

**DISEÑO RACIONAL DE RUTAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS
PIPERIDINAS C-4 SUSTITUIDAS CON EL ANILLO DE LA
TETRAHIDRO(DIHIDRO)QUINOLINA Y SUS TRANSFORMACIONES QUÍMICAS**

LEONOR YAMILE VARGAS MÉNDEZ

**LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIOMOLECULAR
ESCUELA DE QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
2009**

**DISEÑO RACIONAL DE RUTAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS
PIPERIDINAS C-4 SUSTITUIDAS CON EL ANILLO DE LA
TETRAHIDRO(DIHIDRO)QUINOLINA Y SUS TRANSFORMACIONES QUÍMICAS**

Autor

LEONOR YAMILE VARGAS MÉNDEZ

**Tesis para optar al título de
Doctora en Química**

Director

VLADÍMIR V. KOUZNETSOV, *PhD, DSc.*

**LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIOMOLECULAR
ESCUELA DE QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
2009**

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de Síntesis Orgánica que se describe en la presente Memoria se ha llevado íntegramente en el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular de la Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander dirigido por el doctor Vladímir V. Kouznetsov.

Son muchas las dificultades que surgen a la hora de desarrollar un trabajo de estas características, dificultades que resulta imposible superar desde la individualidad. Por ello, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, directa o indirectamente, han contribuido para que esta difícil empresa llegara a buen fin.

En primer lugar agradecer al Profesor Vladímir, mi director de tesis, por su constante apoyo, por su eficiente dirección, con soluciones para todos los problemas por complicados que sean. Con él he aprendido muchos “secretos” de la química. También por la confianza ciega que desde un principio depositó en mí y todos los esfuerzos que ha realizado dentro y fuera de la química, durante estos años, para conseguir la realización de este proyecto.

A la Profesora Elena Stashenko por haber estado siempre dispuesta a ayudarme en el ámbito personal, y en el científico, especialmente en lo que se refiere a espectrometría de masas.

Al Profesor Ricardo Fierro Medina, sin su infinita generosidad hubiese sido imposible realizar tan apreciables estudios de resonancia magnética nuclear. No

es fácil encontrar personas de su calidad humana, siempre dispuestas a prestarte su ayuda.

A la Dra. Susana Zacchino por recibirme en su laboratorio para realizar la pasantía, y mostrarme una visión más amplia de la química y de lo que podemos hacer los químicos.

A mis compañeros de laboratorio durante todos estos años, que han hecho ameno y divertido el trabajo diario. Gracias, porque de todos he aprendido algo.

Quisiera agradecer muy especialmente a mi familia, mi esposo, mis padres, mis hermanos y mis sobrinos, por el esfuerzo de todos estos años, por entender aun sin comprender en que consiste mi trabajo y mis numerosas “faltas de tiempo”.

A Julio, a Isabel Cristina y a Sebastián por realizar un trabajo de gran calidad tomándome los espectros de RMN.

Agradezco al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas”, COLCIENCIAS, por su soporte económico a través de la beca de sostenimiento concedida durante estos años.

Por último agradezco al Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, al Laboratorio de Cromatografía y a COLCIENCIAS a través del proyecto CENIVAM (Contrato N° 432-2004) por el soporte económico para la realización de esta investigación.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE OBTENCIÓN DE NUEVAS ESPIROPIPERIDINAS C-4 SUSTITUIDAS CON EL ANILLO DE LA DIHIDROQUINOLINA VÍA REACCIONES DE ARILACIÓN INTRAMOLECULAR DE AMINOALQUENOS	6
1.1 Antecedentes	6
1.1.1. Espiropiperidinas	7
1.1.2. Espiro[piperidina-4,2'-quinolinas]	13
1.2 Desarrollo de un nuevo método de obtención de las 1 <i>H</i> -dihidro espiro[piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolinas]	19
1.2.1. Preparación de las 4-alil-4-N-arilamino-1-bencilpiperidinas, sustratos necesarios en la investigación	19
1.2.2. Síntesis de nuevas 1 <i>H</i> -dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolinas] vía arilación catalítica de las 4-alil-4-N-arilamino-1-bencilpiperidinas y desbencilación	32
2. REACTIVIDAD QUÍMICA DE NUEVAS ESPIROPIPERIDINAS C-4 SUSTITUIDAS. ESTUDIO DE LA NUEVA MIGRACIÓN DEL GRUPO ACILO EN LOS SISTEMAS RÍGIDOS DE LAS 1-ACIL-3',4'-DIHIDRO ESPIRO [PIPERIDINA-4,2'-(1' <i>H</i>)QUINOLINAS	48
2.1 Antecedentes	48
2.2 Preparación y caracterización de las 1'-acil-1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-quinolinas] 89-99	56
2.3 Transformación de las 1'-acil-1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-quinolinas] 89-99 a las 1-acil-4'-metil-3',4'-dihidro espiro[piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolinas] 100-109 bajo condiciones de desbencilación	65

2.4	Estudio de la reacción de migración del grupo acilo bajo condiciones de desbencilación	77
2.4.2.	Establecimiento de la migración	80
2.4.2.1.	Migración inter- o intramolecular?	80
2.4.2.2.	Determinación de los fragmentos estructurales	81
2.4.3.	Experimentos de cruzamiento	84
2.4.4.	Alcances de la migración	84
3.	ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD QUÍMICA DE LAS N-(1-BENCIL PIPERIDINIL -4)- N-ARILAMIDAS COMO ANÁLOGOS FLEXIBLES EN LA MIGRACIÓN DEL GRUPO ACILO	90
3.1	Antecedentes	90
3.1.1.	4-Aminopiperidinas	90
3.1.2.	N-(Piperidinil-4)amidas	95
3.2	Preparación de las N-(1-bencilpiperidinil-4)-N-arilamidas	97
4.	ESTUDIO QUÍMICO DE LAS (ESPIRO)PIPERIDINAS C-4 SUSTITUIDAS. PREPARACIÓN DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA Y SUS ANÁLOGOS	119
4.1	Antecedentes	119
4.1.1.	Reacción de Strecker	119
4.2	Sustitución nucleófila de las 1-cloroacetil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'H)quinolinas]	122
4.3	Preparación del alcaloide piperidínico <i>Girgenshonina</i> y sus análogos	127
5.	PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE MOLÉCULAS CON EL FRAGMENTO 4-PIRIDILMETIL HACIA NUEVOS SISTEMAS PIPERIDÍNICOS	135
5.1	Antecedentes	135
5.2	Preparación de las N-(piperidin-4-ilmetil)anilinas, a partir de sus respectivas aldiminas	141

5.3	Preparación de las 4- <i>N</i> -aril- <i>N</i> -(4-piridilbuten-3-il)aminas a partir de las respectivas aldiminas. Generación de nuevas tetrahydroquinolinas C-2 γ -piridil sustituidas	145
5.4	Estudio sintético hacia nuevas tetrahydroquinolinas C-2 γ -piridinil sustituidas	158
6.	PROSPECCIÓN BIOLÓGICA DE LAS NUEVAS MOLÉCULAS OBTENIDAS. BÚSQUEDA DE NUEVOS AGENTES TERAPÉUTICOS	160
6.1.	Antecedentes	160
6.2	Actividad fungicida	162
6.2.1.	Importancia de la búsqueda de compuestos antifúngicos	162
6.2.2.	Características de los hongos causantes de infecciones fúngicas en humanos	162
6.2.3.	Estructuras y mecanismos de acción de los principales antifúngicos en uso clínico	164
6.2.3.1.	La membrana celular	165
6.2.3.2.	Síntesis de ADN y de proteínas	168
6.2.3.3.	La pared celular fúngica	168
6.2.3.4.	La respiración mitocondrial	169
6.2.4.	Bioensayos para determinar actividad antifúngica	171
6.2.4.1.	Métodos de difusión	171
6.2.4.2.	Métodos bioautográficos	172
6.2.4.3.	Métodos de dilución	172
6.2.5.	Resultados de los bioensayos para determinar actividad antifúngica	173
6.2.5.1.	De los ensayos bioautográficos	173
6.2.5.2.	Determinación de las CIM	174
6.2.5.3.	Determinación de la CFM	182
6.2.5.4.	Determinación del valor de la CIM en diversas cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> y <i>T. mentagrophytes</i> aislados clínicamente	184

6.3	Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa	187
6.3.1.	Antecedentes	187
6.3.2.	Enfermedad de Alzheimer (EA) e importancia de la búsqueda de compuestos inhibidores de la acetilcolinesterasa	189
6.3.3.	Ensayo para determinar la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa	195
6.3.4.	Resultados de los ensayos de inhibición	197
6.4	Actividad antioxidante	205
6.4.1.	Importancia de la búsqueda de compuestos antioxidantes	205
6.4.2.	Métodos para determinación de la actividad antioxidante	207
6.4.3.	Resultados de los ensayos de capacidad antioxidante equivalente al trolox	210
7.	PARTE EXPERIMENTAL	235
7.1	Aspectos Generales	
7.1.1.	Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos de partida	224
7.1.2.	Técnicas Analíticas	224
7.2	Capítulo primero	225
7.3	Capítulo segundo	226
7.4	Capítulo tercero	227
7.5	Capítulo cuarto	228
7.6	Capítulo quinto	229
7.7	Capítulo sexto	230
8.	CONCLUSIONES	240
9.	BIBLIOGRAFIA	247

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Productos recientemente lanzados al mercado, que contienen el anillo piperidínico 1,4-disustituido como uno de los principales componentes estructurales.	7
Figura 2. Estructuras C-2 y C-4 espiropiperidínicas.	7
Figura 3. Posible fragmentación y espectro de masas de la <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-iliden)- <i>N</i> -fenilamina (49).	21
Figura 4. Posible ruta de la formación del ion imínio en la fragmentación de las <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-iliden)- <i>N</i> -arilaminas.	22
Figura 5. Espectro de RMN de ¹ H de la <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-iliden)- <i>N</i> -(4-fluorofenil)amina (52).	23
Figura 6. Mecanismo de la formación de los compuestos de Grignard; ~e ^θ indica migración del electrón.	24
Figura 7. Espectro de masas y fragmentación principal del ion molecular de la 4-alil-4- <i>N</i> -(4-metoxifenil)amino-1-bencilpiperidina (57).	27
Figura 8. Espectro de RMN de ¹ H de la 4-alil-4- <i>N</i> -(4-clorofenil)amino-1-bencilpiperidina (59).	28
Figura 9. Espectro de RMN ¹ H de la 1-bencil-4'(6')-dimetil-3',4'-dihidro espiro[piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolina] (62).	36
Figura 10. Espectro de RMN ¹ H de la 1- <i>H</i> -4'-metil-6'-metoxi-3',4'-dihidro espiro[piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolina] (69).	41
Figura 11. Espectros de masas de la 1- <i>H</i> -4',5',7'-trimetil-3',4'-dihidro espiro[piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolina] (71).	44
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H de la 1- <i>H</i> -4',5',7'-trimetil-3',4'-dihidro	

espiro[piperidina-4,2'-(1'-H) quinolina] (71) a 30 °C.	45
Figura 13. Equilibrio conformacional de la espiropiperidina 71 .	46
Figura 14. Espectro de RMN ¹ H con irradiación selectiva del grupo 4'-CH ₃ de la 1-H-4',5',7'-trimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (71) a 25 °C.	47
Figura 15. Producto esperado y formado en la reacción de desbencilación de un espirano N-acetilado.	55
Figura 16. Espectro de RMN ¹ H de la 1-bencil-1'-benzoil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-quinolina] (91).	60
Figura 17. Equilibrio en amidas N,N-disustituidas asimétricamente.	60
Figura 18. Espectro de RMN ¹ H de la 1-bencil-1'-formil-4',5',7'-trimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-quinolina] (98).	62
Figura 19. Ampliación de la zona alifática del espectro COSY de la 1-bencil-1'-benzoil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-quinolina] (91).	63
Figura 20. Disposición espacial de los hidrógenos 3'-Ha y 5-He de la 1-bencil-1'-benzoil-4',6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-quinolina] (91).	64
Figura 21. Disposición espacial de la 1-bencil-1'-benzoil-4',6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-quinolina] (91).	64
Figura 22. Espectro de RMN ¹ H de la 1-formil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (100).	69
Figura 23. Espectros de RMN ¹ H de la 1-acetil-4'6'-dimetil-3',4'-dihidro espiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (104) en CDCl ₃ .	71
Figura 24. Espectros de RMN ¹ H de la 1-acetil-4'6'-dimetil-3',4'-dihidro espiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (104) en acetona-d ₆ .	73
Figura 25. Equilibrio conformacional para la 1-acetil-4'6'-dimetil-3',4'-di hidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (104).	74
Figura 26. Geometría de la 1-benzoil-4'6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (102).	75
Figura 27. Desplazamientos químicos (ppm) en RMN ¹³ C del anillo piperidínico de las amidas 103-105 en CDCl ₃ a 25 °C.	76

Figura 28. Espectros de RMN ¹³ C con desacoplamiento de protones y acoplado con NOE de la 1-acetil-4'6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (104).	77
Figura 29. Espectro HMBC de la 1-formil-4'6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (103).	79
Figura 30. Espectro HMBC de la 1-acetil-4'6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (104).	79
Figura 31. Productos que podrían formarse en la reacción de desbencilación de las espiropiperidinas 89-99 .	80
Figura 32. Experimentos <i>crossover</i> entre distintos derivados acilados de las espiropiperidinas.	82
Figura 33. Experimento de atrapamiento del fragmento acilo con piperidina.	83
Figura 34. Estudio de la reacción con hidrógeno molecular y acetato de amonio.	84
Figura 35. Estudio de la reacción usando agua, metanol-agua y sin disolvente.	85
Figura 36. Estudio de la reacción a 37 °C, en metanol y agua.	86
Figura 37. Estudio de la reacción inversa a 40 °C.	87
Figura 38. Vía de la migración intramolecular de acilo en los sistemas espiránicos.	88
Figura 39. Densidad de carga sobre los nitrógenos en 67 , 101 , y el intermedio de reacción ii .	88
Figura 40. Conformación de bote del anillo piperidínico en el intermedio de reacción de la amida 93 .	89
Figura 41. Morfina como prototipo en el desarrollo de nuevos fármacos en base de 4-aminopiperidinas.	95
Figura 42. Sistemas rígidos y flexibles de la piperidina.	98
Figura 43. Espectro de RMN ¹ H de la 1-bencil-4-N-(4-metilfenil)amino piperidina (143).	101

Figura 44. Espectro de RMN ¹ H de la <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-il)- <i>N</i> -fenilformamida (146).	104
Figura 45. Acoplamientos relevantes en el espectro HMBC de la <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-il)- <i>N</i> -(4-metil fenil)acetamida (150).	104
Figura 46. Posible fragmentación y espectro de masas de la <i>N</i> -fenil- <i>N</i> -(piperidin-4-il)formamida (158A).	110
Figura 47. Posible fragmentación y espectro de masas de la la 4- <i>N</i> -(fenilamino)-1-formilpiperidina (158A).	111
Figura 48. Distancias entre el oxígeno carbonílico y los hidrógenos axiales y ecuatoriales del anillo piperidínico en las amidas 158A y 158B .	112
Figura 49. Espectro de RMN ¹ H de la amida 161A .	114
Figura 50. Espectro de RMN ¹ H de la amida 161B .	115
Figura 51. Ejemplos de los acoplamientos del hidrógeno del C-4 con los hidrógenos del C- α .	115
Figura 52. Posible estereoquímica de la adición de hidruro a las cetiminas.	117
Figura 53. Espectros de masas y posible fragmentación de la 1-(2-cloroacetil)-4'-metil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'- <i>H</i>)quinolina] (172).	124
Figura 54. Espectro de masas y posible fragmentación de la 4'-metil-1-(2-piperidin-1-ilacetil)-3',4'-dihidro espiro[piperidina-4,2'-(1'- <i>H</i>)quinolina] (173).	125
Figura 55. Espectro de RMN ¹ H de la 1-(2-cloroacetil)-4'-metil-3',4'-dihidro espiro[piperidina-4,2'-(1'- <i>H</i>)quinolina] (172).	126
Figura 56. Espectro de RMN ¹ H de la 4'-metil-1-(2-piperidin-1-ilacetil)-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'- <i>H</i>)quinolina] (173).	127
Figura 57. Estructuras de los glicósidos cianogénicos.	128
Figura 58. <i>Girgensohnia oppositiflora</i> en floración y el alcaloide girgensohnina.	129

Figura 59. Espectro de masas y posible fragmentación del 2-(3,4-dioxi metilfenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (175).	132
Figura 60. Espectro de RMN ¹ H de la girgensohnina 174 .	132
Figura 61. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 177 .	133
Figura 62. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 178 .	134
Figura 63. Espectro de RMN ¹³ C de la girgensohnina 174 .	134
Figura 64. Ruta propuesta para la preparación de las 2-(4-piperidinil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolinas y las <i>N</i> -(piperidin-4-ilmetil)aminas.	141
Figura 65. Espectro de RMN ¹ H de la <i>N</i> -(3,5-dimetilfenil)- <i>N</i> -(piridin-4-ilmetil)amina (210).	144
Figura 66. Formación de homoalilaminas - 4- <i>N</i> -aril- <i>N</i> -1-(arilbuten-3-il)aminas.	146
Figura 67. Espectro de masas y fragmentación principal de la 4- <i>N</i> -(4-metoxifenil)- <i>N</i> -[1-(4-piridil)buten-3-il]amina (213).	150
Figura 68. Espectro de RMN ¹ H del la 4- <i>N</i> -(3,5-dimetilfenil)- <i>N</i> -[1-(4-piridil)buten-3-il]amina (215).	151
Figura 69. Representación espacial de los isómeros <i>cis</i> -2e,4e, <i>trans</i> -2e,4a de las tetrahydroquinolinas.	154
Figura 70. Espectro de RMN ¹ H del isómero <i>cis</i> de la 6-bromo-4-metil-2-(4-piridil)-1,2,3,4-tetrahidro quinolina (219).	155
Figura 71. Quinolinas formadas en el proceso de ciclación de las homoalilaminas 211-214 .	156
Figura 72. Imágenes de macro y micromorfología de los hongos observados a ojo desnudo y con microscopio óptico (400x): a) levaduras, b) hongos filamentosos.	164
Figura 73. Esquema de la célula fúngica con los principales blancos de ataque de agentes antifúngicos.	165
Figura 74. Estructura de la anfotericina B.	166

Figura 75. Estructuras de algunos imidazoles.	167
Figura 76. Estructuras de algunos triazoles.	167
Figura 77. Estructuras químicas de alilaminas.	167
Figura 78. Estructura de la 5-fluocitosina.	168
Figura 79. Estructura base de las equinocandinas.	169
Figura 80. Estructura de dos estrobilurinas.	170
Figura 81. Método de difusión en agar con discos de papel.	171
Figura 82. Método bioautográfico en capa de agar.	172
Figura 83. Distintos tipos de métodos de dilución: A) macrodilución en caldo; B) microdilución en caldo; C) macrodilución en agar.	173
Figura 84. Actividad antifúngica por bioautografía de los compuestos 67-71 , frente a <i>C. neoformans</i> , sobre placa de CCF a 10 µg/mL.	174
Figura 85. Determinación de la CIM.	175
Figura 86. Micromorfología del <i>Cryptococcus neoformans</i> con microscopio óptico (400x), teñido con tinta china.	181
Figura 87. Distintos niveles de evaluación y comparación de la cantidad de muestras evaluadas a medida que se avanza en el proceso.	182
Figura 88. Esquema de la metodología para determinar la concentración fungicida mínima (CFM). Los números debajo de los tubos indican las concentraciones en µg/mL del compuesto prueba.	183
Figura 89. Tubos de Khan conteniendo los diferentes hongos en crecimiento.	185
Figura 90. Estructura de la acetilcolina.	188
Figura 91. Esquema de una sinapsis colinérgica.	190
Figura 92. Estructuras de la epibatidina y las conotoxinas.	192
Figura 93. Estructura de la fisostigmina y la escopolamina.	193

Figura 94. Fármacos usados en el tratamiento de la EA.	193
Figura 95. Pez <i>Electrophorus electricus</i> y estructura tridimensional de la enzima.	196
Figura 96. Esquema una microplaca de 96 pocillos para la determinación de la inhibición enzimática.	197
Figura 97. Fotografía de una microplaca experimental, y ecuación para calcular el % de inhibición a partir de las absorbancias medidas.	197
Figura 98. Graficas de los ensayos de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por galantamina, fisostigmina y los compuestos 61-63 y 66 .	199
Figura 99. Estructura química del Trolox y de los antioxidantes usados como control.	211
Figura 100. Graficas del efecto de la inhibición del ABTS por los antioxidantes Trolox, vit. E, el BHA y el BHT, como % inhibición vs concentración, con absorbancias medidas a los 30 min de reacción.	212
Figura 101. Fotografía de una microplaca usada en la determinación de capacidad antioxidante total.	216
Figura 102. Efecto de la inhibición del ABTS por los antioxidantes 61 , 63 , 66 , como % inhibición vs concentración, con absorbancias medidas a los 30 min de reacción.	218

LISTA DE ESQUEMAS

	Pag.
Esquema 1. Formación de la espirounión en los precursores de las espiropiperidinas CT51464 y CT51463.	9
Esquema 2. Preparación de la 1'- <i>H</i> -espiro[indolin-3,4'-piperidina].	9
Esquema 3. Preparación de 1,3,8-triazaspiro[4.5]decano-2,4-dionas.	10
Esquema 4. Formación de la espirounión en las espiro[2 <i>H</i> -1-benzo pirano-2,4'-piperidinas].	12
Esquema 5. Construcción de epoxiespiro[octahidroisoquinolina-3,4'-piperidinas]y tetrahidroespiro [3 <i>H</i> -2-benzazepina-3,4'-piperidinas] a partir de 4-ariliminopiperidinas.	12
Esquema 6. Tipos de cierre C-C y C-N para generar el anillo tetrahidro quinolínico.	14
Esquema 7. Análisis retro-sintético de la estructura de las espiro [piperidina-4,2'-quinolinas].	14
Esquema 8. Primera construcción del sistema de la 3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1 <i>H</i>)quinolina].	16
Esquema 9. Preparación de análogos del antioxidante etoxiquina.	16
Esquema 10. Preparación de espiropiperidinas antioxidantes con afinidad por las lipoproteínas plasmáticas de baja densidad.	17
Esquema 11. Síntesis de espiro[piperidina-4,2'-quinolinas] usando la reacción de Heck.	18
Esquema 12. Síntesis de las <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-iliden)- <i>N</i> -arilaminas <u>49-54</u> .	20

Esquema 13. Síntesis de las 4-alil-4- <i>N</i> -arilamino-1-bencilpiperidinas <u>55-60</u> .	25
Esquema 14. Preparación de las 1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolinas] <u>61-66</u> .	32
Esquema 15. Preparación de las 1 <i>H</i> -dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolinas] <u>67-71</u> .	37
Esquema 16. Glicólisis aerobia el piruvato.	49
Esquema 17. Transferencia de acilo a arilalquilaminas.	49
Esquema 18. Transferencia de acetilo a aminas alifáticas.	50
Esquema 19. Producción biológica de la melatonina	51
Esquema 20. Transferencia del grupo acetilo desde la acetilCoA hasta el grupo amino de algunos antibióticos aminoglicosidos.	52
Esquema 21. Monoacetilación de las aminas biogénicas espermidina y espermina.	52
Esquema 22. Transferencia intermolecular del acilo dentro los acetatos y fenolatos.	53
Esquema 23. Dos posibles mecanismos en la transferencia intermolecular de acilo desde el acetato de <i>p</i> -nitrofenilo a la 2-metoxietilamina.	54
Esquema 24. Transferencia del grupo metoxicarbonilo desde el ion <i>N</i> -(metoxicarbonil)isoquinolinio a varias piridinas.	54
Esquema 25. Síntesis de las 1'-acil-1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-quinolinas] <u>89-99</u> .	57
Esquema 26. Preparación de las 1-acil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolinas] <u>100-109</u> .	65
Esquema 27. Rutas generales de obtención de 4-aminopiperidinas.	91
Esquema 28. Preparación de <i>N</i> -alquil-4- <i>N</i> -alquilaminopiperidinas 120 .	92
Esquema 29. Preparación de derivados piperidínicos antimaláricos 123 .	93
Esquema 30. Preparación de piperidin-benzooxazinonas 127 .	94

Esquema 31. Conversión de la <i>N</i> -Boc- γ -piperidona en la <i>N</i> -Boc-4-amino piperidina (128).	94
Esquema 32. Síntesis de orto-amino benzamidas 135 como antagonistas de la MCHR1.	96
Esquema 33. Nicotinamidas 139 antagonistas de la MCHR1.	97
Esquema 34. Síntesis de las 1-bencil-4- <i>N</i> -aril(bencil)aminopiperidinas 142-145 .	98
Esquema 35. Síntesis de las <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-il)- <i>N</i> -aril(bencil)amidas 146-157 .	102
Esquema 36. Productos A y B formados en la reacción de desbencilación de las <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-il)- <i>N</i> -aril(bencil)amidas 146-157 .	107
Esquema 37. Reacciones de atrapamiento del fragmento acilo con piperidina en los sistemas acíclicos.	118
Esquema 38. Reacción de Strecker “clásica”.	119
Esquema 39. Reacción tipo Strecker multi-componente con el TMSCN.	120
Esquema 40. Reacción tipo Strecker multi-componente con las aminas cíclicas.	121
Esquema 41. Preparación de la 4'-metil-1-(2-piperidin-1-ilacetil)-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'- <i>H</i>)quinolina] (173).	122
Esquema 42. Síntesis del alcaloide <i>girgensohnina</i> 174 , y sus análogos 175 , 177 y 178 .	130
Esquema 43. Hidrogenación de derivados piridínicos usando diversos catalizadores metálicos.	136
Esquema 44. Reducción de la <i>N</i> -aril- <i>N</i> -(2-piridilmetil)amina empleando óxido de platino como catalizador.	137
Esquema 45. Síntesis del ácido pipecólico por hidrogenación del ácido picolínico.	137
Esquema 46. Reducción de un intermedio en la síntesis del donepezil.	137
Esquema 47. Reducción de las sales de piridina.	138

