.7 (OCH₂), 23.2 (CH₂CH₃), 10.6 (CH₂CH₃) ppm; HRESI-MS m/z calc. para C₁₀H₁₈NO₅⁸⁰Se ([M+H]⁺): 312.0345, encontrado: 312.0346.

5.3.8. Método general para la obtención de los *O*-alquil-*Se*-metil isoselenocarbamatos 27-29

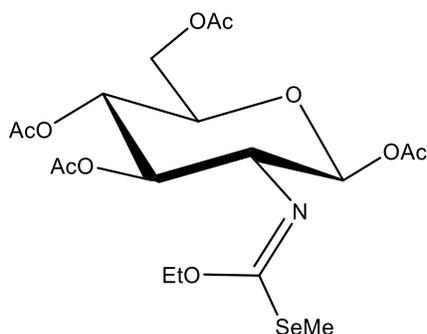
A una solución de los selenocarbamatos **14,15,17** en diclorometano (10 mL) se añade yoduro de metilo (3.0 equiv.) y trietilamina (3.0 equiv.); la reacción se mantiene a reflujo durante 1 h en la oscuridad. A continuación, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂/MeOH 10:1).

5.3.8.1. O-Metil-Se-metil-N-(1,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranos-2-il)selenocarbamato (27)



Se empleó el selenocarbamato **14** (25 mg, 0.053 mmol). Rendimiento: 19 mg (75%). $[\alpha]_D^{28}$ -27 (*c* 0.24, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.71 (d, 1H, *J*_{1,2}=8.1 Hz, H-1), 5.24 (t, 1H, *J*_{2,3} *J*_{3,4}=9.5 Hz, H-3), 5.10 (1H, *J*_{4,5}=9.8 Hz, H-4), 4.33 (dd, 1H, *J*_{6a,5}= 9.55 Hz, *J*_{6a,6b}=12.4 Hz, H-6a), 4.09 (dd, 1H, *J*_{6b,5}=1.3 Hz, H-6b), 3.87 (dddd, 1H, H-5), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.51 (t, 1H, H-2), 2.28 (s, 3H, SeCH₃), 2.10, 2.09, 2.02, 2.01 (4s, 3H each, 4OAc) ppm; ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃): δ 170.9, 170.1, 169.9, 169.1 (4 CH₃CO), 157.6 (C=N), 93.8, (C-1), 74.4 (C-3), 72.9 (C-5), 68.1 (C-4), 64.7 (C-2), 61.9 (C-6), 56.6 (OCH₃), 21.2, 21.0, 20.9, 20.8 (4CH₃CO), 5.9 (SeCH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₁₇H₂₅NNaO₁₀⁸⁰Se ([M+Na]⁺): 506.0536, encontrado: 506.0532.

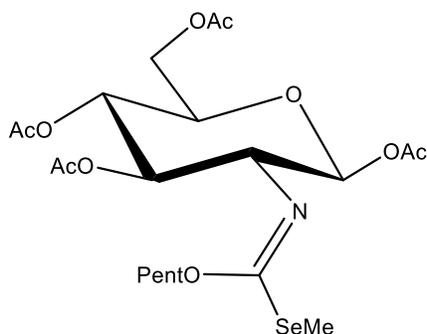
5.3.8.2. O-Etil-Se-metil-N-(1,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranos-2-il)selenocarbamato (28)



Se empleó el selenocarbamato **15** (35 mg, 0.072 mmol). Rendimiento: 32 (89 $[\alpha]_D^{28}$ -19 (*c* 0.66, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.70 (d, 1H, *J*_{1,2}=8.1 Hz, H-1), 5.22 (t, 1H, *J*_{2,3}= *J*_{3,4}= 9.5 Hz, H-3), 5.09 (t, 1H, *J*_{4,5}=9.8 Hz, H-4), 4.32 (dd, 1H, , *J*_{5,6a}= 4.5 Hz,

