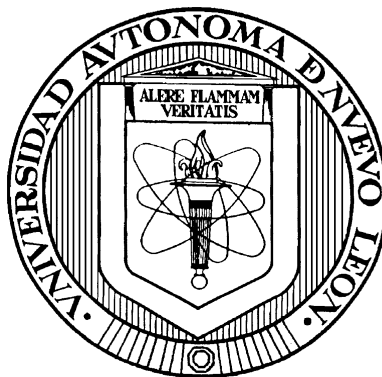


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE INDENOPIRROLIDINAS

Por

QCB. EDUARDO NIETO SEPÚLVEDA

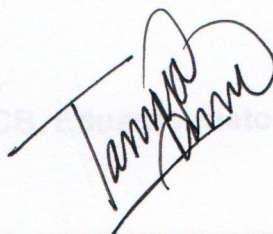
**Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias con Orientación en
Química Biomédica**

Diciembre de 2014

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE INDENOPIRROLIDINAS

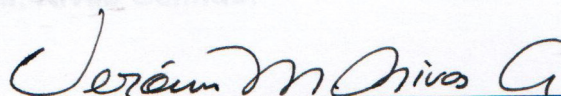
Aprobación de la Tesis:

Presentado por: —

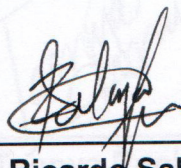


Dra. Q. Tannya Rocío Ibarra Rivera
Director de Tesis

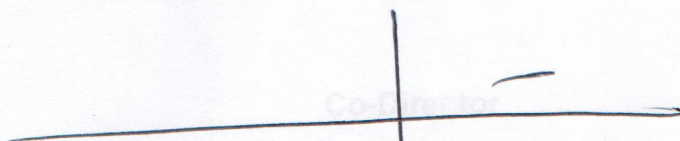
Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Q. Tannya R. Ibarra Rivera y la co-dirección de la Dra. C. Verónica M. Rivas Galindo.



Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo
Co-Director de Tesis



Dr. C. Ricardo Salazar Aranda
Comisión de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Postgrado

Verónica Mayela Rivas Galindo
Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE INDENOPIRROLIDINAS

Presentado por:

QCB. Eduardo Nieto Sepúlveda

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Q. Tannya R. Ibarra Rivera y la co-dirección de la Dra. C. Verónica M. Rivas Galindo.

Director

Dra. Q. Tannya Rocío Ibarra Rivera

Co-Director

Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo

“Freedom of thought is best promoted by the gradual illumination of
men’s minds which follows from the advance of science”.

— *Charles Darwin*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Q. Tannya Ibarra que sin conocerme a fondo me dio la oportunidad de ser su primer estudiante de nivel posgrado. Por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia y su paciencia, me orientó y apoyó para que de una forma motivada haya terminado mis estudios en este nuevo campo para mí de una manera exitosa.

A mi co-directora, Dra. Verónica Rivas, por su apoyo incondicional a la hora de requerir los espectros de RMN, así como de sus consejos y enseñanzas que espero, al menos una parte de ellas hayan quedado plasmadas en este trabajo.

Al Dr. Ricardo Salazar, que como asesor de esta tesis me brindó de su experiencia en el área de bioensayos, así como gracias a su retroalimentación hizo de manera favorable que éste fuera un mejor trabajo.

A la Dra. Noemí Waksman, que desde que era alumno de pregrado confió en mí y me orientó de manera acertada en la elección de dónde comenzar este nuevo trayecto como estudiante de posgrado. Así como su ayuda de manera incondicional para lograr los apoyos requeridos durante esta etapa.

Al Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina por permitirme el uso de su equipo, a los Profesores que estuvieron involucrados en mi formación y a todo el personal que de manera directa o indirecta tuvo una invaluable contribución en el desarrollo de este estudio.

A mi madre, por estar siempre ahí, por ver primero por sus hijos, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a través de esta carrera, por darme la libertad de elegir y aprender de mis errores, por ser un ejemplo a seguir. Espero siempre hacerte sentir orgullosa y llegar a poder regresarte algo de lo mucho que me has dado. Te quiero mucho.

A mi segunda madre, “mi güeli” Lichita, por considerarme no como su nieto, sino como el más pequeño de sus hijos. Por enseñarme el valor de la educación y por siempre estar ahí con una sonrisa y chiflarme solo como una abuela lo puede hacer.

A toda mi familia, mis padrinos, tíos y primos por el apoyo moral que siempre me ha brindado.

A mis amigas Brenda, Lizzete y Mariel, que siempre estuvieron ahí desde el inicio, por ofrecerme su amistad incondicional, sin juzgar nunca mis decisiones y por el contrario siempre apoyarme, por acompañarme en los momentos de frustración y diversión. Por ser simplemente ustedes, *partners in crime*.

A mis compañeros de generación César y Daniela, que sin esperarlo se volvieron mis amigos a través de estos dos años de esfuerzo y dedicación, y que siempre me ayudaron cuando lo necesitaba.

A Elda que se convirtió en una gran amiga. Por ser esa persona especial con la cual podía contar y platicar de mucho más que solo la escuela, que destaca entre el resto y me entiende al pensar de manera similar.

A mis compañeros Marce, Omar, Cecilia, Magda, que en algún tiempo estuvimos juntos y siempre me brindaron su ayuda cuándo algo surgía. Así como a Graciela por dedicar parte de su tiempo y colaborar en este trabajo.

Al pasante Alejandro que siempre estuvo atento y disponible para cualquier tarea que se requiriera en el laboratorio, así como a Orlando que me asistió en los primeros procesos que realicé.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|------|
| RESUMEN..... | x |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xi |
| ÍNDICE DE TABLAS | xii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xiii |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| | |
| 2. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1 La síntesis orgánica | 4 |
| 2.2 Reacciones multicomponentes | 5 |
| 2.3 Isonitrilos y su papel en las RMC..... | 6 |
| 2.4 La reacción de Ugi | 8 |
| 2.5 Combinación de RMC de Ugi y post-condensaciones | 10 |
| 2.6 La naturaleza heterocíclica de las moléculas y su bioactividad | 11 |
| 2.7 Actividad biológica de las indenopirrolidinas | 12 |
| 2.8 Aproximaciones sintéticas de las indenopirrolidinas | 13 |
| 2.9 Enfoques farmacológicos de la medicina moderna | 15 |
| 2.10 Bioensayos en la evaluación biológica | 16 |
| 2.11 Ensayos actividad antidiabética..... | 17 |
| | |
| 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 19 |
| 3.1 Justificación..... | 19 |
| 3.2 Objetivo general | 20 |
| 3.3 Objetivos específicos | 20 |

| | |
|--|----|
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 21 |
| 4.1 Estrategia sintética..... | 21 |
| 4.2 Procedimientos generales | 22 |
| 4.2.1 Preparación de aductos de Ugi..... | 22 |
| 4.2.2 Preparación de indenopirrolidinas..... | 23 |
| 4.2.3 Ensayo de inhibición de α -amilasa | 24 |
| 4.2.4 Ensayo de inhibición de α -glucosidasa | 26 |
| 4.3 Materiales y equipo | 29 |
| 5. RESULTADOS | 31 |
| 5.1 Aductos de Ugi..... | 31 |
| 5.2 Indenopirrolidinas..... | 36 |
| 5.3 Evaluación de la actividad anti-hiperglicemiante | 39 |
| 5.3.1 Ensayo de α -amilasa..... | 39 |
| 5.3.2 Ensayo de α -glucosidasa | 40 |
| 6. DISCUSIÓN..... | 41 |
| 6.1 Aductos de Ugi..... | 41 |
| 6.2 Indenopirrolidinas..... | 47 |
| 6.3 Evaluación biológica | 52 |
| 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 54 |
| 7.1 Conclusiones..... | 54 |
| 7.2 Perspectivas..... | 55 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA..... | 56 |

| | |
|--|----|
| APÉNDICE | 60 |
| Compuestos sintetizados | 61 |
| Propiedades físicas y datos espectroscópicos | 62 |
| Aductos de Ugi | 62 |
| Indenopirrolidinas | 68 |

Q.C.B. Eduardo Nieto Sepúlveda

Fecha de graduación: Diciembre, 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio:

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA
DE INDENOPIRROLIDINAS

Número de páginas: 71

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias
con Orientación en Química Biomédica

Área de Estudio: Química Orgánica

Propósito y Método del Estudio: En la actualidad existe una tendencia creciente en el desarrollo de nuevas estrategias sintéticas, cortas y eficientes, encaminadas a la obtención de nuevos compuestos que incluyan estructuras diversas y complejas que aumenten la probabilidad de presentar una actividad biológica importante. Debido al antecedente de estructuras de tipo indenopirrolidina que han presentado actividad hipoglucemiante *in vivo*, y que hasta el momento solo se ha reportado una ruta sintética compleja y poco eficiente es necesario el desarrollo de una nueva estrategia sintética que permita la producción de este tipo de compuestos y sus variantes estructurales para la exploración de su potencial uso biológico. Este trabajo consistió en aprovechar las ventajas de las reacciones multicomponentes en combinación con una reacción de ciclación asistida por paladio para el desarrollo de una nueva estrategia sintética que permitió la producción de indenopirrolidinas. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue sintetizar una pequeña colección que consistió de cuatro compuestos tipo indenopirrolidina mediante la ciclación de aductos de Ugi y la evaluación de su actividad biológica mediante ensayos de inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa.

Contribuciones y Conclusiones: Se desarrolló una ruta sintética de dos pasos para la preparación de indenopirrolidinas, la cual consiste en una Reacción Multicomponente como primer paso y posteriormente una ciclación asistida por paladio. Lo cual confiere una forma sencilla y rápida para obtener moléculas con este núcleo químico. Los rendimientos de la reacción de Ugi fueron mejores con la amina libre (líquida) que con el clorhidrato de la misma; adicionalmente, el uso de InCl_3 como catalizador aumenta los rendimientos de la reacción. La adición de trietilamina en la reacción de Ugi con el clorhidrato de la amina, aumenta moderadamente los rendimientos cuando se usa diclorometano como disolvente. La reacción de ciclación asistida por paladio se favorece cuando los grupos aromáticos del aducto de Ugi presentan al menos un grupo electroattractor fuerte. Un segundo grupo electroattractor mejora ligeramente los rendimientos. Las indenopirrolidinas **6a-d** no mostraron actividad *in vitro* como inhibidores de α -amilasa y α -glucosidasa a las concentraciones probadas.

FIRMA DEL ASESOR: _____

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ejemplos de diversas RMC..... | 6 |
| Figura 2. Síntesis de xilocaína | 7 |
| Figura 3. Híbridos de resonancia de los isonitrilos..... | 7 |
| Figura 4. Esquema de la reacción de Ugi | 8 |
| Figura 5. Compuestos con propiedades farmacológicas preparados mediante U-4CR. | 9 |
| Figura 6. Esquema del mecanismo general de la reacción de Ugi | 10 |
| Figura 7. RMC de Ugi y post-condensaciones..... | 10 |
| Figura 8. Benzodiazepinas e indol..... | 11 |
| Figura 9. Indenopirrolidina | 12 |
| Figura 10. Síntesis multipasos para la obtención de indenopirrolidinas | 13 |
| Figura 11. Esquema de síntesis para la obtención de indenopirrolidinas vía Ugi-Smiles / ciclación promovida por paladio | 14 |
| Figura 12. Propuesta sintética para la preparación indenopirrolidinas | 22 |
| Figura 13. Esquema general de la reacción de Ugi | 31 |
| Figura 14. Esquema general de la reacción de ciclación asistida por Pd | 36 |
| Figura 15. RMN ¹ H del aducto de Ugi 5d | 46 |
| Figura 16. RMN ¹³ C del aducto de Ugi 5d | 47 |
| Figura 17. RMN ¹ H de la indenopirrolidina 6d | 50 |
| Figura 18. RMN ¹³ C de la indenopirrolidina 6d | 51 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Resultados de la reacción de Ugi utilizando la amina 1a | 32 |
| Tabla 2. Optimización de condiciones utilizando el clorhidrato de la amina | 34 |
| Tabla 3. Resultados de la reacción de Ugi utilizando el clorhidrato de la amina | 35 |
| Tabla 4. Resultados de la reacción de ciclación asistida por paladio | 37 |
| Tabla 5. Ensayo de inhibición de α -amilasa por las indenopirrolidinas | 39 |
| Tabla 6. Ensayo de inhibición de α -glucosidasa por las indenopirrolidinas | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|------------------------------------|
| OAc | Acetato |
| OAcEt | Acetato de etilo |
| DNSA | Ácido 3,5-dinitrosalicílico |
| ASB | Albúmina sérica bovina |
| CI ₅₀ | Concentración inhibitoria media |
| <i>J</i> | Constante de acoplamiento |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| Da | Dalton |
| δ | Desplazamiento químico |
| DMF | Dimetilformamida |
| eV | Electrón-voltio |
| Eq | Equivalentes |
| °C | Grados Celsius |
| Hex | Hexano |
| MHz | Megahertz |
| µg | Microgramos |
| µL | Microlitros |
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| mM | Milimolar |
| mU | Miliunidades |
| min | Minutos |
| M | Molar |
| nm | Nanómetro |
| ppm | Partes por millón |
| p-NPG | p-nitrofenil-α-glucopiranosido |
| RMC | Reacciones multicomponentes |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos |
| TEA | Trietilamina |
| UV | Ultravioleta |
| UV-Vis | Ultravioleta-visible |
| U | Unidad |
| α-Gluasa | α-Glucosidasa |

1. INTRODUCCIÓN

Las magníficas propiedades biológicas que presentan muchos de los compuestos orgánicos y las espléndidas oportunidades que ofrecen para responder diversas demandas científicas, son los principales argumentos que motivan su estudio. A partir de fuentes naturales o preparados mediante diversos métodos sintéticos, se conocen más de 5 millones de compuestos orgánicos y cada año se integran a las bases de datos 600 mil nuevos compuestos. In silico, se ha estimado un espacio químico que excede las 10^{60} estructuras químicas con probable actividad biológica.

La síntesis orientada a la diversidad es una de las estrategias para la preparación de una gran variedad de compuestos con posible actividad biológica, teniendo como objetivo principal abarcar un espacio químico grande y de ésta manera incrementar las posibilidades para el descubrimiento de un nuevo compuesto con propiedades farmacológicas.

Una de las metodologías principales para conseguir diversidad estructural se basa en el uso de las reacciones de multicomponentes. Dentro de las cuales la más sobresaliente ha sido la reacción de multicomponentes con

isonitrilos desarrollada por Ugi hace 55 años y su impacto dentro de la química orgánica ha sido considerable.

El desarrollo de diversos fármacos se ha facilitado gracias a la introducción de las reacciones de multicomponentes. Desde la simple construcción de aminoácidos, hasta productos complejos y activos biológicamente, la reacción de Ugi ha tenido una notable evolución a través de su historia.

A partir de que la reacción de Ugi fue dada a conocer, se han descrito muchas síntesis, principalmente de heterociclos. La mayoría de estas metodologías se basan en la combinación de la reacción de Ugi con post-condensaciones que usualmente incluyen la ciclación de los productos de Ugi, lo cual incrementa considerablemente la versatilidad de esta reacción.

Diversos heterociclos son considerados esqueletos moleculares especialmente importantes en química medicinal. Además, de que muchos fármacos incluyen estos núcleos en su estructura, nuevas actividades biológicas han sido descubiertas para nuevos compuestos heterocíclicos.

Las indenopirrolidinas son una clase especial de heterociclos que no han sido encontradas en compuestos naturales, pero recientemente han sido descritas como nuevos agentes hipoglucémicos orales.

Por lo anterior, este trabajo describe el desarrollo de una metodología basada en la combinación de dos procesos químicos para la preparación de heterociclos del tipo indenopirrolidina y su evaluación como potenciales agentes anti-diabéticos mediante la evaluación *in vitro* de la inhibición de dos enzimas involucradas en la disminución de la glucosa en sangre: α -amilasa y α -glucosidasa.

2. ANTECEDENTES

2.1 La Síntesis Orgánica

La síntesis orgánica ha contribuido al descubrimiento de nuevos compuestos biológicamente activos principalmente al generar diversas estructuras químicas mediante el desarrollo de nuevas y muy eficientes metodologías.