Esquema 48. Preparación de la stenusina por reducción de derivados piridínicos.	139
Esquema 49. Obtención de piperidinas por reducción de los <i>N</i> -óxidos de piridina.	140
Esquema 50. Preparación de las <i>N</i> -aril- <i>N</i> -(piridin-4-ilmetil)aminas <u>196-203</u> , y las <i>N</i> -aril- <i>N</i> -(piridin-4-ilmetil)aminas <u>204-210</u> .	142
Esquema 51. Síntesis de las homoalilaminas <u>211-215</u> con el fragmento γ -piridil.	147
Esquema 52. Preparación de las 4-metil-2-(4-piridil)-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas <u>216-219</u> y el ácido 4,5,7-trimetil-2-(4-piridil)quinolin-8-sulfónico <u>220</u> .	153
Esquema 53. Intentos de reducción del anillo piridínico a partir de los sustratos <u>210</u> , <u>216</u> y <u>217</u> .	158
Esquema 54. Preparación de las amidas <u>221</u> , <u>222</u> y <u>223</u> , e intentos de reducción del anillo piridínico a partir de éstas.	159
Esquema 55. Reacción para determinar la actividad inhibitoria de la AChE.	195
Esquema 56. Reacción entre un antioxidante de tipo fenol y ABTS ⁺ .	210

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Constantes físicas y químicas de las <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-iliden)- <i>N</i> -arilaminas <u>49-54</u> .	21
Tabla 2. Iones principales en la fragmentación de las <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-iliden)- <i>N</i> -arilaminas <u>49-54</u> .	22
Tabla 3. Constantes físicas y químicas de las 4-alil-4- <i>N</i> -arilamino-1-bencilpiperidinas <u>55-60</u> .	26
Tabla 4. Iones principales en la fragmentación de las 4-alil-4- <i>N</i> -arilamino-1-bencilpiperidinas <u>55-60</u> .	29
Tabla 5. Datos de RMN-1H para las 4-alil-4- <i>N</i> -arilamino-1-bencilpiperidinas <u>55-60</u> .	30
Tabla 6. Datos de RMN- ¹³ C para los 4- <i>N</i> -arilaminobutenos <u>55-60</u> .	31
Tabla 7. Constantes físicas y químicas de las 1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolinas] <u>61-66</u> .	33
Tabla 8. Posible fragmentación e iones principales de las 1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolinas] <u>61-66</u> .	34
Tabla 9. Datos de RMN-1H para las 1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolinas] <u>61-66</u> .	38
Tabla 10. Constantes físicas y químicas de las 1- <i>H</i> -4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolinas] <u>67-71</u> .	39
Tabla 11. Iones principales y posible ruta de fragmentación de las 1- <i>H</i> -4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolinas] <u>67-71</u> .	42
Tabla 12. Datos de RMN-1H para las 1- <i>H</i> -4'-metil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1' <i>H</i>)quinolinas] <u>67-71</u> .	43
Tabla 13. Constantes físicas y químicas de las 1'-acil-1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-quinolinas] <u>89-99</u> .	57

Tabla 14. Iones principales y posible fragmentación en los espectros de masas de los compuestos <u>89-99</u> .	58
Tabla 15. Constantes físicas y químicas de las 1'- acil-1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-quinolinas] <u>100-109</u> .	66
Tabla 16. Iones principales y posible fragmentación en los espectros de masas de los compuestos <u>100-109</u> .	67
Tabla 17. Relación de los conformeros de las formamidas y acetamidas.	69
Tabla 18. Resultados de resonancia magnética nuclear dinámica para la 1-acetil-4'6'- dimetil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (<u>104</u>) en CDCl ₃ .	70
Tabla 19. Resonancia magnética nuclear dinámica para la 1-acetil-4'6'- dimetil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (<u>104</u>) en acetona-d ₆ .	72
Tabla 20. Constantes físicas y químicas de las 1-bencil-4-N-aril(bencil) aminopiperidinas <u>142-145</u> .	99
Tabla 21. Iones principales y posible ruta de fragmentación de las 1-bencil-4-N-aril(bencil)amino piperidinas <u>142-145</u> .	100
Tabla 22. Datos de caracterización por RMN- ¹ H para las 1-bencil-4-N-aril(bencil)aminopiperidinas <u>142-145</u> .	101
Tabla 23. Constantes físicas y químicas de las N-(1-bencilpiperidin-4-il)-N-aril(bencil)amidas <u>146-157</u> .	103
Tabla 24. Iones principales y posible ruta de fragmentación de las N-(1-bencilpiperidin-4-il)-N-aril(bencil)amidas <u>146-157</u> .	105
Tabla 25. Caracterización por RMN- ¹ H para las 1-bencil-4-N-aril(bencil) aminopiperidinas <u>146-157</u> .	106
Tabla 26. Relaciones (en %) de las amidas de las series A y B formadas en la desbencilación de las 1-bencil-4-N-aril(bencil)aminopiperidinas <u>146, 149, 155-157</u> .	108

Tabla 27. Constantes físicas y químicas de las <i>N</i> -(4-aril(bencil))- <i>N</i> -(piperidin-4-il)amidas <u>158A-168A</u> , y las 4- <i>N</i> -aril(bencil)amino-1-acilpiperidinas <u>158A-168A</u> .	109
Tabla 28. Iones principales en los espectros de masas de los compuestos <u>158A-168A</u> .	112
Tabla 29. Iones principales en los espectros de masas de los compuestos <u>158B</u> , <u>161B</u> , <u>166B-168B</u> .	113
Tabla 30. Datos de caracterización por RMN- ¹ H para las <i>N</i> -(4-aril(bencil))- <i>N</i> -(piperidin-4-il)amidas <u>158A-168A</u> , y para las 4- <i>N</i> -arilamino-1-formil piperidinas <u>158B</u> y <u>161B</u> .	116
Tabla 31. Catalizadores y disolventes empleados en la reacción tipo Strecker multi-componente con el TMSCN.	121
Tabla 32. Constantes físicas y químicas de las espiropiperidinas <u>172</u> , <u>173</u> .	123
Tabla 33. Constantes físicas y químicas de la gircensohnina y sus análogos.	131
Tabla 34. Rendimientos de la reducción de <i>N</i> -óxidos de piridina con el sistema formiato de amonio-Pd/C.	140
Tabla 35. Constantes físicas y químicas de las aldiminas <u>196-203</u> y las aminas <u>204-210</u> .	143
Tabla 36. Datos de caracterización por RMN- ¹ H para las <i>N</i> -4-aril- <i>N</i> -(piridin-4-ilmetil)aminas <u>204-210</u> .	145
Tabla 37. Constantes físicas y químicas de las homoalilaminas <u>211-215</u> .	148
Tabla 38. Posible fragmentación e iones principales en los espectros de masas de las homoalilaminas <u>211-215</u> .	149
Tabla 39. Datos de caracterización por RMN- ¹ H para las 4- <i>N</i> -aril- <i>N</i> -[1-(4-piridil)buten-3-il]aminas <u>211-215</u> .	151
Tabla 40. Constantes físicas y químicas de los productos <u>216-220</u> .	153
Tabla 41. Relación en % de los isómeros <i>cis/trans</i> de las tetrahydro quinolinas <u>216-219</u> .	154

Tabla 42. Datos de caracterización por RMN-1H para los isómeros <i>cis</i> de las 4-metil-2-(4-piridil)-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas <u>216-219</u> .	157
Tabla 43. Valores de CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los compuestos <u>55-71</u> frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos.	176
Tabla 44. Valores de CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los compuestos <u>89, 92, 100 y 103</u> frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos.	178
Tabla 45. Valores de CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los compuestos <u>143, 149-151, 161A-163A</u> frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos.	178
Tabla 46. Valores de CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los compuestos <u>145, 155-157, 166A-168A</u> frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos.	179
Tabla 47. Valores de CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los compuestos <u>204-210</u> frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos.	180
Tabla 48. Valores de CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los compuestos <u>211-219</u> frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos.	181
Tabla 49. Valores para la CIM 100 y la CFM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los compuestos <u>214 y 216</u> actuando contra <i>M. gypseum</i> , <i>T. rubrum</i> y <i>T. mentagrophytes</i> .	184
Tabla 50. CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los compuestos <u>208 y 209</u> actuando frente a cepas aisladas clínicamente de <i>Cryptococcus neoformans</i> .	185
Tabla 51. CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los compuestos <u>208 y 209</u> actuando frente a cepas aisladas clínicamente de <i>Trichophyton rubrum</i> .	186
Tabla 52. CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los compuestos <u>208 y 209</u> actuando frente a cepas aisladas clínicamente de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .	187
Tabla 53. Costo de los medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de la demencia de Alzheimer.	194
Tabla 54. Valores de IC_{50} para los compuestos <u>55-71</u> .	198
Tabla 55. Valores de IC_{50} para los compuestos <u>89-99</u> .	200
Tabla 56. Valores de IC_{50} para las amidas <u>100-173</u> .	201
Tabla 57. Valores de IC_{50} para los derivados acíclicos de piperidina.	202

Tabla 58. Valores de IC ₅₀ para los compuestos <u>174-178</u> .	203
Tabla 59. Valores de IC ₅₀ para los compuestos derivados de piridina.	204
Tabla 60. Comparación de valores TEAC de las sustancias “control” obtenidos por los métodos de Re, <i>et al.</i> y el propuesto.	213
Tabla 61. Valores de TEAC para los compuestos <u>55-71</u> .	217
Tabla 62. Valores de TEAC e IC ₅₀ para los compuestos <u>89-99</u> .	219
Tabla 63. Valores de TEAC e IC ₅₀ para los compuestos <u>100-173</u> .	219
Tabla 64. Valores de TEAC e IC ₅₀ para las aminas y amidas acíclicas.	220
Tabla 65. Valores de TEAC e IC ₅₀ para la girgenschonina y sus análogos.	221
Tabla 66. Valores de TEAC e IC ₅₀ para los compuestos piperidínicos.	222
Tabla 67. Comparación de la actividad antioxidante e inhibitoria de la acetilcolinesterasa de los compuestos más activos.	223

Título: DISEÑO RACIONAL DE RUTAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS PIPERIDINAS C-4 SUSTITUIDAS CON EL ANILLO DE LA TETRAHIDRO(DIHIDRO)QUINOLINA Y SUS TRANSFORMACIONES QUÍMICAS*

Autor: VARGAS MÉNDEZ Leonor Yamile**

Palabras claves: Espiropiperidinas, migración de acilo, inhibidores de acetilcolinesterasa, antifungicos.

Contenido:

La presente Memoria se ha dividido de acuerdo con los grandes temas en los que se diseñó y desarrolló la investigación. En el primer capítulo se describe el método de obtención de nuevas espiropiperidinas con la estructura base de la 3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolina]. En el segundo y tercer capítulo se recogen la preparación y estudio de la reactividad química de las nuevas 3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolinas], y se describe por primera vez la migración del grupo acilo en los sistemas rígidos de las 1-acil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'H)quinolinas] y en los sistemas flexibles de la N-(1-bencilpiperidinil-4)-N-arilamidas, en condiciones reductivas ($\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-/\text{Pd/C}$). Los estudios de atrapado de intermedios con trampas químicas, determino un carácter intramolecular. Esta reacción puede ser aprovechada para el acceso a nuevas estructuras. En el capítulo cuarto se describe la obtención de un compuesto híbrido a partir de la 3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolina], también la síntesis del alcaloide piperidínico *girsenshonina* y de sus análogos cianogénicos. El capítulo quinto se refiere a la preparación y transformaciones químicas de moléculas con el fragmento 4-piridilmetil y los intentos de consecución del sistema heterocíclico de la 2-(4-piperidinil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolina por hidrogenación del anillo piridínico de las 4-metil-2-(4-piridil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolinas. En el capítulo sexto se encuentra los resultados de los ensayos de actividad de bioactividad de las nuevas moléculas obtenidas. En el último capítulo se encuentra la parte experimental.

* Tesis de Doctorado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Vladimir V. Kouznetsov *Ph.D. DSc.*

Title: RATIONAL SYNTHETIC DESIGN FOR THE CONSTRUCTION OF NEW C-4 SUBSTITUTED PIPERIDINES CONTAINING A TETRAHYDRO (DIHYDRO)QUINOLINE RING AND THEIR CHEMICAL TRANSFORMATIONS*

Author: VARGAS MÉNDEZ Leonor Yamile**

Keywords: spiropiperidines, acyl migration, acetylcholinesterase inhibitors, fungicides.

Content:

Rational synthetic design for the construction of new C-4 substituted piperidines containing a tetrahydro(dihydro)quinoline ring and their chemical transformations. This memory contains seven chapters; each of them has its own structure, bibliography and numeration that would help read and understand this investigation. In chapter 1: Development of a method for obtaining new C-4 substituted piperidines containing a (dihydro)quinoline ring through intermolecular arylation reactions of aminoalkenes. In chapter 2: Chemical reactivity of new C-4 substituted piperidines. Studies on a new acyl group migration in the rigid system of the 1-acyl-3',4'-dihydrospiro[piperidin-4,2'-(1'H)quinolines]. In chapter 3: Chemical reactivity studies for *N*-(1-benzylpiperidinyl-4)-*N*-arylamides as flexible analogs in the acyl group migration. In chapter 4: Chemical studies on the C-4 substituted (spiro)piperidines. Preparation of the piperidine alkaloid girgensohnine and its analogs. In chapter 5: Preparation and chemical transformations of the molecules with a 4-pyridylmethyl fragment toward new piperidine molecules. In chapter 6: Biological study of new piperidine molecules obtained. Finally in chapter chapter the experimental part.

* Doctoral Thesis

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Vladimir V. Kouznetsov, *Ph.D. DSc.*

INTRODUCCIÓN

Esta investigación se encuadra dentro del campo de la Síntesis Orgánica orientada a la Diversidad, concretamente en el marco del desarrollo de nuevas metodologías para la preparación de derivados espiro y C-piperidínicos. Desde el punto de vista general, el empleo de estos compuestos es uno de los puntos clave en el desarrollo de nuevos medicamentos. Esta afirmación está avalada por el elevado número de publicaciones científicas dedicadas exclusivamente a este tema.

En ese sentido, las piperidinas y sus benzoanálogos, han demostrado ser, desde su primera aparición en la bibliografía, en 1853, hasta hoy en día, los representantes más estudiados y más famosos de los compuestos heterocíclicos. Su importante rol en el estudio de la química de productos naturales y de fármacos es reconocido por parte de los químicos orgánicos, los químicos medicinales y los biólogos desde hace mucho tiempo. Por eso, el conocimiento de la química de los derivados de estos sistemas es siempre de gran utilidad, y de suma importancia para el desarrollo de la química orgánica y biomolecular.

En la actualidad, la química orgánica se cataloga como una ciencia central en el entendimiento de los fenómenos naturales a nivel molecular, desarrollando sus métodos y objetos, y ampliando sus esferas de actividades. Una de estas actividades es la construcción intencional de moléculas de uso práctico, la cual se basa en el diseño y desarrollo de nuevos reactivos, catalizadores, y reacciones para mejorar los procesos de síntesis.

En la interfase entre la química orgánica y la biología ha aparecido la química bioorgánica, de la cual la tarea más importante es el desarrollo de nuevas moléculas con múltiples funciones químicas, de bajo peso molecular (< 500 Da, moléculas pequeñas) y con marcada actividad fisiológica. La tarea de identificación y optimización de nuevas sustancias químicas que pueden interactuar específicamente con las dianas terapéuticas es importante sin ninguna duda.

Por otro lado, la sociedad actual demanda un desarrollo sostenible y respetuoso con el entorno, de modo que la comunidad científica internacional ha de centrarse en la búsqueda de nuevas metodologías no contaminantes, que aúnen no sólo limpieza sino también eficiencia y selectividad. Una gran parte de esta búsqueda está dirigida a descubrir novedosos métodos de síntesis, que generen nuevas moléculas heterocíclicas como posibles agentes quimioterapéuticos, en respuesta a las enfermedades para las cuales el tratamiento existente no resulta eficiente, como las enfermedades producidas por hongos, o es casi inexistente, como la demencia de Alzheimer.

De acuerdo con esta filosofía, aquí se recoge el trabajo desarrollado en el diseño, síntesis y estudio farmacológico, por combinación formal de dos diferentes anillos heterocíclicos farmacóforos -la piperidina y la tetrahydroquinolina- de los sistemas de la dihidroespiro[piperidino-quinolina] y la piridil-tetrahydroquinolina utilizando materiales accesibles y relativamente baratos.

En la implementación de las rutas sintéticas, a veces ocurren reacciones inesperadas, el estudio de éstas, hace que después de un tiempo, puedan unirse al arsenal de herramientas disponibles en la literatura para lograr objetivos sintéticos. Este fue el caso de la reacción de migración de grupos acilo entre los dos átomos de nitrógeno presentes en la estructura de la 3',4'-

dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolina] descubierta durante la realización de esta investigación.

De acuerdo con todo lo expuesto, la presente Memoria ha sido estructurada en siete capítulos, cada uno de éstos tiene su propia estructura acompañada de la bibliografía lo que facilitará la lectura y comprensión de esta investigación:

Capítulo primero: Desarrollo de un método de obtención de nuevas espiropiperidinas C-4 sustituidas con el anillo de la dihidroquinolina vía reacciones de arilación intramolecular de aminoalquenos.

Capítulo segundo: Reactividad química de nuevas espiropiperidinas C-4 sustituidas. Estudio de la nueva migración del grupo acilo en los sistemas rígidos de las 1-acil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolinas].

Capítulo tercero: Estudio de la reactividad química de las *N*-(1-bencilpiperidinil-4)-*N*-arilamidas como análogos flexibles en la migración del grupo acilo.

Capítulo cuarto: Estudio químico de las (espiro)piperidinas C-4 sustituidas. Preparación del alcaloide girgensohnina y sus análogos.

Capítulo quinto: Preparación y transformaciones químicas de moléculas con el fragmento 4-piridilmetil hacia nuevas moléculas piperidínicas.

Capítulo sexto: Prospección biológica de las nuevas moléculas obtenidas. Búsqueda de nuevos agentes terapéuticos.

Capítulo séptimo: La parte experimental.

Parte del trabajo desarrollado en esta Memoria se refleja en las siguientes publicaciones:

1. "An efficient synthesis of new 1-H-4'-methyl-3',4'-dihydrospiro[piperidine-4,2'(1'H)quinoline] scaffolds".
Vargas, M. L. Y.; Kouznetsov, V. V.
Tetrahedron Letters, **2007**, *48*, 2509-2512.
2. "Antifungal and cytotoxic activities of some *N*-substituted aniline derivatives bearing a hetaryl fragment".
Kouznetsov V. V.; Vargas, M. L. Y.; Sortino, M.; Vásquez, Y.; Gupta, M. P.; Freile, M.; Enriz, R. D.; Zacchino, S. A.
Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2008**, *16*, 794-809.
3. "Synthesis and transformations of new spiro-4-piperidines. Acetyl migration in 1-acetyl-1'-benzyl-4-methyl-3,4-dihydrospiro[(1H)quinoline-2,4'-piperidines] under debenzoylation conditions".
Kouznetsov, V. V.; Díaz, P. B.; Sanabria M. C. M.; Vargas M. L. Y.; Poveda, J. C.; Stashenko, E.; Bahsas, A.; Amaro-Luis J.
Letters in Organic Chemistry, **2005**, *2*, 29-32.
4. "Synthesis of some secondary amine derivatives bearing a heteroaryl fragment".
Kouznetsov, V. V.; Astudillo, S. L.; Vargas M. L. Y.; Cazar, R. M. E.
Journal of the Chilean Chemical Society, **2004**, *49*, 107-203.
5. "Recent Developments in three component Grignard-Barbier-type reactions".
Kouznetsov V.V., Vargas Méndez, L.Y.
Synthesis, **2008**, 491-506.
6. "4-Aminopiperidinas y espiro-4-piperidinas: Importancia farmacológica y esfuerzos sintéticos"
Vargas, L. Y.; Kouznetsov, V. V.
Universitas Scientiarum, **2007**, *12*, 23-45.

Se consiguió la divulgación de partes de la investigación en varios eventos científicos:

1. *"Synthesis of new 1-acyl-4'-methyl-3',4'-dihydrospiro[piperidine-4,2'-(1'-H)quinolines] via an intramolecular N-acyl migration promoted by debenzoylation conditions"*.
Vargas, M. L. Y.; Muñoz, A. A.; Stashenko, E.; Kouznetsov, V. V.
Congreso Iberoamericano de Química, 13-17 de octubre de **2008**, Cuzco, Perú.
2. *"Desarrollo de un método de cribado de alto rendimiento para la búsqueda de compuestos naturales y sintéticos con propiedades captadoras de radicales"*.
Muñoz, A. A.; Vargas, M. L. Y.; Stashenko, E.; Kouznetsov, V. V.
XV Congreso Colombiano de Química, 29-31 de **2008**, Bogotá, Colombia.
3. *"2-(4'-Piridil)tetrahidroquinolinas: una nueva clase de compuestos antimicóticos"*. Vargas, L. Y.; Zacchino, S.; Kouznetsov, V. V.
XI Congreso Nacional de Farmacología y Terapéutica y I Congreso Internacional de Farmacología, 17-19 de agosto de **2007**, Bucaramanga, Colombia.
4. *"Búsqueda de nuevos inhibidores de la acetilcolinesterasa"*.
Vargas, M. L. Y.; Amado, T. D. F.; Kouznetsov, V. V.
I Latin American Meeting on Medicinal Chemistry, 22-25 de abril de **2007**, Montevideo, Uruguay.
5. *"Migración del grupo acilo en la serie de 4-N-aril(bencil)amido-1-bencilpiperidinas como método simple, conveniente y eficiente para la síntesis de 1-acil-4-N-aril(bencil)aminopiperidinas"*.
Vargas, M. L. Y.; Kouznetsov, V. V.
XXVI Congreso Argentino de Química, 13-15 de septiembre de **2006**, San Luís, Argentina.
6. *"Transformación de nuevas espiro-4-piperidinas. Estudio de la migración de grupos acilo en los sistemas de la 1-acil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolinas] bajo condiciones de debencilación"*
Vargas, M. L. Y.; Kouznetsov, V. V.
Congreso Latinoamericano de Química, 16-20 de octubre de **2006**, La Habana, Cuba.
7. *"Síntesis y caracterización estructural de nuevas quinolinas espiroaneladas con el anillo γ -piperidínico"*.
Vargas, M. L. Y.; Kouznetsov, V. V.
XIV Congreso Colombiano de Química, mayo de **2006**, Armenia, Colombia.

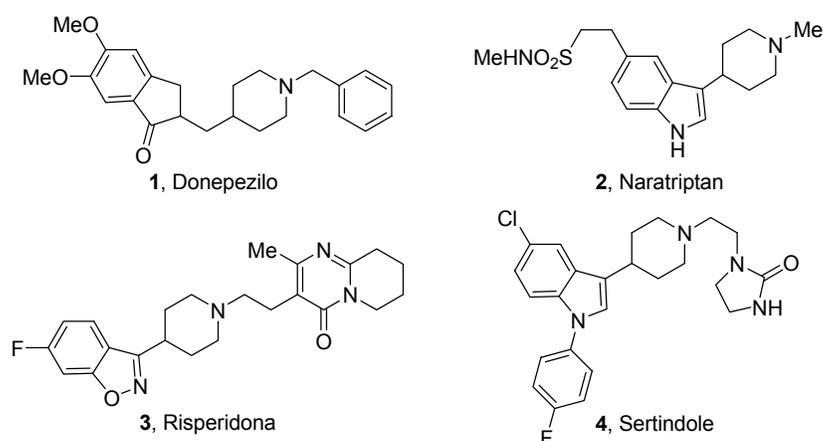
1. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE OBTENCIÓN DE NUEVAS ESPIROPIPERIDINAS C-4 SUSTITUIDAS CON EL ANILLO DE LA DIHIDROQUINOLINA VÍA REACCIONES DE ARILACIÓN INTRAMOLECULAR DE AMINOALQUENOS

1.1 ANTECEDENTES

El anillo piperidínico es una estructura ubicua, característica en muchos productos alcaloidales y candidatos a fármacos (Rubiralta *et al.*, 1991). Se calcula que durante julio de 1988 y diciembre de 1998 miles de compuestos piperidínicos (alrededor de 12.000) fueron mencionados en los estudios clínicos y preclínicos de los desarrollos farmacéuticos (Watson *et al.*, 2000). Aún mas, no es sorprendente que la 1,4-disustitución en la piperidina predomine en la literatura debido a la facilidad en la síntesis y a la ausencia de las numerosas complicaciones estereoquímicas presentes en los otros tipos de sustitución.

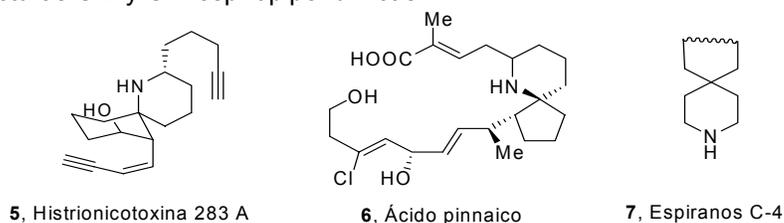
Desde 1993 se encuentran en el mercado farmacéutico cuatro nuevos, y diversos, productos que poseen este tipo de sustitución como componente central (Figura 1). El *aricep* (donepezilo, **1**), un inhibidor de la acetilcolinesterasa (Akasofu *et al.*, 2006), aprobado por la FDA en 1998, es corrientemente prescrito para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer. El *naramig* (naratriptan, **2**) un agonista de la 5-HT_{1D} y de la 5-HT_{1B}, se ha mostrado como una promesa en el tratamiento de los dolores de cabeza tipo migraña (Yevich *et al.*, 1997). Finalmente, el *risperdal* (risperidona, **3**) y el *serdolect* (sertindole, **4**), ambos antagonistas no selectivos de la 5-HT₂ y de la dopamina D₂, son utilizados en el tratamiento de la esquizofrenia (Andersen *et al.*, 1996; Marder, *et al.*, 1997).

Figura 1. Productos recientemente lanzados al mercado, que contienen el anillo piperidínico 1,4-disustituido como uno de los principales componentes estructurales.



1.1.1. Espiropiperidinas. Las espiropiperidinas son una subclase particular de este sistema heterocíclico. La diversidad molecular de la espirounión entre piperidina y otros anillos carbocíclicos o heterocíclicos ha generado una plétora estructural sin precedentes. Revisando múltiples ejemplos de este tipo de espiranos, se puede notar que la naturaleza biosintetiza alcaloides C-2 espiropiperidínicos como *p. ej.* la histrionicotoxina **5**, una neurotoxina aislada de las secreciones de la piel de las ranitas *Dendrobatidae* (Daly *et al.*, 1999), y el ácido pinnaico **6**, aislado del bivalvo marino *Pinna muricata* (Chou *et al.*, 1996) Ambos sistemas espiránicos son blancos atractivos en la síntesis orgánica (Dake, 2006); mientras tanto los espiranos C-4 del tipo **7**, surgen en los laboratorios de síntesis orgánica del mundo (Figura 2).