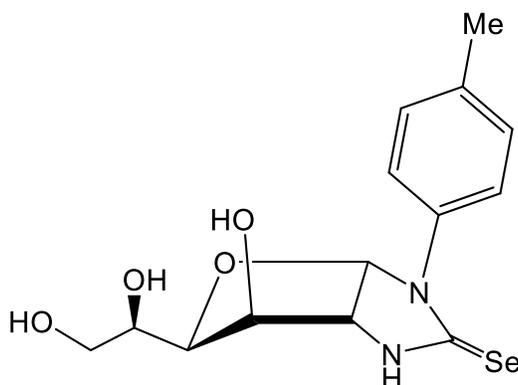
$J_{6a,6b}=12.5$ Hz, H-6a), 4.14 (q, 2H, $J_{H,H}= 7.0$ Hz, OCH_2CH_3), 4.08 (dda, 1H, H-6b), 3.85 (dddd, 1H, H-5), 3.50 (t, 1H, H-2), 2.26 (s, 3H, $SeCH_3$), 2.09, 2.08, 2.01, 2.00 (4s, 3H each, 4OAc), 1.20 (t, 3H, OCH_2CH_3) ppm; ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$): δ 170.8, 170.1, 169.9, 169.1 (4 CH_3CO), 156.9 (C=N), 93.8 (C-1), 74.3 (C-3), 72.9 (C-5), 68.1 (C-4), 65.3 (OCH_2CH_3), 64.8 (C-2), 62.0 (C-6), 21.2, 21.0, 20.9, 20.8 (4 CH_3CO), 14.1 (OCH_2CH_3), 5.9 ($SeCH_3$) ppm. HRESI-MS m/z calc. para $C_{18}H_{28}NO_{10}^{80}Se$ ($[M+H]^+$): 498.0873, encontrado: 498.0873

5.3.8.3. *Se-Metil-O-pentil-N-(1,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranos-2-il)selenocarbamato (29)*



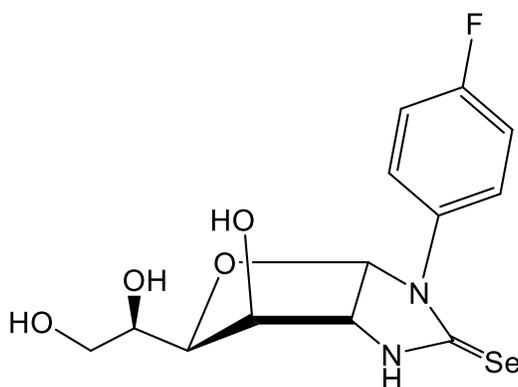
Se empleó el selenocarbamato **17** (32 mg, 0.061 mmol). Rendimiento: 24 mg (74%); $[\alpha]_D^{28}$ -14 (c 0.24, CH_2Cl_2); 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$): δ 5.70 (d, 1H, $J_{1,2}=8.1$ Hz, H-1), 5.22 (t, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}= 9.5$ Hz, H-3), 5.09 (t, 1H, $J_{4,5}=9.8$ Hz, H-4), 4.33 (dd, 1H, $J_{5,6a}= 4.6$ Hz, $J_{6a,6b}=12.4$ Hz, H-6a), 4.09 (m, 3H, H-6b, OCH_2-), 4.0 (m, 0.3H, OCH_2^*), 3.92 (m, 0.3H, $OCH_2-CH_2^*$) 3.85 (m, 1H, H-5), 3.50 (t, 1H, H-2), 2.28 (2s, 3H, $SeCH_3$), 2.09, 2.08, 2.01, 2.00 (4s, 3H each, 4OAc), 1.75 (sext, 0.33, CH_2^*) 1.60 (m, 2H, $-CH_2-$), 1.38 (m, 0.3H, CH_2^*) 1.31 (m, 2H, $-CH_2-$), 1.17 (m, 0.3 H, CH_2^*) 0.88 (m, 3H, $-CH_3$) ppm; ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$): δ 170.9, 170.0, 169.9, 169.1 (4 CH_3CO), 157.1 (C=N*), 156.9 (C=N), 93.8 (C-1), 74.3 (C-3), 73.7 (CH_2^*) 72.9 (C-5), 69.4 (OCH_2), 68.1 (C-4), 64.8 (C-2), 62.0 (C-6), 34.2 ($-CH_2^*$), 28.2, 28.1 ($-CH_2$), 26.08 ($-CH_2^*$), 22.4 ($-CH_2$), 21.1, 21.0, 20.9, 20.8 (4 CH_3CO), 16.5 (**), 14.1 (CH_3), 11.3 (**), 5.9 ($SeCH_3$), 5.8 ($SeCH_3^*$) ppm. HRESI-MS m/z calc. para $C_{21}H_{34}NO_{10}^{80}Se$ ($[M+H]^+$): 540.1342, encontrado: 540.1334.