El descubrimiento de nuevos compuestos biológicamente activos mediante métodos sintéticos, ha sido el resultado de la producción de compuestos estructuralmente diversos que posean características adecuadas para la unión a receptores biológicos definidos, la identificación de un compuesto líder mediante su evaluación biológica, y la preparación de variantes o análogos optimizados en combinación con el estudio de la relación estructura-actividad. En todos los casos es esencial una síntesis eficiente para la aplicación práctica del desarrollo de nuevos medicamentos.

2.2 Reacciones multicomponentes

Las reacciones de multicomponentes (RMC) son procesos en los que se combinan de tres o más materiales de partida para formar un producto final mediante un único mecanismo de reacción. Presentan características básicas de una síntesis ideal ya que son altamente convergentes, eficientes y sencillas de realizar. Armonizan con los principios de la química verde ya que al formarse más de dos enlaces en un paso de reacción favorecen la economía atómica y la complejidad estructural con mínima producción de residuos.

Existen diversas metodologías de importancia en síntesis orgánica basadas en el uso de RMC (*Figura 1*), por ejemplo la síntesis de aminoácidos de Stecker en 1850, de dihidropiridinas de Hantzsch en 1882, de dihidropirimidinas en 1891, la reacción de Mannich en 1912, entre otras, todas estas han sido ampliamente explotadas en la química combinatoria y medicinal; y a pesar de que fueron descubiertas hace más de un siglo, representan actualmente la metodología de elección para la preparación de estos compuestos. En los últimos años, las RMC más usadas han sido las que se basan en el uso de isonitrilos ya que son especialmente inigualables en las estrategias de la síntesis orientada a la diversidad.

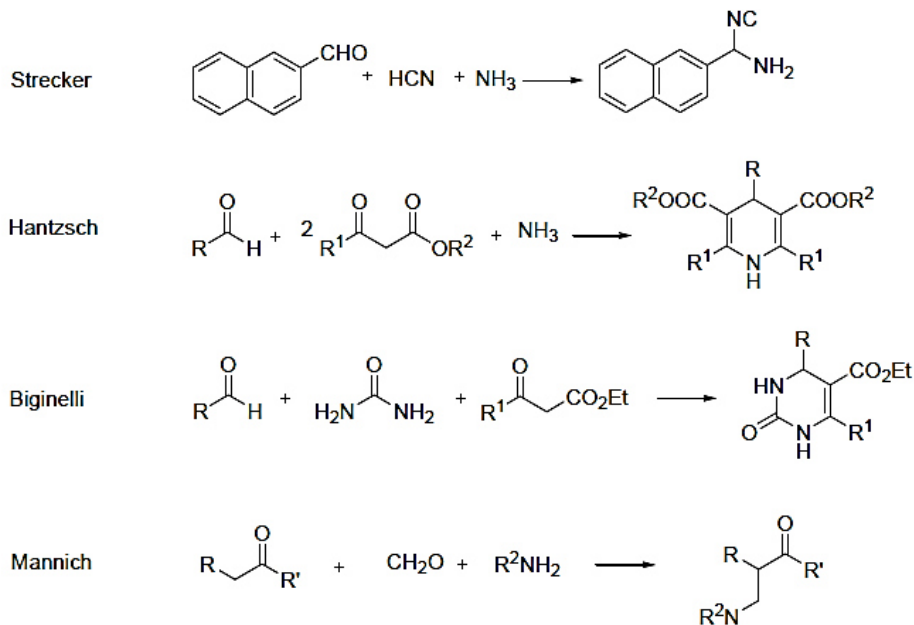


Figura 1. Ejemplos de diversas RMC

2.3 Isonitrilos y su papel en las RMC

El descubrimiento de los isonitrilos ocurrió al aislar la “xantocilina” de un cultivo de *Penicillium notatum*, por Rothe en 1950, el cual fue utilizado como antibiótico. A partir de este momento, diversos isonitrilos de origen natural fueron aislados de diferentes fuentes. En contraste, el primer isonitrilo sintético fue preparado accidentalmente por Lieke en 1859, el cual presentaba como característica el tener un olor penetrante y desagradable.

No fue sino hasta 1920 cuando Passerini descubre la primera reacción de multicomponentes con isonitrilos al hacerlos interaccionar con derivados

carbonílicos y ácidos carboxílicos. Cuarenta años más tarde, Ugi introdujo una de las reacciones más importantes y ampliamente utilizadas dentro del ámbito de la química de los multicomponentes, basada en isonitrilos, al añadir aminas como cuarto componente de la reacción y así facilitar la generación de heterociclos. Donde una de sus aportaciones más significativas y notables ha sido la síntesis de xilocaína a partir de un isonitrilo, formaldehído y una amina (Figura 2).

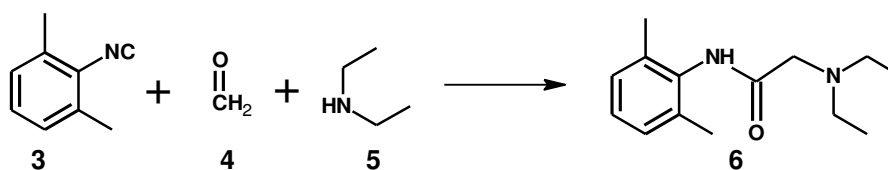


Figura 2. Síntesis de xilocaína

La versatilidad de estas reacciones se debe en gran parte a las características del isonitrilo, ya que estos poseen una estructura parecida a los carbenos con un átomo de carbono divalente, su estructura electrónica de resonancia puede ser representada como se muestra en la Figura 3. La propiedad sintética más importante de los isonitrilos es su reacción con nucleófilos y electrófilos.

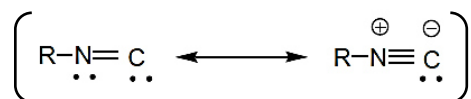


Figura 3. Híbridos de resonancia de los isonitrilos

A partir de las contribuciones a dicha área por Passerini y Ugi, se han realizado una inmensa cantidad de reacciones que conservan esa idea original.

2.4 La reacción de Ugi

Durante el comienzo de la década de los 90's, la naturaleza multicomponente, junto con el desarrollo de la química combinatoria en la industria farmacéutica, establecieron la reacción de Ugi como líder en la tendencia creciente de la química orgánica, favoreciendo así la popularidad del uso de isonitrilos en las RMC.

Por lo que tan solo al involucrar cuatro componentes, la reacción de Ugi, conocida por su abreviación U-4CR, ofrece una extensa gama de derivados peptídicos (*Figura 4*).

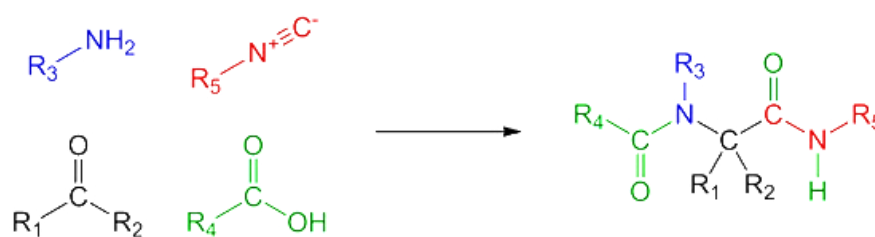


Figura 4. Esquema de la reacción de Ugi

En los últimos 20 años, esta reacción ha demostrado su potencial para la preparación de una gran variedad de compuestos heterocíclicos privilegiados con actividad medicinal como los que se muestran en la *Figura 5*.

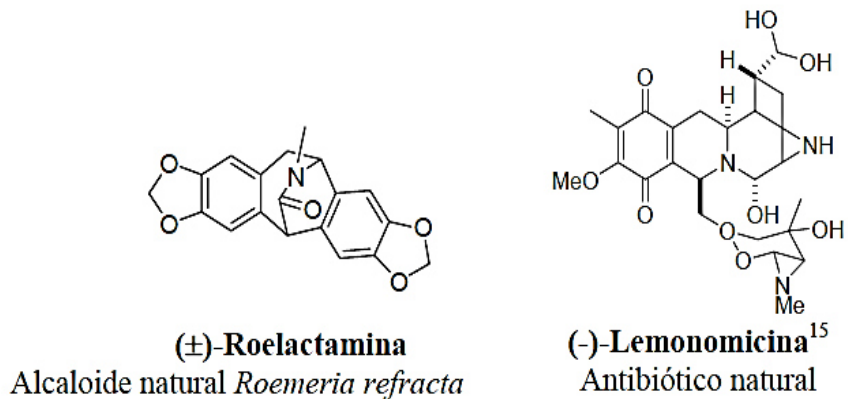


Figura 5. Compuestos con propiedades farmacológicas preparados mediante U-4CR.

Se describe a continuación el mecanismo de la reacción de Ugi (*Figura 6*):

1. El mecanismo involucra la formación previa de la imina, lo cual se produce por la condensación entre la amina y el aldehído.
2. Las iminas que usualmente son electrófilos débiles para reaccionar con los isonitrilos (moderadamente nucleófilos) en las reacciones de Ugi de 4 componentes, deben ser activados por el intercambio de un protón del ácido carboxílico dando como resultado el ion iminio.
3. Posteriormente el ion iminio es atacado por el isonitrilo para formar el ion nitrilio mediante una adición nucleofílica.
4. A continuación ocurre una segunda adición nucleofílica al reaccionar con el ácido carboxílico.
5. Por último, la molécula sufre un rearrreglo tipo Mumm o transferencia de acilo para dar como producto final una α -acilaminoamida.

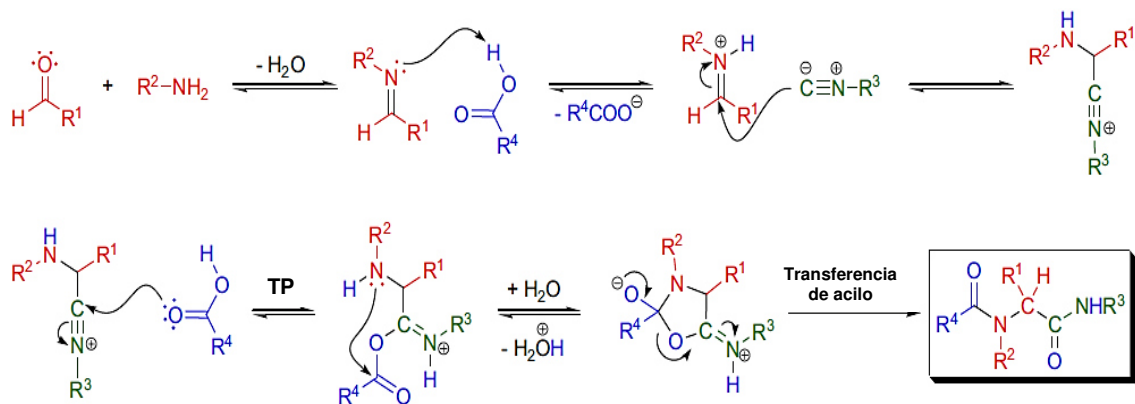


Figura 6. Esquema del mecanismo general de la reacción de Ugi

2.5 Combinación de RMC de Ugi y post-condensaciones

La versatilidad de las reacciones de Ugi se atribuye a la gran facilidad con la que se pueden combinar con alquilaciones en C, O y N, o diversas post-condensaciones para generar estructuras heterocíclicas nitrogenadas en un mínimo de pasos de una manera eficiente (*Figura 7*). Esta gran ventaja se debe en gran parte a que la reacción permite incluir diferentes sustituyentes y un número considerable de grupos funcionales que no son fáciles de obtener mediante metodologías convencionales.

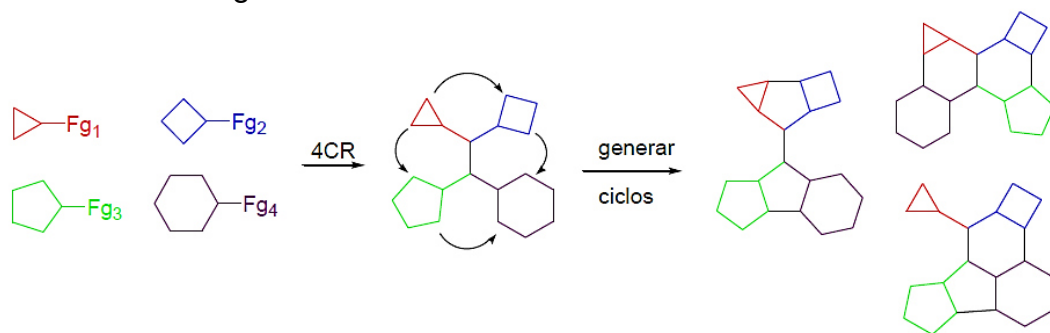


Figura 7. RMC de Ugi y post-condensaciones

En el presente trabajo se describe una metodología novedosa, útil para la síntesis de heterociclos del tipo indenopirrolidina. La estrategia propuesta para la ruta de síntesis se basa en la combinación de una reacción de multicomponentes de Ugi con una reacción de ciclación.

2.6 La naturaleza heterocíclica de las moléculas y su bioactividad

Los heterociclos son estructuras químicas privilegiadas. Entre ellas destacan las benzodiazepinas e índoles (*Figura 8*), que son especies reconocidas por poseer actividades biológicas significativas.

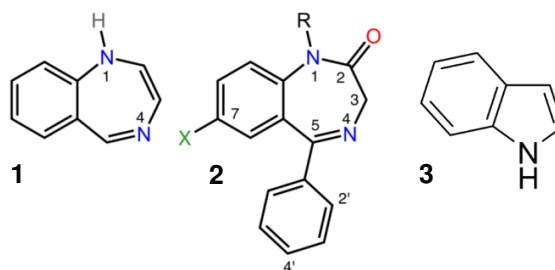


Figura 8. Benzodiazepinas **1** y **2**, Indol **3**

Algunas de las actividades más importantes de las benzodiazepinas se deben al efecto potencializador del neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico sobre su receptor, resultando en propiedades sedativas, hipnóticas, ansiolíticas, anticonvulsivantes y relajantes musculares. Por otra parte, las moléculas de tipo indol y sus derivados tienen una amplia gama de actividades, se ha descrito su

uso como agentes antimicrobianos, fármacos anti-cáncer, antihipertensivos, antidepresivos, antipsicóticos, antieméticos, antiarrítmicos, analgésicos, por mencionar algunas.

Debido a las magníficas propiedades biológicas de varios heterociclos, en la química medicinal, es común la búsqueda de nuevos métodos sintéticos eficientes que generen un acceso rápido a este tipo de estructuras heterocíclica para el descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos con actividad farmacológica.

2.7 Actividad biológica de las indenopirrolidinas

Hasta la fecha existen al menos dos referencias en las que se detalla la preparación de diferentes indenopirrolidinas (*Figura 9*) en donde se reporta que varios de estos compuestos presentaron actividad como agentes hipoglucemiantes orales en modelos animales, en especial aquellos dos que contenían la porción n-butil y n-propil como sustituyente.

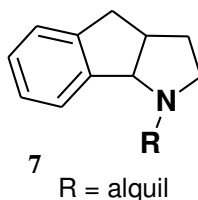


Figura 9. Indenopirrolidina

2.8 Aproximaciones sintéticas de las indenopirrolidinas

Hasta el límite de nuestro conocimiento, existen pocos reportes en la literatura referentes a la síntesis de indenopirrolidinas. Las metodologías descritas presentan la desventaja común que involucran varios pasos de reacción para la formación del policiclo (*Figura 10*), además de ser reacciones complicadas y se requieren tiempos de reacción prolongados.

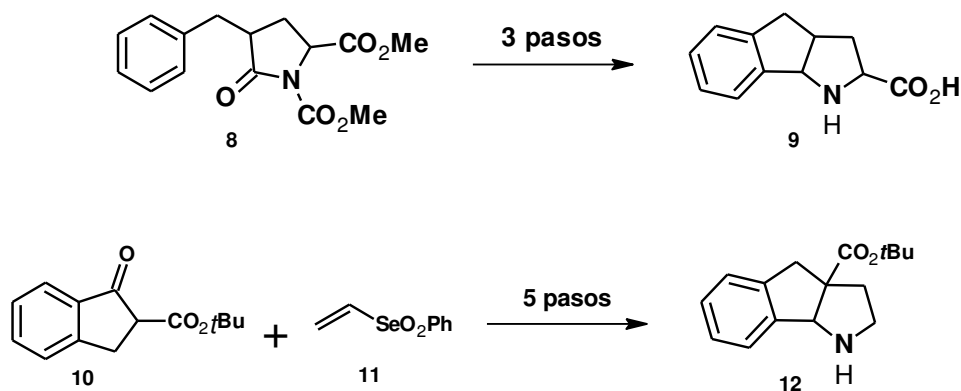


Figura 10. Síntesis multipasos para la obtención de indenopirrolidinas

Al menos un reporte demuestra la eficiencia en la obtención de indenopirrolidinas mediante la oxidación mediada por paladio de N-arilpéptidos, obtenidos a partir de una reacción Ugi-Smiles (*Figura 11*).