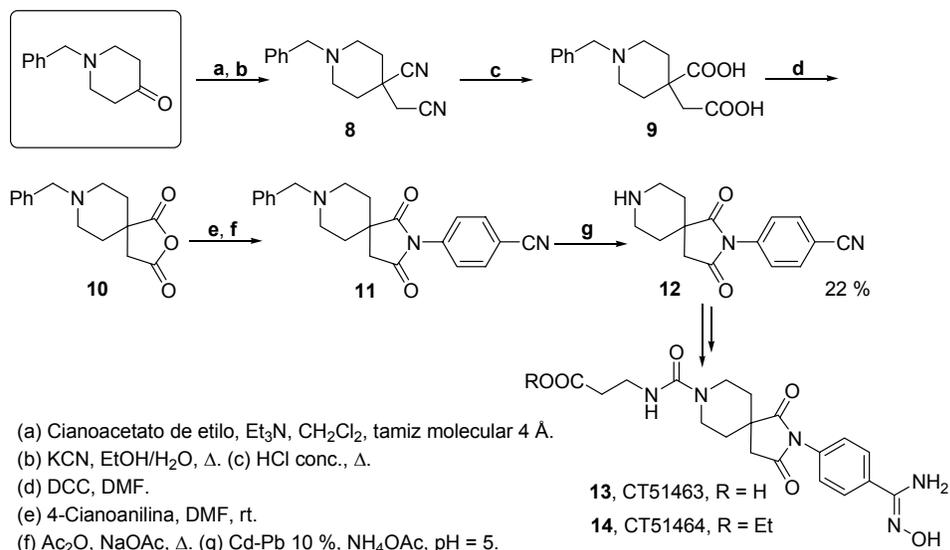
Figura 2. Estructuras C-2 y C-4 espiropiperidínicas.



La tarea de clasificar estos últimos derivados no es tan fácil, ya que cada año aparece nueva información química y biológica de ellos. El análisis de la síntesis y química de las piperidinas C-4 espiroenlazadas con carbociclos no entra en el tema de la tesis, aunque algunas de ellas son modelos interesantes que se unen selectivamente a los σ -receptores (agentes antipsicóticos) (Moltzen *et al.*, 1995; Maier *et al.*, 2002), y al receptor opioide ORL1 (analgésicos) (Goto *et al.*, 2006). Las piperidinas C-4 espiroenlazadas con heterociclos de diferentes tamaños y naturaleza química son de interés especial para nuestra investigación, por eso, siguiendo la lógica de nuestro trabajo en esta sección se seleccionan y reseñan sus ejemplos más representativos.

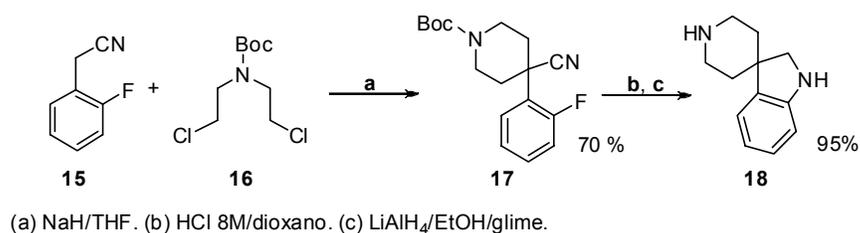
La preparación de piperidinas espiroaneladas con heterociclos casi siempre inicia con la transformación preliminar de las γ -piperidonas. Por ejemplo, la síntesis de la espiropiperidina **12** consta de un gran número de pasos, siete en total, a partir del producto comercial *N*-bencil- γ -piperidona, y el compuesto **12** no es el producto final, es apenas el bloque de construcción para generar nuevos antagonistas de las glucoproteínas IIb y IIIa, los *prodrugs* **13** y **14**, denominados CT51464 y CT51463 (Mehrotra, *et al.*, 2004) (Esquema 1). La formación de la espirounión es la etapa clave del proceso; ésta se llevó a cabo por medio de la deshidratación del diácido **9** en presencia de DCC (1,3-diciclohexilcarbodiimida).

Esquema 1. Formación de la espirounión en los precursores de las espiropiperidinas CT51464 y CT51463.



Otra ruta de acceso a espirouniones es la alquilación del 2-fluorofenilacetoniitrilo **15** con la bis(2-cloroetil)amida **16** en presencia de hidruro de sodio, lo que conduce a la formación del anillo piperidínico **17**; precursor apropiado para formar la 1'-H-espiro[indolin-3,4'-piperidina] **18** (Xie *et al.*, 2004) (Esquema 2).

Esquema 2. Preparación de la 1'-H-espiro[indolin-3,4'-piperidina].

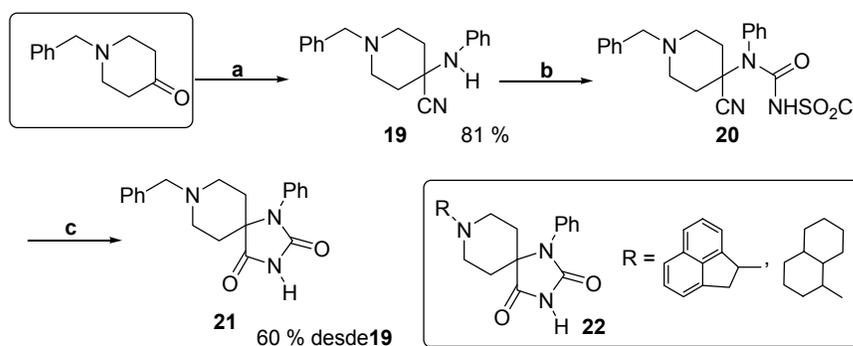


Este espirano es la estructura base del agente MK-0677, un potente peptidomimético de la GHS (Hormona liberadora de la hormona del crecimiento) (Bednarek, *et al.*, 2000).

Sin embargo, este último ejemplo de preparación de espiropiperidinas no permite generar gran diversidad estructural, por eso, la *N*-bencil- γ -piperidona se ha convertido en un material indispensable, relativamente económico, y asequible para la síntesis de otros sistemas heterocíclicos en base de espiropiperidinas.

Los espiranos **22** -1,3,8-triazaspiro[4.5]decano-2,4-dionas- se consideran modelos muy interesantes en los estudios farmacológicos como agonistas y antagonistas del receptor ORL1, que actualmente se conoce como el receptor NOP (receptor de la nociceptina) (Barlocco *et al.*, 2000; Rover *et al.*, 2000). Su síntesis se consiguió por una reacción de Strecker multicomponente entre la *N*-bencil-4-piperidona, cianuro de trimetilsililo y varias aminas primarias. La posterior alquilación y ciclación de las 4-ciano-4-arylaminopiperidinas **20** conduce a los precursores, los sustratos espiránicos **21** (Feldman *et al.*, 1990) (Esquema 3).

Esquema 3. Preparación de 1,3,8-triazaspiro[4.5]decano-2,4-dionas.



(a) TMSCN, HOAc, PhNH₂. (b) ClSO₂NCO, CH₂Cl₂. (c) HCl_{ac}.

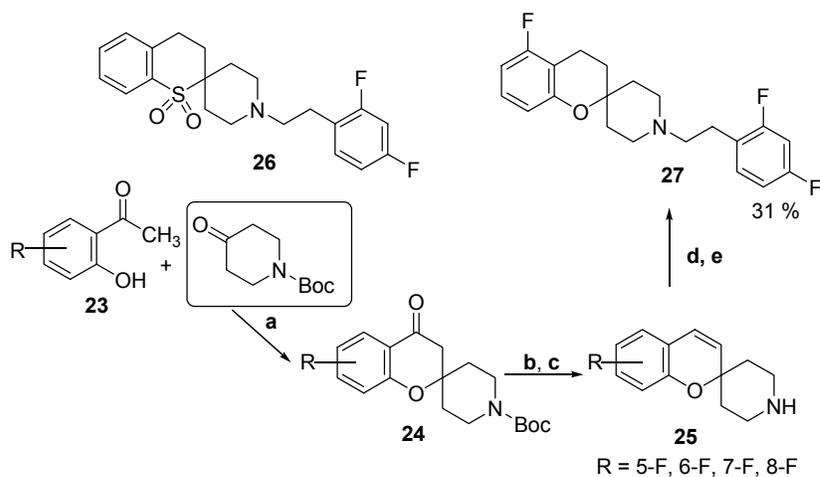
Otros espiranos de interés farmacológico son las moléculas compuestas entre piperidinas y benzo(tio)pironas **26** y **27**, ambos sistemas preparados por una ruta similar.

La formación de la espirounión en las espiro[2*H*-1-benzopirano-2,4'-piperidinas] **26** se dió por una condensación común, catalizada por bases entre la *N*-Boc- γ -piperidona, (producto comercial con el precio alto) y la 2-hidroxiacetofenona **23**. Los precursores **24** fueron transformados en los dihidroespiranos **25**, por reducción del grupo C=O con borano, y subsecuentes eliminaciones de agua y del grupo N-protector. Las etapas finales fueron: N-alquilación con el bromuro de 2,4-difluorofenetilo e hidrogenación catalítica (Fletcher *et al.*, 2002) (Esquema 4).

Otra posibilidad de formar la espirounión entre piperidinas y heterociclos, especialmente nitrogenados, surge del potencial químico de las 4-ariliminopiperidinas derivadas de γ -piperidonas N-alquil sustituidas y bencil (α -furilmetil)aminas (Kuznetsov *et al.*, 1994; Varlamov *et al.*, 2002; Zubkov *et al.*, 2004).

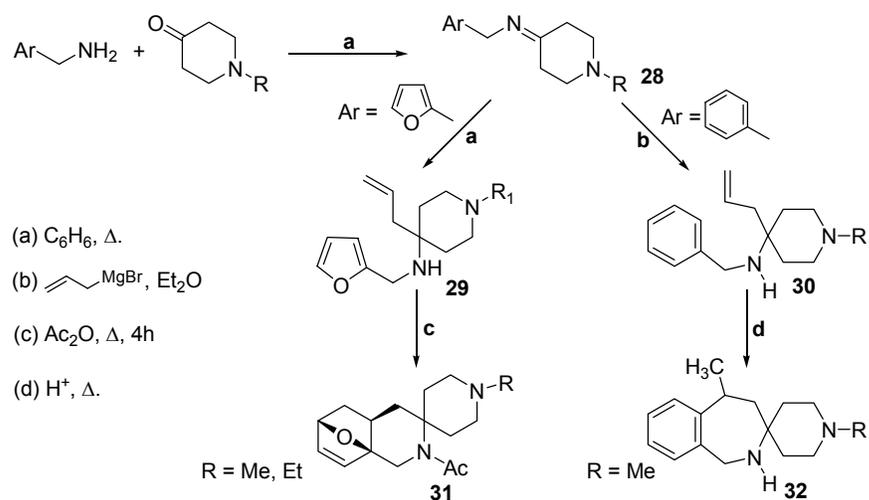
Diversas γ -ariliminopiperidinas **28** fueron utilizadas exitosamente en la construcción de nuevos espirosistemas nitrogenados. Sus rutas sintéticas emplean los productos de la reacción de Grignard, las γ -alil- γ -*N*-arilaminopiperidinas **29** y **30**, como precursores de la epoxiespiro[octahidroisoquinolina-3,4'-piperidina] **31** y la tetrahidroespiro[3*H*-2-benzazepina-3,4'-piperidina] **32** (Esquema 5).

Esquema 4. Formación de la espirounión en las espiro[2*H*-1-benzopirano-2,4'-piperidinas].



(a) Pirrolidina, EtOH, r.t. 18h (b) Borano/THF, reflujo, 16 h. (c) HCl 5N, reflujo, 2.5 h. (d) Bromuro de 2,4-difluorofenilo, K₂CO₃, CH₃CN, reflujo, 10 h. (e) Pd/C, H₂ (55 psi), EtOH, HCl 1N, 8 h.

Esquema 5. Construcción de epoxiespiro[octahidroisoquinolina-3,4'-piperidinas] y tetrahidroespiro[3*H*-2-benzazepina-3,4'-piperidinas] a partir de 4-ariliminopiperidinas.



Tal vez, la reacción entre γ -iminopiperidinas y reactivos de Grignard insaturados es una de las mejores opciones para crear este tipo de espiranos, por su simplicidad y eficacia.

1.1.2. Espiro[piperidina-4,2'-quinolinas]. Teniendo en cuenta que: i) el sistema de la espiro[piperidina-4,2'-quinolina] incluye los anillos de quinolina y piperidina los cuales son una clase de compuestos privilegiados en el desarrollo de fármacos; ii) hasta el momento no existe información alguna sobre su interacción con diversos receptores biológicos, esto debido a que sus síntesis no han sido exploradas a fondo, los investigadores piensan que estos sistemas podrían convertirse en modelos muy interesantes en los estudios farmacológicos (Arya *et al.*, 2005).

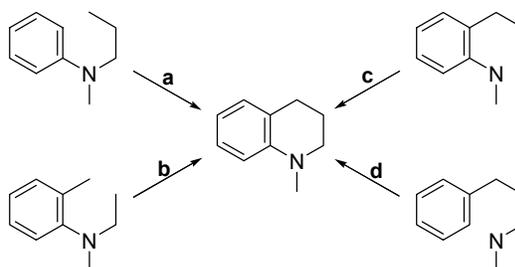
La presencia de una amplia variedad de productos naturales bioactivos - alcaloides- con el esqueleto tetrahydroquinolínico (Dewick, 1997) ha impulsado el desarrollo de métodos sintéticos dirigidos a la preparación de derivados del anillo de la tetrahydroquinolina. Estos métodos se encuentran revisados (Katritzky *et al.*, 1996; Kouznetsov *et al.*, 1998), para mencionarlos, se da un breve panorama de su estado de desarrollo.

En general, para acceder al anillo tetrahydroquinolínico existen dos métodos tradicionales: hidrogenación de quinolinas y la ciclación intramolecular de precursores acíclicos.

La hidrogenación de quinolinas sigue siendo un método efectivo de obtención de tetrahydroquinolinas, las quinolinas apropiadas son fácilmente accesibles por otros caminos. La reducción directa de la parte heterocíclica del anillo quinolínico se realiza con hidrógeno molecular, y unos pocos catalizadores: PtO₂, Co(estearato)₂. Varias reducciones químicas incluyen el uso de sistemas Na/n-BuOH, Ni-Al/NaOH, HCOOH-NEt₃/Pd/C, NaBH₄/NiCl₂ y NaBH₃CN/HCl. La utilización de cada uno de ellos depende de la compatibilidad con las funcionalidades sobre el anillo quinolínico, lo que a veces, limita generar las correspondientes tetrahydroquinolinas.

Una táctica que permite ampliar el número de tetrahydroquinolinas con diversidad de funcionalidades, son las ciclaciones intramoleculares de enlaces tipo C-C y C-N de precursores acíclicos (Esquema 6).

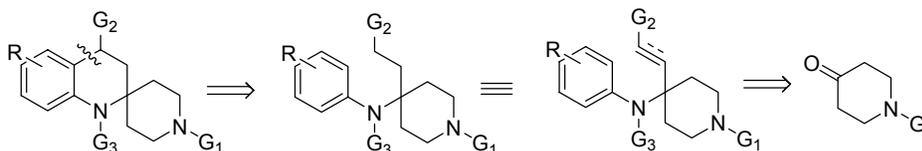
Esquema 6. Tipos de cierre C-C y C-N para generar el anillo tetrahydroquinolínico.



Se tienen dos posibilidades de cierre de enlace C-C y también dos para formar enlace C-N. Analizando la literatura química, se puede notar que tres de ellas (rutas **b**, **c**, y **d**) no pueden ofrecer la formación de los sistemas de la espiro[piperidina-4,2'-quinolina]; estas rutas requieren precursores espiránicos poco o difícilmente accesibles.

El único acceso fácil a la formación de espiropiperidinas quinolónicas es el camino **a**, -donde se requiere de los precursores piperidínicos adecuados-, cuyas ciclaciones intramoleculares catalíticas permiten realizar el cierre de enlace C-C (Esquema 7).

Esquema 7. Análisis retro-sintético de la estructura de las espiro[piperidina-4,2'-quinolinas].



El proceso de la formación del enlace C-C es la quintaesencia de la química orgánica y está en desarrollo constante. Su versión intramolecular es también de

suma importancia para la construcción moléculas cíclicas. Las espiro[piperidina-4,2'-quinolinas] a preparar en nuestra investigación, pueden considerarse como productos de la reacción de hidroarilación catalítica de alquenos.

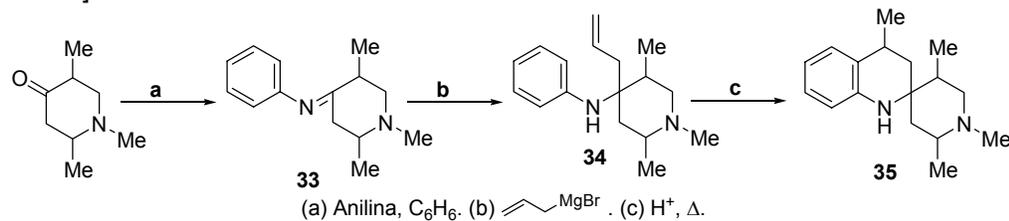
La reacción de **hidroarilación** consiste en la adición de enlaces C-H, provenientes de un areno, a una sustancia olefínica o a un alquino, generando de esta manera la formación de un nuevo enlace C-C, favorecida por el empleo de catalizadores que optimizan el proceso. La reacción de hidroarilación es considerada como una sustitución electrófila aromática, que guarda gran similitud con la reacción de alquilación de Friedel-Crafts (Li et al., 2005).

El desarrollo de catalizadores para la hidroarilación de olefinas y alquinos ha recibido gran atención por los químicos orgánicos. Para favorecer el proceso de hidroarilación, se han empleado una gran cantidad y variedad de ellos, se destacan los ácidos de Lewis, Brønsted, complejos de paladio y platino (Ogata *et al.*, 1971), y el ion iodonio proveniente de IPy₂BF₄ (Barluenga *et al.*, 2004).

La revisión de la literatura química indica que actualmente la reacción de hidroarilación intramolecular catalizada por diversos ácidos es una herramienta poderosa en la síntesis de heterociclos de seis eslabones, como los cromanos, las cumarinas y las 3,4-dihidroquinolin-2-onas (Barluenga *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2000, Jean-François *et al.*, 1983; Elliot *et al.*, 2004; Conley *et al.*, 1964).

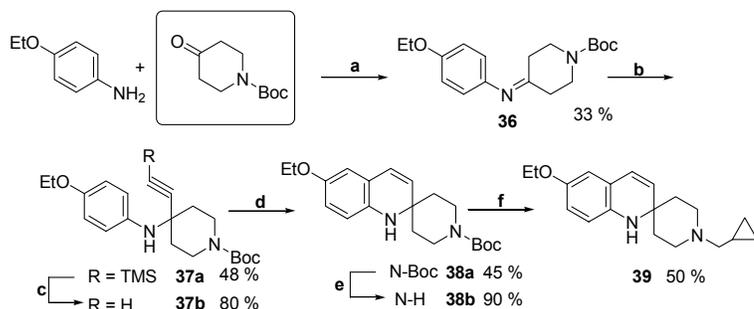
Teniendo un precursor apropiado **34** en esta ruta se puede acceder al sistema de la espiro[piperidina-4,2'-quinolina] **35** (Kouznetsov *et al.*, 1997; Prostakov *et al.*, 1989). Este precursor fue obtenido a partir de la 1,2,5-trimetil- γ -piperidona, el material de partida esencial para la fabricación del fármaco analgésico -promedol-. Así, vía la reacción de hidroarilación de la 4-alil-4-N-fenilamino- piperidina **34** fue realizada primera construcción de este sistema (Esquema 8).

Esquema 8. Primera construcción del sistema de la 3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1*H*)quinolina].



Luego, este material de partida poco accesible fue cambiado por el producto comercial: *N*-Boc-γ-piperidona, para generar las dihidro- **38** y **39** y las tetrahidroespiro[piperidina-4,2'-quinolinas] **43** y **44**, cuyo interés farmacológico se mantiene desde que en los años 80's fuera preparada la etoxiquina -1,2-dihidro-6-etoxi-2,2,4-trimetilquinolina-, un poderoso antioxidante sintético con acción protectora sobre el sistema nervioso central (Pryor *et al.*, 1988). Series de derivados de ambos sistemas han sido sintetizados, y estudiados para intentar aumentar la lipofilidad y así facilitar la penetración en el sistema nervioso central. La síntesis del espirano **39** consta de seis etapas a partir de 4-etoxianilina y la *N*-Boc-γ-piperidona, utilizando la ciclación 6-*endo*-dig de la 4-etinil-4-*N*-arilaminopiperidina **37b** como reacción clave en el proceso (Dorey *et al.*, 2000) (Esquema 9).

Esquema 9. Preparación de análogos del antioxidante etoxiquina.

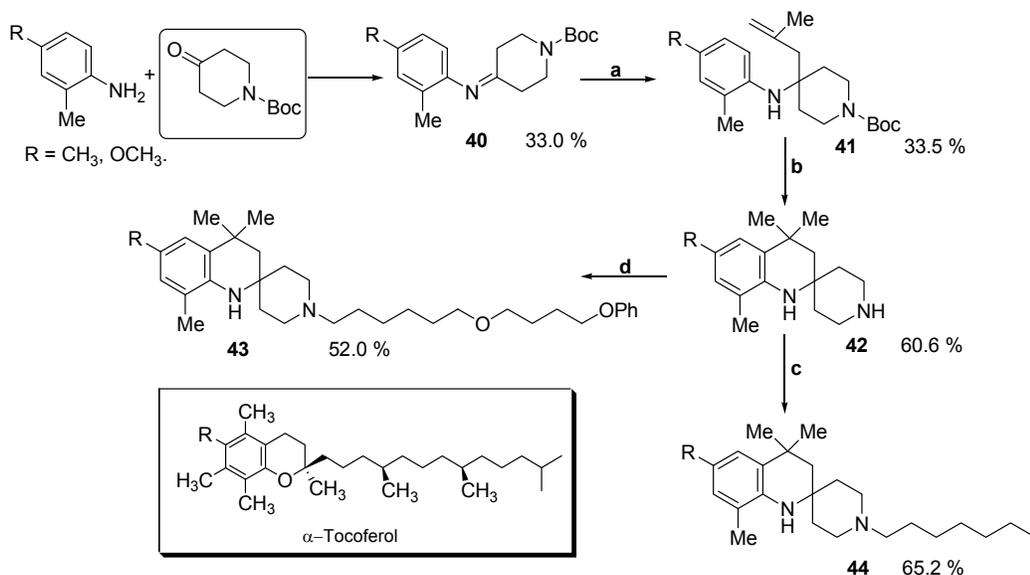


(a) Tamiz molecular 5 Å, Et₂O, rt. (b) trimetilsililacetileno, *n*-BuLi, THF, -78 °C - rt. (c) TBAF, THF, 0°C. (d) CuCl, tolueno, reflujo. (e) HCl, EtOH. (f) bromometilciclopropano, K₂CO₃, CH₃CN, reflujo.

Las tetrahidroespiro[piperidina-4,2'-quinolinas] **43** y **44** fueron diseñados como estructuras *mímicas* del α -tocoferol, y al igual que éste, son inhibidores selectivos de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad en el plasma. Su síntesis también parte del producto comercial: *N*-Boc- γ -piperidona y consiste en varias reacciones consecutivas: adición de metalilitio a la imina **40**, ciclación 6-*exo*-trig, desprotección del grupo Boc y N-alkilación (Brown *et al.*, 1997) (Esquema 10).

Otro modo de efectuar el cierre C-C, es a través de la famosa y potente reacción de Heck, lo cual fue demostrado por un grupo de químicos franceses; en su aproximación usaron la 4-alil-4-*N*-(2-bromofenil)aminopiperidina **46b**, preparada previamente por adición del bromuro de alilmagnesio a la imina **45** (Cossy *et al.*, 1998) (Esquema 11).

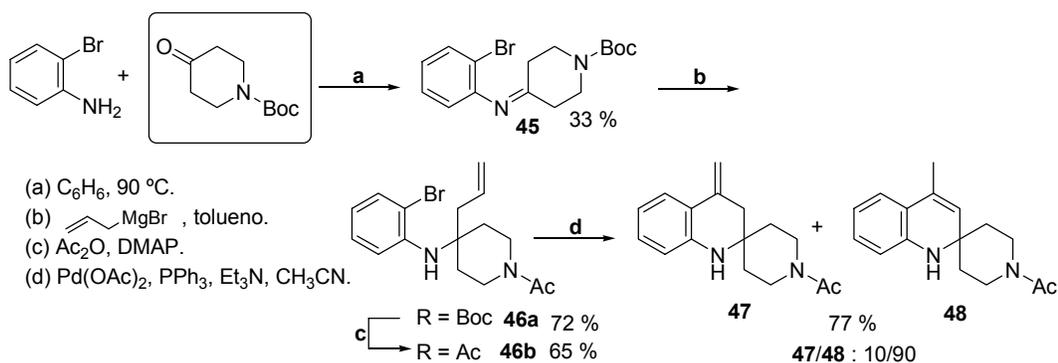
Esquema 10. Preparación de espiropiperidinas antioxidantes con afinidad por las lipoproteínas plasmáticas de baja densidad.



Para $R = \text{CH}_3$: (a) $\text{LiCH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_3$, THF, 30 h. (b) H_2SO_4 conc. 50-60 °C, 10 min. (c) Heptanal, triacetoxiborohidruro de sodio, 1,2-dicloroetano, r.t. 4 h. (d) Bromuro de 11-fenoxi-7-oxaundecilo, K_2CO_3 , CH_3CN , reflux, 4h.

Salta a la vista que estos procesos son poco efectivos en las etapas iniciales (~ 30 %), y la ciclación intramolecular ocurre con rendimientos aceptables (~ 60 %).

Esquema 11. Síntesis de espiro[piperidina-4,2'-quinolinas] usando la reacción de Heck.



A pesar de la efectividad de esta ciclación, la obtención de la espiro[piperidina-4,2'-quinolina] **48** se complicó por la formación del producto de ciclación 6-*endo*-trig **47**, en alta proporción.

En resumen, el análisis de la literatura química nos muestra que actualmente existe un solo camino confiable para construir el sistema de la espiro[piperidina-4,2'-quinolina] con aceptables rendimientos, y está basado en la reacción de hidroarilación de los alquenos apropiados.