5.3.9. 1-(*p*-Metilfenil)-(1,2-didesoxi- α -D-glucofuranoso)[2,1-*d*] imidazolidina-2-selona (30)



Se utilizó el método de la **Sección 5.2.17**. Se empleó glucosamina (100 mg, 0.46 mmol). Rendimiento: 83 mg (50%); $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 9.58 (sa, 1H, NH), 7.28 (m, 2H, Ar-H), 7.18 (m, 2H, Ar-H), 5.90 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.3$ Hz, H-1), 5.41 (sa, 1H, OH), 4.79 (sa, 1H, OH), 4.54 (sa, 1H, OH), 4.13 (m, 2H, H-2, H-3), 3.72 (m, 1H, H-5), 3.60 (m, 1H, H-4), 3.56 (m, 1H, H-6a) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 178.3 (C=Se), 136.6, 136.5, 129.0, 127.7 (Ar-C), 95.0 (C-1), 79.4 (C-4), 73.5 (C-3), 68.0 (C-5), 66.8 (C-2), 63.7 (C-6), 20.7 (CH_3) ppm.

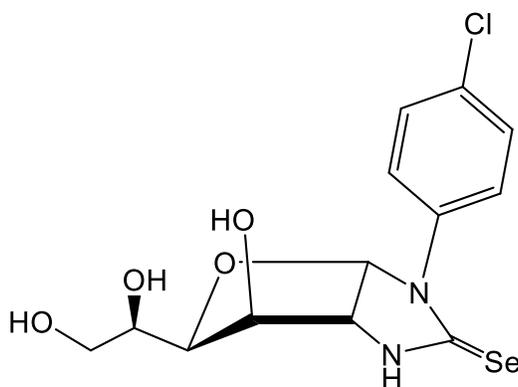
5.3.10. 1-(*p*-Fluorofenil)-(1,2-didesoxi- α -D-glucofuranoso)[2,1-*d*] imidazolidina-2-selona (31)



Se utilizó el método de la **Sección 5.2.17**. Se empleó glucosamina (150 mg, 0.69 mmol). Rendimiento: 156 mg (62%); $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7.51-7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.18-7.15 (m, 2H, Ar-H), 6.01 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.5$ Hz, H-1), 4.39 (m, 1H, $J_{2,3} \approx 0$ Hz, H-2), 4.36 (d, 1H, $J_{3,4} = 6.5$ Hz, H-3), 4.01 (m, 1H, H-5), 3.93 (d, 1H, $J_{4,5} = 8.6$ Hz, H-4), 3.84 (dd,

1H, $J_{5,6a} = 2.2$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.4$ Hz, H-6a), 3.70 (dd, 1H, H-6b) ppm; ^{13}C RMN (125.7 MHz, CD_3OD): δ 180.9 (C=Se), 163.3 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 245.8$ Hz, C-4'), 136.4 (d, $^4J_{\text{C,F}} = 2.8$ Hz, C-1'), 131.5 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 8.8$ Hz, C-2'), 116.4 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 23.0$ Hz, C-3'), 96.9 (C-1), 80.6 (C-4), 75.7 (C-3), 69.9 (C-5), 68.5 (C-2), 65.0 (C-6) ppm.