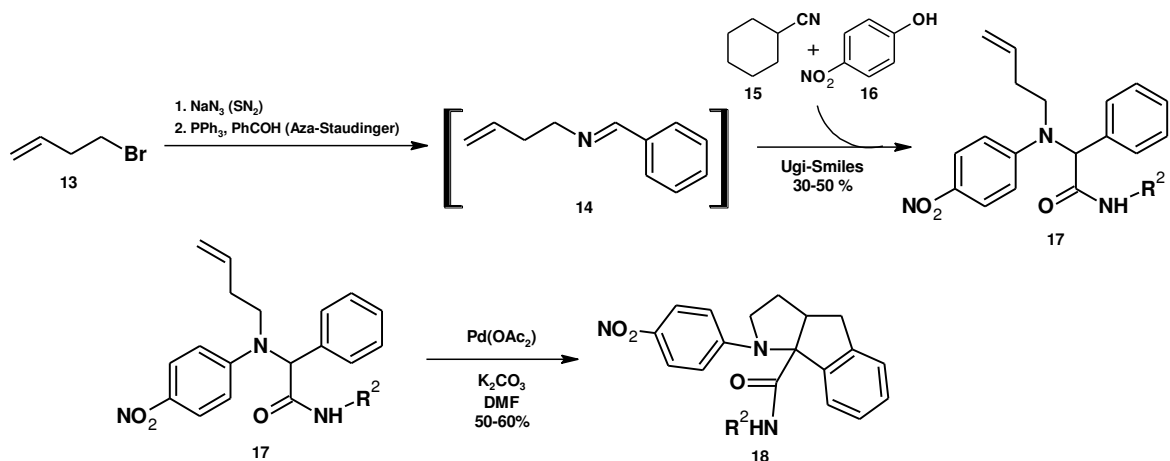


Figura 11. Esquema de síntesis para la obtención de indenopirrolidinas vía Ugi-Smiles / ciclación promovida por paladio

En este trabajo, para la obtención de los N-arilpéptidos fue necesaria la preparación de la imina previamente mediante una reacción SN_2 seguida de una Aza-Staudinger. Posteriormente a la formación de la imina se llevó a cabo una reacción multicomponente tipo Ugi-Smiles. Después, el N-arilpéptido obtenido se hace reaccionar en condiciones oxidativas de paladio para llevar a cabo la ciclación y obtener finalmente la indenopirrolidina en un solo paso de reacción.

Dada la capacidad del paladio para la preparación de nuevos núcleos de indenopirrolidina y que la reacción de Ugi permite la incorporación de heterociclos biológicamente importantes como dicetopiperazinas y benzodiazepinonas, la combinación de ambos procesos permitirá incrementar la complejidad de las indenopirrolidinas.

2.9 Enfoques farmacológicos de la medicina moderna

La investigación farmacológica se inició en Europa en la segunda mitad del siglo 19, cuando sus fundadores investigaron la acción de los fármacos existentes en experimentos con animales. Con el surgimiento de la química sintética en el siglo XX se hizo necesaria la evaluación farmacológica de estos nuevos productos para su indicación terapéutica.

La forma clásica para la selección farmacológica involucra pruebas secuenciales de los nuevos compuestos químicos o extractos biológicos en órganos aislados seguidos por pruebas en animales, en su mayoría ratas y ratones. El desarrollo de nuevas tecnologías y la evolución en las estrategias sintéticas han permitido producir una amplia variedad de compuestos, los cuales han sido evaluados biológicamente mediante pruebas *in vitro* en períodos más cortos de tiempo y reduciendo los costos. Por lo que las pruebas *in vivo* ya no son la única opción viable para realizar un cribado preliminar.

2.10 Bioensayos en la evaluación biológica

Los bioensayos existen como una forma alternativa para la evaluación biológica de compuestos tanto sintéticos como naturales ya que proveen una metodología fiable para determinar una o más actividades biológicas. Entre los numerosos bioensayos que existen se encuentran aquellos basados en la inhibición enzimática, ya que se ha demostrado su relación con diferentes procesos patológicos. Estos métodos actualmente son utilizados en el desarrollo y descubrimiento de fármacos.

Las evaluaciones biológicas basadas en el uso de enzimas ofrecen claras ventajas debido a la medición de una actividad enzimática definida. De esta forma se puede desarrollar una relación estructura-actividad de una manera más sencilla debido a la facilidad de manipulación de los ensayos, al contrario a aquellos en donde se utilizan células completas, ya que presentarán factores extras que interfieren en el ensayo, como lo son las membranas celulares, permeabilidad, transportadores activos, etc., que pueden arrojar falsos resultados.

Los sistemas *in vitro* permiten la manipulación independiente de las condiciones para ajustar la “sensibilidad” de un ensayo y así detectar clases

específicas de inhibidores. Estas opciones definirán el seguimiento de inhibidores potenciales. Adicionalmente, estos sistemas en donde no se utilizan células permiten la posibilidad de preparar un único lote de enzimas y almacenar alícuotas para futuros ensayos, en lugar de depender de la viabilidad y el crecimiento de células en medios de cultivos o de la obtención de lotes relativamente pequeños de algún tejido.

Sin embargo, los ensayos *in vitro* son sistemas inherentemente artificiales que solo podrán imitar un estado fisiológico de una manera aproximada. Existe la posibilidad que falten mecanismos de regulación o de retroalimentación que sean claves y por lo tanto puedan afectar la unión a la enzima. Además que éstas requieren de cierto nivel de aislamiento y purificación ya sea que provengan de fuente natural o recombinante, y esto siempre eleva la posibilidad que algún componente crítico sea removido durante la purificación o que algún contaminante sea añadido y pueda dar como resultado una actividad no deseada o enmascarar la actividad esperada.

2.11 Ensayos actividad antidiabética

Existen diversos bioensayos para determinar la actividad antidiabética de un compuesto, entre los que se encuentran los siguientes estudios:

- Estudios *in vivo* – Modelos animales de Diabetes Mellitus
 - Inducción farmacológica.
 - Modelos quirúrgicos.
 - Modelos genéticos.
 - Líneas animales que espontáneamente desarrollan diabetes.
 - Ratones diabéticos por ingeniería genética.
 - Otros modelos de DM2 para evaluar la reducción de la masa de células β del páncreas.

- Estudios *in vitro*
 - Estudios de secreción de insulina.
 - Estudios que utilizan líneas celulares aisladas de los islotes pancreáticos.
 - Estudios que utilizan líneas celulares secretoras de insulina.
 - Estudios *in vitro* sobre la captación de glucosa.
 - Estudios *in vitro* sobre la inhibición enzimática.

De los ensayos enlistados previamente, aquellos basados en la inhibición enzimática, constituyen las pruebas de primera elección para la evaluación general de compuestos con posible actividad biológica, ya que además de las ventajas mencionadas en la sección anterior, éstos son económicos, de fácil acceso, no se requiere equipo especializado ni personal altamente capacitado.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3.1 Justificación

En la actualidad existe una tendencia creciente en el desarrollo de nuevas estrategias sintéticas, cortas y eficientes, encaminadas a la obtención de nuevos compuestos que incluyan estructuras diversas y complejas que aumenten la probabilidad de presentar una actividad biológica importante.

Debido al antecedente de estructuras de tipo indenopirrolidina que han presentado actividad hipoglucemiante *in vivo*, y que hasta el momento solo se ha reportado una ruta sintética compleja y poco eficiente; es necesario el desarrollo de una nueva estrategia sintética que permita la producción de este tipo de compuestos y sus variantes estructurales para la exploración de su potencial uso biológico.

3.2 Objetivo General

Sintetizar una pequeña colección que consista de 4 compuestos tipo indenopirrolidina mediante la ciclación de aductos de Ugi y evaluar su actividad biológica.

3.3 Objetivos Específicos

1. Obtención de aductos de Ugi para la preparación de las indenopirrolidinas.
2. Preparación de indenopirrolidinas.
3. Evaluar la actividad *in vitro* de las indenopirrolidinas obtenidas mediante ensayos de inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia sintética

De acuerdo a lo encontrado en la literatura, se propuso el método sintético para la obtención de las indenopirrolidinas que consistió en la combinación de la reacción de multicomponentes de Ugi con un proceso oxidativo de ciclación en cascada asistido por paladio. La formación del núcleo indenopirrolidina requiere que el aducto de Ugi la función homoalílica proveniente de la amina y un anillo aromático del componente aldehído (*Figura 12*).

Por lo tanto, a partir de diversos isonitrilos, ácidos benzoicos, benzaldehídos y homoalilamina comerciales se obtendrán los compuestos de Ugi necesarios para que en una segunda reacción oxidativa mediada por paladio se produzcan los poliheterociclos del tipo indenopirrolidina. Es importante resaltar que la combinación de estos dos procesos brindará mayor economía atómica para la generación, en solo dos pasos, de un poliheterociclo nitrogenado bioactivo poco descrito en la literatura ya que se formarán 5 enlaces.

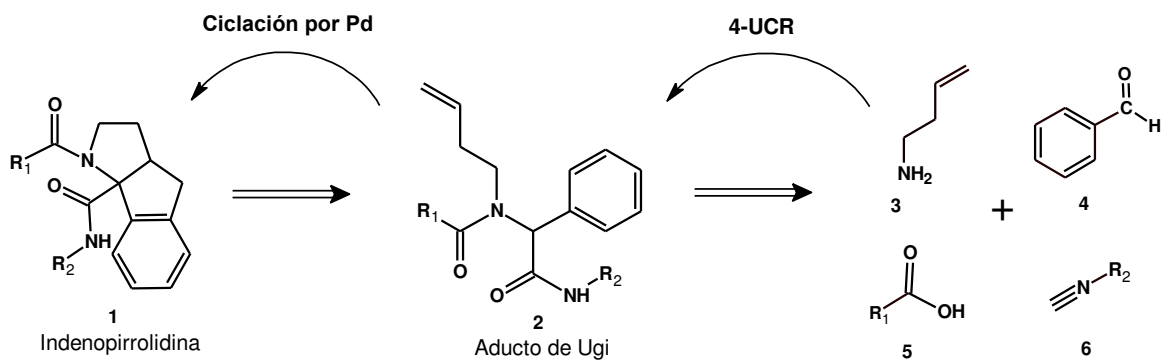


Figura 12. Propuesta sintética para la preparación
de indenopirrolidinas

4.2 Procedimientos generales

4.2.1 Preparación de Aductos de Ugi

Procedimiento A. Una solución del aldehído (1.1 Eq.) y la homoalilamina (1.0 Eq.) se agitó de manera constante en metanol seco (0.5 M) durante 15 min a temperatura ambiente. Después se añadió el componente ácido (1.0 Eq.) y enseguida el isonitrilo (1.0 Eq.). La mezcla se agitó a velocidad constante a temperatura ambiente en atmósfera inerte por 3 días hasta observar la desaparición de los materiales de partida por CCF. Se eliminaron los

componentes volátiles a presión reducida y el sólido resultante se cromatografió (SiO₂, OAcEt/Hex) para obtener el producto deseado.

Procedimiento B. Una solución de aldehído (1.1 Eq.), clorhidrato de homoalilamina (0.7 Eq.) y trietilamina (1.5 Eq.), se agitó de manera constante en diclorometano seco (0.22 M) durante 30 min a temperatura ambiente. Después se añadió InCl₃ (0.07 Eq.) y se mantuvo en agitación a velocidad constante por 10 min. Posteriormente se agregó el componente ácido (1.0 Eq.) y enseguida el isonitrilo (1.0 Eq.). La mezcla se agitó de manera constante a temperatura ambiente en atmósfera inerte por 3 días hasta observar la desaparición de los materiales de partida por CCF. Se eliminaron los componentes volátiles a presión reducida y el sólido resultante se cromatografió (SiO₂, OAcEt/Hex) para obtener el producto deseado.

4.2.2 Preparación de Indenopirrolidinas

Procedimiento C. A una solución 0.2 M del aducto de Ugi (1.0 Eq.) en DMF se le añadió Pd(OAc)₂ (0.05 Eq.) y K₂CO₃ (2 Eq.). La mezcla resultante se agitó a velocidad constante a 110°C en atmósfera de O₂ hasta por 4 horas hasta observar la desaparición total del aducto de Ugi (indicada por CCF), la mezcla se concentró a presión reducida. El crudo se cromatografió (SiO₂, OAcEt/Hex) para obtener el producto deseado.

4.2.3 Ensayo de inhibición de α -amilasa

Se realizó según el procedimiento reportado por Subramanian con algunas modificaciones, mediante el cual se determinó la concentración inhibitoria máxima media (CI_{50}) de las indenopirrolidinas sintetizadas para inhibir la enzima α -amilasa por medio de espectrofotometría UV-Vis. Los grupos reductores liberados de la hidrólisis del almidón por la α -amilasa, reducen el ácido 3,5-dinitrosalicílico, resultando en la formación de un producto coloreado que absorbe a 540 nm. Si el inhibidor de α -amilasa está presente en el sistema de ensayo habrá menos liberación de grupos reductores traduciéndose en una disminución en la absorbancia a la longitud de onda antes mencionada.

Para el blanco se colocó en el tubo 500 μ L de la solución ASB y 1000 μ L de PBS-NaCl, se tomaron 500 μ L de esta mezcla y se colocaron en un tubo de reacción, se ajustó el espectrofotómetro a cero de absorbancia en 540 nm y se tomó la primera lectura de todos los tubos restantes. Posteriormente se agregó 500 μ L de la solución de almidón y se dejó incubando 3 min a 25 °C, enseguida se añadió 1 mL de DNSA y se colocó en baño de agua en ebullición por 5 min más, trascurrido el tiempo se retiró del baño, se dejó enfriar y se diluyó con 10 mL de agua destilada. Se ajustó nuevamente a cero de absorbancia a 540 nm para proseguir a tomar la segunda lectura de todos los tubos restantes.

Para el ensayo del 100 % de actividad (control enzimático) se colocó en un tubo 500 μ L de solución de Albúmina Sérica Bovina (ASB) 3 mg/mL, 250 μ L de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.02 M a pH 6 y 750 μ L de solución de PBS con NaCl 6 mM (PBS-NaCl); posteriormente se tomaron 500 μ L de esta mezcla y se colocaron en un tubo de reacción de vidrio al cual se le midió la absorbancia a 540 nm (blanco). Se añadió al tubo de reacción 500 μ L de almidón 1 % p/v y se dejó incubando por 3 min a 25 °C y una vez transcurrido el tiempo se agregó 1 mL de solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico 3.65 mM (DNSA). Se colocó el tubo de reacción en un baño de agua en ebullición e incubó por 5 min. Una vez enfriado el tubo, se diluyó con 10 mL de agua destilada y se midió una vez más la absorbancia a 540 nm (final).

Para el ensayo de las muestras (concentración final de 2.08, 4.16, 6.25, 8.33 y 10.41 μ g/mL) se colocaron cinco tubos con 750 μ L de solución PBS-NaCl, al primer tubo se agregó un volumen de 750 μ L de muestra disuelta (1 mg/mL) y se mezcló, posteriormente se tomaron 750 μ L del primer tubo y se agregaron al segundo haciendo una dilución seriada 1:2, esto se repitió sucesivamente hasta el quinto tubo, del cual se tomaron 750 μ L y se desecharon. A continuación se tomaron 500 μ L de esta mezcla y se colocaron en un tubo de reacción de vidrio al cual se le midió la absorbancia a 540 nm (blanco). Se añadió al tubo de reacción 500 μ L de almidón 1 % y se dejó incubando por 3 min a 25 °C y una vez transcurrido el tiempo se agregó 1 mL de solución de DNSA. Se colocó el tubo de reacción en un baño de agua en

ebullición e incubó por 5 min. Una vez enfriado el tubo, se diluyó con 10 mL de agua destilada y se midió una vez más la absorbancia a 540 nm (final).