La química y el estudio farmacológico de los derivados de este sistema, todavía están en su infancia. Por eso, hay necesidad del desarrollo de un método confiable y general para la obtención de los derivados de este sistema heterocíclico.

1.2 DESARROLLO DE UN NUEVO MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LAS 1H-DIHIDROESPIRO[PIPERIDINA-4,2'-(1'H)QUINOLINAS]

En este capítulo de la investigación se desarrolló un nuevo método de obtención del núcleo de las 1H-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolinas] utilizando la N-bencil- γ -piperidona y las 4-alil-1-bencil-4-N-arilaminopiperidinas, como productos de partida, siguiendo una metodología de síntesis orientada a la diversidad.

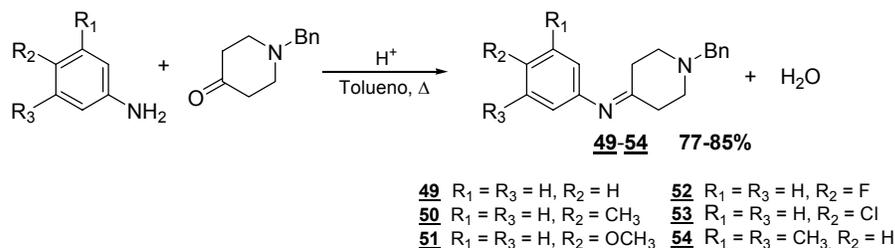
1.2.1. Preparación de las 4-alil-4-N-arilamino-1-bencil piperidinas, sustratos necesarios en la investigación. Muchos métodos sintéticos para la preparación de aminas homoalílicas usan la adición del alilo al doble enlace C=N de un imino derivado; este es el método más confiable y eficiente para su preparación, y ha sido ampliamente revisado (Bloch *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1999; Enders *et al.*, 1997; Alvaro *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2005), así como también las aplicaciones sintéticas en la preparación de N-heterociclos (Puentes *et al.*, 2002).

El grupo imino formado en la reacción de condensación de aminas y compuestos carbonílicos (Schiff 1864; Dalpozzo *et al.*, 2006) es un intermedio muy versátil en muchas transformaciones orgánicas (Patai 1970), incluyendo la formación de enlaces C-C por adición. Las nuevas 4-alil-1-bencil-4-N-arilaminopiperidinas fueron preparadas por adición del alilmetal -bromuro de alilmagnesio- a las correspondientes cetiminas derivadas de arilaminas y la N-bencil- γ -piperidona, usando el procedimiento tradicional de la reacción de Grignard, donde el organometálico fue preparado a partir de bromuro de alilo y magnesio en éter dietílico anhidro.

Típicamente estas reacciones se llevan a cabo por calentamiento de los reactantes en un disolvente orgánico y utilizando como catalizadores: bases, ácidos próticos o de Lewis (Sprung 1940; Layer 1963; Wagner 1954). En nuestro caso las cetiminas (**49-54**) se obtuvieron condensando cantidades equimolares de

la γ -piperidona como componente carbonílico, con aminas aromáticas primarias, anilina, 4-metilanilina, 4-metoxianilina, 4-fluoroanilina, 4-cloroanilina, y 3,5-dimetilanilina, en tolueno anhidro a reflujo, con destilación azeótropa de agua, durante 0.5-2 horas, y utilizando ácido acético glacial como catalizador (Esquema 12).

Esquema 12. Síntesis de las *N*-(1-bencilpiperidin-4-iliden)-*N*-arilaminas **49-54**.



Después de ser purificados por destilación fraccionada a presión reducida (p.eb. 176-206 °C/7 mmHg), los compuestos **49-54** se obtuvieron con altos rendimientos, entre el 77 y el 85%. Las iminas **49**, **52** y **53** cristalizaron después de la destilación. En la Tabla 1 se reúnen las constantes físicas y químicas de estos compuestos.

Las cetiminas se caracterizaron por espectrometría de masas. En la Figura 3 se presenta un espectro típico de este grupo de compuestos. De acuerdo con la posible fragmentación, en los espectros analizados se encontró el ion m/z 91 ($C_7H_7^+$) como pico de base y el ion m/z 172 ($C_{12}H_{14}N^+$) como ion *diagnóstico* para estas moléculas; además, en ellos se encontraron iones procedentes del mismo tipo de escisión como la pérdida de un hidrógeno lábil (Φ_1) y rupturas β (Φ_3 y Φ_4) en el anillo piperidínico (Tabla 2).

Tabla 1. Constantes físicas y químicas de las *N*-(1-bencilpiperidin-4-iliden)-*N*-arilaminas **49-54**.

Comp.	Fórmula empírica	Estado físico	p.eb (°C) / 7 mmHg	p.f. (°C)	R (%)	P.M. (g/mol)	CG t_R (min)
49	C ₁₈ H ₂₀ N ₂	Aceite incoloro, muy viscoso	176-178	26-27	84	264.36	31.42
50	C ₁₉ H ₂₂ N ₂	Aceite amarillo, muy viscoso	188-190	-	85	278.39	33.44
51	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O	Aceite amarillo, muy viscoso	195-196	-	85	294.39	-
52	C ₁₈ H ₁₉ FN ₂	Aceite incoloro, muy viscoso	180-181	104-105	82	282.35	31.29
53	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₂	Aceite amarillo, muy viscoso	204-206	75-76	77	298.81	35.81
54	C ₂₀ H ₂₄ N ₂	Aceite amarillo, muy viscoso	200-201	-	80	292.42	34.49

Figura 3. Posible fragmentación y espectro de masas de la *N*-(1-bencilpiperidin-4-iliden)-*N*-fenilamina (**49**).

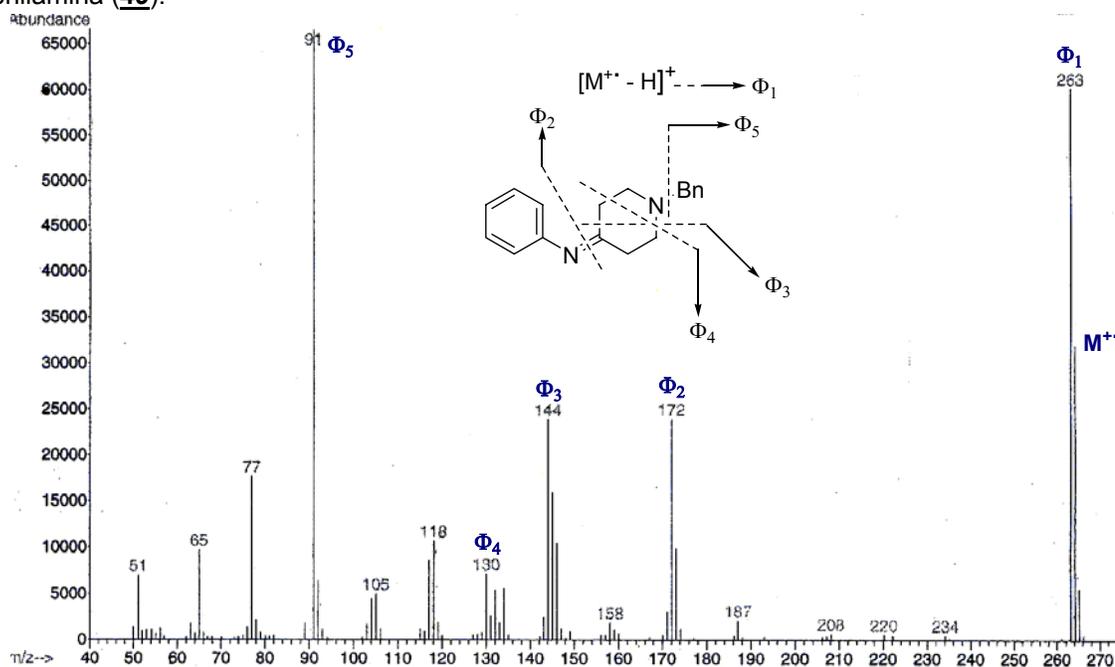
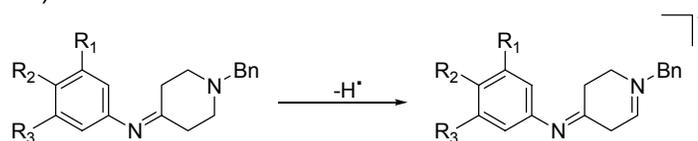


Tabla 2. Iones principales en la fragmentación de las *N*-(1-bencilpiperidin-4-iliden)-*N*-arilaminas **49-54**.

Comp.	<i>m/z</i> , (I, %)					
	M^+	$[M^+ - H]^+$	$[M^+ - (ArNH)]$	$[M^+ - (BnCH_3N)]$	$[M^+ - (BnC_2H_5N)]$	$[M^+ - (C_{11}H_{13}N_2)]$
49	264 (54)	263 (98)	172 (36)	144 (34)	130 (10)	91 (100)
50	278(53)	277(86)	172 (36)	158 (25)	144 (22)	91 (100)
52	282 (45)	281 ()	172 (28)	162 (23)	148 (10)	91 (100)
53	298 (35)	297 (55)	172 (32)	178 (13)	164 (4)	91 (100)
54	292 (38)	291 (80)	172 (78)	172 (78)	158 (29)	91 (100)

La intensa ruptura Φ_1 correspondiente a la pérdida de un radical hidrógeno, $[M^+ - H]^+$, es un proceso ampliamente estudiado y establecido por marcaje isotópico con deuterio (Porter 1985; Duffield *et al.*, 1965).³⁵ Esta escisión posiblemente ocurre de forma vecinal al nitrógeno piperidínico, formándose un ion iminio (Figura 4).

Figura 4. Posible ruta de la formación del ion iminio en la fragmentación de las *N*-(1-bencilpiperidin-4-iliden)-*N*-arilaminas.

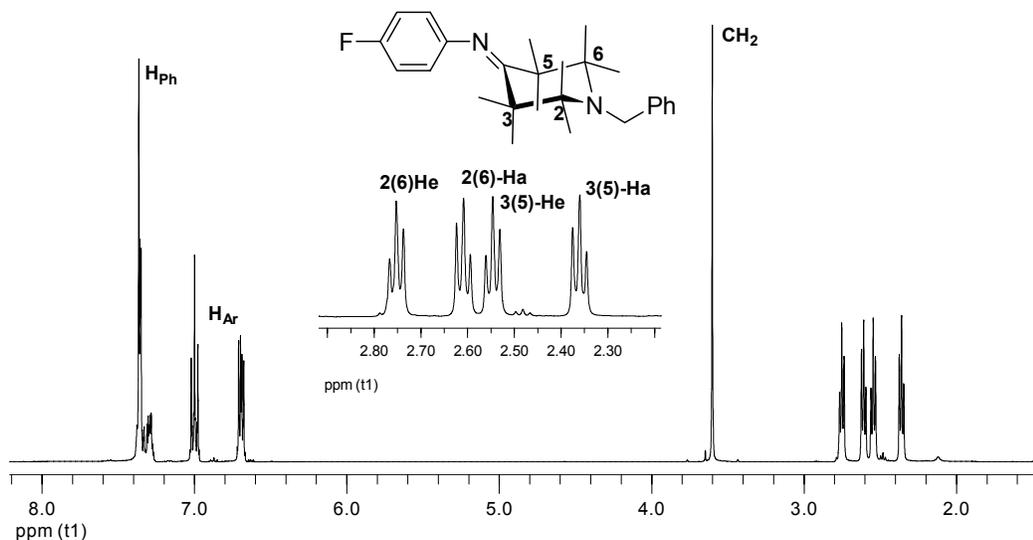


Para confirmar la formación de las iminas, el compuesto **52** derivado de la 4-fluoroanilina y la γ -piperidona, se caracterizó por resonancia magnética nuclear de 1H y ^{13}C . En el espectro de resonancia protónica se pueden diferenciar fácilmente las señales del anillo piperidínico: a 2.36, 2.55, 2.61 y 2.75 ppm resuenan los hidrógenos de los carbonos 3 y 5 de las disposiciones axiales y ecuatoriales respectivamente, en forma de tripletes ($J = 6.1$ Hz). A campos bajos, en el rango de 6.70-7.27 ppm se encuentran las señales de los hidrógenos aromáticos (Figura 5).

Las condiciones de síntesis de las cetiminas usadas en esta investigación son sencillas y efectivas y las reacciones se llevaron a cabo con altos rendimientos.

Los productos, por su misma naturaleza, se descomponen al exponerlas a la humedad del ambiente, por eso fueron utilizadas en la reacción subsiguiente el mismo día de su preparación.

Figura 5. Espectro de RMN de ^1H de la *N*-(1-bencilpiperidin-4-iliden)-*N*-(4-fluorofenil)amina (**52**).

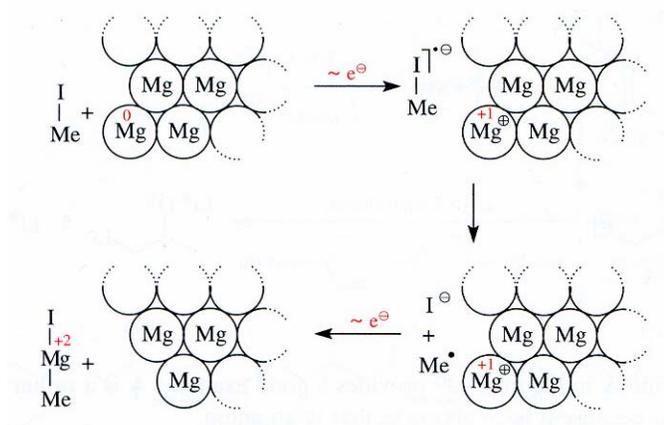


Una de las etapas más importantes en la historia de la síntesis orgánica es la introducción del magnesio por Barbier y Grignard hace más de una centuria, para formar enlaces C-C por adición de reactivos organometálicos al grupo carbonilo (Barbier 1898; Grignard 1900; Kharasch *et al.*, 1954; Zhang *et al.*, 1999; Coates *et al.*, 1975). Se han propuesto varias clases de mecanismos para explicar los intermediarios de la reacción y los productos formados, pero en general se acepta la interpretación de una estructura intermediaria RMgX (Pérez *et al.*, 1994; Garst *et al.*, 1989; Sakamoto *et al.*, 2001).

La reacción se inicia por la transferencia de un electrón desde la superficie del metal al sustrato. El electrón extra ocupa el orbital $\sigma^*(\text{C-I})$, lo que ocasiona el rompimiento del enlace; en la ruptura se forman: un radical metilo y un ion yoduro.

En la tercera etapa de la reacción la valencia del septeto de electrones del radical metilo se convierte en octeto por formación de un enlace covalente entre el radical metilo y un radical metálico (Figura 6) (Bruckner 2002).

Figura 6. Mecanismo de la formación de los compuestos de Grignard; $\sim e^\ominus$ indica migración del electrón.



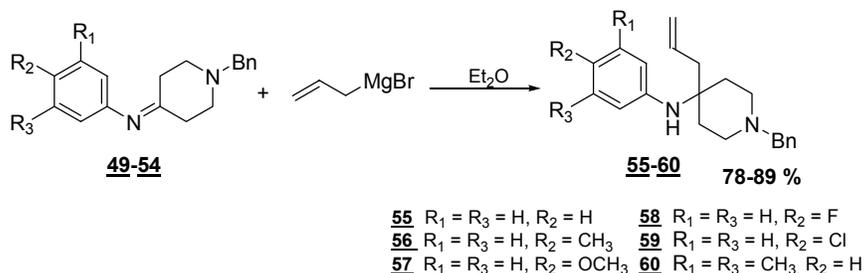
El procedimiento de *Barbier-Grignard* de alilación de iminas para obtener homoalilaminas utilizando una amplia variedad de reactivos alil-metálicos, ha sido intensamente estudiado (Volkman 1991; Kleinman *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1993; Bloch 1998; Kouznetsov *et al.*, 2008). Varias especies organometálicas (principalmente compuestos alílicos de Li, Mg, Cu, y Zn) han sido usadas con éxito en la alilación de iminas. Sin embargo, cuando se trata de la alilación de iminas derivadas de compuestos carbonílicos alifáticos, las metodologías más exitosas tienen limitaciones: este tipo de compuestos son inestables (son sensibles al agua y al aire), y tienen una pobre reactividad a causa de su baja electrofilia. Los recientes desarrollos sintéticos en los que la reacción se lleva a cabo en forma one-pot multicomponentes no son efectivos para la alilación de las iminas derivadas de la γ -piperidona (Kouznetsov *et al.*, 2008).

Para la generación de las homoalilaminas **55-60**, se presintetizó la especie alil-metal a partir de bromuro de alilo y magnesio metálico en éter dietílico. Antes de

preparar el organometálico, la capa de oxido formada en la superficie del metal fue removida de forma química agitando fuertemente las virutas de magnesio con yodo metálico, para de esta forma, “cortar” la superficie del metal y hacerlo reactivo.

Al bromuro de alilmagnesio, preparado inmediatamente antes de su uso, se le adicionaron las cetiminas **49-54** disueltas en éter etílico anhidro, a temperatura ambiente y con agitación vigorosa (Esquema 13). Finalizada la adición, la masa de reacción se trató con hielo y una pequeña cantidad de cloruro de amonio, seguidamente se extrajo con éter, y después de secar las fases orgánicas (Na_2SO_4), las nuevas aminopiperidinas **55-60** fueron aisladas por destilación fraccionada a presión reducida (7 mmHg), como aceites incoloros o amarillos, muy viscosos, con muy altos puntos de ebullición (entre 195 y 222 °C). Los compuestos **58-60** cristalizaron como sólidos de punto de fusión definido después de la destilación. Los rendimientos de la reacción fueron bastante buenos, entre el 78 y el 89%.

Esquema 13. Síntesis de las 4-alil-4-*N*-arilamino-1-bencilpiperidinas **55-60**.



En la Tabla 3 se recogen las características y constantes físicas y químicas de cada uno de los nuevos productos **55-60**.

Tabla 3. Constantes físicas y químicas de las 4-alil-4-*N*-arilamino-1-bencilpiperidinas **55-60**.

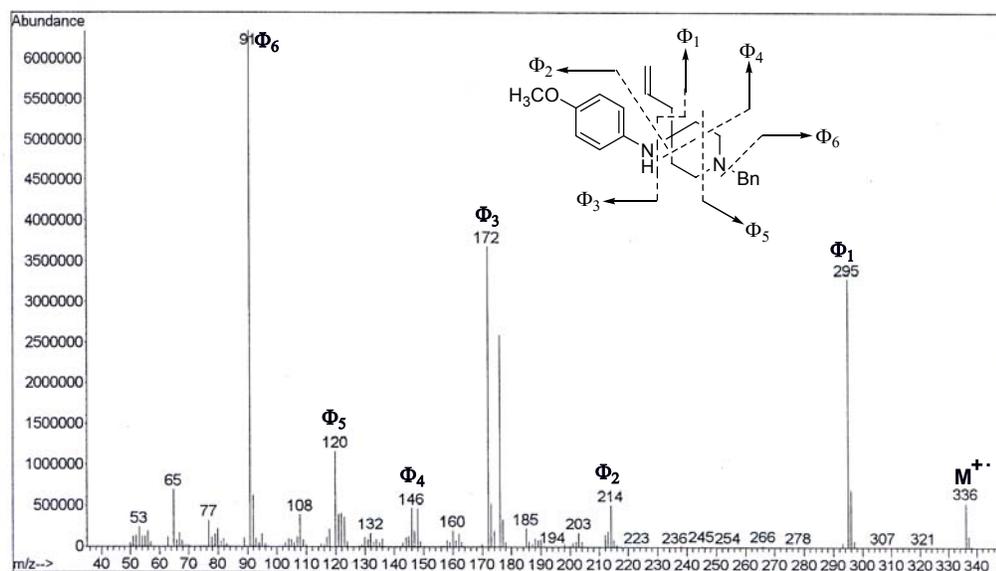
Comp.	Fórmula empírica	Estado físico	p.eb (°C)/ 7 mmHg	p.f. (°C)	R (%)	P.M. (g/mol)	CG t _R (min)	IR (cm ⁻¹) ν _{N-H}
55	C ₂₁ H ₂₆ N ₂	Aceite incoloro, muy viscoso	195-196	-	82	306.45	35.41	3414
56	C ₂₂ H ₂₈ N ₂	Aceite incoloro, muy viscoso	201-202	-	78	320.47	37.49	3414
57	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	Aceite amarillo, muy viscoso	210-212	-	89	336.47	41.98	3406
58	C ₂₁ H ₂₅ FN ₂	Aceite incoloro, muy viscoso	198-200	56-57	85	324.44	35.34	3417
59	C ₂₁ H ₂₅ ClN ₂	Aceite amarillo, muy viscoso	220-222	78-79	85	340.89	42.13	3417
60	C ₂₃ H ₃₀ N ₂	Aceite amarillo, muy viscoso	216-217	47-48	89	334.50	38.27	3417

Los estudios de espectroscopia infrarroja de las homoalilaminas muestran la aparición de una banda de mediana intensidad en la zona de 3417-3406 cm⁻¹, correspondiente a la vibración de tensión del grupo N-H (Tabla 3). En los espectros de masas los fragmentos característicos principales de estos compuestos son los iones C₇H₇⁺ (*m/z* 91, pico de base) y los correspondientes a la ruptura alílica (Φ₁). Adicionalmente, se encontraron cuatro iones *diagnósticos* *m/z* 214 (C₁₅H₂₀N⁺), *m/z* 172 (C₁₂H₁₄N⁺), *m/z* 146 (C₁₀H₁₂N⁺) y *m/z* 120 (C₈H₁₀N⁺) productos de las rupturas β (Φ₂-Φ₅) en los anillos piperidínico y arílico (Tabla 4). En la Figura 7 se presenta la posible ruta de fragmentación y un espectro típico de las homoalilaminas **55-60** analizadas por CG-EM.

Las estructuras de las homoalilaminas preparadas se confirmaron con experimentos de resonancia magnética nuclear. Los espectros de RMN ¹H de las homoalilaminas **55-60**, se caracterizan por la presencia de tres grupos de señales

en zonas distintas: los protones piperidínicos, los protones del fragmento alílico y los protones aromáticos (arílicos y bencílicos).

Figura 7. Espectro de masas y fragmentación principal del ion molecular de la 4-alil-4-*N*-(4-metoxifenil)amino-1-bencilpiperidina (**57**).



En el espectro de RMN ^1H de la 4-alil-4-*N*-(4-clorofenil)amino-1-bencilpiperidina, compuesto **59** (Figura 8), se observan grupos de señales a 1.68, 1.90, 2.30 y 2.57 ppm, correspondientes a la resonancia de los protones piperidínicos; a 3.37 ppm aparece como un singlete ancho el hidrogeno del grupo amino secundario. El protón olefínico $=\text{CH}_{2(\text{trans})}$ resuena a 4.98 ppm con una constante de acoplamiento $J_{\text{trans}} = 17.0$ Hz; el $=\text{CH}_{2(\text{cis})}$ a 5.04 ppm, con una constante de acoplamiento $J_{\text{cis}} = 10.2$ Hz. El protón $=\text{CH}$ aparece como un multiplete entre 5.69-5.79 ppm. Los hidrógenos $-\text{CH}_2$ del fragmento alílico generan un doblete centrado en 2.43 ppm con $J = 7.3$ Hz. Los hidrógenos aromáticos resuenan a campo bajo en el intervalo de 6.60 y 7.29 ppm.

Figura 8. Espectro de RMN de ^1H de la 4-alil-4-*N*-(4-clorofenil)amino-1-bencilpiperidina (**59**).

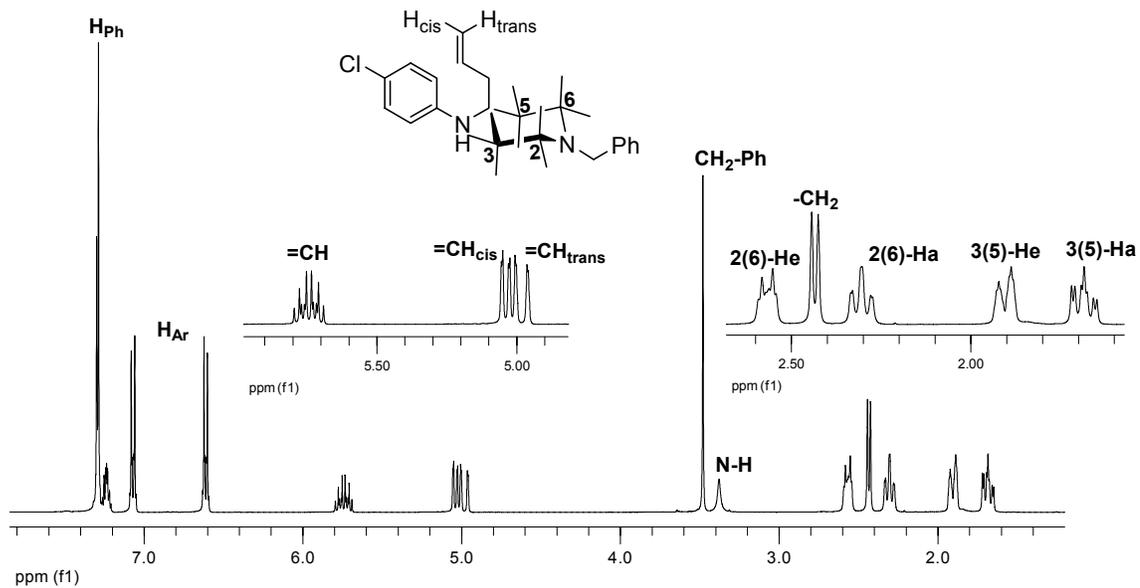
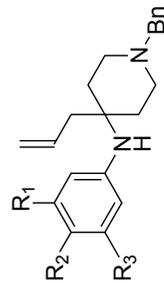


Tabla 4. Iones principales en la fragmentación de las 4-allyl-4-N-arylamino-1-bencilpiperidinas **55-60**.