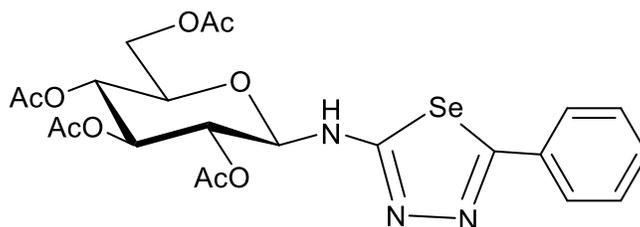
5.3.11. 1-(*p*-Clorofenil)-(1,2-didesoxi- α -D-glucofuranoso)[2,1-*d*] imidazolidina-2-selona



Se empleó glucosamina (100 mg, 0.46 mmol). Rendimiento: 90 mg (51%); ^1H -RMN (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 9.75 (sa, 1H, NH), 7.46 (m, 4H, Ar-H), 5.97 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.3$ Hz, H-1), 5.52 (sa, 1H, OH), 4.89 (sa, 1H, OH), 4.57 (sa, 1H, OH), 4.15 (m, 2H, H-2, H-3), 3.73 (m, 1H, H-5), 3.61 (m, 1H, H-4), 3.56 (m, 1H, H-6a) ppm; ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 178.2 (C=Se), 138.2, 131.5, 129.4, 128.5 (Ar-C), 94.9 (C-1), 79.6 (C-4), 73.4 (C-3), 67.9 (C-5), 66.9 (C-2), 63.7 (C-6) ppm.

5.3.12. 5-Fenil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)amino-1,3,4-selenadiazol

(33)



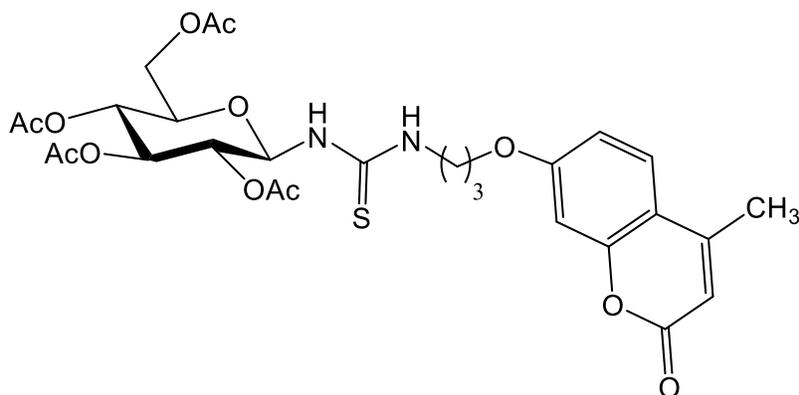
A una solución del isoselenocianato **127** (100 mg, 0.23 mmol) en DCM (10 mL) se le añade monohidrato de hidracina (11.04 μL , 1.0 equiv.), la reacción se mantiene a t.a y en la oscuridad durante 1 h. Pasado este tiempo, y en el mismo de reacción se añade

benzaldehído (23.34 μL , 2.0 equiv.) y AcOH (14.41 μL , 2.0 equiv.). La reacción se mantiene a reflujo durante 2h. Finalmente se añade NBS (61 mg, 1.5 equiv.) y AcONa (37 mg, 2.0 equiv.) y se refluje durante 4 h. La mezcla de reacción se lava con salmuera y se extrae con CH_2Cl_2 ; la fase orgánica es evaporada a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (7:3 Hexano-AcOEt). Rendimiento: 68 mg (53%). $[\alpha]_D^{28}$ -31 (*c* 0.10, CH_2Cl_2); $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.74 (m, 2H, Ar-H), 7.42 (m, 3H, Ar-H), 5.37 (m, 1H, H-3), 5.31 (m, 2H, H-1, H-2), 5.06 (t, 1H, $J_{4,5}=9.4$ Hz, H-4), 4.34 (dd, 1H, $J_{6a,5}=4.7$ Hz, $J_{6a,6b}=12.5$ Hz, H-6a), 4.13 (dd, 1H, $J_{6a,5}=2.3$ Hz, H-6b) 3.87 (ddd, 1H, $J_{5,4}=2.25$ Hz, H-5), 2.08, 2.08, 2.05, 2.04 (4s, 3H c/u, 4OAc) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (1255 MHz, CDCl_3): δ 171.3, 170.7, 170.1, 169.7 (4 CH_3CO), 133.3, 130.5, 129.2, 128.0, 127.2 (Ar-C), 85.1 (C-1), 73.5 (C-5), 72.8 (C-3), 71.0 (C-4), 68.4 (C-2), 61.8 (C-6), 20.9, 20.9, 20.7 (CH_3CO); HRESI-MS *m/z* calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_9$ ^{80}Se ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 556.0829, encontrado: 556.0831.