Para el ensayo del control positivo (concentración final de 2.5, 2.0, 1.5, 1.0 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$) se colocaron cinco tubos (con sus respectivos blancos) a los cuales se les añadió 25, 50, 75, 100 y 125 μL de acarbosa respectivamente, 250 μL de enzima, 500 μL de albúmina y la cantidad necesaria de solución PBS-NaCl para completar un volumen final de 1500 μL . Se tomó la primera lectura a 540 nm (blanco) y posteriormente se tomaron 500 μL de cada tubo y se colocaron en un nuevo tubo de vidrio respectivamente rotulado. A partir de este punto se continuó como se describe en el procedimiento del ensayo del 100 % de actividad.

4.2.4 Ensayo de inhibición de α -glucosidasa

Se realizó según el procedimiento reportado por Subramanian con algunas modificaciones, mediante el cual se determinó la concentración inhibitoria máxima media (CI_{50}) de las indenopirrolidinas sintetizadas para inhibir la enzima α -amilasa por medio de espectrofotometría UV-Vis. Los grupos p-nitrofenol liberados de la hidrólisis del p-nitrofenil- α -glucopiranosido por la α -glucosidasa, causarán un cambio de coloración en la solución el cual se mide

a 400 nm. Si el inhibidor de α -glucosidasa está presente en el sistema de ensayo habrá menos liberación de estos grupos traduciéndose en una disminución en la absorbancia a la longitud de onda antes mencionada.

Para el blanco se colocó en el tubo de reacción 500 μ L de la solución ASB y 250 μ L de p-NPG y se dejó incubando durante 5 min a temperatura ambiente, se ajustó el espectrofotómetro a cero de absorbancia en 400 nm y se tomó la primera lectura de todos los tubos restantes. Posteriormente se agregó 250 μ L de solución ASB y 2 mL de Na_2CO_3 (133.3 mM) y se ajustó nuevamente a cero de absorbancia a 400 nm para proseguir a tomar la segunda lectura de todos los tubos restantes.

Para el ensayo del 100 % de actividad (control enzimático) se colocó en el tubo de reacción 500 μ L de solución de Albúmina Sérica Bovina (ASB), 2 mg/mL y 250 μ L de solución de p-nitrofenil- α -glucopiranosido (p-NPG), 0.415 mM, se dejó incubando por 5 min a temperatura ambiente y una vez transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 400 nm (blanco). Posteriormente se agregó al tubo de reacción 250 μ L de α -glucosidasa (α -Gluasa) 100 mU/mL para proceder a incubar nuevamente durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se agregó al tubo de reacción 2 mL de Na_2CO_3 (133.3 mM) y se midió una vez más la absorbancia a 400 nm (final).

Para el ensayo de las muestras (concentración final de 41.6, 20.8, 10.4, 5.2 y 2.6 $\mu\text{g/mL}$) se colocaron cinco tubos con 500 μL de solución ASB, al primer tubo se agregó un volumen de 500 μL de muestra disuelta (1 mg/mL) y se mezcló, posteriormente se tomaron 500 μL del primer tubo y se agregaron al segundo haciendo una dilución seriada 1:2, esto se repitió sucesivamente hasta el quinto tubo, del cual se tomaron 500 μL y se desecharon. A continuación se añadieron 500 μL de solución ASB a cada uno de los cinco tubos y se mezclaron. De cada tubo se tomaron 500 μL y se traspasaron a otros cinco tubos limpios, se agregó 250 μL de p-NPG y se dejó incubando por 5 min a temperatura ambiente para posteriormente leer la absorbancia a 400 nm (blanco). Se realizaron con sus respectivos blancos de muestras, a las muestras se añadieron 250 μL de enzima y a los blancos se agregaron 250 μL de ASB y se dejaron incubando 15 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se añadió a todos los tubos de reacción 2 mL de Na_2CO_3 (133.3 mM) y se tomó la segunda lectura a 400 nm.

Para el ensayo del control positivo (concentración final de 250, 125, 62.5, 31.2 y 15.6 $\mu\text{g/mL}$) se tomaron cinco tubos a los que se les añadieron 500 μL de solución ASB. Al primer tubo se le adicionó un volumen de 500 μL de acarbosa disuelta (3 mg/mL) y se mezcló, posteriormente se tomaron 500 μL de este tubo y se agregaron al segundo haciendo una dilución seriada 1:2, esto se repitió sucesivamente hasta el quinto tubo, del cual se tomaron 500 μL y se desecharon. A partir de este punto se continuó como se describe en el procedimiento del ensayo del 100 % de actividad.

4.3 Materiales y equipo

Todos los disolventes utilizados: acetato de etilo, acetona, diclorometano, dimetilformamida, hexano, metanol y tolueno, fueron adquiridos comercialmente con grado ACS y marca *Sigma*[®].

Los reactivos: ácidos benzoicos (y sus derivados), acetato de paladio (II), benzaldehídos (y sus derivados), clorhidrato de homoalilamina, tricloruro de indio (InCl_3), carbonato de potasio (K_2CO_3), tert-butilisonitrilo, trietilamina, fueron comprados marca *Sigma*[®] con excepción de la homoalilamina (líquida), marca *Alfa Aesar*[®].

El curso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina utilizando cromatoplasmas de gel de sílice 60 F_{245} marca *Merck*[®]. En todos los experimentos se utilizó como revelador una lámpara de luz ultravioleta (*UVP*, modelo UVGL-15 de 365 y 254 nm). Para las cromatografías en columna se utilizó gel de sílice de malla 230-400 marca *Merck*[®].

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono 13 se obtuvieron en un equipo modelo *Bruker Avance DPX400* de 400 MHz, utilizando como disolvente CDCl_3 y tetrametilsilano como referencia. El

desplazamiento químico (δ) se expresa en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz).

5. RESULTADOS

5.1 Aductos de Ugi

La primera etapa de la ruta de síntesis propuesta consistió en la preparación de los aductos de Ugi (α -acilaminoamidas) **5** que resultaron al hacer reaccionar la amina **1a** o su clorhidrato **1b**, los aldehídos **2a** y **2b**, los ácidos carboxílicos **3a-d** y el isonitrilo **4** (Figura 13).

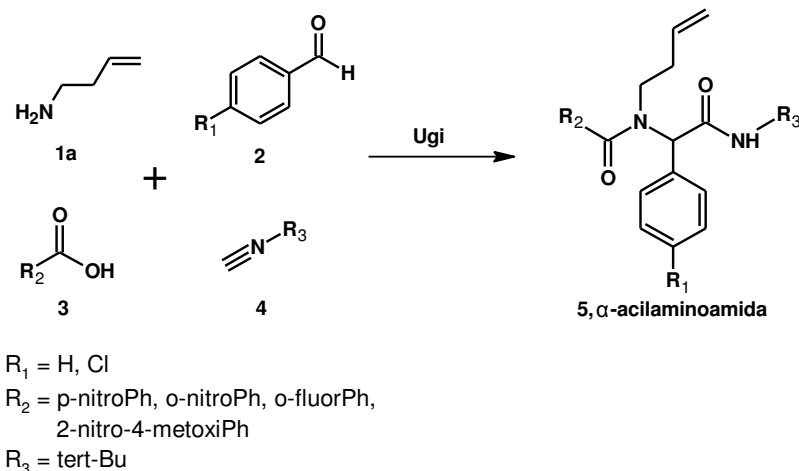
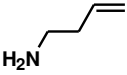
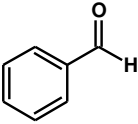
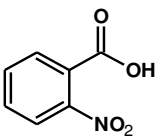

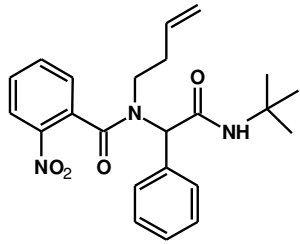
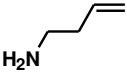
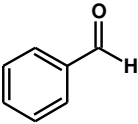
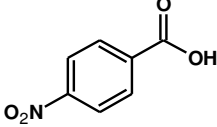

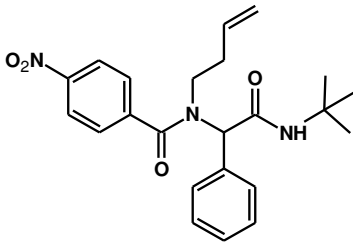
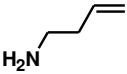
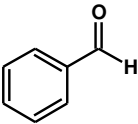
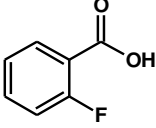

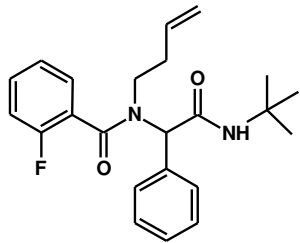


Figura 13. Esquema general de la reacción de Ugi

En condiciones clásicas de la reacción de Ugi (amina libre, metanol y temperatura ambiente) se obtuvieron los aductos **5a-c** en rendimientos de altos a casi cuantitativos (Tabla 1). El rendimiento casi cuantitativo se obtuvo con el

ácido 4-nitrobenzóico (*ejemplo II*) y el rendimiento más bajo se observó cuando se usó el ácido 2-fluorobenzóico (*ejemplo III*), del crudo de reacción no se recuperó ningún subproducto ni material de partida.

Tabla 1. Resultados de la reacción de Ugi utilizando la amina **1a**

| Amina | Aldehído | Ácido | Isonitrilo | Ugi |
|--|--|--|--|--|
|  I 1a |  2a |  3a |  4 |  5a, 85 % |
|  II 1a |  2a |  3b |  4 |  5b, 95 % |
|  III 1a |  2a |  3c |  4 |  5c, 72 % |

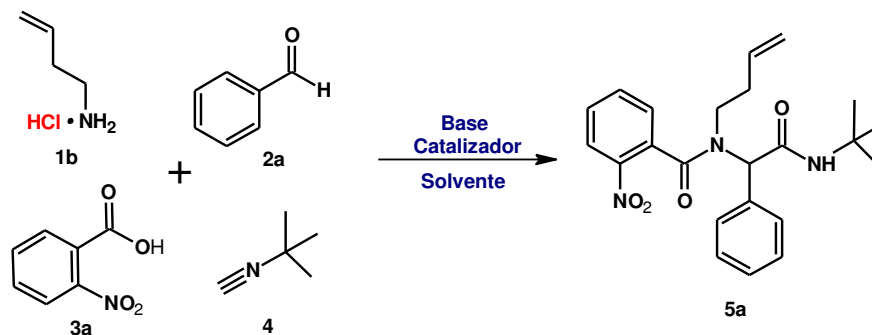
Condiciones de reacción: 1 equivalente de aldehído, 1 equivalente de amina, 1 equivalente de ácido y un equivalente de isonitrilo en metanol a temperatura ambiente por 48h.

Paralelamente se prepararon algunos aductos de Ugi con el clorhidrato de la homoalilamina **1b** para comprobar la efectividad de la reacción. Todos los

clorhidratos son sólidos y ofrecen las bondades de una mejor y amigable manipulación para el usuario. Además de evitar la posible evaporación de la amina en el medio de reacción.

Para la obtención de los productos de Ugi a partir del clorhidrato de la homoalilamina **1b**, se llevó a cabo una optimización de condiciones (*Tabla 2*). La reacción de Ugi entre el clorhidrato **1b**, benzaldehído **2a**, ácido 2-nitrobenzónico **3a** e isonitrilo **4** puede ocurrir sin ningún otro aditivo en rendimiento bajo (*experimento 1*) y la adición de un ácido de Lewis como el tricloruro de indio en cantidades catalíticas mejora ligeramente el rendimiento de la reacción. Por lo que se decidió incluirlo en los ejemplos posteriores que incluyen también una base. De acuerdo a la literatura cuando son usados los clorhidratos en las reacciones de Ugi, en la mayoría de los casos, es necesaria una base no nucleofílica para aumentar los rendimientos. El carbonato disminuye drásticamente los rendimientos de 27 % a 8 % y cuando se usa como disolvente una mezcla agua-diclorometano no se lleva a cabo la reacción (*experimentos 3 y 4*). La trietilamina (TEA) también disminuyó el rendimiento de la reacción en metanol (*experimento 5*), ligeramente se aumentó en tolueno (*experimento 6*) y se duplicó el rendimiento cuando la reacción se realizó en diclorometano (DCM, *experimento 7*). De manera que los rendimientos más altos con el clorhidrato de la amina se obtuvieron en una mezcla equimolar de los cuatros componentes en DCM, equivalentes de TEA y tricloruro de indio como catalizador. Estas condiciones fueron usadas para la preparación de los aductos de Ugi **5d-f**.

Tabla 2. Optimización de condiciones utilizando el clorhidrato de la amina

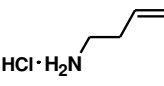
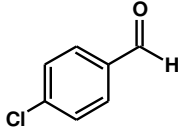
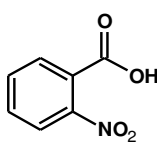

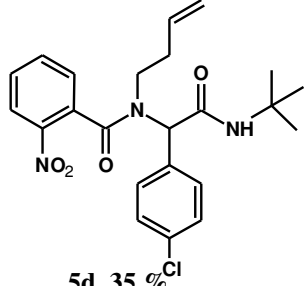
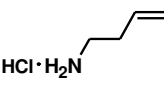
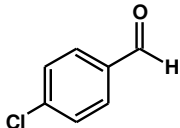
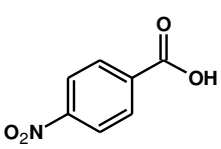

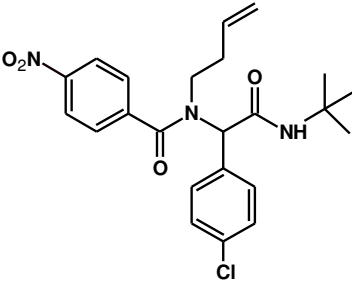
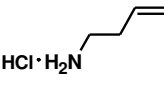
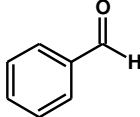
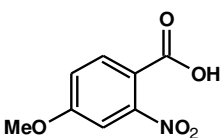

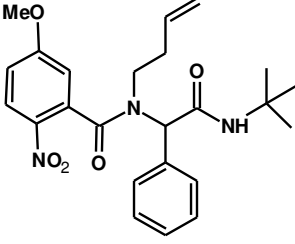


| Experimento | Solvente | Catalizador | Base | Rendimiento |
|-------------|------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------|
| 1 | MeOH | — | — | 24 % |
| 2 | MeOH | InCl ₃ | — | 27 % |
| 3 | MeOH | InCl ₃ | K ₂ CO ₃ | 8 % |
| 4 | H ₂ O / DCM | InCl ₃ | K ₂ CO ₃ | 0 % |
| 5 | MeOH | InCl ₃ | TEA | 14 % |
| 6 | Tolueno | InCl ₃ | TEA | 37 % |
| 7 | DCM | InCl ₃ | TEA | 50 % |

Como se esperaba, los rendimientos de las reacciones para la preparación de los aductos de Ugi **5d-f** a partir el clorhidrato **1b** en general fueron moderados, (*Tabla 3*). Aun así, pudieron obtenerse en buena cantidad para su posterior modificación y con grupos sustituyentes como los grupos nitro o el cloro en los grupos bencílicos, que facilitarán la siguiente reacción de ciclación. El rendimiento fue ligeramente más bajo cuando se usó el p-clorobenzaldehído **2b** (*ejemplo I*), usando el mismo aldehído **2b** el rendimiento mejora un poco con el ácido p-nitrobenzoico **3b** (*ejemplo II*) y

finalmente, el rendimiento continuó siendo ligeramente más bajo cuando se usó el ácido 2-nitro-5-metoxibenzoico **3d** (ejemplo III) comparado el ácido p-nitrobenzoico **3b**.