Comp.	<i>m/z</i> , (I, %)						
	<i>M</i> ⁺	<i>F</i> ₁	<i>F</i> ₂	<i>F</i> ₃	<i>F</i> ₄	<i>F</i> ₅	<i>F</i> ₆
55	306 (5)	[<i>M</i> ⁺ -(C ₃ H ₅) ⁺]	<i>M</i> ⁺ -(ArNH)	[<i>F</i> ₁ ⁺ -ArNH ₂]	[<i>M</i> ⁺ -(ArNHC ₅ H ₈)]	[<i>M</i> ⁺ -(ArNHC ₇ H ₁₀)]	[<i>M</i> ⁺ -(ArNHC ₈ H ₁₃ N)]
	265 (46)	214 (9)	172 (85)	146 (33)	120 (22)	91 (100)	
56	320 (6)	265 (50)	214 (7)	172 (82)	146 (11)	120 (23)	91 (100)
57	336 (9)	295 (57)	214 (10)	172 (66)	146 (10)	120 (23)	91 (100)
58	324 (4)	283 (39)	214 (10)	172 (71)	146 (6)	120 (24)	91 (100)
59	340 (4)	299 (30)	214 (11)	172 (76)	146 (7)	120 (25)	91 (100)
60	334 (5)	293 (52)	214 (7)	172 (100)	146 (16)	120 (20)	91 (98)



- 55** R₁ = R₃ = H, R₂ = H
56 R₁ = R₃ = H, R₂ = CH₃
57 R₁ = R₃ = H, R₂ = OCH₃
58 R₁ = R₃ = H, R₂ = F
59 R₁ = R₃ = H, R₂ = Cl
60 R₁ = R₃ = CH₃, R₂ = H

En la Tabla 5 se pueden encontrar la asignación de las señales de los espectros de RMN ^1H para los compuestos **54-60**.

Otro punto a tener en consideración para la caracterización de las homoalilaminas, son los espectros de RMN ^{13}C ; en la Tabla 6 se pueden encontrar las señales de más interés en la caracterización de estos compuestos. Los carbonos del fragmento alílico resuenan entre: 42.5-42.9, 117.7-118.1, y 133.3-134.0 ppm para los carbonos $-\text{CH}_2$, $=\text{CH}_2$ y $=\text{CH}$ respectivamente.

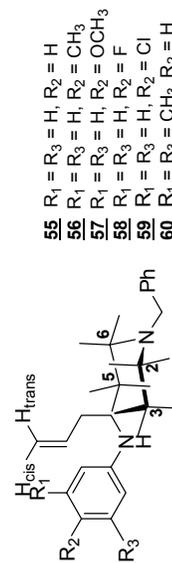
Tabla 6. Datos de RMN- ^{13}C para los 4-N-arilaminobutenos **55-60**.

Comp.	Desplazamientos químicos δ (ppm)					
	Piperidínicos			Alílicos		
	3(5)-C	2(6)-C	4-C	$=\text{CH}_2$	$=\text{CH}$	$-\text{CH}_2$
55	35.6	49.2	53.6	117.9	133.8	42.8
56	35.6	49.3	53.7	117.8	133.9	42.9
57	35.6	49.3	54.1	117.9	133.9	42.9
58	35.6	49.2	53.4	118.1	133.6	42.7
59	35.5	49.1	53.8	118.1	133.3	42.5
60	35.5	49.2	53.4	117.7	134.0	42.8

Las diversas posibilidades de transformación química a las que puede ser sometido el doble enlace $\text{C}=\text{C}$ del fragmento alílico o el átomo de nitrógeno básico, hace de las homoalilaminas no solo intermediarios de gran valor sintético en la obtención de diversos heterociclos nitrogenados, ellos también son modelos interesantes en las investigaciones de bioactividad como antifúngicos y antiprotozoarios (Kuznetsov *et al.*, 1995; Kouznetsov *et al.*, 2000). La simplicidad del procedimiento de Grignard y la accesibilidad de los materiales de partida permitió la preparación de las aminopiperidinas en grandes cantidades, los cuales son los sustratos apropiados para la construcción del anillo tetrahydroquinolínico por una hidroarilación catalítica de alquenos.

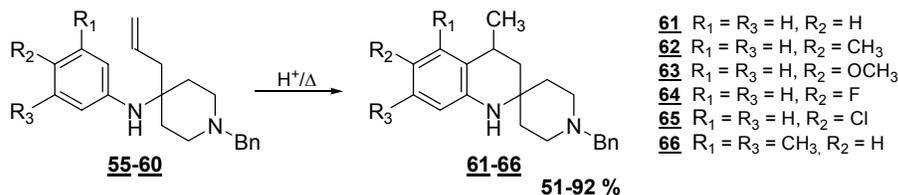
Tabla 5. Datos de RMN-¹H para las 4-allyl-4-N-aryl-amino-1-bencilpiperidinas **55-60**.

Comp.	Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz)											
	Piperidínicos			Alílicos				Otros			Arílicos y bencilícos	
	3(5)-Ha	3(5)-He	2(6)-Ha	2(6)-He	=CH ₂ (trans)	=CH ₂ (cis)	=CH	-CH ₂	NH	CH ₂ -Ph		R
55	1.61 (ddd) J = 14.2, 10.9, 3.9	1.86 (dt) J = 13.7, 2.1	2.26 (td) J = 10.9, 3.8	2.49 (dt) J = 11.9, 3.8	4.91 (dd) J = 17.1, 2.2	4.96 (dd) J = 10.3, 2.1	5.65- 5.76 (m)	2.40 (d) J = 7.3	3.29 (bs)	3.40 (s)	-	6.61-7.22
56	1.67 (ddd) J = 14.1, 10.7, 3.9	1.90 (dt) J = 13.8, 2.2	2.36 (td) J = 10.9, 2.2	2.55 (dt) J = 11.9, 3.9	5.00 (dd) J = 17.1, 2.2	5.04 (dd) J = 10.3, 2.2	5.75- 5.85 (m)	2.43 (d) J = 7.3	3.23 (bs)	3.48 (s)	-CH ₃ 2.22 (s)	6.64-7.31
57	1.70 (ddd) J = 13.8, 10.0, 3.9	1.88 (dt) J = 13.9, 2.1	2.47 (td) J = 12.3, 2.5	2.60 (dt) J = 11.7, 3.9	5.07 (dd) J = 17.0, 1.9	5.12 (dd) J = 10.2, 2.1	5.83- 5.94 (m)	2.41 (d) J = 7.3	3.11 (bs)	3.55 (s)	-OCH ₃ 3.79 (s)	6.76-7.39
58	1.65 (ddd) J = 14.0, 10.4, 3.9	1.84 (dt) J = 13.9, 2.3	2.47 (td) J = 12.3, 2.4	2.53 (dt) J = 11.8, 3.8	4.96 (dd) J = 17.1, 2.0	5.04 (dd) J = 10.2, 2.1	5.72- 5.82 (m)	2.37 (d) J = 7.3	3.20 (bs)	3.47 (s)	-	6.64-7.28
59	1.68 (ddd) J = 14.2, 10.9, 3.8	1.90 (dt) J = 13.8, 2.2	2.30 (td) J = 10.7, 2.2	2.57 (dt) J = 11.9, 3.7	4.98 (dd) J = 17.0, 2.0	5.04 (dd) J = 10.2, 2.0	5.69- 5.79 (m)	2.43 (d) J = 7.3	3.37 (bs)	3.48 (s)	-	6.61-7.29
60	1.67 (ddd) J = 14.2, 11.0, 3.9	1.93 (dt) J = 13.7, 2.1	2.32 (td) J = 11.0, 2.2	2.56 (dt) J = 11.9, 3.7	4.97-5.04 (m)		5.73- 5.84 (m)	2.47 (d) J = 7.3	3.27 (bs)	3.48 (bs)	-(CH ₃) ₂ 2.21 (s)	6.33-7.29



1.2.2. síntesis de nuevas 1*H*-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolinas] vía arilación catalítica de las 4-alil-4-*N*-arilamino-1-bencilpiperidinas y desbencilación. La etapa clave en el proceso de preparación de las dihidroquinolinas **67-71** es la formación de la espirounión; ésta se llevó a cabo por una ciclación 6-*exo*-trig (Baldwin 1978; Baldwin 1976) de los precursores adecuados, en presencia de ácido sulfúrico o polifosfórico (Pongutá 2000; Vargas *et al.*, 2007) (Esquema 14).

Esquema 14. Preparación de las 1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolinas] **61-66**.



Las espiropiperidinas **61-66** fueron preparadas por tratamiento de las 4-alil-4-*N*-arilamino-1-bencilpiperidinas **55-60** con ácido sulfúrico al 85% (o polifosfórico en el caso del compuesto **63**), y calentando a 80-90 °C durante 1-5 horas con agitación vigorosa. Posteriormente la masa de reacción se enfrió a 0 °C y se trató con solución acuosa de hidróxido de amonio hasta pH 12 y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó, y después de separado el disolvente, los productos se aislaron por cromatografía en columna sobre alúmina como sólidos cristalinos o aceites muy viscosos. Los rendimientos de la reacción oscilaron entre el 51 y 92 % (Tabla 7).

La estructura de estos nuevos derivados heterocíclicos se confirmó por espectroscopía de IR, de RMN ¹H, ¹³C, DEPT 135, RMN 2D y espectrometría de masas. En los espectros IR de los compuestos **61-66** se encontró la banda de tensión de mediana intensidad característica del grupo NH entre 3394 y 3412 cm⁻¹.

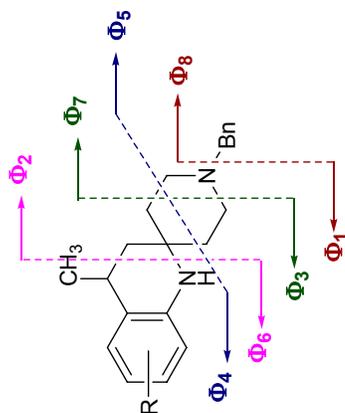
Tabla 7. Constantes físicas y químicas de las 1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolinas **61-66**.

Comp.	Fórmula empírica	Estado físico	p.f. (°C)	R (%)	P.M. (g/mol)	CG t_R (min)	IR ν_{N-H} (cm ⁻¹)
61	C ₂₁ H ₂₆ N ₂	Aceite incoloro, muy viscoso	-	92	306.45	38.66	3412
62	C ₂₂ H ₂₈ N ₂	Aceite amarillo, muy viscoso	-	88	320.47	41.10	3406
63	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	Cristales amarillos	68-70	51	336.47	46.60	3404
64	C ₂₁ H ₂₅ FN ₂	Cristales blancos	87-88	84	324.44	38.76	3403
65	C ₂₁ H ₂₅ ClN ₂	Cristales amarillos	65-66	86	340.89	47.81	3410
66	C ₂₃ H ₃₀ N ₂	Aceite amarillo, muy viscoso	-	70	334.50	43.90	3394

Los espectros de masas de esta serie de compuestos muestran fragmentaciones bastante ricas y complejas, encontrándose cuatro iones *diagnosticos* m/z 186, m/z 146, m/z 120 y m/z 91 (rupturas Φ_2 , Φ_4 , Φ_7 ψ Φ_8). También se encontró que la escisión que genera el pico de base en todos los espectros de la serie ($C_7H_7^+$, m/z 91), está acompañada de su ion complementario con relación masa/carga dada por $[M^+-(C_7H_7)]$. Las rupturas β características del anillo piperidínico (Φ_3 , Φ_4 , Φ_5 , Φ_7), están presentes de igual forma en estos espectros. Adicionalmente, hay rupturas bencílicas del anillo de la dihidroquinolina, que posiblemente generaron los iones con m/z $[M^+-(ArC_2H_6N)]$, y $[M^+-(ArNHC_7H_{10})]$.

En la Tabla 8 se reportan las señales más importantes en los espectros de masas de estos espirocompuestos.

Tabla 8. Posible fragmentación e iones principales de las 1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolinas **61-66**.



Comp	m/z (I, %)								
	M ⁺	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈
61	306 (38)	[M ⁺ -(C ₇ H ₇)] 215 (11)	[M ⁺ -(ArC ₂ H ₆ N)] 186 (27)	[M ⁺ -(ArBnCH ₂ N)] 187 (18)	[M ⁺ -(ArC ₉ H ₁₀ N)] 146 (48)	[M ⁺ -(BnC ₃ H ₈ N)] 159 (28)	[M ⁺ -(BnC ₉ H ₉ N)] 120 (19)	[M ⁺ -(ArC ₇ H ₁₂ N)] 120 (19)	[M ⁺ -(ArC ₈ H ₁₀ N ₂)] 91 (100)
62	320(51)	229 (8)	186 (75)	201 (14)	146 (46)	173 (47)	134 (24)	120 (5)	91 (100)
63	336 (45)	245 (3)	186 (22)	217 (6)	146 (42)	189 (59)	150 (12)	120 (5)	91 (100)
64	324 (26)	233 (7)	186 (18)	205 (10)	146 (36)	177 (30)	138 (7)	120 (12)	91 (100)
65	340 (23)	249 (7)	186 (24)	221 (7)	146 (38)	193 (24)	154 (4)	120 (12)	91 (100)
66	334 (24)	243 (5)	186 (21)	215 (16)	146 (26)	187 (25)	148 (20)	120 (4)	91 (100)

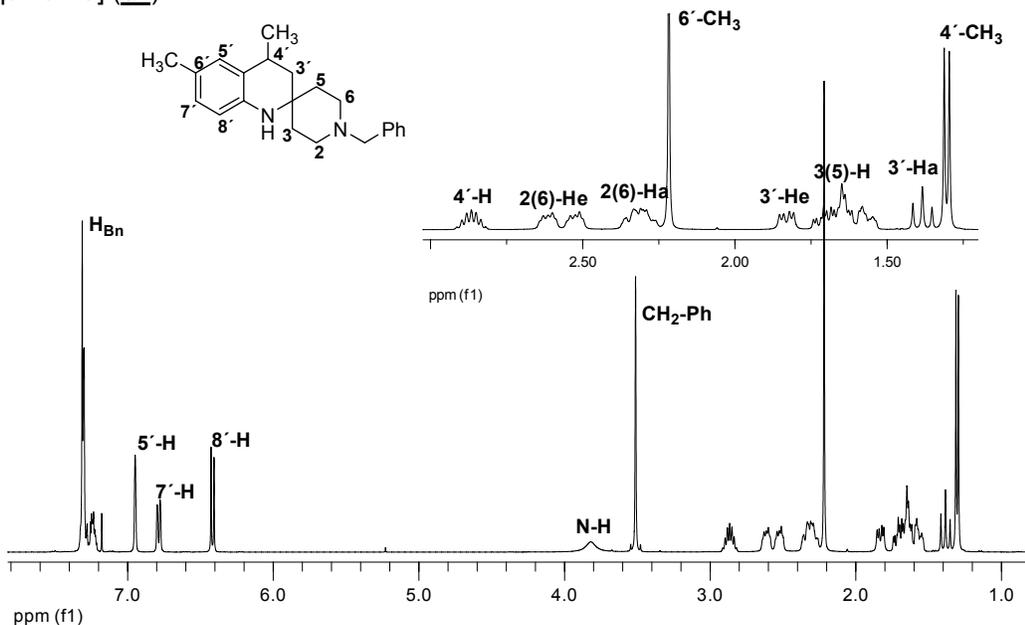
En los espectros de RMN ^1H de las espiropiperidinas **61-66** se tienen cuatro tipos de señales para los protones del anillo dihidroquinolínico, los más importantes en la caracterización estructural de esta serie de heterociclos, así: en el rango de 1.37-1.72 ppm como un triplete, se observa el hidrógeno axial de la posición 3'-C ($J = 12.2-12.7$ Hz), a su vez, el ecuatorial aparece a 1.84-1.92 ppm como un doblete ($J = 12.9-13.0$ y $J = 5.1-5.7$ Hz); como un septeto se observa la señal del hidrógeno que se encuentra en C-4' a 2.87-3.06 ppm ($J = 6.4-6.9$ Hz); los hidrógenos del grupo metilo 4'-CH₃ generan un doblete entre 1.30-1.36 ppm ($J = 6.7-7.0$ Hz). Las señales de los hidrógenos 3(5)-C, 2(6)-C del anillo piperídínico resuenan como multipletes entre 1.55-1.75 y 2.77-2.37 ppm respectivamente; los protones 2(6)-H_e se observan diferenciados entre 2.54-2.66 ppm como dobles dobletes ($J = 11.7-12.0$, 6.2-6.5 Hz) (compuestos **61-63**), y como multipletes en la misma zona en los compuestos **64-66**. El grupo amino secundario se observa como un singulete ancho entre 3.83-3.99 ppm. Los hidrógenos aromáticos generan las señales a campo bajo en el intervalo de 6.26-7.36 ppm, con la multiplicidad correspondiente a cada sustitución.

En el espectro de la 1-bencil-4'(6')-dimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolina] **62** (Figura 9), se puede observar claramente lo antes descrito. Los desplazamientos, multiplicidad y constantes de acoplamiento para cada uno de los compuestos **61-66**, se encuentran resumidos en la Tabla 9.

Teniendo preparadas y caracterizadas la diversidad de espiropiperidinas N-bencil sustituidas, se enfocaron los esfuerzos sintéticos hacia el proceso de obtención del núcleo de la dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolina]. El proceso de desbencilación se ha empleado para dos diferentes propósitos: el más común, y que también es nuestro caso, es remover el grupo bencilo introducido para proteger una posición reactiva en un sustrato durante un proceso de síntesis, en este caso el producto no-bencilado es el deseado. Las desbencilaciones también

se usan en reacciones donde el interés recae en el producto que contiene el grupo bencilo después de la ruptura.

Figura 9. Espectro de RMN ^1H de la 1-bencil-4'(6')-dimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolina] (**62**).

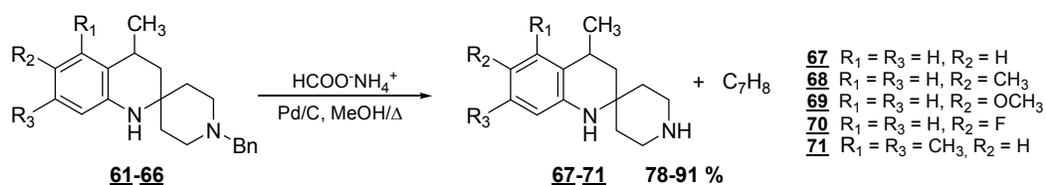


Un fragmento bencilico unido a átomos de nitrógeno amínicos terciarios, puede ser removido como tolueno, o el correspondiente tolueno sustituido, por métodos catalíticos o químicos (Greene *et al.*, 1999; Bull *et al.*, 2000; Adams 1967). Usualmente, la desprotección se lleva a cabo con hidrógeno gaseoso en presencia de un catalizador metálico como paladio, Pd/C u oxido de paladio, usando metanol, etanol o ácido acético como opciones de disolventes; asimismo pueden realizarse quimioselectivamente utilizando el formiato de amonio, un agente versátil en las reducciones por transferencia catalítica de hidrógeno (Brieger *et al.*, 1974).

La hidrogenólisis se realizó eficientemente, calentando a reflujo por 5-10 minutos una mezcla de los sustratos **61-66**, disueltos en metanol anhidro, y las cantidades

calculadas del sistema $\text{HCOO}^-\text{NH}_4^+/\text{Pd}/\text{C}$ (Esquema 15). La masa de reacción se filtró para retirar el catalizador y después de separado el disolvente se purificó por cromatografía en columna. Las espiropiperidinas finales, las 1-*H*-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolinas] **67-71** se obtuvieron en excelentes rendimientos (78-95%), como sólidos cristalinos blancos estables, de muy altos puntos de fusión (Tabla 10).

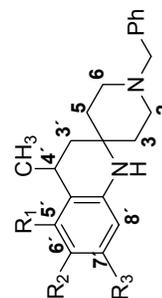
Esquema 15. Preparación de las 1-*H*-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolinas] **67-71**.



Hay que mencionar que durante el tratamiento de la masa de reacción, no se utilizó el procedimiento “tradicional” de adicionar agua, para disolver la parte inorgánica residual y posterior extracción, porque los espiranos **67-71** tienen la particularidad de ser solubles en agua, e insolubles en todos los disolventes orgánicos de bajo punto de ebullición usados comúnmente. Esta característica complicó el trabajo de purificación y caracterización, pero permitió la utilización del disolvente “ideal” en los bioensayos, el agua.

Tabla 9. Datos de RMN-¹H para las 1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolinas **61-66**.

Comp.	Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz)											
	N°	Piperidínicos			Dihidroquinolínicos				Otros			Arlícos y bencilicos
		3(5)-H	2(6)-Ha	2(6)-He	2(6)-He	3'-Ha	3'-He	4'-H	4'-CH ₃	N-H	CH ₂ -Ph	
61	1.60-1.80 (m)	2.33-2.42 (m)	2.58 (dd) J = 11.8, 6.2	2.67 (dd) J = 12.0, 6.3	1.43 (t) J = 12.6	1.89 (dd) J = 13.0, 5.4	2.94 (sp) J = 6.5	1.36 (d) J = 6.7	3.99 (bs)	3.56 (s)	-	6.53-7.36
62	1.55-1.75 (m)	2.27-2.37 (m)	2.54 (dd) J = 11.8, 6.3	2.63 (dd) J = 11.9, 6.3	1.39 (t) J = 12.5	1.84 (dd) J = 12.9, 5.5	2.87 (sp) J = 6.5	1.31 (d) J = 6.7	3.84 (bs)	3.52 (s)	6'-CH ₃ 2.22 (s)	6.64-7.32
63	1.54-1.75 (m)	2.28-2.37 (m)	2.52 (dd) J = 11.7, 6.5	2.61 (dd) J = 11.9, 6.3	1.38 (t) J = 12.6	1.85 (dd) J = 13.0, 5.7	2.88 (sp) J = 6.6	1.30 (d) J = 6.7	3.90 (bs)	3.53 (s)	6'-OCH ₃ 3.73 (s)	6.46-7.32
64	1.55-1.78 (m)	2.28-2.39 (m)	2.54-2.64 (m)		1.37 (t) J = 12.7	1.91 (dd) J = 13.0, 5.3	2.88 (sp) J = 6.5	1.30 (d) J = 6.7	3.83 (bs)	3.54 (s)	-	6.43-7.34
65	1.55-1.80 (m)	2.29-2.41 (m)	2.53-2.68 (m)		1.37 (t) J = 12.7	1.87 (dd) J = 13.0, 5.1	2.88 (sp) J = 6.4	1.32 (d) J = 6.7	3.98 (bs)	3.55 (s)	-	6.43-7.35
66	1.51-1.79 (m)	2.28-2.40 (m)	2.55-2.66 (m)		1.72 (t) J = 12.2	1.92 (d) J = 7.0	3.06 (sp) J = 6.9	1.30 (d) J = 7.0	3.87 (bs)	3.54 (s)	5',7'-(CH ₃) ₂ 2.21 (s) 2.26 (s)	6.26-7.35



- 61** R₁ = R₃ = H, R₂ = H
62 R₁ = R₃ = H, R₂ = CH₃
63 R₁ = R₃ = H, R₂ = OCH₃
64 R₁ = R₃ = H, R₂ = F
65 R₁ = R₃ = H, R₂ = Cl
66 R₁ = R₃ = CH₃, R₂ = H

Tabla 10. Constantes físicas y químicas de las 1-*H*-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolinas] **67-71**.

Comp.	Fórmula empírica	Estado físico	p.f. (°C)	R (%)	P.M. (g/mol)	CG t_r (min)	IR ν_{N-H} (cm ⁻¹)
67	C ₁₄ H ₂₀ N ₂	Cristales blancos	> 300	86	216.32	17.19	3449 (bs)
68	C ₁₅ H ₂₂ N ₂	Cristales blancos	> 300	89	230.35	27.23	3445, 3341
69	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	Cristales blancos	> 300	91	246.35	21.27	3449, 3337
70	C ₁₄ H ₁₉ FN ₂	Cristales blancos	> 300	90	234.31	17.58	3449, 3340
71	C ₁₆ H ₂₄ N ₂	Cristales blancos	265- 266	78	244.38	20.45	3453, 3340

En diversos reportes de hidrogenaciones reductivas promovidas por el formiato de amonio hay indicaciones de varias horas en los tiempos de reacción (Ram *et al.*, 1988). Se realizaron una diversidad de experimentos para estudiar la reacción y determinar el factor causante de esta “lentitud” y se pudo concluir que la causa es la pérdida por sublimación del formiato de amonio, aun a temperaturas menores a 40 °C. Para evitar la pérdida del reactivo y hacer las reacciones de forma rápida, se optó por realizarlas con un choque térmico, introduciendo el reactor en un baño de aceite precalentado a la temperatura de ebullición del disolvente, y no con aumento paulatino de la temperatura. De esta forma se encontraron los tiempos extremos de la reacción: cinco minutos para el derivado fluorado **70** y diez para el compuesto **71** con dos metilos en el anillo arílico, acortándose de forma sustancial el tiempo para llevar hasta el final la reacción.

Otros experimentos mostraron que es posible llevar a cabo la transformación sin disolvente. Los sustratos **61-66** se mezclaron con el formiato de amonio y el Pd/C y se sometieron a calentamiento, a 65 °C para los líquidos (compuestos **61**, **62** y **66**) y cinco grados por encima del punto de fusión los sólidos (compuestos **63**, **64** y **65**); en este momento se observó un intenso desprendimiento de gas, finalizado

éste, termina la desbencilación. El tiempo de reacción, en todos los casos, estuvo por debajo de los cinco minutos.

Es importante comentar que si bien en la literatura estas reacciones se realizan bajo atmósfera inerte, en las condiciones de reacción exploradas, esto no fue necesario. El uso del formiato de amonio como donador de hidrógeno generó altos rendimientos, practicidad, seguridad en los experimentos.

Aunque la desprotección de los derivados N-bencilados conduce de forma lógica e intuitiva hacia el núcleo de las dihidroespiro[piperidina4,2'(1'H)quinolinas], se intentó realizar una elucidación estructural lo más completa posible para corroborar su estructura. En los espectros de IR, en la región de 3453-3341 cm^{-1} , se observan las bandas de absorción de mediana intensidad, características de la elongación asimétrica de los grupos N-H (Tabla 10).

En los espectros de masas de los compuestos **67-71** se observan los picos de los iones moleculares con intensidades entre 52-70%. El pico de base en estos compuestos no corresponde a una sola ruptura: en el caso de los compuestos **68**, **69** y **70** una escisión β (Φ_1) en el anillo piperidínico, con pérdida de $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}^{\cdot}$, generó el ion mayor intensidad. En los compuestos **67** y **71** los iones moleculares se fragmentan (Φ_4) perdiendo 72 unidades de masa ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}^{\cdot}$) generando el catión pico de base. Otras rupturas β del anillo piperidínico generan dos iones diagnóstico con m/z 56 y m/z 57, hallándose además sus respectivos iones complementarios. En la Tabla 11 se reportan las señales más importantes en los espectros de masas de estos espiranos.