5.3.13. Método general para la síntesis de las glicocumarinas 34-37

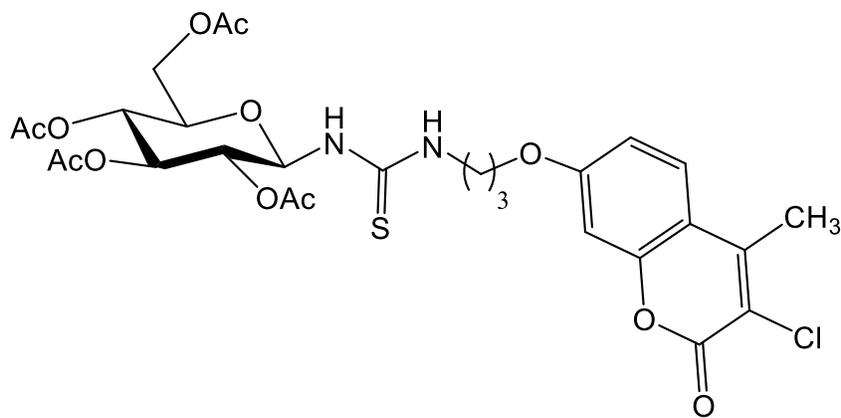
A una disolución del β -D-glucopiranosilisotiocianato **148** (1.0 equiv.) y Et_3N (4.0 equiv.) en una mezcla 10:1 de MeCN-*i*PrOH (11 mL) se añade la amino-cumarina correspondiente **147a-d** y se calienta a 65 °C durante 4 h. A continuación, se concentra a sequedad y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna (Ciclohexano \rightarrow Ciclohexano-AcOEt 7:3).

5.3.13.1. *N*-[3-{4'-metil-2'-oxo-2'*H*-cromen-7'-il}oxi]propil-*N'*-(2'',3'',4'',6'')-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)tiourea (**34**)



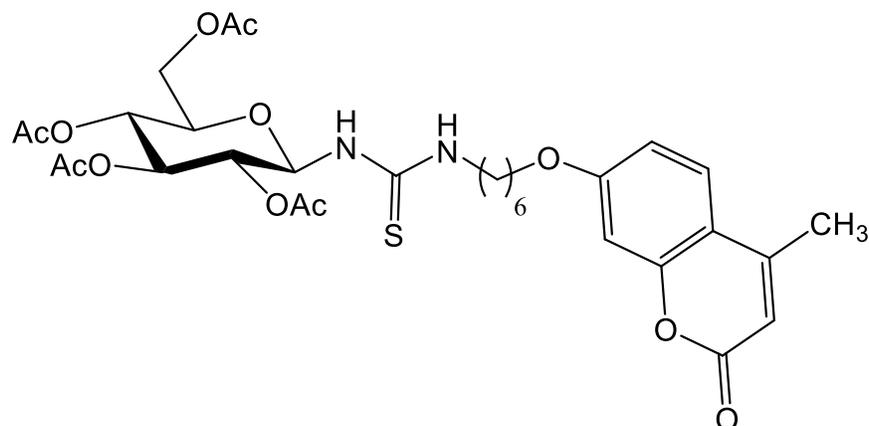
Se empleó la cumarina **147a** (90.0 mg, 0.38 mmol) y el β -D-glucopiranosilisotiocianato **148** (150 mg, 0.38 mmol). Rendimiento: 26.6 mg (11%). $[\alpha]_D^{28} +4$ (*c* 1.06, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.46 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8.7$ Hz, H), 6.85 (d, 1H, Ar-H), 6.78 (s, 1H, Ar-H), 6.11 (s, 1H, H-3), 5.73 (t, 1H, H-1 Glc), 5.32 (t, 1H, H-3 Glc), 5.29 (s, 3H, CH₃), 4.28 (dd, 1H, $J_{6a,5} = 4.8$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, H-6a Glc), 4.07 (m, H-3, H-2, H,4 H-6b), 3.83 (ddd, H-1, $J_{5,6b} = 1.9$ Hz), 3.37 (t, 2H, $J_{H,H} = 7.0$ Hz), 2.35 (m, 4H, CH₂), 2.05, 2.02, 2.02, 1.99 (4s, 3H c/u, 4OAc) ppm; ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 184.0 (C=S), 175.4 (C-2), 170.8, 169.9, 169.8 (3 CH₃CO), 161.5, 155.1, 152.9, 125.7, 112.5 (Ar-C), 112.1 (C-3), 101.8 (Ar-C), 82.8 (C-1 Glc), 73.4 (C-5 Glc), 70.9 (C-2 Glc), 68.6 (C-4 Glc), 62.0 (C-6 Glc), 53.5 (CH₃), 49.6, 30.8, 28.3 (-CH₂-), 20.9, 20.7, 18.8, 17.7 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₂₈H₃₄N₂NaO₁₂S ([M+Na]⁺): 645.1717, encontrado: 645.1725.