Tabla 3. Resultados de la reacción de Ugi utilizando el clorhidrato de la amina

| Amina | Aldehído | Ácido | Isonitrilo | Ugi |
|--|--|--|---|--|
|  I 1b |  2b |  3a |  4a |  5d, 35 % |
|  II 1b |  2b |  3b |  4a |  5e, 43 % |
|  III 1b |  2a |  3d |  4a |  5f, 39 % |

Condiciones de reacción: 1 equivalente de aldehído, 1 equivalente de amina, 1 equivalente de ácido, un equivalente de isonitrilo, 5 % de InCl_3 y 2.0 equivalentes de TEA en DCM a temperatura ambiente por 48 h.

5.2 Indenopirrolidinas

La segunda etapa en la ruta de síntesis propuesta consistió en la conversión de los aductos de Ugi **5a-f** a las indenopirrolidinas deseadas **6a-f** mediante un proceso de ciclación oxidativo asistido por paladio. Los aductos de Ugi **5a-f** se mezclaron con carbonato de potasio (K_2CO_3) y acetato de paladio ($Pd(OAc)_2$) catalítico en dimetilformamida (DMF) y se calentaron a 110 °C en presencia de oxígeno. (Figura 14).

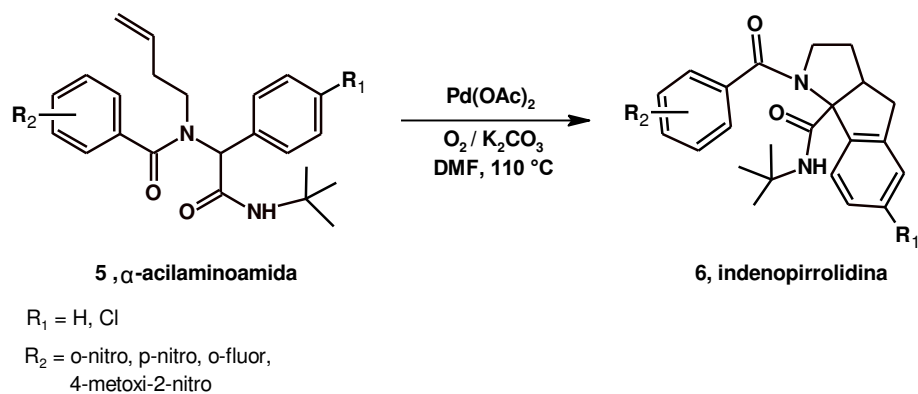


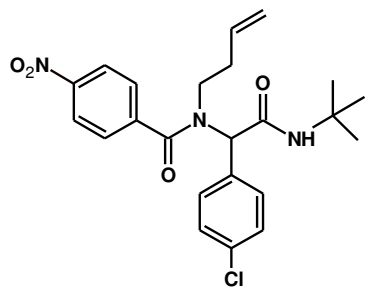
Figura 14. Esquema general de la reacción de ciclación asistida por Pd

Los resultados de la ciclación de paladio de los aductos de Ugi **5a-b** y **5d-e** se muestran en la Tabla 4. Sin ninguna optimización en las condiciones de reacción las indenopirrolidinas **6a-d** fueron obtenidas en rendimientos bajos. La incorporación de grupos atractores de electrones como el cloro en los

aromáticos ligeramente mejoran el rendimiento (*ejemplo III y IV*). El rendimiento de la reacción de los aductos de Ugi **5b** y **5e** (*ejemplo II y IV*) que contienen un grupo nitro en posición *para* ligeramente es mayor a los que lo tiene en la posición *orto*. Cuando los aductos de Ugi **5c** y **5f** fueron sometidos a las condiciones de reacción previamente descritas no se observó la formación de su respectiva indenopirrolidina **6e** y **6f** (*ejemplo V y VI*), aparentemente el producto de Ugi no reaccionó.

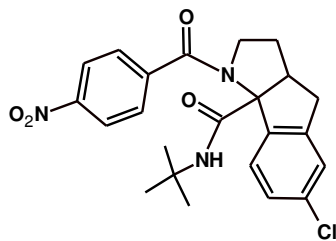
Tabla 4. Resultados de la reacción de ciclación asistida por paladio

| Aducto Ugi | Producto de ciclación |
|--|--|
| <p data-bbox="630 1171 662 1201">5a</p> | <p data-bbox="1052 1171 1156 1201">6a, 13 %</p> |
| <p data-bbox="630 1474 662 1503">5b</p> | <p data-bbox="1052 1474 1156 1503">6b, 15 %</p> |
| <p data-bbox="630 1801 662 1831">5d</p> | <p data-bbox="1052 1801 1156 1831">6c, 18 %</p> |

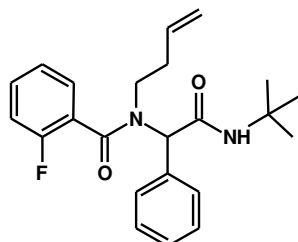


IV

5e

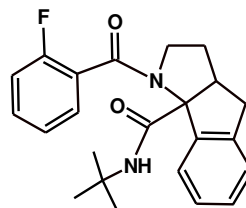


6d, 23%

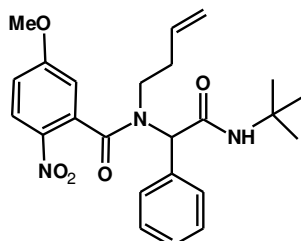


V

5c

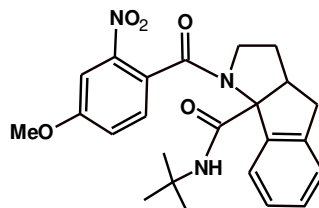


6e, 0 %



VI

5f



6f, 0 %

Condiciones de reacción: 2.0 equivalentes de K_2CO_3 , 5 % de $Pd(OAc)_2$, aire a 110 °C en dimetilformamida.

5.3 Evaluación de la actividad anti-hiperglicemiante

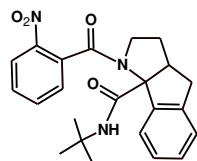
5.3.1 Ensayo de α -amilasa

Se determinó la inhibición enzimática de α -amilasa en un rango de concentraciones de 2.08 a 10.41 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los compuestos. Las cuatro indenopirrolidinas sintetizadas **6a-d** no mostraron actividad como inhibidores de la enzima α -amilasa incluso a las máximas concentraciones evaluadas (*Tabla 5*).

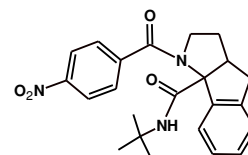
Tabla 5. Ensayo de inhibición de α -amilasa por las indenopirrolidinas.

| Compuesto | CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------------|---------------------------------------|
| 6a | > 10.41 |
| 6b | > 10.41 |
| 6c | > 10.41 |
| 6d | > 10.41 |
| Acarbosa (+) | 1.39 |

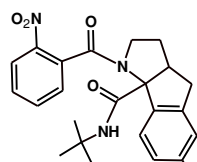
n = 3



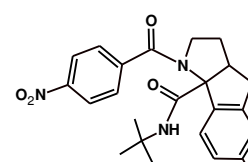
6a



6b



6c



6d

5.3.2 Ensayo de α -glucosidasa

Se determinó la inhibición enzimática de α -amilasa en un rango de concentraciones de 2.6 a 41.06 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los compuestos. Las cuatro indenopirrolidinas sintetizadas **6a-d** no mostraron actividad como inhibidores de la enzima α -amilasa incluso a las máximas concentraciones evaluadas (*Tabla 6*).

Tabla 6. Ensayo de inhibición de α -glucosidasa por las indenopirrolidinas.

| Compuesto | CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------------|--------------------------------|
| 6a | > 41.06 |
| 6b | > 41.06 |
| 6c | > 41.06 |
| 6d | > 41.06 |
| Acarbosa (+) | 188.1 |

n = 3

6a

6b

6c

6d

6. DISCUSIÓN

6.1 Aductos de Ugi

Desde 1959, Ugi reportó que los isonitrilos en presencia de una amina, un aldehído y un nucleófilo llevan a cabo reacciones de condensación para la generación de un solo producto. Los nucleófilos más comunes de esta reacción son los ácidos carboxílicos, los cuales juegan doble papel. Primero, protonan la imina resultante de la condensación entre el aldehído y la amina para facilitar la adición del isonitrilo y dar origen al ion nitrilo. Segundo, el carboxilato del ácido hace su función de nucleófilo y se adiciona al ion nitrilio para después de una transposición del grupo acilo (Mumm) generar el producto de Ugi.

Los ácidos carboxílicos aromáticos, en la reacción de Ugi, permiten generar una mayor diversidad de heterociclos mediante post-condensaciones conocidas. Por ejemplo, sustituciones nucleofílicas aromáticas con aductos de Ugi derivados del ácido *o*-fluorobenzóico o reducción/acilación de grupos nitro de los aductos de Ugi derivados del ácido *o*-nitrobenzóico para la preparación de quinoxalinas o benzodiazepinonas.

En el presente trabajo se prepararon aductos de Ugi con los ácidos *p*-nitrobenzoico **3b**, *o*-nitrobenzoico **3a**, ácido *o*-fluorobenzoico **3c**, y ácido 2-nitro-4-metoxibenzoico **3d**. Los tres últimos fueron seleccionados en base a su habilidad para formar benzodiazepindionas y que potencialmente pueden ser preparadas indenopirrolidinas unidas a este farmacóforo. Los productos de la reacción de Ugi con la homoalilamina **1a**, benzaldehído **2a**, ácido benzoico **3a-c** e isonitrilo **4** fueron obtenidos en rendimientos que van de acuerdo a los reportados en la literatura con materiales y condiciones similares (*Tabla 1*). El rendimiento de la reacción es ligeramente más alto cuando el grupo nitro se encuentra en posición *para*, lo cual nos indica que un efecto diferente a la acidez es el determinante en la reacción ya que no existe una relación con el pK_a de los ácidos usados. En general, los rendimientos de la reacción de Ugi fueron mejores con la amina libre **1a** en comparación con el hidrocloreto de la homoalilamina **1b** (*Tabla 2, experimento 1*). Los reportes que existen en la literatura sobre el uso de aminas en forma de sal refieren que en la reacción de Ugi no alterarán la obtención del producto deseado aunque diversas publicaciones reportan rendimientos menores.

Debido a los buenos resultados obtenidos en nuestro laboratorio con la adición catalítica de tricloruro de indio (InCl_3) a reacciones de Ugi, se adicionó un poco (0.1 equivalentes) a la reacción con el hidrocloreto **1b** y el rendimiento mejoró ligeramente (*Tabla 2 – experimento 2*). Aunque existen pocos reportes que describen el uso del tricloruro de indio en reacciones de Ugi, en la literatura se menciona la adición de varios ácidos de Brønsted y Lewis con buenos

resultados ya que mejoran los tiempos de reacción y los rendimientos de la reacción. En dichos reportes se estableció que los ácidos de Lewis en cantidades catalíticas ayudan a estabilizar el ion iminio, el cual es fundamental durante el mecanismo de reacción del aducto de Ugi. Por otro lado, existe la hipótesis que este tipo de ácidos de Lewis activan al aldehído para la formación de la imina mejorando así la reacción.

Otros reportes encontrados en la literatura describen el uso de más de un equivalente de bases orgánicas o inorgánicas en el medio de reacción con el fin de liberar la amina del hidrocloreuro para que fácilmente reaccione con los demás componentes. Particularmente, en los experimentos del presente trabajo el uso de una base inorgánica como el carbonato de potasio (*Tabla 2, experimento 3*) disminuyen el rendimiento de la reacción de 27% a 8%. Inclusive la incorporación de agua para facilitar la disolución de carbonato reduce a cero el rendimiento de la reacción. Aunque el carbonato de potasio en la mezcla agua-diclorometano es ampliamente usado para la liberación del grupo amino de los hidrocloreuros derivados de los aminoácidos en reacciones de acoplamiento, estas condiciones no favorecen las reacciones de multicomponentes de Ugi. Aparentemente, la trietilamina no mejora el rendimiento cuando la reacción se llevó a cabo en metanol, pero un cambio del disolvente eleva el rendimiento de 14 % a 37 % en tolueno y 50 % en diclorometano (*Tabla 2, experimento 6 y 7*). Usualmente, el éxito de la trietilamina en procesos similares depende del solvente en que se lleva a cabo la reacción (efecto disolvente).

Tres nuevos aductos de Ugi (*Tabla 3*) preparados a partir del clorhidrato **1b**, usando trietilamina en diclorometano fueron preparados en rendimientos relativamente bajos si se comparan con los rendimientos obtenidos de los Ugi preparados a partir de la amina libre **1a**. La reacción de Ugi está clasificada como un proceso eficiente principalmente porque involucra la formación de cuatro enlaces con la mínima generación de residuos. De manera que la obtención de los aductos **5d-f**, aunque sea en rendimientos moderadamente bajos representa un buen resultado la obtención del aducto de Ugi.

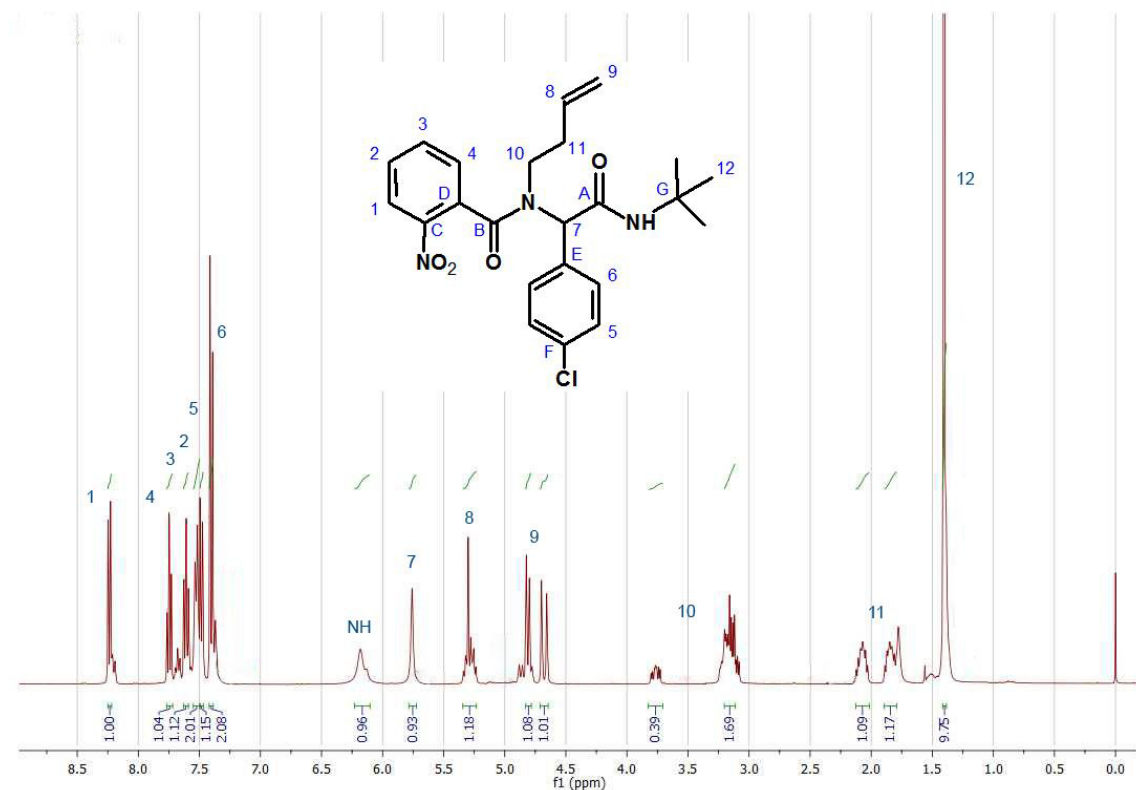
Se muestran solo los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de un aducto de Ugi (*Figuras 15 y 16*); en éstos se evidencian la formación del compuesto **5d**.