El análisis por CG-EM del producto formado en la desbencilación del compuesto **65** mostró que el anillo aromático se deshalogenó, formándose el compuesto **67**. En esta investigación, la reacción de descloración y su producto no fueron usados

con ningún propósito sintético. Este comportamiento fue observado previamente con varios agentes reductores (Barren *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 2001).

Los espectros de RMN ^1H de los núcleos de la dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1' H)quinolina] **67-70** son similares a los de sus precursores N-bencilados. El hidrógeno axial de la posición 3'-C aparece como un triplete a 1.20-1.62 ppm ($J=12.7-12.9$ Hz), el de la disposición ecuatorial aparece a 2.01-2.13 ppm como un doblete ($J=13.7-14.1$ y $J=6.0-7.2$ Hz); el hidrógeno del C-4' se observa como un septeto a 2.73-3.02 ppm ($J=6.4-6.9$ Hz); el grupo metilo 4'-CH₃ genera un doblete entre 1.13-1.22 ppm ($J=6.7-6.9$ Hz). Las señales de los hidrógenos 3(5)-C, 2(6)-C del anillo piperidínico resuenan como multipletes entre 1.51-1.90 y 2.98-3.34 ppm respectivamente. Los hidrógenos aromáticos generaron las señales en el intervalo de 6.41-7.20 ppm. Como ejemplo de la serie, en la Figura 10 se muestra el espectro de la 1- H -4'-metil-6'-metoxi-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1' H)quinolina] (**69**). En la Tabla 12 se reúnen los datos para cada uno de los espiranos.

Figura 10. Espectro de RMN ^1H de la 1- H -4'-metil-6'-metoxi-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1' H)quinolina] (**69**).

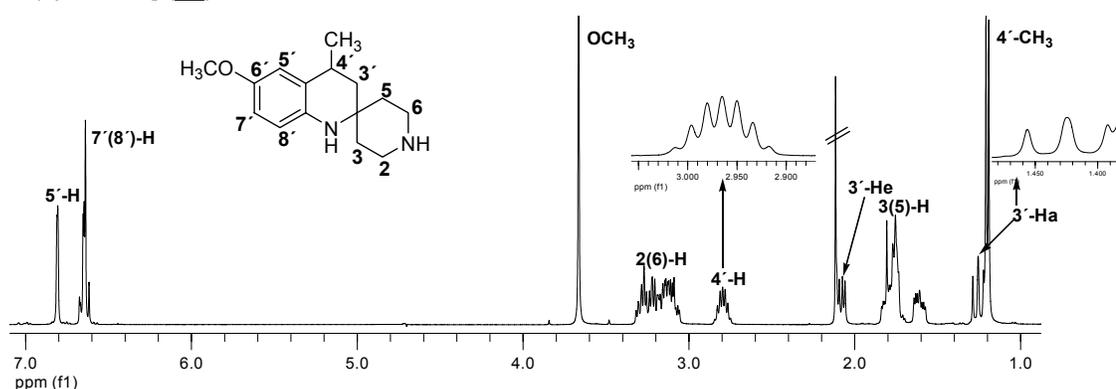
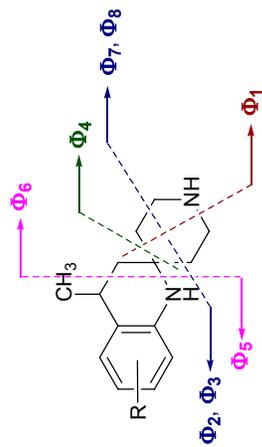
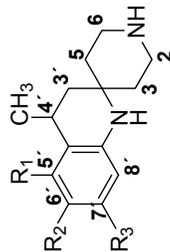


Tabla 11. Iones principales y posible ruta de fragmentación de las 1-*H*-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolinas] **67-71**.



Comp.	<i>m/z</i> (I, %)								
	<i>M</i> ⁺	<i>F</i> ₁ [<i>M</i> ⁺ -(C ₂ H ₇ N)]	<i>F</i> ₂ [<i>M</i> ⁺ -(C ₃ H ₈ N)]	<i>F</i> ₃ [<i>M</i> ⁺ -(C ₃ H ₇ N)]	<i>F</i> ₄ [<i>M</i> ⁺ -(C ₄ H ₁₀ N)]	<i>F</i> ₅ [<i>M</i> ⁺ -(C ₆ H ₁₀ N)]	<i>F</i> ₆ [<i>M</i> ⁺ -(ArC ₂ H ₆ N)]	<i>F</i> ₇ [<i>M</i> ⁺ -(ArC ₆ H ₉ N)]	<i>F</i> ₈ [<i>M</i> ⁺ -(ArC ₆ H ₁₀ N)]
67	216 (61)	171 (85)	160 (49)	159 (52)	144 (100)	120 (12)	96 (21)	57 (54)	56 (45)
68	230 (52)	185 (100)	174 (38)	173 (54)	158 (84)	134 (10)	96 (16)	57 (44)	56 (45)
69	246 (54)	201 (100)	190 (26)	189 (49)	174 (73)	150 (6)	96 (10)	57 (34)	56 (43)
70	234 (70)	189 (100)	178 (37)	177 (64)	162 (80)	138 (9)	96 (23)	57 (75)	56 (56)
71	244 (60)	199 (80)	188 (39)	187 (39)	172 (100)	148 (6)	96 (7)	57 (26)	56 (33)

Tabla 12. Datos de RMN-¹H para las 1-*H*-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolinas] **67-71**.

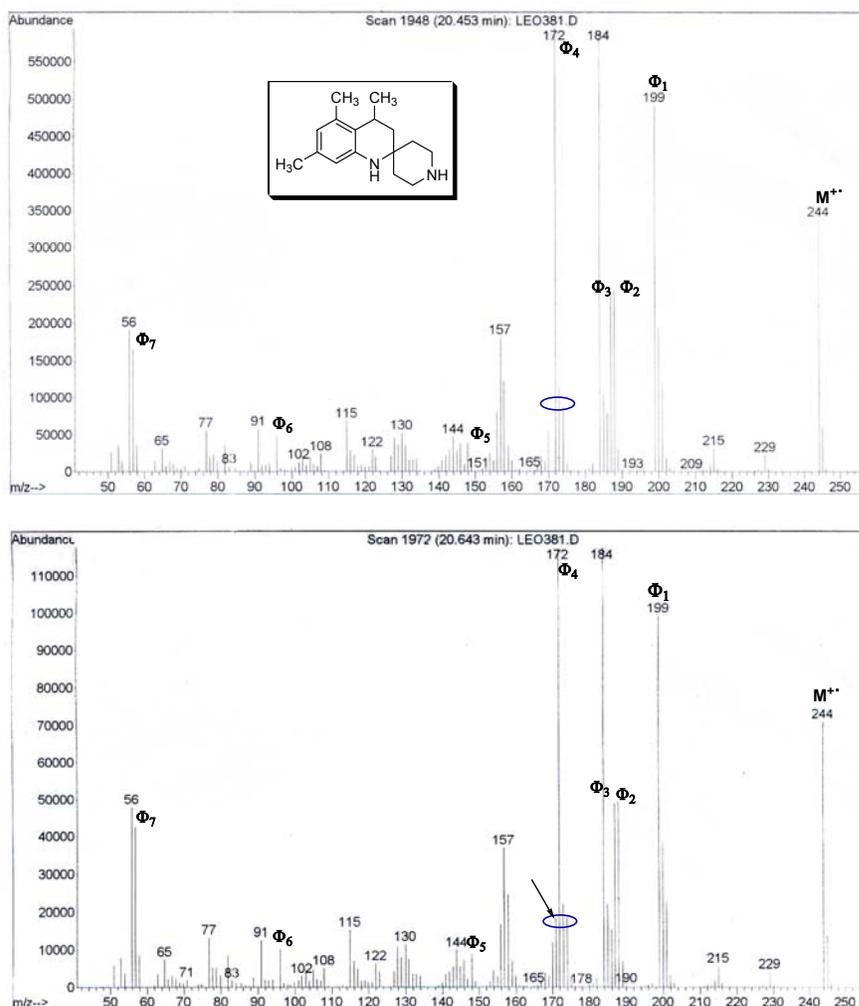


- 67** R₁ = R₃ = H, R₂ = H
68 R₁ = R₃ = H, R₂ = CH₃
69 R₁ = R₃ = H, R₂ = OCH₃
70 R₁ = R₃ = H, R₂ = F
71 R₁ = R₃ = CH₃, R₂ = H

Comp.	Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz)											
	Piperidínicos		Dihidroquinolínicos				Arlílicos				Otros	
	3(5)-H	2(6)-H	3'-Ha	3'-He	4'-H	4'-CH ₃	5'-H	6'-H	7'-H	8'-H	R	
67	1.59-1.84 (m)	3.03- 3.28 (m)	1.27 (t) J = 12.8	2.09 (dd) J = 13.7, 6.1	2.83 (sp) J = 6.4	1.22 (d) J = 6.7	7.20 (d) J = 7.6	6.76 (t) J = 7.2	6.99 (t) J = 7.5	6.65 (d) J = 7.9	-	
68	1.51-1.78 (m)	2.98- 3.24 (m)	1.19 (t) J = 12.8	2.01 (dd) J = 13.7, 6.2	2.73 (sp) J = 6.4	1.13 (d) J = 6.7	6.98 (s)	-	6.77 (d) J = 8.0	6.51 (d) J = 8.1	6'-CH ₃ 2.12 (s)	
69	1.58-1.85 (m)	3.06- 3.31 (m)	1.26 (t) J = 12.7	2.01 (dd) J = 13.7, 6.2	2.80 (sp) J = 6.4	1.20 (d) J = 6.7	6.98 (d) J = 2.0	-	6.63-6.65 (m)		6'-OCH ₃ 3.66 (s)	
70	1.58-1.81 (m)	3.01- 3.11 (m)	1.20 (t) J = 12.9	2.09 (dd) J = 14.0, 6.0	2.76 (sp) J = 6.2	1.13 (d) J = 6.7	6.89 (dd) J = 10.0, 2.0	-	6.68 (td) J = 8.4, 2.4	6.55 (dd) J = 8.6, 5.1	-	
71	1.53-1.90 (m)	3.07- 3.34 (m)	1.62 (dd) J = 14.0, 7.2	2.13 (dd) J = 14.1, 6.2	3.02 (c) J = 7.1	1.15 (d) J = 6.9	-	6.51 (s)	-	6.41 (s)	5',7'-(CH ₃) ₂ 2.09 (s) 2.26 (s)	

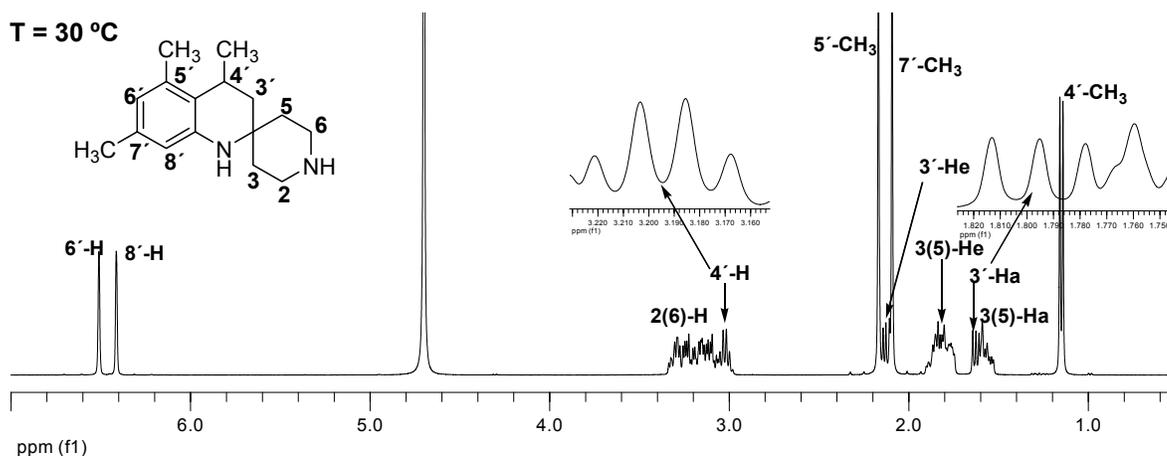
En los estudios de cromatografía de gases se observó una sola señal para todas las espiropiperidinas a excepción del compuesto **71**; en éste se observaron dos señales con tiempos de retención muy cercanos en relación 60 : 40. Ambas correspondieron a espectros de masas con el mismo ion molecular, pero con diferencias muy sutiles en las fragmentaciones. En el espectro correspondiente a la señal con tiempo de retención de 20.64 min, aparece un ion con m/z 171, que no se encuentra en el espectro del pico con 20.45 min de tiempo de retención (Figura 11.).

Figura 11. Espectros de masas de la 1-*H*-4',5',7'-trimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolina] (**71**).



En el espectro de protones del compuesto **71**, las señales de los hidrógenos 3'-Ha y el 4'-H del anillo de la dihidroquinolina son diferentes a los demás espectros de la serie (Figura 12); el primer hallazgo fue un desplazamiento significativo hacia campos bajos: el 3'-Ha ($\delta\Delta\sim 0.39$ ppm) y el 4'-H ($\delta\Delta\sim 0.24$ ppm).

Figura 12. Espectro de RMN ^1H de la 1-H-4',5',7'-trimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolina] (**71**) a 30 °C.

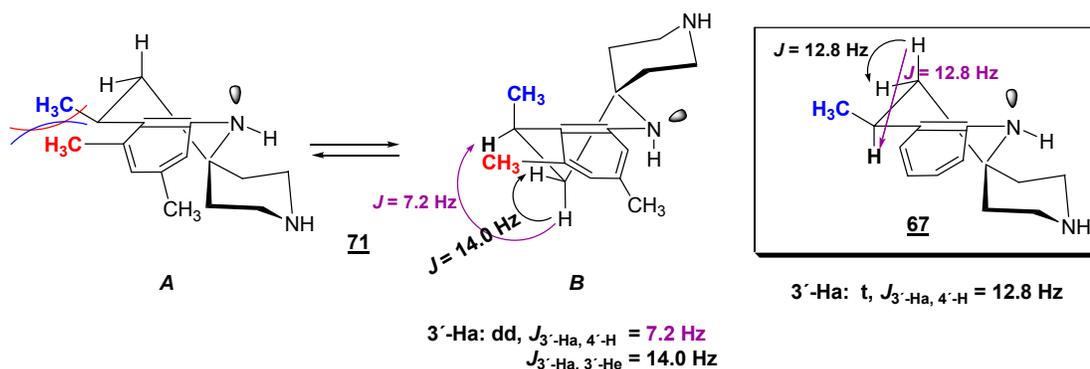


La multiplicidad y sus constantes de acoplamiento también difieren. Los protones del grupo metilo del 4'-C aparecen como un doblete ($^3J_{4'-\text{CH}_3,4'} = 6.9$ Hz), el hidrógeno axial de la posición 3'-C resuena a 1.72 ppm como un doblete ($^2J_{3'a,3'e} = 14.1$, $^3J_{3'a,4'} = 7.2$ Hz), el protón tres ecuatorial aparece a 1.92 ppm como doblete ($^2J_{3'a,3'e} = 14.1$, $^3J_{3'e,4'} = 6.2$ Hz). El hidrógeno del 4'-C aparece como un cuatriplete ($^3J = 7.1$ Hz); este último aparece como un septeto en el resto de compuestos de la serie.

El valor de 7.2 Hz para la constante de acoplamiento entre los hidrógenos 3a' y 4' es diferente, y mucho más bajo, que el encontrado para el compuesto **67** ($^3J_{3'a,4'} = 12.8$ Hz), sin ningún sustituyente en el anillo aromático. Se sabe que los grupos voluminosos tienden a situarse en posiciones ecuatoriales, pero en este caso hay otro grupo voluminoso vecinal (el 5'-CH₃) que ocasiona una inversión de la semi-

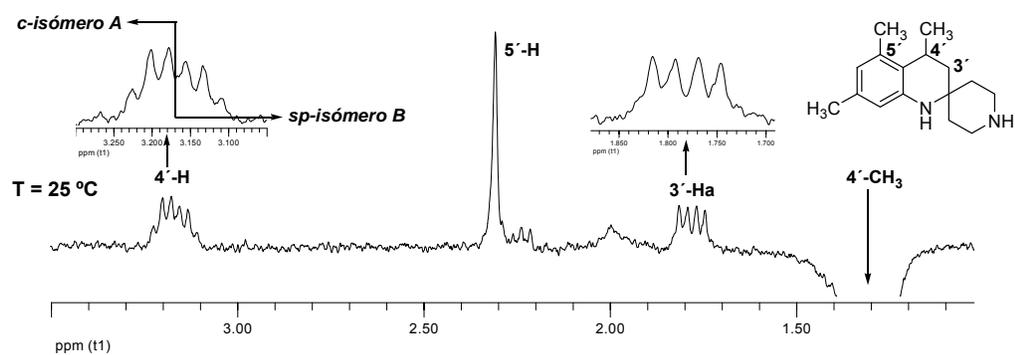
silla, y “empuja” al metilo del 4'-C a una posición axial, estableciéndose un equilibrio conformacional entre las dos estructuras mostradas en la Figura 13, debido a las interacciones estéricas entre los dos grupos. Este comportamiento se estudió profundamente en compuestos espirocicloalcanicos (Kuznetsov *et al.*, 1991).⁵¹

Figura 13. Equilibrio conformacional de la espiropiperidina **71**.



Una irradiación selectiva de la señal de los hidrógenos del grupo metilo de 4'-C a 25 °C (cinco grados menos que el experimento anterior) hace que la multiplicidad de la señal del protón en 4'-C cambie. Se puede percibir que hay dos tipos de señales mezcladas, el cuatriplete (c) y el septeto (sp), correspondientes a los isómeros **A** y **B**, respectivamente (Figura 14).

Figura 14. Espectro de RMN ^1H con irradiación selectiva del grupo $4'\text{-CH}_3$ de la 1-*H*-4',5',7'-trimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolina] (**71**) a 25 °C.



2. REACTIVIDAD QUÍMICA DE NUEVAS ESPIROPIPERIDINAS C-4 SUSTITUIDAS. ESTUDIO DE LA NUEVA MIGRACIÓN DEL GRUPO ACILO EN LOS SISTEMAS RÍGIDOS DE LAS 1-ACIL-3',4'-DIHIDROESPIRO [PIPERIDINA-4,2'-(1'H)QUINOLINAS]

2.1 Antecedentes

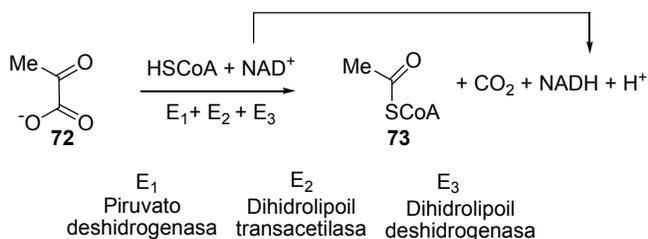
Los procesos de transferencia de los grupos químicos de una molécula (donador) a otra (aceptor) son importantísimos tanto en la química bioorgánica, donde juegan un rol substancial en el funcionamiento celular normal, como en la química orgánica, donde pueden ser útiles en los estudios de varios mecanismos principales (Larock 1999; Smith *et al.*, 2001; Williams 2000; Williams *et al.*, 1975). En general, estos procesos pueden ocurrir principalmente por dos vías: intermolecular -transferencia de los grupos de una molécula a otra- o intramolecular -transferencia de los grupos de una molécula a otra parte de la misma molécula-.

En los procesos bioquímicos la realización de la transferencia de los grupos químicos (acil, amina y amida, entre otros) se hace vía un modo intermolecular por medio de catalizadores específicos, -las transferasas (Boyer 2000; Lozano *et al.*, 2000). Su rol indispensable en estos procesos se aprecia a través de múltiples procesos bioquímicos, *p. ej.* de la glicólisis aerobia (Avendaño 2000) o biosíntesis del peptidoglicano, componente principal rígido de la pared de la bacterias, que involucra dos deferentes transferasas: transglicolilasa y transpeptidasa (Vetting *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2005).

En la glicólisis aerobia el piruvato **72**, producido en condiciones anaerobias a partir de la glucosa, se introduce en las mitocondrias y, tras su conversión en

acetilCoA **73** por medio de la coenzima A (CoASH), el NAD^+ y el complejo piruvato deshidrogenasa, alimenta el ciclo de los ácidos tricarboxílicos para finalizar su metabolismo hasta CO_2 y agua (Esquema 16).

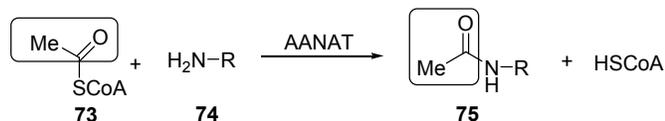
Esquema 16. Glicólisis aerobia el piruvato.



Dentro de las tres enzimas de este complejo (E_1 , E_2 y E_3) se destaca la dihidrolipoil transacetilasa (E_2), cuyo papel consiste en transferir el grupo acetilo a la lipoamida que se deriva de la vitamina ácido lipoico. La reacción descrita origina el derivado **73**, aun más reactivo y potente donador del grupo acilo.

Según la naturaleza química de un aceptor (moléculas que contienen de átomos de N, O y/o S), la acetilcoenzima A le transfiere su acetilo en presencia de acetiltransferasas específicas. Por ejemplo, la arilalquilamina *N*-acetiltransferasa (AANAT, EC 2.3.1.5) (Hanna 1994), de interés especial, transfiere el grupo de acetilo desde de acetilCoA hasta las aminas **74**, en particular, a las arilalquilaminas, incluyendo triptamina y serotonina (Esquema 17).

Esquema 17. Transferencia de acilo a arilalquilaminas.

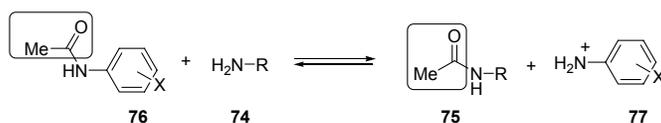


La reacción de N-acetilación es la segunda fase del proceso de biotransformación de los xenobióticos o los agentes quimioterapéuticos, y es considerada como la reacción de destoxificación en seres vivos. La acetilación disminuye la disponibilidad de un sustrato para la hidroxilación metabólica de los grupos aminos primarios; este último conduce a la formación de las *N*-arilhidroxiaminas, muy tóxicas y/o carcinogénicas (Hanna 1996; Kim 2005; Wang 2004; Wang *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2006).

Esta transferasa pertenece a la superfamilia de las acetiltransferasas (GNAT) que cuenta con aprox. 50 miembros (Marmorstein 2001; Chou *et al.*, 1952;), que fueron encontrados y caracterizados en múltiples especies eucariotas y procariontas.

Desde los primeros estudios sobre los procesos de transferencia de acilo a aminas alifáticas **74** y aminas aromáticas **76** por medio del sistema acetilCoA/AANAT (Tabor *et al.*, 1953; Riddle *et al.*, 1971), ha habido un interés enorme hacia su mecanismo (Riddle *et al.*, 1971; De Angelis *et al.*, 1998). La propuesta de Lipmann, descubridor de este sistema, sugería que la transferencia de acetilo catalizada por una transferasa desde de las acetanilidas **76** hasta las aminas **74** procede vía la formación del intermediario “acetil-enzima” (Bessman *et al.*, 1953) (Esquema 18).

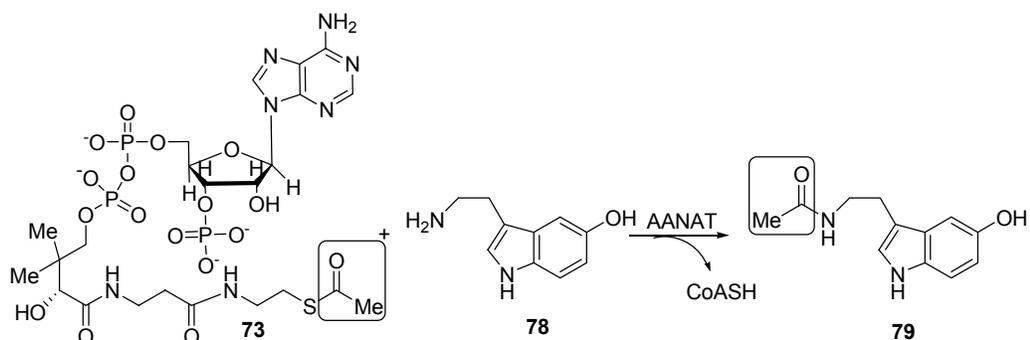
Esquema 18. Transferencia de acetilo a aminas alifáticas.



La serotonin-*N*-acetiltransferasa regula el ritmo diario vía la producción de la melatonina (5-metoxi-*N*-acetil-triptamina) **79** que “se prepara” *in vivo* a partir de la serotonina **78** y acetilCoA **73** (Klein *et al.*, 1970) (Esquema 19). Cualquier

irregularidad en la producción de esta hormona, es decir, en el trabajo catalítico de AANAT afecta al funcionamiento celular normal (Hwang *et al.*, 2007; Khalil *et al.*, 1998; Szewczuk *et al.*, 2007).

Esquema 19. Producción biológica de la melatonina.

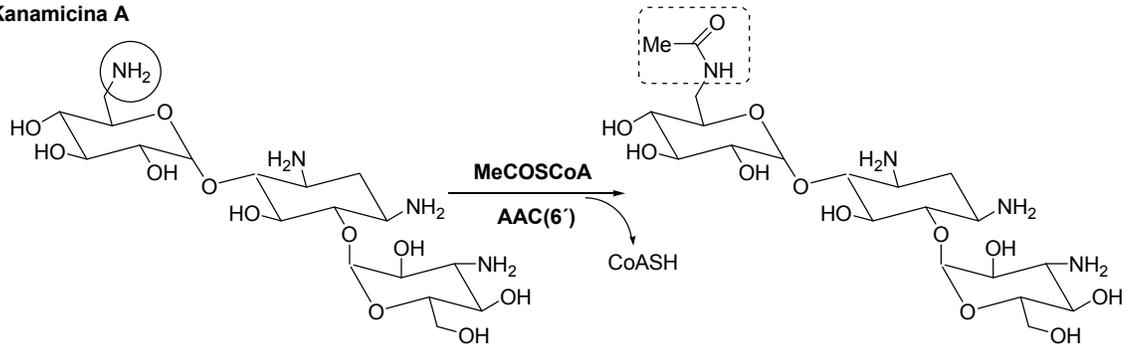


Otro tipo de *N*-acetiltransferasas importantes son la aminoglicosido 6'-*N*-acetiltransferasa [AA(6')] o la aminoglicosido 3-*N*-acetiltransferasa [AA(3)] de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Ambas enzimas bacteriales están involucradas en el proceso de resistencia a los antibióticos aminoglicosídicos (p.ej., kanamicina A y apramicina) y catalizan una transferencia del grupo acetilo desde la acetilCoA hasta el lugar definido del grupo amino de los aminoglicosidos (Hwang *et al.*, 2007; Khalil *et al.*, 1998; Szewczuk *et al.*, 2007; Draker *et al.*, 2003; Draker *et al.* 2004; Magalhaes *et al.*, 2005) (Esquema 20).