5.3.13.2. N-[3-{3'-Cloro-4'-metil-2'-oxo-2'H-cromen-7''-il}oxi]propil-N'-(2'',3'',4'',6''-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil)tiourea (35)



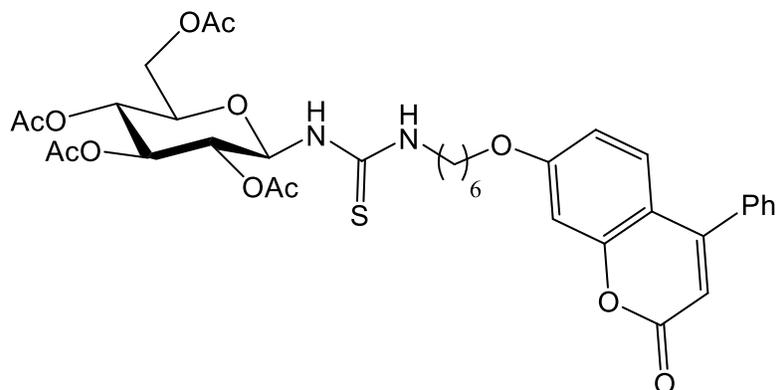
Se empleó la cumarina **147b** (60 mg, 0.22 mmol) y el β -D-glucopiranosilisotiocianato **148** (84 mg, 0.22 mmol). Rendimiento: 23.8 mg (17%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.11 (da, 1H, Ar-H), 6.82 (sa, 1H, Ar-H), 6.65 (da, 1H, Ar-H), 5.70 (m, 1H, H-1), 5.30 (m, 2H, H-3, H-4), 4.27 (m, 1H, H-6a), 4.02 (m, 2H, H-6b, H-2), 3.82 (m, 1H, H-5), 3.37 (t, 2H, $J_{H,H} = 7.0$ Hz, -CH₂-), 2.36 (t, 2H, -CH₂-), 2.06, 2.03, 2.01, 2.00 (4s, 3H c/u, 4OAc), 1.28 (t, 2H, -CH₂-) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₃₁H₃₉N₂ClNaO₁₂S ([M+Na]⁺): 721.1797, encontrado: 721.1804.

5.3.13.3. *N*-[6-(4'-metil-2'-oxo-2'*H*-cromen-7'-il)oxi]hexil-*N*'-(2'',3'',4'',6''-tetra-*O*-acetil-β-*D*-glucopiranosil)tiourea (36)