El espectro de ^1H (*Figura 15*) presenta todas las señales correspondientes al aducto de Ugi. En campos bajos se observan las señales de los grupos aromáticos con sus respectivos patrones de sustitución en *orto* y *para*. Las señales del aromático *orto* sustituido son las primeras en aparecer. Primero aparece un doblete en 8.24 ppm con una constante de acoplamiento de 8.2 Hz que integra para un hidrógeno, se asignó al protón H1. El siguiente protón aromático H4 aparentemente se observa como doble de triplete en 7.75 ppm con las constantes de acoplamiento de 7.5 y 1 Hz y la integración de la señal corresponde a un hidrógeno. Probablemente existe solapamiento que evita determinar su tercera constante de acoplamiento. La siguiente señal nuevamente aparece como un aparente doble triplete en 7.6 ppm con las constantes de acoplamiento de 8.5 Hz y 1.3 Hz que integra para un hidrógeno y

se designó para el tercer protón H3. Finalmente, existe un doble de dobles en 7.48 ppm con las constantes de acoplamiento de 7.6 y 1.2 Hz que integra para un hidrógeno y corresponde a H2. Todas estas señales en conjunto describen un sistema aromático *orto* sustituido ya que todas las constantes de acoplamiento concuerdan con lo reportado en la literatura. Las señales del sistema aromático *para* se observan en 7.52 y 7.40 ppm con una constante de acoplamiento de 8.4 Hz, similar a lo reportado en la literatura. Ambas señales integran para 2 hidrógenos cada una y se asignaron a H5 y H6 respectivamente. Posteriormente aparece un singulete ancho de baja intensidad que corresponde al hidrógeno del NH. El siguiente singulete que aparece en 5.76 ppm que integra para 1 hidrógeno, dado su desplazamiento, se relaciona con el protón alfa de los aductos de Ugi. La aparición de esta señal justifica la obtención del producto de Ugi. En la zona de 5.34 a 5.24 ppm aparece una señal múltiple que integra para un hidrógeno y que corresponde al H8 de la olefina terminal. La siguiente señal que aparece como doble de dobles en 4.75 ppm con las constantes de acoplamiento de 9.8 y 17.1 Hz las cuales integra para un hidrógeno cada una y se asignó al H9. Cada señal se relaciona con el acoplamiento *cis* y *trans* con el protón H8. Los protones del primer metileno, H10 aparecen como dos señales debido a que son diasterotópicos unidos a la amida terciaria. El primer hidrógeno de H10 aparece como una señal de doble de dobles de dobles en 3.76 ppm con las constantes de acoplamiento de 16.2, 11.2 y 5.1 Hz que integra para un hidrógeno. El segundo hidrógeno de H10 aparece como una señal múltiple de 3.21 a 3.15 ppm que integra para un hidrógeno. A campos más altos aparecen dos señales múltiples de 2.12 a 2.03

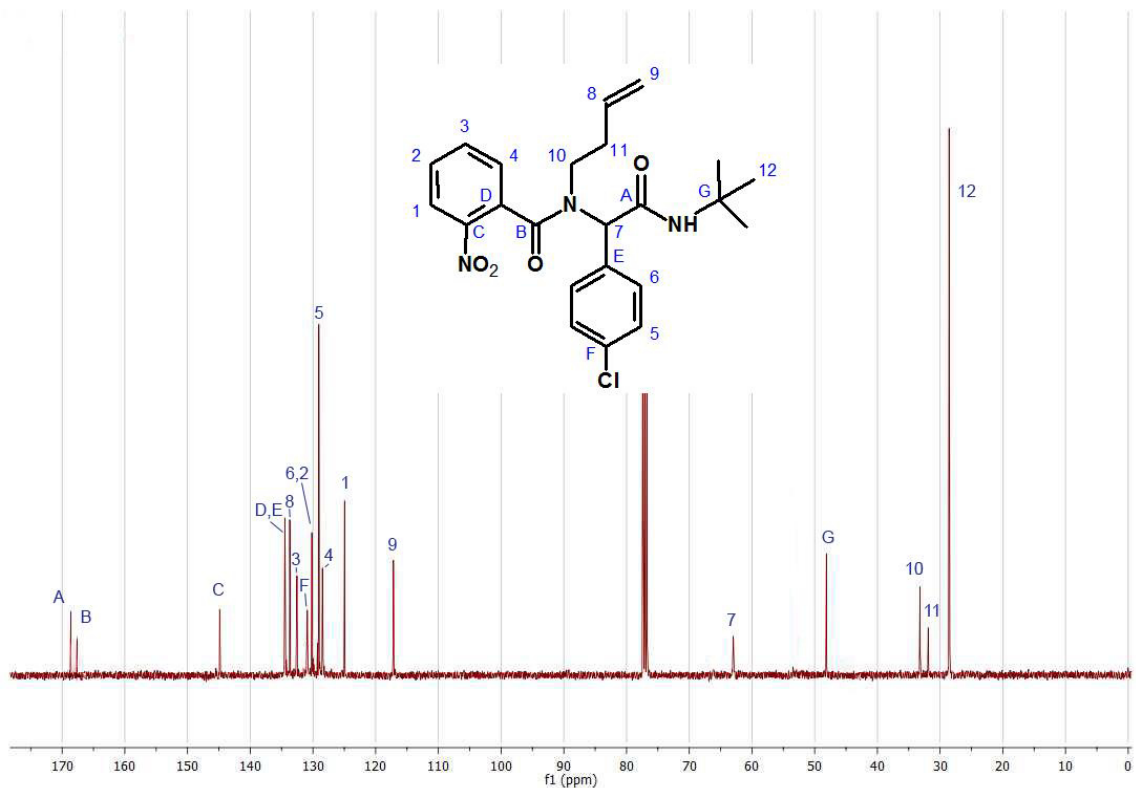
ppm y 1.89 a 1.80 ppm que corresponden a los protones del segundo metileno que también es diasterotópico. Finalmente, los 9 protones del grupo tert-butilo aparecen como singulete en 1.40 ppm.

Figura 15. RMN ^1H del aducto de Ugi **5d**



El espectro de ^{13}C (Figura 16) muestra todas la señales esperadas para el compuesto de Ugi **5d**. A campos bajos aparecen los carbonos de los grupos carbonílicos de amidas en 168.6 y 167.2 ppm asignados como C_A y C_B respectivamente. Posteriormente aparecen 12 señales de los carbonos aromáticos y olefínicos de 144.9 a 117.2 ppm. El carbono alfa característico de los aductos de Ugi aparece en 63.0 ppm. Además se observan las señales en 48.1, 33.2, 31.9 y 28.6 ppm asignadas para C_G , C_{10} , C_{11} y C_{12} respectivamente.

Figura 16. RMN ^{13}C del aducto de Ugi **5d**



6.2 Indenopirrolidinas

Las reacciones de multicomponentes con isonitrilos como las de Ugi son procesos sintéticamente muy poderosos para la preparación de compuestos estructuralmente diversos. El gran potencial de estas reacciones puede extenderse exponencialmente mediante transformaciones posteriores que deben su éxito a la elaboración de compuestos que contienen grupos

funcionales en posiciones adecuadas para que reaccionen con la adición de más reactivos.

Los aductos de Ugi **5a-f** preparados en este trabajo fueron diseñados para llevar a cabo una reacción de ciclación oxidativa en cascada asistida por paladio en la cual se forman dos nuevos enlaces más y dan origen al poliheterociclo del tipo indenopirrolidina. Las porciones claves en estos aductos de Ugi es un grupo homoalil proveniente de la amina y aromático del grupo aldehído.

Los aductos de Ugi **5a-f** fueron sometidos a las condiciones iniciales de reacción: 2.0 equivalentes de K_2CO_3 , 5 % de $Pd(OAc)_2$, aire a 110 °C en dimetilformamida (DMF) que no fueron optimizadas. Cuatro indenopirrolidinas **6a-d** fueron obtenidas en rendimientos relativamente bajos, los más altos provienen de los aductos de Ugi que contienen aromáticos con grupos deficientes de electrones. Aparentemente los grupos electroattractores como el grupo nitro y cloro favorecen esta reacción. Se observó un ligero aumento en el rendimiento de reacción cuando se usaron los aductos **5d** y **5e** que contienen el cloro en el segundo aromático. De acuerdo al mecanismo probable, los grupos electroattractores pueden aumentar la acidez del protón alfa facilitando la generación del enolato de paladio de los aductos de Ugi.

Los aductos de Ugi **5c** y **5f** en las condiciones antes mencionadas no sufren ninguna transformación, se recupera únicamente la materia prima del

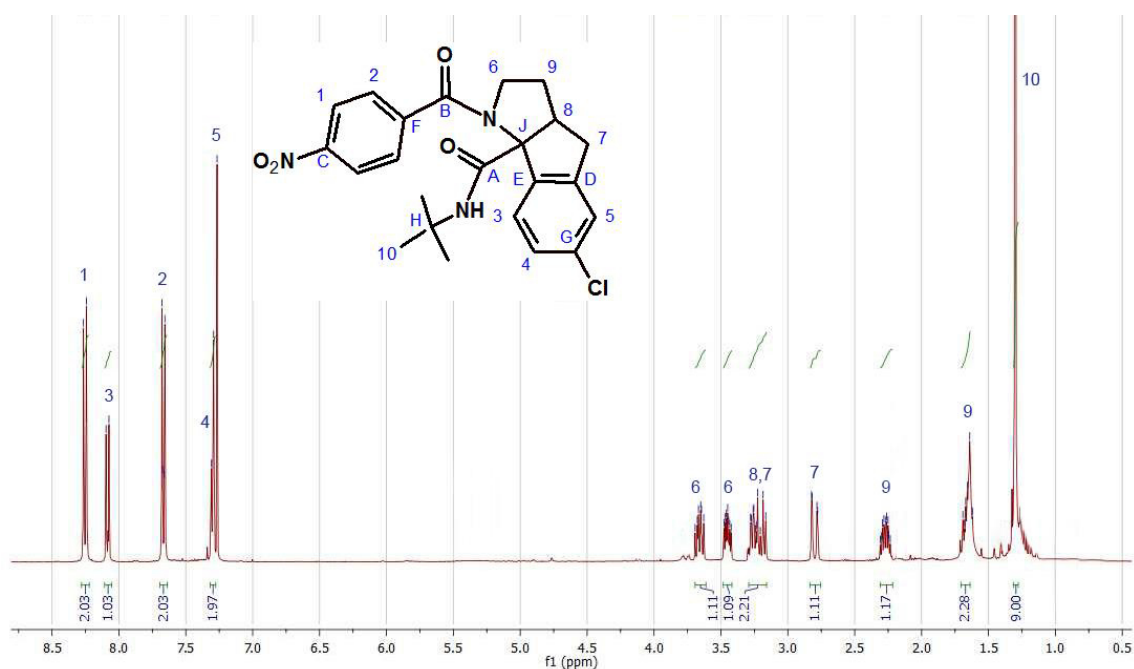
crudo de reacción. El grupo flúor del aducto de Ugi **5c** no es lo suficientemente electronegativo para provocar la desprotonación del hidrógeno alfa y causar la ciclación. En el caso del Ugi **5f** el grupo metoxilo puede estar contrarrestando el efecto electroattractor del grupo nitro.

Se muestran los espectros típicos de ^1H y ^{13}C (*Figuras 17 y 18*) de una indenopirrolidina; en éstos se demuestra la formación del compuesto **6d**.

El espectro de ^1H (*Figura 17*) presenta todas las señales esperadas para el compuesto **6d**. A campos bajos se observan las señales que corresponden a los protones de los grupos aromáticos. Primero aparece un doblete a 8.25 ppm con una constante de acoplamiento de 8.7 Hz que integra para dos hidrógenos asignado a H1 y por su valor se asume que se acopla con el doblete en 7.66 ppm que integra para el mismo número de hidrógenos asignado a H2. La señal doble que se encuentra en 8.08 ppm con una constante de acoplamiento de 8.9 Hz que integra para un hidrógeno se asignó al protón H3. Los protones H4 y H5 aparecen como un par de señales anchas muy juntas en 7.31 y 7.29 ppm, cada una integra para un hidrógeno. La evidencia en la formación de la indenopirrolidina se demuestra con la desaparición de las señales del protón alfa del producto de Ugi, la ausencia de señales olefínicas y la modificación en el sistema aromático *para* cloro. A campos más altos aparecen las señales que componen el núcleo de la indenopirrolidina. El metileno diasterotópico del protón H6 se observa como dos señales múltiples en 3.69-3.63 ppm y 3.47-3.42 ppm. El metino H8 importante para determinación de la indenopirrolidina

aparece como señal múltiple de 3.28 a 3.23 ppm. El metileno de los protones H7 se divide en dos señales dobles en 3.19 y 2.80 ppm con constantes de acoplamiento de 16.3 Hz que integran cada una para un hidrógeno. El metileno de los hidrógenos H9 aparece como dos señales múltiples (2.31 - 2.23 ppm y 1.70 - 1.61 ppm) que integra para un hidrógeno cada uno. Finalmente en 1.30 ppm aparece un singulete que integra para 9 hidrógenos correspondiente al grupo tert-butilo.

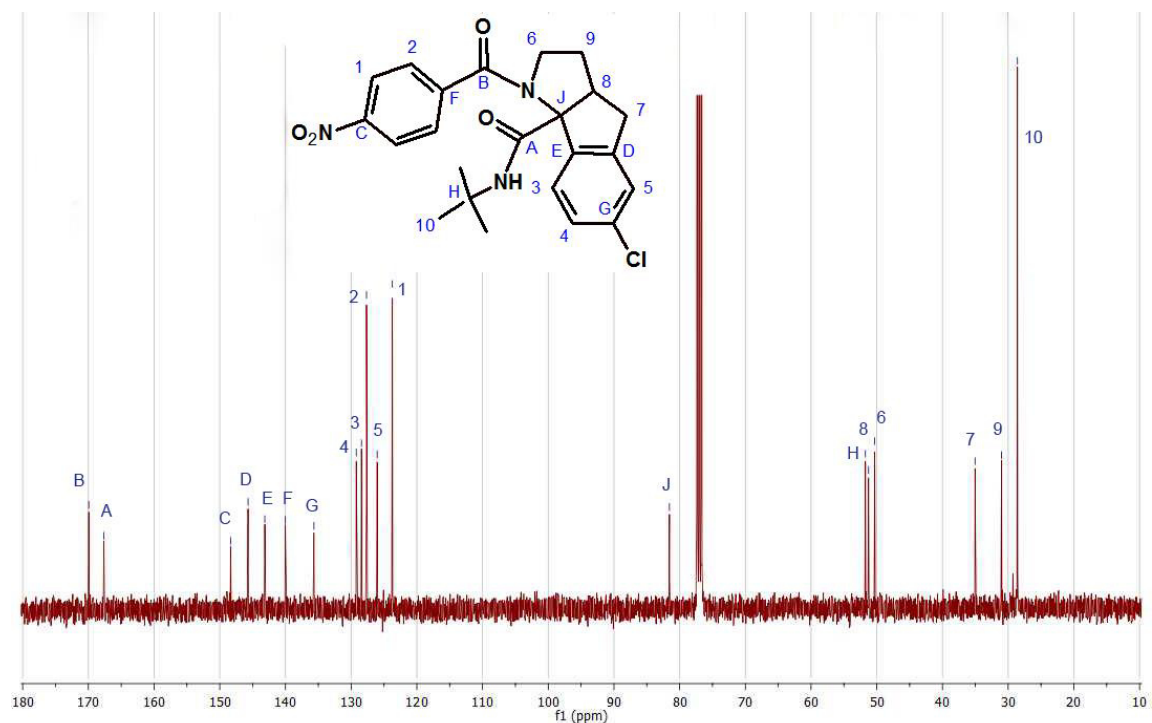
Figura 17. RMN ^1H de la indenopirrolidina **6d**



Todas las señales que se esperan para la indenopirrolidina **6d** aparecen en el espectro de ^{13}C (Figura 18). Primeramente aparecen en 167.6 y 169.9 ppm los carbonos carbonílicos de las amidas C_A y C_B respectivamente. Después aparecen los 5 carbonos aromáticos sustituidos de 148.3 a 135.7 ppm,

aquí se incluye el nuevo carbono sustituido durante la reacción C_D. De 129.3 a 123.7 ppm aparecen 5 señales de los carbonos aromáticos restantes, C₄, C₃, C₂, C₅ y C₁. En el espectro aparece una señal que corresponde por desplazamiento al carbono cuaternario (C_J) en 81.6 ppm, la cual permite confirmar la formación del policiclo. El segundo carbono cuaternario del grupo tert-butilo C_H aparece en 51.7 ppm. Las señales en 51.3, 50.3, 35.0 y 31.0 ppm se asignaron a los carbonos C₈, C₆, C₇ y C₉ del núcleo indenopirrolidina. Por último está la señal originada de los carbonos terbutílicos presente a 28.6 ppm.