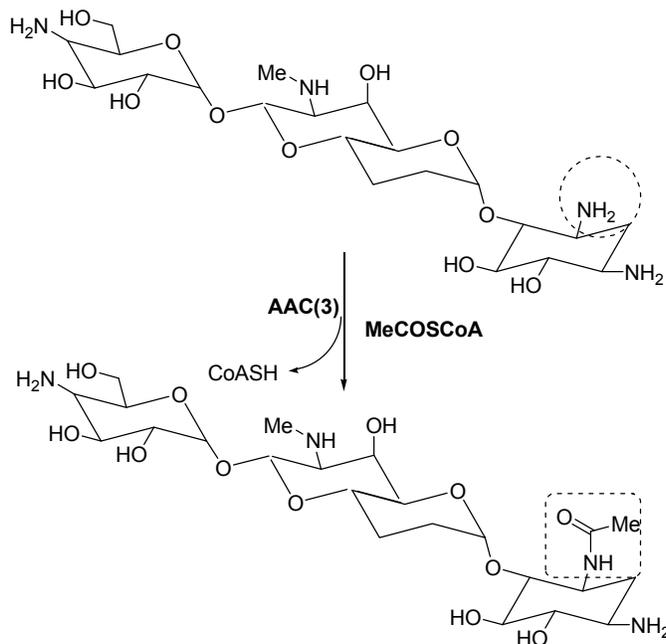
Es importante mencionar otro tipo de *N*-acetiltransferasas, con un papel diferente, pero con la misma misión, -la espermidina/espermina acetiltransferasa (SSAT), una enzima clave del catabolismo de las poliaminas eucarióticas, capaz de monoacetilar dos importantes poliaminas- espermidina y espermita (Hegde *et al.*, 2007), cuyas alteración es una seria alarma de varias enfermedades, incluyendo el cáncer, la fibrosis quística y la enfermedad de Alzheimer (Esquema 21).

Esquema 20. Transferencia del grupo acetilo desde la acetilCoA hasta el grupo amino de algunos antibióticos aminoglicosidos.

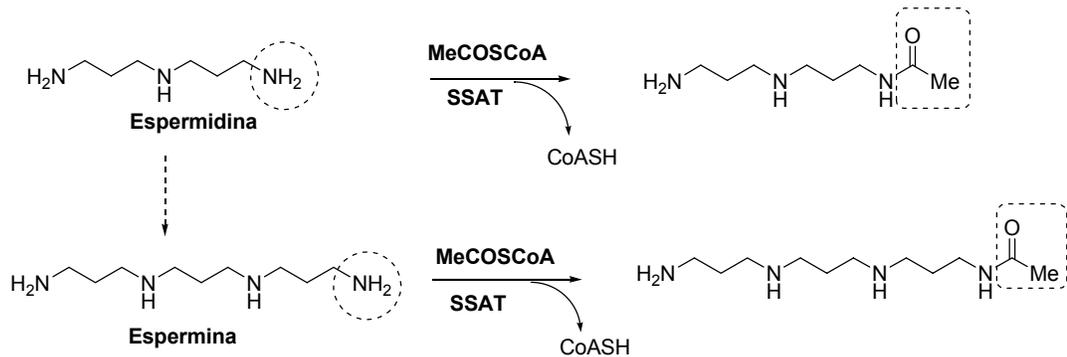
Kanamicina A



Apramicina

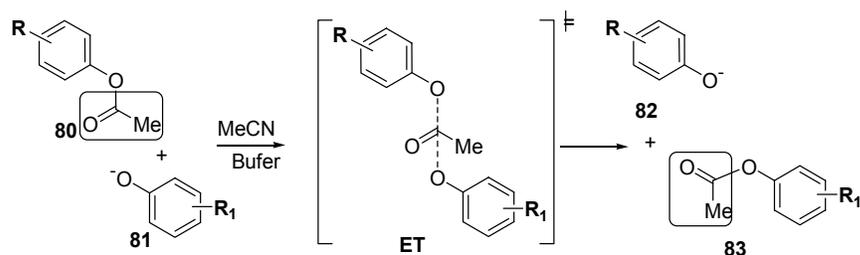


Esquema 21. Monoacetilación de las aminas biogénicas espermidina y espermina.



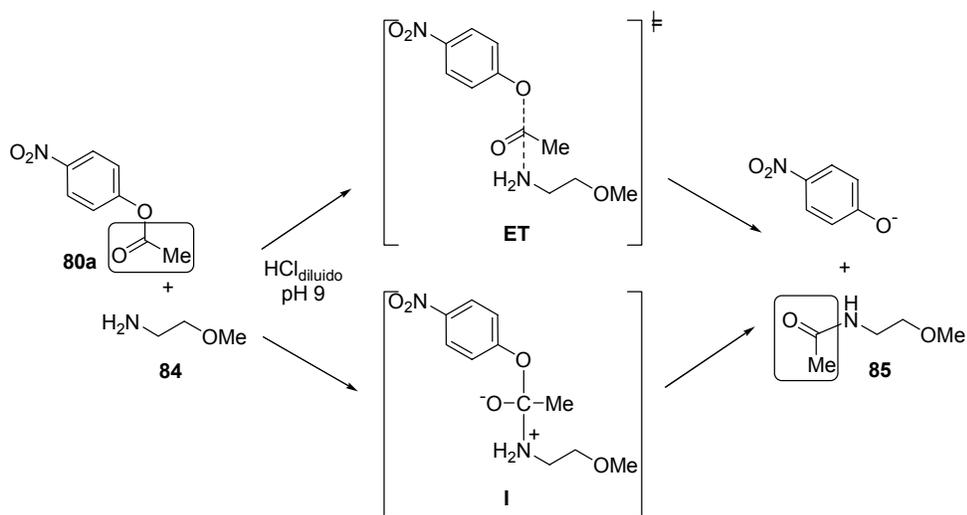
En el campo de la química orgánica existen varios trabajos pioneros sobre la transferencia intermolecular del acilo dentro los acetatos **80** y fenolatos **81** hacia sus respectivos análogos (**82** y **83**), que han permitido proponer un mecanismo concertado vía el estado de transición (ET) (Ba-Saif *et al.*, 1987; Ba-Saif *et al.*, 1989; Hengge *et al.*, 1994) (Esquema 22). En estos experimentos se usaron una amplia gama de sustratos que contenían diferentes sustituyentes (donadores y aceptores) y una técnica de marcaje isotópico. Uno de los sustratos más usados en estos estudios fue el acetato de p-nitrofenilo (**9a**, cuando R = p-NO₂).

Esquema 22. Transferencia intermolecular del acilo dentro los acetatos y fenolatos.



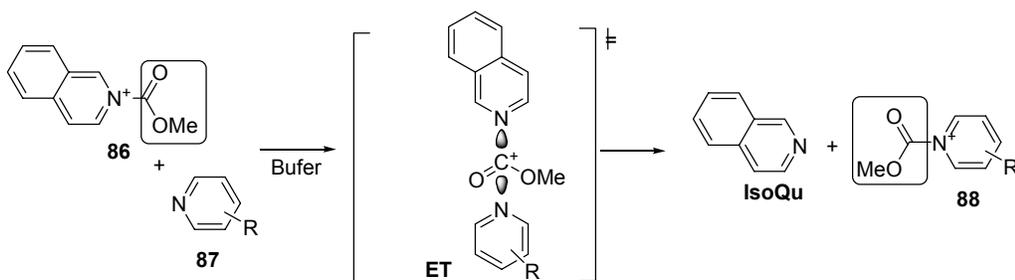
Sin embargo, el mismo estudio de la transferencia intermolecular del acilo del mismo acetato **80a** a la 2-metoxietilamina **84** hacia la formación la *N*-acetilamina **85**, no ha arrojado los resultados similares, más bien los datos obtenidos a través de este estudio no han permitido distinguir los dos posibles mecanismos: o concertado vía (ET), o bien adición-eliminación con la formación del intermediario tetraédrico (I) (Hengge *et al.*, 1994) (Esquema 23).

Esquema 23. Dos posibles mecanismos en la transferencia intermolecular de acilo desde el acetato de p-nitrofenilo a la 2-metoxietilamina.



Otro estudio cinético entre el ion *N*-(metoxicarbonil)isoquinolinio **86** y varias piridinas **87**, en las soluciones acuosas, para la transferencia del metoxicarbonil (que es muy similar al acetilo) formándose como producto las *N*-(metoxicarbonil)piridinas **88** indicó un proceso concertado vía el ET según el Esquema 24. El ET en esta transferencia, según los autores adquiere un carácter del plano cuadrado con el ion acilio (Chrystiuk *et al.*, 1987).

Esquema 24. Transferencia del grupo metoxicarbonilo desde el ion *N*-(metoxicarbonil)isoquinolinio a varias piridinas.

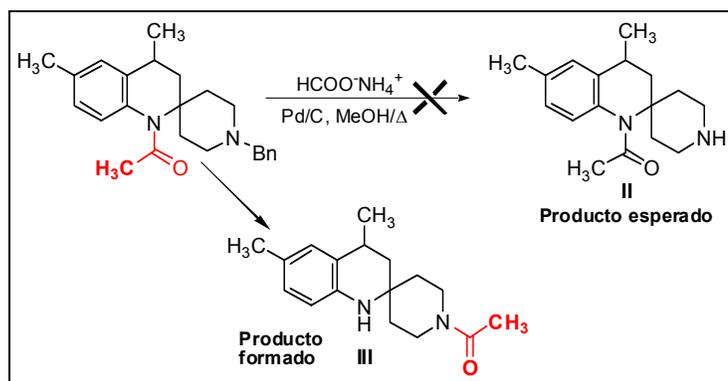


Cabe notar que los trabajos mencionados fueron enfocados hacia el estudio del mecanismo. El uso de la reacción de transferencia del acilo (casi siempre acetilo) en la síntesis práctica no ha sido abordado hasta ahora.

Fortuitamente durante el estudio de la reacción de desbencilación de un derivado *N*-acilado con formiato de amonio en metanol a reflujo, y en presencia de Pd/C, se encontró que el producto formado en la reacción correspondió a la amida **III**, y no a la molécula **II**, en el que el grupo seguiría protegiendo el nitrógeno dihidroquinolínico y el piperidinico estaría libre (Figura 15).

El resultado obtenido, aunque no fue el esperado, tiene gran significado en cuanto a la química de esta clase de compuestos. La formación inesperada del producto **III** se explica a través de dos procesos consecutivos: desbencilación y transacetilación.

Figura 15. Producto esperado y formado en la reacción de desbencilación de un espirano *N*-acilado.



En la literatura no hay ningún ejemplo de estudio, ni mecanismo, ni síntesis, de las reacciones de transferencia de un grupo acilo de un átomo de nitrógeno a otro de la misma molécula, por esto, se prepararon varios sustratos con diversos grupos

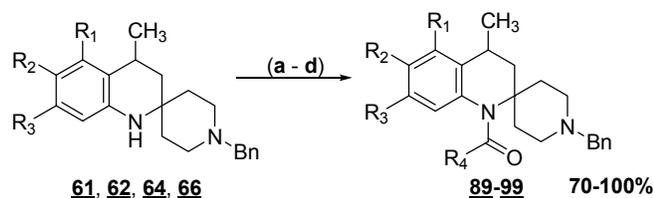
acilo y se sometieron a la reacción de desbencilación en las condiciones mencionadas, para determinar los alcances y las condiciones en las que transcurre la reacción. Adicionalmente se diseñaron y realizaron experimentos para dilucidar si esta migración sucedía inter- o intramolecularmente.

2.2 Preparación y caracterización de las 1'-acil-1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-quinolinas] 89-99

El primer paso del estudio fue la preparación de las amidas. Los espiranos bencilados **61**, **62**, **64** y **66**, con grupos funcionales electrodonadores y aceptores, se sometieron a reacciones de acilación. Las condiciones mostradas en el Esquema 25, se manifestaron como las más adecuadas para obtener los mejores rendimientos en la reacción, una menor cantidad de productos secundarios, facilidad, economía en el proceso experimental y en la extracción y purificación: a) para formular se usó el anhídrido acético fórmico a 0 °C, b) las acetilaciones se realizaron con anhídrido acético a reflujo, c) la benzoilación con el cloruro de benzoilo a temperatura ambiente, d) la cloroacetilación con el cloruro de cloroacetilo a temperatura ambiente, e) y la p-nitrobenzoilación con el cloruro de p-nitrobenzoilo a 5 °C.

Los tiempos de reacción en general fueron cortos y los rendimientos bastante buenos. Las amidas se presentaron en su aspecto físico como aceites muy viscosos o sólidos cristalinos de puntos de fusión definidos (Tabla 13). Las estructuras de todas las amidas **89-99** se confirmaron por espectroscopia de IR, de RMN y espectrometría de masas. En los espectros de IR en la región de 1641-1677 cm⁻¹ se registró la banda de absorción, de alta intensidad, característica de la vibración de tensión del grupo C=O en las amidas.

Esquema 25. Síntesis de las 1'-acil-1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-quinolinas] **89-99**.



a. HCOOH/Ac₂O/Py/0°C. b. Ac₂O/NEt₃/Δ. c. C₆H₅COCl/NEt₃/C₇H₈/r.t.
d. CH₃COCl/NEt₃/CH₂Cl₂/0°C. e. *p*-NO₂C₆H₅COCl/NEt₃/C₇H₈/5°C.

89 R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = H **95** R₁ = R₃ = H, R₂ = CH₃, R₄ = CH₂Cl
90 R₁ = R₂ = R₃ = H, R₄ = CH₃ **96** R₁ = R₃ = H, R₂ = CH₃, R₄ = *p*-NO₂C₆H₅
91 R₁ = R₂ = R₃ = H, R₄ = Ph **97** R₁ = R₃ = R₄ = H, R₂ = F
92 R₁ = R₃ = R₄ = H, R₂ = CH₃ **98** R₁ = R₃ = CH₃, R₂ = R₄ = H
93 R₁ = R₃ = H, R₂ = R₄ = CH₃ **99** R₁ = R₃ = CH₃, R₂ = H, R₄ = CH₂Cl
94 R₁ = R₃ = H, R₂ = CH₃, R₄ = Ph

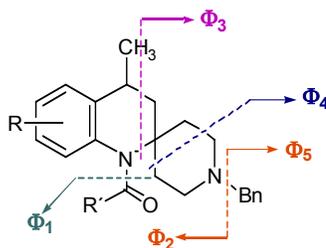
Tabla 13. Constantes físicas y químicas de las 1'-acil-1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-quinolinas] **89-99**.

Nº	Fórmula Molecular	Estado físico	p.f. (°C)	R (%)	IR ν _{N-C=O} (cm ⁻¹)	P.M. (g/mol)	t _R (min)
89	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O	Aceite incoloro, muy viscoso	-	95	1676	334.46	49.13
90	C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O	Aceite incoloro, muy viscoso	-	89	1657	348.48	44.09
91	C ₂₈ H ₃₀ N ₂ O	Cristales amarillos	124-125	82	1648	410.55	42.67
92	C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O	Cristales blancos	90-91	85	1677	348.48	53.99
93	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O	Cristales blancos	26-27	86	1663	362.51	47.45
94	C ₂₉ H ₃₂ N ₂ O	Aceite amarillo, muy viscoso	-	81	1641	424.58	45.89
95	C ₂₄ H ₂₉ ClN ₂ O	Cristales blancos	119-120	89	1669	396.95	36.24
96	C ₂₉ H ₃₁ N ₃ O ₃	Cristales naranjas	147-148	70	1648	469.58	30.74
97	C ₂₂ H ₂₅ FN ₂ O	Aceite incoloro, muy viscoso	-	90	1666	352.45	30.25
98	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O	Aceite amarillo, muy viscoso	-	Cuant.	1660	362.51	33.49
99	C ₂₅ H ₃₁ ClN ₂ O	Cristales blancos	158-159	79	1668	410.98	36.81

En los espectros de masas de estos compuestos el ion molecular es de muy baja intensidad (0.5-8%), y en algunos casos no aparece registrado porque su masa está por fuera del rango de trabajo (50-400 *m/z*) del equipo utilizado. Los iones

diagnósticos encontrados en estas fragmentaciones se asocian principalmente a las rupturas Φ_1 , Φ_3 y Φ_4 . Los cationes $[M-(COR')]^+$ se forman por la eliminación de los grupos acilo sustituidos desde los iones moleculares, a través de la ruptura Φ_1 . Los iones con m/z 186 ($C_{13}H_{16}N^+$) y m/z 146 ($C_{10}H_{12}N^+$), provienen de las rupturas β del anillo piperidínico relacionadas con las escisiones Φ_3 y Φ_4 . Estas mismas escisiones generaron sus respectivos iones complementarios. Finalmente, el ion pico de base corresponde al ion tropilio m/z 91 (100%) (Tabla 14).

Tabla 14. Iones principales y posible fragmentación en los espectros de masas de los compuestos **89-99**.



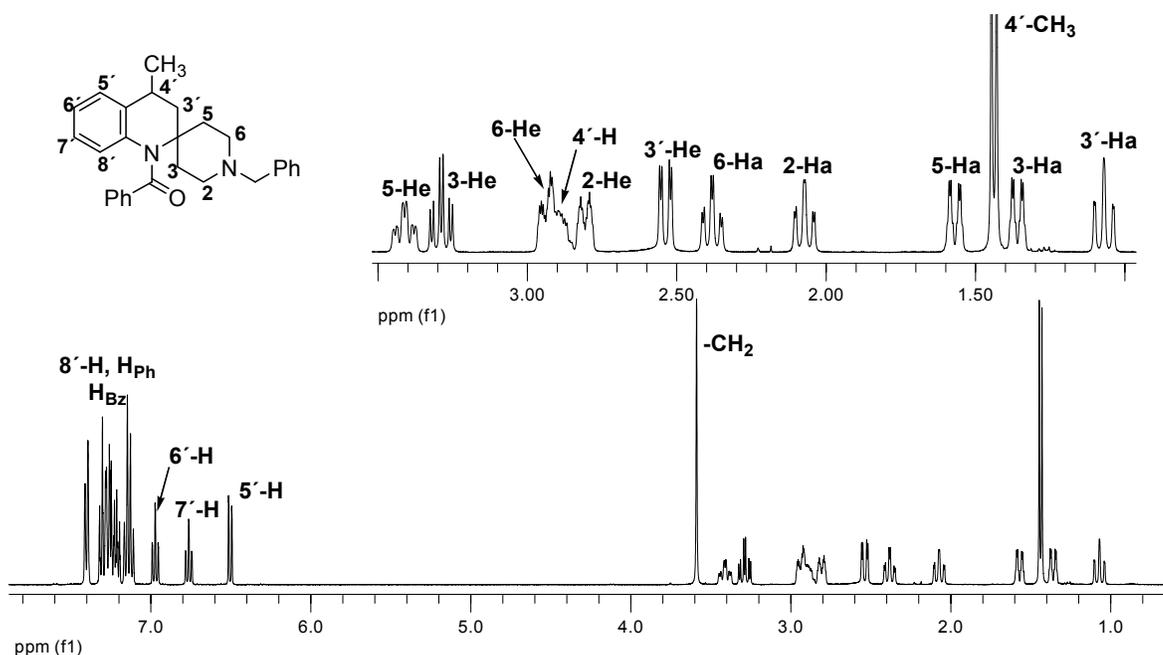
Comp.	m/z , (I, %)					
	M^+	Φ_1 [$M^+-(COR')$]	Φ_2 [$M^+-(C_7H_7)$]	Φ_3 [$M^+-(ArC_2H_6NCOR')$]	Φ_4 [$M^+-(ArC_5H_{10}NCOR')$]	Φ_5 [$M^+-(ArC_8H_{14}N_2COR')$]
89	334 (1)	305 (4)	243 (13)	186 (16)	146 (44)	91 (100)
90	348 (5)	305 (28)	257 (32)	186 (25)	146 (60)	91 (100)
91	-	305 (61)	319 (5)	186 (12)	146 (77)	91 (100)
92	348 (1)	319 (4)	257 (9)	186 (50)	146 (47)	91 (100)
93	362 (8)	319 (32)	271 (30)	186 (42)	146 (65)	91 (100)
94	-	319 (67)	333 (4)	186 (24)	146 (79)	91 (100)
95	396 (1)	319 (4)	305 (10)	186 (15)	146 (26)	91 (100)
96	-	-	-	-	146 (20)	91 (100)
97	352 (0.5)	323 (4)	261 (17)	186 (18)	146 (39)	91 (100)
98	362 (1)	333 (4)	271 (7)	186 (19)	146 (51)	91 (100)
99	-	333 (4)	319 (9)	186 (14)	146 (42)	91 (100)

La facilidad de preparación de estas amidas contrasta grandemente con la caracterización estructural por resonancia magnética nuclear. Los espectros de RMN de 1H de los compuestos **89-99** tienen zonas alifáticas confusas, que

mejoran sustancialmente a medida que el sustituyente del grupo amida es capaz de interaccionar o perturbar los hidrógenos piperidínicos que se encuentran a mayor distancia. Para el caso de las formamidas, los espectros muestran las señales como singuletes anchos sin ninguna resolución, en las acetamidas se observó una mejor resolución, y en los derivados benzoilados y p-nitrobenzoilados, las señales para cada uno de los hidrógenos alifáticos están perfectamente resueltas.

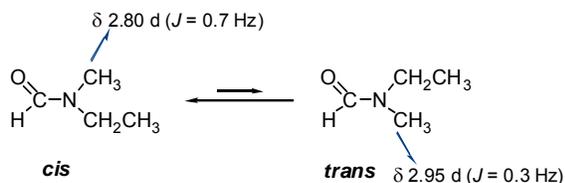
En el espectro de RMN ^1H de la 1-bencil-1'-benzoil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-quinolina] (**91**) (Figura 16.), se encontraron ocho señales para el anillo piperidínico: el hidrógeno axial del 3-C en aparece a 1.36 ppm como un doble doblete ($J = 12.5, 2.3$ Hz), y el ecuatorial a 3.29 ppm como un triplete de dobletes ($J = 12.7, 4.5$ Hz). Como un doble doblete a 1.57 ppm ($J = 12.8, 2.3$ Hz) y un triplete de dobletes a 3.34 ppm ($J = 12.2, 4.1, 1.2$ Hz) aparecen los protones axial y ecuatorial del 5-C. El hidrógeno axial del carbono 2-C resuena a 2.06 ppm como un triplete de dobletes ($J = 12.0, 2.3$ Hz) y el ecuatorial a 2.81 ppm con la misma multiplicidad ($J = 11.7, 2.0$ Hz). En 2.38 ppm ($J = 12.0, 2.9$ Hz) y 2.94 ppm ($J = 11.8, 2.3$ Hz) aparecen las señales de los hidrógenos axial y ecuatorial, del carbono 6-C, respectivamente, como tripletes de dobletes. El anillo dihidroquinolínico genera cuatro tipos de señales así: un triplete de dobletes a 1.07 ppm ($J = 12.8, 1.2$ Hz) para el hidrógeno axial del 3'-C y un doble doblete a 2.54 ppm ($J = 12.9, 3.0$ Hz) para el ecuatorial. Como un sexteto en 2.89 ppm ($J = 6.7$ Hz) se observa la señal del hidrógeno que se encuentra en 4'-C, y como un doblete a 1.44 ppm ($J = 6.8$ Hz) el metilo unido a este carbono. Los hidrógenos bencílicos generan un singulete a 3.59 ppm y los aromáticos resuenan a campo bajo en el intervalo de 6.50-7.41 ppm. En el capítulo de parte experimental encuentra la elucidación estructural para las amidas **89-99**.

Figura 16. Espectro de RMN ^1H de la 1-bencil-1'-benzoil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-quinolina] (**91**).



Las barreras de rotación de las amidas han sido amplia y extensamente estudiadas, en especial lo que concierne a las interacciones por efectos estéricos y electrónicos. En amidas *N,N*-disustituidas asimétricamente, el equilibrio está usualmente desplazado hacia uno de los conformeros, donde el preferido es aquel que tiene el sustituyente menos voluminoso *cis*, con respecto al átomo de oxígeno carbonílico (Oki 1985; Stewart *et al.*, 1970; Jackman 1975; La Planche *et al.*, 1963; Johnson 1968) (Figura 17).

Figura 17. Equilibrio en amidas *N,N*-disustituidas asimétricamente.

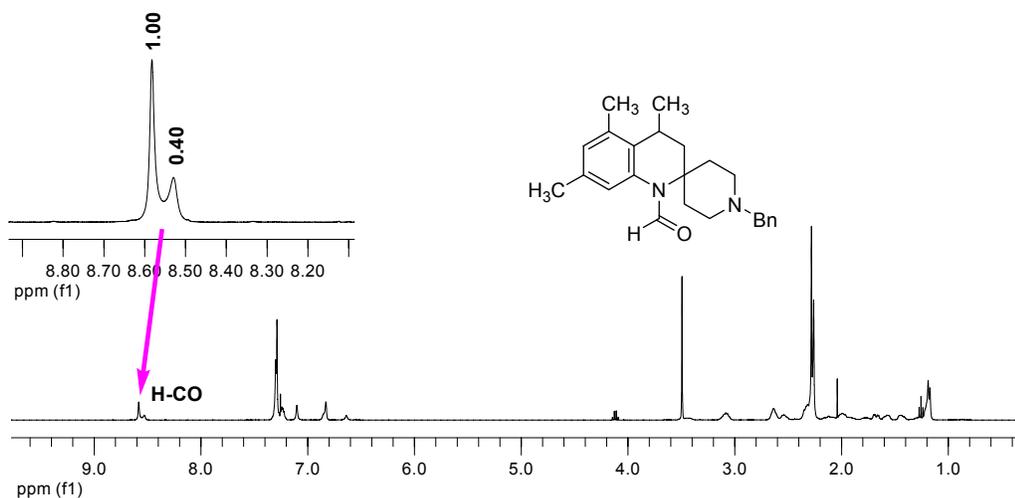


Los diferentes ambientes magnéticos de los sustituyentes del nitrógeno, promovidos por el átomo de oxígeno de la amida, son claramente observables por RMN ^1H y usualmente permite la asignación de cada conformación. El grupo *trans* con respecto al átomo de oxígeno amida resuena a campos más bajos que uno *cis*, en concordancia con el modelo de anisotropía diamagnética propuesto por Paulsen y Todt (Paulsen *et al.*, 1966).