Se empleó la cumarina **147c** (60 mg, 0.22 mmol) y el β-*D*-glucopiranosilisotiocianato **148** (84 mg, 0.22 mmol). Rendimiento: 23.8 mg (17%); $[\alpha]_D^{27} +4$ (*c* 1.44, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.47 (d, 1H, Ar-H), 6.83 (dd, 1H, Ar-H), 6.77 (d, 1H, Ar-H), 6.11 (d, 1H, H-5), 5.75 (t, 1H, H-1 Glc), 5.33 (m, 1H, H-3 Glc), 5.05 (t, 1H, H-4 Glc), 4.96 (t, 1H, H-2 Glc), 4.31 (dd, 1H, $J_{6a,5} = 4.7$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, H-6a Glc), 4.09 (dd, 1H, $J_{6b,5} = 2.1$ Hz, H-6b Glc), 3.85 (ddd, 1H, H-5 Glc), 3.38 (t, 2H, $J_{H,H} = 7.0$ Hz, -CH₂-), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.35 (d, 2H, -CH₂-), 2.06, 2.03, 2.02, 2.00 (4s, 3H c/u, 4OAc), 1.79 (m, 2H, -CH₂-), 1.61 (m, 2H, -CH₂-), 1.96 (m, 4H, -CH₂-) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 175.3 (C-2), 170.7, 169.9, 169.8 (3 CH₃CO), 162.2, 161.5, 155.4, 152.8, 125.6, 113.6, 112.8 (Ar-C), 111.95 (C-3), 101.4 (Ar-C), 82.8 (C-1 Glc), 73.4 (C-5 Glc), 73.1 (C-3 Glc), 70.9 (C-2 Glc), 68.5 (C-4 Glc), 61.9 (C-6 Glc), 49.6, 30.8, 29.7, 28.9, 28.7, 26.7, 25.8 (-CH₂-), 20.9, 20.7, 18.8, 17.8 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calc. para C₃₁H₄₀N₂NaO₁₂S ([M+Na]⁺):687.2200, encontrado: 678.2194.

5.3.13.4. *N*-[6-{4'-Fenil-2'-oxo-2'*H*-cromen-7'-il}oxi]hexil-*N*'-(2'',3'',4'',6''-tetra-*O*-acetil-β-*D*-glucopiranosil)tiourea (37)



Se empleó la cumarina **147d** (100 mg, 0.30 mmol) y el β-²⁷*D*-glucopiranosilisotiocianato (114 mg, 0.30 mmol) **148**. Rendimiento: 110 mg (49%). $[\alpha]_D^{27}$ -1 (c 0.51, CH₂Cl₂); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.50 (m, 3H, Ar-H), 7.42 (m, 2H, Ar-H), 7.36 (d, 1H, Ar-H), 6.85 (d, 1H, Ar-H), 6.76 (dd, 1H, Ar-H), 6.20 (s, 1H), 5.75 (t, 1H, H-1), 5.34 (m, 1H, H-3), 5.05 (t, 1H, $J_{4,3} = J_{4,5} = 10$ Hz, H-4), 4.97 (t, 1H, H-2), 4.32 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, H-6a), 4.09 (dd, 1H,), 4.01 (m, 2H, H6b), 3.85 (ddd, 1H, $J_{5,6a} = 2.1$ Hz, $J_{5,6b} = 4.6$ Hz, H-5), 3.38 (t, 2H, $J_{H,H} = 7.0$ Hz, CH₂-NH), 2.37 (t, 2H, , $J_{H,H} = 8.0$ Hz, -CH₂-), 2.05, 2.03, 2.02, 2.00 (4s, 3H c/u, 4OAc), 1.80 (m, 2H, CH₂), 1.61 (m, 2H, CH₂), 1.46 (m, 4H, CH₂) ppm; ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 175.3, 170.7, 169.9, 169.8 (3 CH₃CO), 162.4, 161.5, 156.1, 156.0, 135.7, 129.7, 128.9, 128.5, 128.1, 112.8, 112.5 (Ar-C) 118.4 (C-3), 101.7 (Ar-C), 82.9 (C-1 Glc), 73.4 (C-5 Glc), 73.1 (C-3 Glc), 70.9 (C-2 Glc), 68.5 (C-4 Glc), 61.9 (C-6 Glc), 49.6 (CH₂-O), 30.8 (CH₂-NH), 28.9, 28.8, 26.7, 25.8 (-CH₂-), 20.9, 20.7, 17.1 (CH₃) ppm . HRESI-MS *m/z* calc. para C₃₈H₄₂N₂O₁₂NaS ([M+Na]⁺): 749.2531, encontrado: 749.2351.