Figura 18. RMN ¹³C de la indenopirrolidina **6d**



6.3 Evaluación biológica

Los bioensayos existen como una forma alternativa para la evaluación biológica de compuestos. Éstos nos proveen de una metodología fiable para asignar determinada actividad biológica de acuerdo a los objetivos planteados o el problema a resolver. En este trabajo se realizaron estudios *in vitro* basándose en la inhibición enzimática de α -amilasa y α -glucosidasa que pueden indicar actividad antidiabética de las moléculas sintetizadas.

Las indenopirrolidinas sintetizadas fueron purificadas mediante una cromatografía preparativa. Para confirmar la pureza de las mismas se verificó mediante la limpieza de las señales en los espectros de RMN de hidrógeno y carbono 13.

En el ensayo de inhibición de α -amilasa, los compuestos **6a-d** no mostraron actividad en el rango de concentraciones probadas (2.08 a 10.41 $\mu\text{g/mL}$). Asimismo, en el ensayo de inhibición de α -glucosidasa los compuestos no mostraron actividad biológica en el rango de concentraciones evaluadas (2.6 a 41.06 $\mu\text{g/mL}$). Por lo que las IC_{50} de los compuestos son mayores a 10.41 $\mu\text{g/mL}$ y a 41.06 $\mu\text{g/mL}$ para cada los ensayos de α -amilasa y α -glucosidasa respectivamente.

Idealmente las IC_{50} deben ser igual o menor que los valores encontrados del control positivo, 1.39 $\mu\text{g/mL}$ para el ensayo de α -amilasa y de 188.1 $\mu\text{g/mL}$ para el de α -glucosidasa. En ambos ensayos se utilizó la acarbosa como control positivo ya que se éste compuesto se refiere como estándar al evaluar la actividad antidiabética de un nuevo compuesto. Se pueden garantizar los resultados de las muestras al comparar los resultados obtenidos del control positivo con los valores reportados en la literatura. En este caso 4.89 ± 0.397 $\mu\text{g/mL}$ para el ensayo de α -amilasa y 193 ± 0.281 $\mu\text{g/mL}$ para el ensayo de α -glucosidasa. En general, un compuesto puro podría considerarse atractivo cuando muestre valores de IC_{50} semejantes al fármaco en uso.

La inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa disminuyen la concentración de glucosa en sangre ya que los carbohidratos de la dieta no pueden ser metabolizados. Por tanto, su inhibición está relacionada con la actividad antihiper glucémica. Los resultados obtenidos no descartan su posible uso como agentes antidiabéticos en general, sino que solo desechan esta vía de acción ya que la actividad antidiabética de un fármaco puede involucrar otros mecanismos o procesos totalmente diferentes. Solo se ha demostrado el efecto anti-hiperglicemiante en modelos animales por vía oral y no se han realizado más ensayos que orienten a un posible mecanismo por el cual presentaron dicha actividad. Por lo que el excluir esta vía es un inicio en el camino de la evaluación de este tipo de compuestos para lograr identificar el blanco biológico responsable de la actividad.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1 Conclusiones

Los rendimientos de la reacción de Ugi fueron mejores con la amina libre (líquida) que con el clorhidrato de la misma.

El uso de un catalizador (InCl_3) en la reacción de Ugi aumenta los rendimientos de la reacción.

La adición de trietilamina en la reacción de Ugi con el clorhidrato de la amina, aumenta moderadamente los rendimientos cuando se usa diclorometano como disolvente.

La reacción de ciclación asistida por paladio se favorece cuando los grupos aromáticos del aducto de Ugi presentan al menos un grupo electroattractor fuerte que estabilice el intermediario en la formación del policiclo. Un segundo grupo electroattractor mejora ligeramente los rendimientos.

Las indenopirrolidinas **6a-d** no mostraron actividad *in vitro* como inhibidores de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa a las concentraciones probadas.

7.2 Perspectivas

Llevar a cabo la optimización de condiciones para mejorar los rendimientos obtenidos en la reacción de ciclación asistida por Pd, evaluando diferentes bases, agentes oxidantes y solventes, así como el uso de radiación microondas como forma alternativa de calentamiento de la reacción.

Llevar a cabo una tercera reacción para lograr la incorporación de grupos farmacóforos a la estructura de la indenopirrolidina e incrementar la complejidad de la misma.

Evaluar las indenopirrolidinas en otros ensayos indicadores de actividad antidiabética, tanto *in vitro* e *in vivo* que orienten al posible mecanismo por el cual este tipo de compuestos presentaron actividad hipoglucemiante oral en modelos animales. Así como explorar su potencial biológico de una forma más amplia mediante otros ensayos indicadores de actividad biológica.

8. BIBLIOGRAFÍA

Biswal, S. et. al., *Asian J. of Pharm. And Clinical Research*. **2011**; 5, 1 – 6.

Bonne, Damien. et al., *Org. Lett.* **2004**; 6, 4771 – 4774.

Chandra, Samir. et. al., *J. Indian Chem.* **1965**; 8, 131 – 133.

Chandra, Subhas P. et. al., *Angew. Chem.* **2008**; 47, 3622 – 3625.

Che, Chao. et. al., *ACS* **2013**; 15, 202 – 207.

Cioc, Razvan C. et. al., *Green Chem* **2014**; 16, 2958 – 2975.

Dobson, Christopher M. et. al., *Nature* **2004**; 432, 824 – 828.

Dömling, A.; Ugi. et. al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**; 29, 3168 – 3210.

Edenborough, M. et. al., *Nat. Prod. Rep.* **1988**; 55, 229 – 245.

El Kaim, Laurent. et al., *Tetrahedron* **2009**; 65, 2153 – 2171.

El Kaim, Laurent. et. al., *Mol Divers* **2010**; 14, 855 – 867.

El Kaïm. et. al., *Chem. Comm.* **2008**; 1, 1350 – 1352.

El Kaim. et. al., *Chem. Int.* **2005**; 44, 7164 – 7166.

Erb W., Neuville. et al., *J. Org. Chem.* **2009**; 74, 3109 – 3115.

Frode, T. S. et. al., *Journal of Ethnopharmacology* **2008**; 115, 173 –183.

Gámez-Montaño, Rocío. et. al., *Synthesis* **2010**; 8, 1285 – 1290.

Godet, T. et. al., *Org. Lett.* **2004**; 6, 3182 – 3184.

Hulme, C. et. al., *Current Medicinal Chemistry* 2003; 10, 51 – 80.

Kirkpatrick, Peter. et. al., *Nature* 2004; 432, 823 – 831.

Marcaccini, Stefano. et. al., *Nat. Protocols* **2007**; 2, 632 – 639.

- Mohamed, Elsnoussi Ali. et. al., *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2012**; 12, 176 – 183.
- Nickavar, Bahman. et. al., *Iranian J. of Pharmaceutical Research* **2008**; 7, 297 – 303.
- Okandeji, Babajide O. et. al., *J. Org. Chem.* **2008**; 73, 5595 – 5597.
- Pando, Orlando. et. al., *ACS* **2011**; 133, 7692 – 7695.
- Passerini, M. Gazz. et. al., *Chim. Ital.* **1921**; 51, 126 – 129.
- Passerini, M. Gazz. et. al., *Chim. Ital.* **1921**; 51, 181 – 188.
- Saha, B.P. et. al., *J. of Pharm. Sciences.* **1973**; 62, 1363 – 1364.
- Schreiber, Stuart L. et. al., *PNAS* **2011**; 108, 6699 – 6702.
- Seethala, Ramakrishna & Fernandes, Prabhavathi B. *Handbook of Drug Screening.* Marcel Dekker **2001**.
- Sternativo, Silvia. et. al., *Tetrahedron* **2012**; 68, 10536 – 10541.

Subramanian, Rammohan. et al., *Acta Bioch. Pol.* **2008**, 55, 391 – 398.

Sunderhaus, J. et al., *Chem. Eur. J.* **2009**; 15, 1300 – 1308.

Tumanov, V. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**; 46, 3563 – 3566.

Vogel, H. Gerhard. *Drug Discovery and Evaluation, Pharmacological Assays.* Springer **2002**.

Welsch, Matthew H. et. al., *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**; 14, 347 –361.

Zhao, Wenjun. et al., *Angew. Chem.* **2014**; 126, 3504 – 3509.

Zhu, J. Eur. et. al., *J. Org. Chem.* **2003**; 1133 – 1144.

Zhu, Jieping & Bienaymé, Hugues. *Multicomponent Reactions.* Wiley-VCH **2005**.

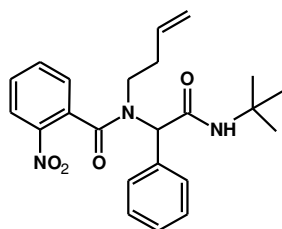
APÉNDICE

Contenido:

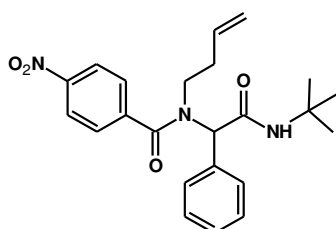
- Compuestos sintetizados
- Propiedades físicas y datos espectroscópicos

Compuestos sintetizados

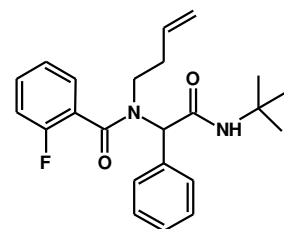
Aductos de Ugi preparados:



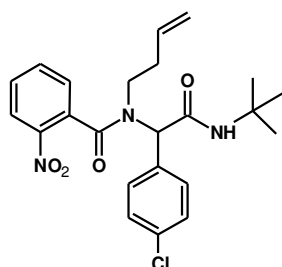
5a



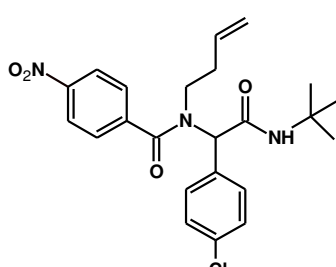
5b



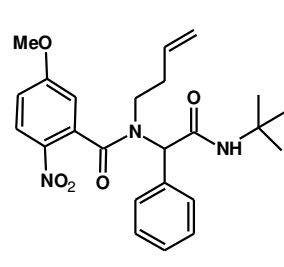
5c



5d

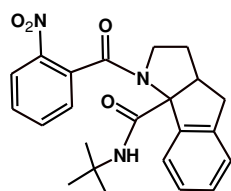


5e

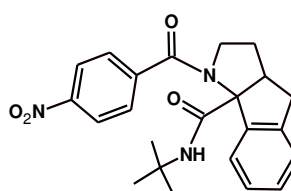


5f

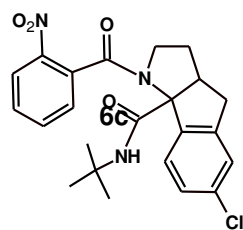
Indenopirrolidinas preparadas:



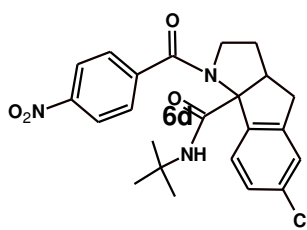
6a



6b



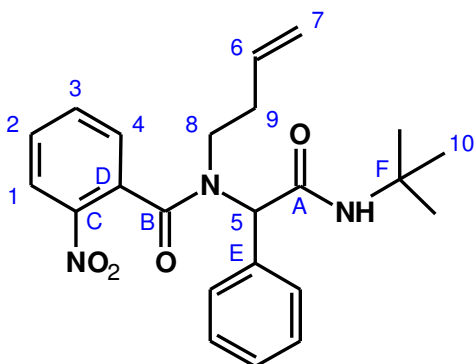
6c



6d

Propiedades físicas y datos espectroscópicos

Aductos de Ugi

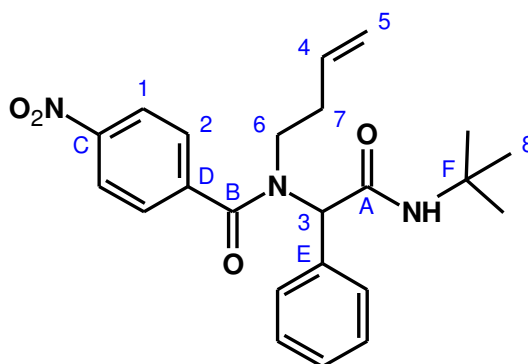


5a. N-*tert*-butil-2-(N-(3-butenil)2-(2-nitrofenil)acetamido)-2-fenilacetamida

Sólido blanco. Tiempo de reacción 1 día. 85 % de rendimiento.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.22 (d, 1H, $J=8.2$ Hz, H_1), 7.73 (dd, 1H, $J_1=7.5$ Hz, $J_2=0.9$, H_4), 7.61-7.52 (m, 2H, H_{2-3}), 7.45-7.36 (m, 5H, H_{Ar}), 6.06 (s, 1H, NH), 5.84 (s, 1H, H_5), 5.30-5.19 (m, 1H, H_6), 4.77-4.75 (d, $J=9.9$, 1H, H_7), 4.63-4.59 (d, 1H, $J=17.1$ Hz, H_7), 3.84-3.77 (m, 1H, H_8), 3.24-3.16 (m, 1H, H_8), 2.42-2.36 (m, 1H, H_9), 2.05-1.97 (m, 1H, H_9), 1.40 (s, 9H, H_{10}).

RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) δ 168.5 (C_B), 144.9 (C_C), 135.0 (C_D), 134.3 (C_E), 133.9 (C_6), 132.8 (C_3), 130.1 (C_2), 129.9 (C_{Ar}), 129.8 (C_{Ar}), 129.5 (C_{Ar}), 129.1 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 128.5 (C_4), 124.8 (C_1), 116.8 (C_7), 63.5 (C_5), 51.7 (C_F), 47.9 (C_8), 33.2 (C_9), 28.5 (C_{10}).

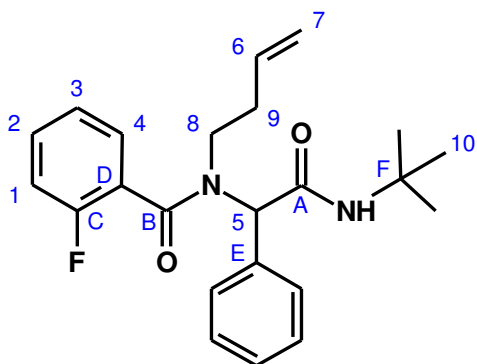


5b. N-*tert*-butil-2-(N-(3-butenil)2-(4-nitrofenil)acetamido)-2-fenilacetamida

Sólido blanco. Tiempo de reacción 1 día. 95 % de rendimiento.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.30 (d, 2H, *J*=8.3 Hz, H₁), 7.68 (d, 2H, *J*=7.9 Hz, H₂), 7.48-7.37 (m, 5H, H_{Ar}), 6.10 (s_a, 1H, NH), 5.83 (s, 1H, H₃), 5.33-5.21 (m, 1H, H₄), 4.80-4.76 (d, *J*=9.6, 1H, H₅), 4.65-4.60 (d, 1H, *J*=16.8 H₅), 3.89-3.78 (m, 1H, H₆), 3.28-3.20 (m, 1H, H₆), 2.44-2.39 (m, 1H, H₇), 2.10-2.02 (m, 1H, H₇), 1.38 (s, 9H, H₉).

RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃) δ 171.2 (C_A), 169.6 (C_B), 147.9 (C_C), 143.6 (C_D), 135.9 (C_E), 129.7 (C_{Ar}), 129.6 (C_{Ar}), 129.3 (C_{Ar}), 129.0 (C_{Ar}), 128.6 (C_{Ar}), 128.2 (C₄), 127.6 (C₂), 123.5 (C₁), 64.3 (C₅), 52.1 (C_F), 48.1 (C₆), 34.3 (C₇), 29.1 (C₈).

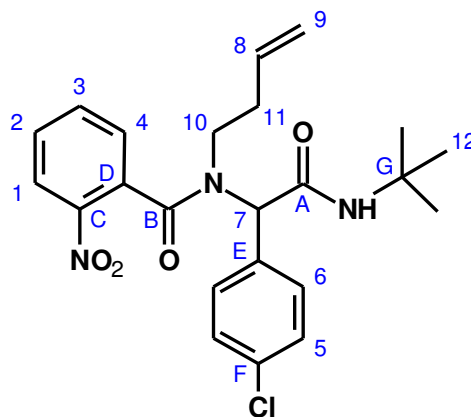


5c. N-*tert*-butil-2-(N-(3-butenil)-2-(2-fluorofenil)acetamido)-2-fenilacetamida

Sólido amarillento. Tiempo de reacción 1 día. 72 % de rendimiento.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.49 (d, 1H, $J=7.2$ Hz, H_4), 7.41-7.34 (m, 6H, $\text{H}_{2-\text{Ar}}$), 7.26-7.24 (m, 2H, H_2), 7.22-7.18 (m, 1H, H_3), 7.14-7.09 (m, 1H, H_1), 6.19 (s, 1H, NH), 5.95 (s, 1H, H_5), 5.28-5.17 (m, 1H, H_6), 4.77-4.74 (d, $J=10.1$, 1H, H_7), 4.62-4.58 (d, $J=17.1$, 1H, H_7), 3.26 (t, $J=8$, 2H, H_8), 2.01-1.92 (m, 1H, H_9), 1.67-1.58 (m, 1H, H_9), 1.38 (s, 9H, H_{10}).

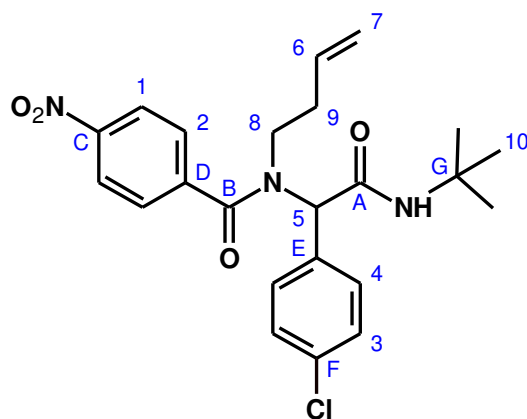
RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) δ 168.4 (C_A), 167.9 (C_B), 157.9 (C_C), 135.2 (C_E), 134.0 (C_6), 131.2 (C_2), 129.4 (C_{Ar}), 128.9 (C_4), 128.8 (C_{Ar}), 128.4 (C_{Ar}), 124.8 (C_3), 124.6 (C_D), 116.9 (C_7), 115.9 (C_1), 63.3 (C_5), 51.6 (C_F), 47.7 (C_8), 33.8 (C_9), 28.6 (C_{10}).



5d. N-*tert*-butil-2-(N-(3-butenil)2-(2-nitrofenil)acetamido)-2-(4-clorofenil)acetamida. Sólido blanco. Tiempo de reacción 3 días. 35 % de rendimiento.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.24 (d, 1H, $J=8.2$ Hz, H_1), 7.75 (dd, 1H, $J_1=7.5$ Hz, $J_2=1.0$, H_4), 7.61 (dd, 1H, $J_1=8.5$ Hz, $J_2=1.3$, H_3), 7.52 (d, 1H, $J_1=8.0$ Hz, H_5), 7.48 (dd, 2H, $J_1=7.6$ Hz, $J_2=1.2$, H_2), 7.4 (d, 2H, $J_1=8.5$ Hz, H_6), 6.18 (s_a , 1H, NH), 5.76 (s, 1H, H_7), 5.34-5.24 (m, 1H, H_8), 4.82-4.79 (m, 1H, H_9), 4.70-4.65 (m, 1H, H_9), 3.80-3.73 (m, 1H, H_{10}), 3.21-3.15 (m, 1H, H_{10}), 2.12-2.03 (m, 1H, H_{11}), 1.89-1.80 (m, 1H, H_{11}), 1.40 (s, 9H, H_{12}).

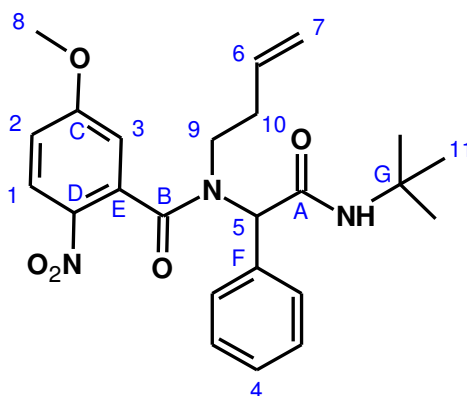
RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) δ 168.6 (C_A), 167.2 (C_B), 144.9 (C_C), 134.6 (C_D), 134.4 (C_E), 133.7 (C_8), 132.6 (C_3), 131.5 (C_F), 130.9 (C_6), 130.2 (C_2), 129.1 (C_5), 128.5 (C_4), 124.9 (C_1), 117.2 (C_9), 63.0 (C_7), 48.1 (C_G), 33.2 (C_{10}), 31.9 (C_{11}), 28.6 (C_{12}).



5e. N-*tert*-butil-2-(N-(3-butenil)2-(4-nitrofenil)acetamido)-2-(4-clorofenil)acetamida. Sólido blanco. Tiempo de reacción 3 días. 43 % de rendimiento.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (d, 2H, *J*=8.5 Hz, H₁), 7.61 (d, 2H, *J*=7.5 Hz, H₂), 7.40 (s, 4H, H₃₋₄), 5.88 (s_a, 1H, NH), 5.74 (s, 1H, H₅), 5.20-5.09 (m, 1H, H₆), 4.80-4.71 (m, 1H, H₇), 4.61-4.53 (m, 1H, H₇), 3.33-3.23 (m, 2H, H₈), 1.91-1.80 (m, 1H, H₉), 1.60-1.49 (m, 1H, H₉), 1.34 (s, 9H, H₁₀).

RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃) δ 170.5 (C_A), 168.2 (C_B), 148.1 (C_C), 142.9 (C_D), 135.0 (C_E), 133.7 (C₆), 129.6 (C_F), 129.1 (C₃), 129.1 (C₄), 127.7 (C₂), 123.8 (C₁), 117.1 (C₇), 63.3 (C₅), 51.8 (C_G), 47.7 (C₈), 34.1 (C₉), 28.6 (C₁₀).

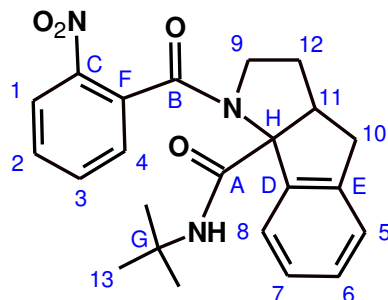


5f. N-*tert*-butil-2-(N-(3-butenil)-2-(5-metoxi-2-nitrofenil)acetamido)-2-fenil acetamida. Sólido blanco. Tiempo de reacción 3 días. 39 % de rendimiento.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.08 (d, 1H, $J=7.0$ Hz, H_1), 7.69 (d, 1H, $J=2.5$ Hz, H_3), 7.55 (d, 1H, $J=7.3$ Hz, H_2), 7.45-7.35 (m, 4H, H_{Ar}), 7.22 (dd, 1H, $J_1=8.5$ Hz, $J_2=2.5$, H_4), 6.12 (s, 1H, H_5), 5.83 (s_{a} , 1H, NH), 5.31-5.21 (m, 1H, H_6), 4.79-4.76 (d, 1H, $J=9.6$ Hz, H_7), 4.66-4.62 (dd, 1H, $J_1=17.1$ Hz, $J_2=1.2$, H_7), 3.91 (s, 3H, H_8), 3.25-3.10 (m, 2H, H_9), 2.07-1.98 (m, 1H, H_{10}), 1.79-1.69 (m, 1H, H_{10}), 1.40 (s, 9H, H_{11}).

RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) δ 168.7 (C_A), 168.4 (C_B), 160.4 (C_C), 146.1 (C_D), 135.2 (C_E), 134.0 (C_F), 133.3 (C_6), 129.6 (C_{Ar}), 128.9 (C_{Ar}), 128.5 (C_4), 125.0 (C_1), 120.6 (C_2), 116.8 (C_7), 109.4 (C_3), 63.6 (C_5), 56.1 (C_8), 51.8 (C_G), 48.1 (C_9), 33.3 (C_{10}), 28.6 (C_{11}).

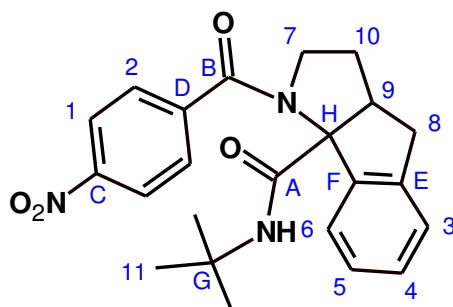
Indenopirrolidinas



6a. N-*tert*-butil-1-(2-nitrobenzoi)-2,3,3a,4-tetrahidroindeno[1,2-*b*]pirrol-8b (1*H*)-carboxamida. Sólido amarillo. Tiempo de reacción 4 horas. 13 % de rendimiento.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.17 (d, 1H, *J*=8.2 Hz, H₁), 8.11-8.09 (m, 1H, H₄), 7.71 (dd, 1H, *J*₁=7.5 Hz, *J*₂=0.8, H₃), 7.57-7.52 (m, 2H, H₂₋₅), 7.37-7.32 (m, 2H, H₆₋₇), 7.28-7.26 (m, 1H, H₈), 5.78 (s_a, 1H, NH), 3.52-3.46 (m, 1H, H₉), 3.34-3.25 (m, 2H, H₉₋₁₁), 3.23-3.17 (m, 1H, H₁₀), 2.80-2.75 (dd, 1H, *J*₁=16.2 Hz, *J*₂=2.2 H₁₀), 2.22-2.14 (m, 1H, H₁₂), 1.72-1.65 (m, 1H, H₁₂), 1.31 (s, 9H, H₁₃).

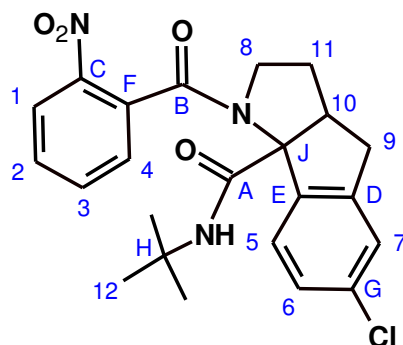
RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃) δ 170.5 (C_A), 165.9 (C_B), 144.4 (C_C), 143.0 (C_D), 141.3 (C_E), 134.6 (C_F), 133.7 (C₃), 129.7 (C₄), 129.4 (C₂), 128.4 (C₇), 128.3 (C₈), 127.9 (C₆), 125.5 (C₅), 124.5 (C₁), 82.0 (C_H), 51.5 (C_G), 50.4 (C₁₁), 50.1 (C₉), 35.1 (C₁₀), 30.7 (C₁₂), 28.5 (C₁₃).



6b. N-*tert*-butil-1-(4-nitrobenzoyl)-2,3,3a,4-tetrahidroindeno[1,2-*b*]pirrol-8b (1*H*)-carboxamida. Sólido amarillo. Tiempo de reacción 4 horas. 15 % de rendimiento.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (dd, 2H, $J_1=6.9$ Hz, $J_2=1.8$, H₁), 8.12 (d, 1H, $J_1=7.0$ Hz, H₃), 7.67 (dd, 2H, $J_1=7.0$ Hz, $J_2=1.9$, H₂), 7.38-7.29 (m, 3H, H₄₋₅₋₆), 5.41 (s_a, 1H, NH), 3.70-3.63 (m, 1H, H₇), 3.47-3.41 (m, 1H, H₇), 3.27-3.17 (m, 2H, H₈₋₉), 2.84-8.80 (m, 1H, H₈), 2.29-2.22 (m, 1H, H₁₀), 1.71-1.62 (m, 1H, H₁₀), 1.29 (s, 9H, H₁₁).

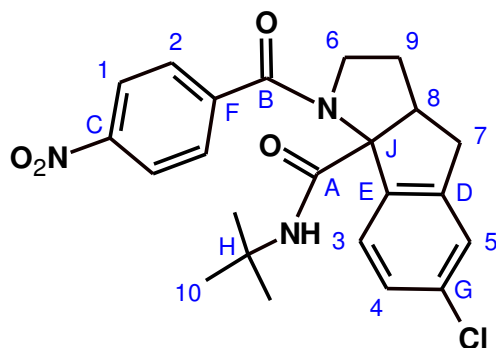
RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃) δ 170.5 (C_A), 167.6 (C_B), 148.2 (C_C), 143.6 (C_F), 143.4 (C_E), 141.5 (C_D), 129.7 (C₅), 128.1 (C₆), 127.9 (C₄), 127.7 (C₂), 125.9 (C₃), 123.7 (C₁), 82.1 (C_H), 51.6 (C_G), 51.3 (C₉), 50.1 (C₇), 35.1 (C₈), 31.1 (C₁₀), 28.6 (C₁₁).



6c. N-*tert*-butil-6-cloro-1-(2-nitrobenzoyl)-2,3,3a,4-tetrahidroindeno[1,2-*b*]pirrol-8b(1*H*)-carboxamida. Sólido amarillo. Tiempo de reacción 4 horas. 18 % de rendimiento.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.17 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, H_1), 8.03 (d, 1H, $J=8.3$ Hz, H_4), 7.71 (dd, 1H, $J_1=7.5$ Hz, $J_2=0.8$, H_3), 7.55 (dd, 1H, $J_1=8.6$ Hz, $J_2=1.2$, H_2), 7.52-7.49 (m, 1H, H_5), 7.32-7.29 (dd, 1H, $J_1=8.3$ Hz, $J_2=1.6$, H_6), 7.26 (s, 1H, H_7), 5.83 (s_a, 1H, NH), 3.51-3.45 (m, 1H, H_8), 3.35-3.24 (m, 2H, H_{8-10}), 3.23-3.17 (m, 1H, H_9), 2.78-2.73 (dd, 1H, $J_1=16.4$ Hz, $J_2=2.5$ Hz, H_9), 2.23-2.15 (m, 1H, H_{11}), 1.72-1.64 (m, 1H, H_{11}), 1.33 (s, 9H, H_{12}).

RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) δ 170.1 (C_A), 165.9 (C_B), 145.1 (C_C), 144.4 (C_D), 140.0 (C_E), 135.3 (C_F), 134.7 (C_{G-3}), 133.5 (C_2), 129.8 (C_6), 129.5 (C_5), 128.3 (C_4), 125.6 (C_7), 124.6 (C_1), 81.4 (C_J), 51.7 (C_H), 50.5 (C_{10}), 50.3 (C_8), 35.1 (C_9), 29.6 (C_{11}), 28.6 (C_{12}).



6d. N-*tert*-butil-6-cloro-1-(4-nitrobenzoyl)-2,3,3a,4-tetrahidroindeno[1,2-*b*]pirrol-8b(1*H*)-carboxamida. Sólido amarillo. Tiempo de reacción 4 horas. 23 % de rendimiento.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (d, 2H, *J*=8.7 Hz, H₁), 8.08 (d, 1H, *J*=8.9 Hz, H₃), 7.66 (d, 2H, *J*=8.7 Hz, H₂), 7.31 (m, 1H, H₄), 7.29 (s, 1H, H₅), 5.36 (s_a, 1H, NH), 3.69-3.63 (m, 1H, H₆), 3.47-3.42 (m, 1H, H₆), 3.28-3.16 (m, 2H, H₇₋₈), 2.82-2.77 (dd, 1H, *J*₁=16.3 Hz, *J*₂=2.3 Hz, H₇), 2.31-2.23 (m, 1H, H₉), 1.70-1.61 (m, 1H, H₉), 1.30 (s, 9H, H₁₀).

RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃) δ 169.9 (C_B), 167.6 (C_A), 148.3 (C_C), 145.7 (C_D), 143.1 (C_E), 140.0 (C_F), 135.7 (C_G), 129.2 (C₄), 128.4 (C₃), 127.7 (C₂), 126.0 (C₅), 123.7 (C₁), 81.6 (C_J), 51.7 (C_H), 51.3 (C₈), 50.3 (C₆), 35.0 (C₇), 31.0 (C₉), 28.6 (C₁₀).

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Eduardo Nieto Sepúlveda

Candidato para el Grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica

Tesis: SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE INDENOPIRROLIDINAS

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 17 de abril de 1986, hijo de Eduardo Rafael Nieto Silva y Amalia Sepúlveda Durán.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Clínico Biólogo en 2012 con mención honorífica, primer lugar en la generación.