En el caso de estas amidas piperidínicas, la situación es muy confusa, no solo existe la rotación de la amida, también la inversión del anillo piperidínico y asignar las señales a un conformero u otro resulta muy complejo. El corrimiento de cada protón axial o ecuatorial depende del efecto de desprotección que ejerce el átomo de oxígeno carbonílico. Del intenso desplazamiento de los protones ecuatoriales en las posiciones C-3 y C-5 hacia campos bajos, se deduce que caen en la zona de desapantallamiento del cono anisotrópico. Los protones de los carbonos C-2 y C-6 no tienen corrimientos significativos hacia campos bajos lo que indica que están fuera del plano del grupo amida.

En los espectros de ^{13}C de las formamidas **89**, **92**, **97**, y **98** las señales para cada carbono aparecen duplicadas, y en los espectros de ^1H de las formamidas **97** y **98**, se observan dos señales para el hidrógeno formílico; en el caso del compuesto **98**; éstas resuenan lo suficientemente separadas para obtener una relación entre ellas de 2.5:1. (Figura 18); se puede afirmar que estas se obtuvieron como una mezcla de los conformeros (rótameros *E* y *Z*, relativos al enlace amida). A diferencia de otras amidas, en las formamidas asimétricas el grupo más voluminoso prefiere una disposición *anti* con respecto al oxígeno carbonílico (Rubiralta *et al.*, 1991), por lo que es de esperar que en este caso el isómero *Z* sea el predominante.

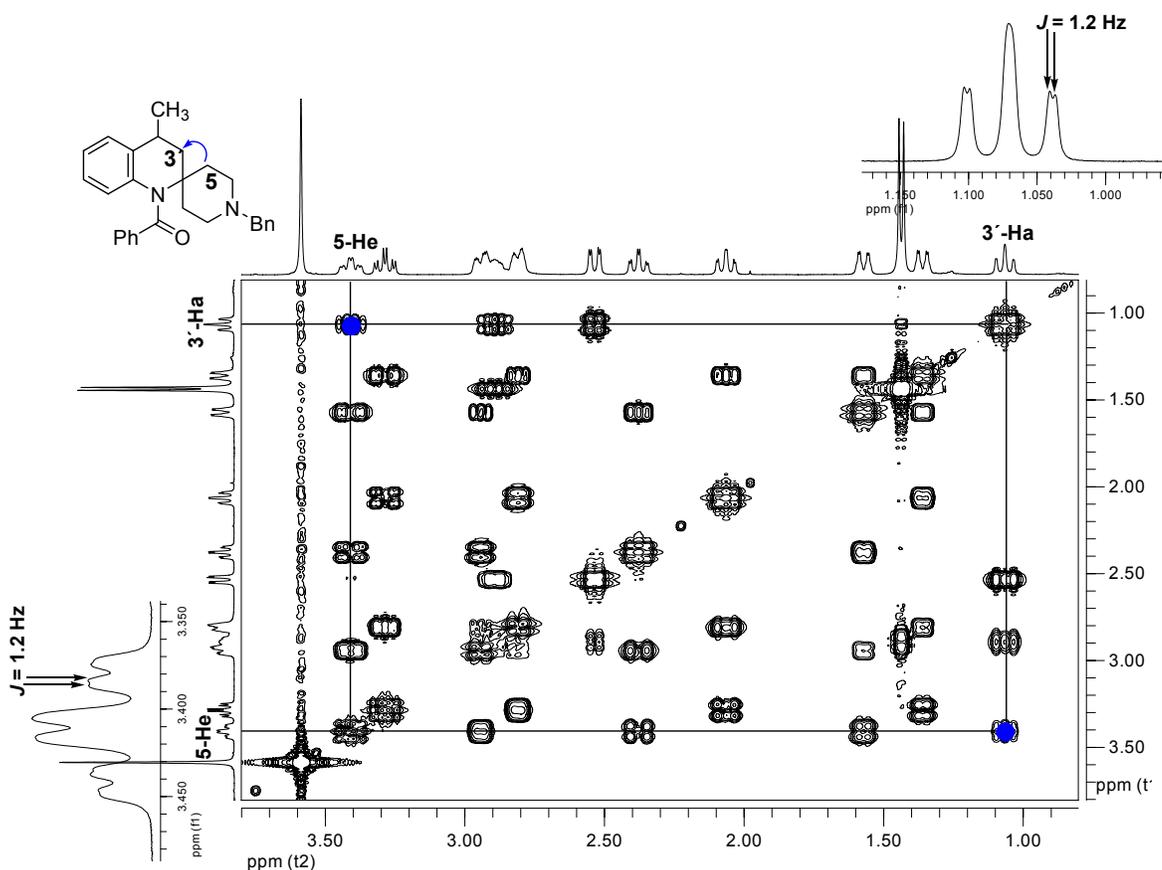
Figura 18. Espectro de RMN ^1H de la 1-bencil-1'-formil-4',5',7'-trimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-quinolina] (**98**).



El que sea posible o no observar los confórmers en los espectros realizados a temperatura ambiente depende de la barrera energética de rotación del enlace C-N amida. La no evidencia espectral de existencia de confórmers para las acetamidas, cloroacetamidas y benzamidas es un indicativo de que las señales coalescen a temperatura ambiente, a partir de esto se puede concluir que la rotación alrededor del enlace amida es relativamente lento, y consecuentemente, cada protón axial o ecuatorial siente un ambiente magnéticamente diferente (Wheland 1955).

En los espectros COSY de los compuestos **91** y **94** se observó un acoplamiento entre el hidrógeno 3'-Ha del anillo de la dihidroquinolina con el hidrógeno piperidínico 5-He (Figura 19).

Figura 19. Ampliación de la zona alifática del espectro COSY de la 1-bencil-1'-benzoil-4'-metil-3',4'-dihidrospiro[piperidina-4,2'-quinolina] (**91**).



En estas amidas los protones mencionados muestran un desdoblamiento (4J) adicional con un valor de 1.2 Hz; la distancia de 2.39328 Å calculada entre los protones 3'-Ha y 5-He (usando una minimización de la geometría para la amida **91** lograda con el programa Gaussian) (Becke 1993; Lee 1988; Hay 1985; Frisch 1995), es relativamente pequeña, lo que indica que el acoplamiento entre los dos núcleos está forzado por la rígida arquitectura molecular del espirano, que adopta una relación W (Figura 20). Con los resultados experimentales y los cálculos se propone la geometría para uno de los conformeros más estables de la benzamida **91**, como se muestra en las Figuras 20 y 21, donde el anillo dihidroquinolínico adopta la forma de semi-silla, y la piperidina de bote torcido.

Figura 20. Disposición espacial de los hidrógenos 3'-Ha y 5-He de la 1-bencil-1'-benzoil-4',6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-quinolina] (**91**).

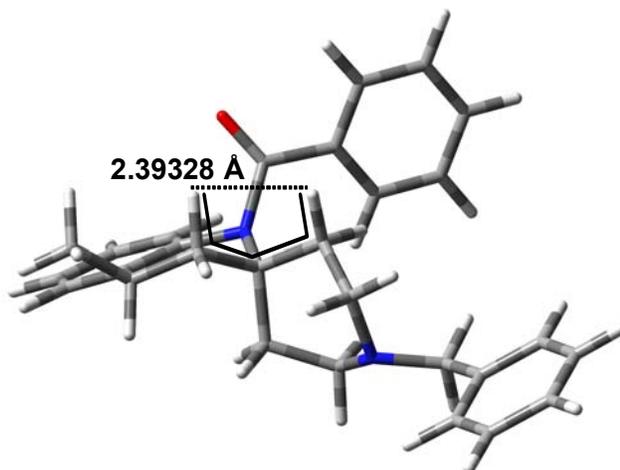
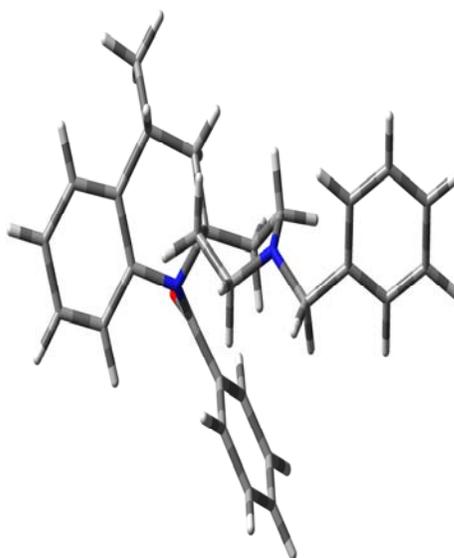


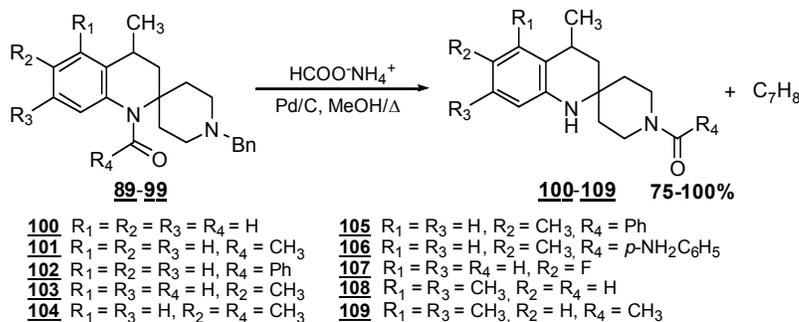
Figura 21. Disposición espacial de la 1-bencil-1'-benzoil-4',6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-quinolina] (**91**).



2.3 Transformación de las 1'-acil-1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-quinolinas] **89-99** a las 1-acil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'-H)quinolinas] **100-109** bajo de las condiciones de desbencilación

Después de preparada y caracterizada la serie de amidas **89-99**, se procedió a estudiar la reacción de migración de los grupos acilo en condiciones de desbencilación. Para esto, las amidas **89-99** se trataron con formiato de amonio en metanol a reflujo, en presencia de Pd/C al 10% durante 5-20 minutos (Esquema 26). Las amidas **100-109** se formaron con excelentes rendimientos, como sólidos cristalinos de altos puntos de fusión (Tabla 15).

Esquema 26. Preparación de las 1-acil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolinas] **100-109**.



La caracterización estructural de todas las amidas **100-109** se realizó de igual forma que en los casos anteriores, por técnicas espectroscópicas y espectrométricas. En los espectros de IR se observa la aparición de la banda de vibración del grupo NH (y NH₂ en el caso del compuesto **106**) en la región de 3343-3437 cm⁻¹, y la del grupo C=O de las amidas en 1622-1679 cm⁻¹.

En los espectros de masas de las amidas **100-109** el ion molecular es de mediana intensidad, en algunos casos, y en otros corresponde al pico de base del espectro (40-100 %). Se presentan las fragmentaciones características, ya mencionadas en anteriormente: la pérdida de 15 unidades de masa, correspondiente a la

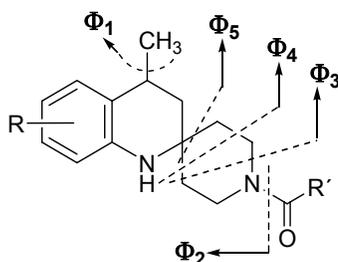
eliminación del grupo metilo del anillo dihidroquinolínico (Φ_1), la pérdida del grupo acilo (Φ_2), y están presentes los iones de las escisiones β del anillo de la piperidina (Φ_3 , Φ_4 , Φ_5).

Tabla 15. Constantes físicas y químicas de las 1'- acil-1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-quinolinas] **100-109**.

Nº	Fórmula Molecular	Estado físico	p.f. (°C)	R (%)	IR $\nu_{N-H}/\nu_{N-C=O}$ (cm^{-1})	P.M. (g/mol)	t_R (min)
100	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O	Cristales blancos	153-154	93	3388/1676	244.33	32.89
101	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O	Cristales blancos	136-137	96	3348/1623	258.36	33.71
102	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O	Cristales amarillos	106-107	90	3437/1645	320.43	31.79
103	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O	Cristales blancos	168-169	91	3394/1679	258.36	34.28
104	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O	Cristales blancos	114-115	88	3354/1635	272.39	35.34
105	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O	Cristales amarillos	155-156	75	3420/1641	334.46	33.75
106	C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O	Cristales amarillos	147-148	92	3471, 3338, 3212/1622	349.47	36.78
107	C ₁₅ H ₁₉ FN ₂ O	Cristales blancos	160-161	97	3343/1665	262.32	23.21
108	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O	Cristales incoloros	104-105	98	3343/1669	272.38	24.81
109	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O	Cristales blancos	169-170	Cuantitativo	3405/1657	286.41	25.45

Los fragmentos de la piperidina eliminados se llevan consigo el grupo acilo, lo que indica que efectivamente este grupo se encuentra sobre el nitrógeno piperidínico. En el caso de los compuestos **101**, **104**, **108** y **109** el pico de base (Φ_6), corresponde a un catión proveniente de la eliminación de tres hidrógenos del catión radical formado en la ruptura Φ_5 (Tabla 16). En el caso de los compuestos benzoilados **102**, **105** y el p-aminobenzoilado **106**, la ruptura Φ_2 generó el catión benzoilo correspondiente con m/z 105 y m/z 120 respectivamente, que para el caso de **105** y **106** fueron los picos de base del espectro.

Tabla 16. Iones principales y posible fragmentación en los espectros de masas de los compuestos **100-109**.



Comp.	<i>m/z</i> , (I, %)						
	M^{+}	Φ_1 [$M^{+}-(CH_3)$]	Φ_2 [$M^{+}-(COR')$]	Φ_3 [$M^{+}-(COR'NC_2H_5)$]	Φ_4 [$M^{+}-(COR'NC_3H_6)$]	Φ_5 [$M^{+}-(COR'NC_4H_9)^+$]	Φ_6 [\square_5-3H]
100	244 (98)	229 (29)	215 (13)	172 (63)	159 (75)	144 (100)	156 (81)
101	258 (61)	243 (25)	215 (14)	172 (83)	159 (17)	144 (54)	156 (100)
102	320 (47)	305 (12)	215 (8)	172 (100)	159 (20)	144 (44)	156 (46)
103	258 (100)	243 (27)	229 (8)	186 (47)	173 (70)	158 (74)	170 (82)
104	272 (67)	257 (22)	229 (12)	186 (76)	173 (17)	158 (44)	170 (100)
105	334 (48)	319 (8)	229 (6)	186 (90)	173 (30)	158 (44)	170 (52)
106	349 (8)	-	229 (41)	186 (13)	173 (5)	158 (7)	170 (5)
107	262 (100)	247 (33)	233 (11)	190 (69)	177 (82)	162 (97)	174 (98)
108	272 (82)	257 (31)	243 (10)	200 (52)	187 (77)	172 (90)	184 (100)
109	286 (40)	271 (16)	243 (10)	200 (54)	187 (8)	172 (29)	184 (100)

En los espectros de 1H y ^{13}C , las formamidas y acetamidas se observa claramente la presencia de dos conformeros causados por la rotación del enlace C-N amida; en el que mejor se pueden observar las señales es en el caso del compuesto **100** (Figura 22), aquí las señales están lo suficientemente separadas para ser analizadas sin inconvenientes; en su espectro de protones las señales de los hidrógenos piperidínicos resuenan así: como un multiplete a 1.54-1.73 ppm aparecen los protones 3(5)-Ha, y 3(5)-He, entre 3.33-3.50 ppm se encuentra un multiplete con un valor de integral de tres, que fue asignado a los hidrógenos 2(6)-Ha y 6-He; entre 3.63 y 3.83 ppm se encuentran las señales para los protones 2-He de cada uno de los conformeros: centrado en 3.66 ppm un doble triplete ($J =$

13.9, 5.3 Hz), y a 3.80 ppm una señal con la misma multiplicidad ($J = 14.0, 4.9$ Hz).

Los hidrógenos del anillo dihidroquinolínico generan cinco tipos de señales, así: los hidrógenos del grupo metilo resuenan como un doblete a 1.35 ppm ($J = 6.7$ Hz), el hidrógeno 3'-Ha resuena como un triplete a 1.42 ppm, con un desdoblamiento adicional por un acoplamiento de largo rango ($J = 12.8, 2.2$ Hz) con el hidrógeno 2-He de la piperidina. El protón 3'-He aparece a 1.94 ppm como un ddd ($J = 13.2, 9.2, 5.5$ Hz). El hidrógeno 4'-H resuena a 2.92 ppm como un sexteto ($J = 6.3$ Hz) y el N-H a 3.99 ppm como un singulete ancho.

Los hidrógenos aromáticos resuenan a campos bajos: el 8'-H a 6.53 ppm como un ddd ($J = 8.0, 2.2, 1.1$ Hz), el 6'-H a 6.69 ppm como un triplete ($J = 7.5$ Hz), el 7'-H como un triplete ($J = 7.3$ Hz), y como un singulete a 7.16 ppm el 5'-H. Para el hidrógeno del grupo amida aparecen dos singuletes en 8.04 y 8.05 ppm, una señal para cada confórmero.

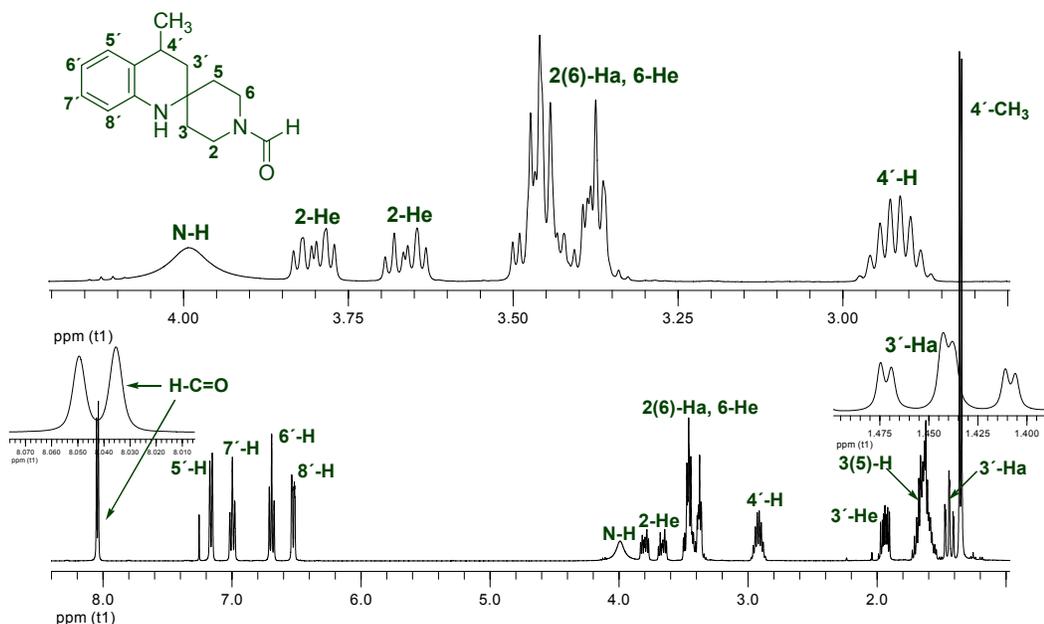
En la sección experimental se encuentra la elucidación estructural para las amidas **100-109**.

En los espectros de las formamidas y acetamidas se escogieron las señales de los hidrógenos formílicos y acetílicos, respectivamente, para obtener una relación entre los confórmeros presentes en solución a temperatura ambiente (Tabla 17); se encontró que la relación en las formamidas **100**, **103** y **107** es de 1:0.88, y en la **108** la relación es casi equivalente, de 1:0.96. En el caso de las acetamidas la relación es de 1:0.84.

Tabla 17. Relación de los conforméres de las formamidas y acetamidas.

Comp.	Señal				
	δ	A	B	A	B
		H-C=O	H-C=O	CH ₃ -C=O	CH ₃ -C=O
100	8.05/8.04	1	0.88		
101	2.12/2.10			1	0.84
103	8.05/8.03	1	0.88		
104	2.11/2.10			1	0.84
107	8.05/8.04	1	0.88		
108	8.04/8.03	0.96	1		

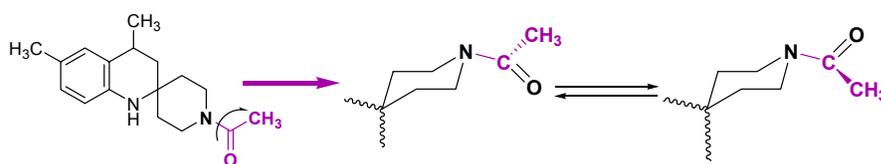
Figura 22. Espectro de RMN ¹H de la 1-formil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**100**).



Para estudiar más profundamente estos isómeros se realizaron experimentos de RMN ¹H dinámico, para la amida **104**, en dos disolventes, cloroformo-d1 y acetona-d6 para intentar establecer las temperaturas en las que ocurren los cambios conformacionales. En cloroformo-d1 se realizaron espectros entre -40 y 40 °C, con intervalos de cinco grados (Figura 23). En éstos, se aprecia que a

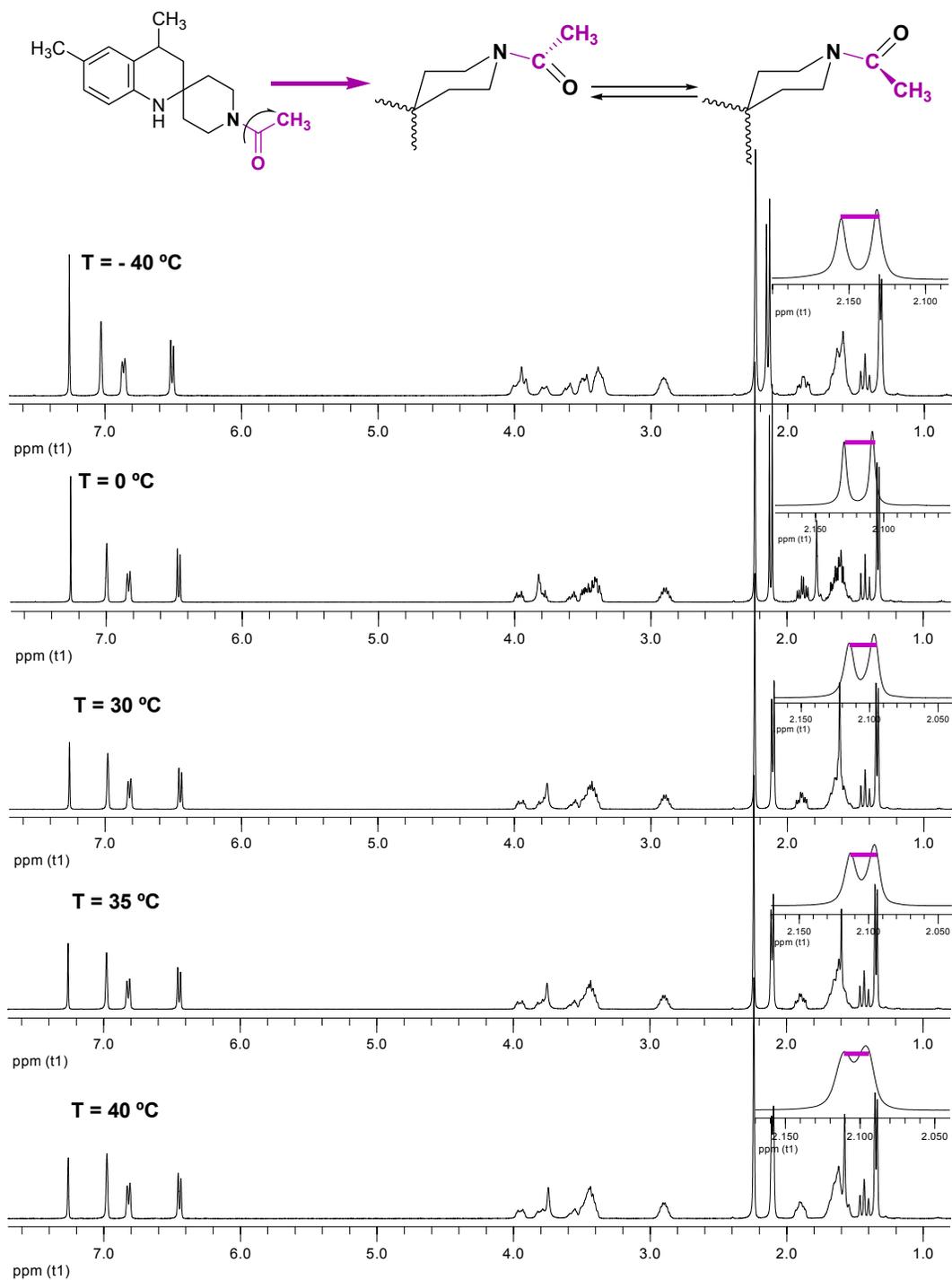
medida que aumenta la temperatura, el valor de δv , entre los dos singuletes del grupo metilo de la amida, disminuye rápidamente (Tabla 18). Aunque no se llegó a apreciar la coalescencia, es presumible que las dos señales del metilo del grupo amida, y por consiguiente los rótameros, van a colapsar en el intervalo de temperatura de 40-60 °C.

Tabla 18. Resultados de resonancia magnética nuclear dinámica para la 1-acetil-4'6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**104**) en CDCl_3 .



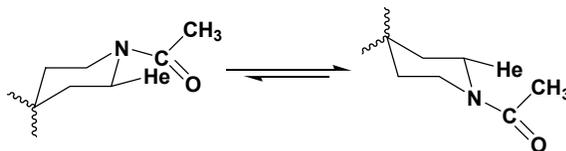
T (°C)	δ (ppm) CH_3	δ (ppm) CH_3	δv (ppm)
40	2.110	2.096	0.014
35	2.113	2.096	0.017
30	2.115	2.097	0.018
25	2.116	2.098	0.018
20	2.119	2.099	0.020
15	2.121	2.101	0.020
10	2.124	2.104	0.020
5	2.126	2.106	0.020
0	2.129	2.108	0.021
-10	2.136	2.114	0.022
-20	2.142	2.120	0.022
-30	2.178	2.155	0.023
-40	2.155	2.132	0.023

Figura 23. Espectros de RMN ^1H de la 1-acetil-4,6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**104**) en CDCl_3 .



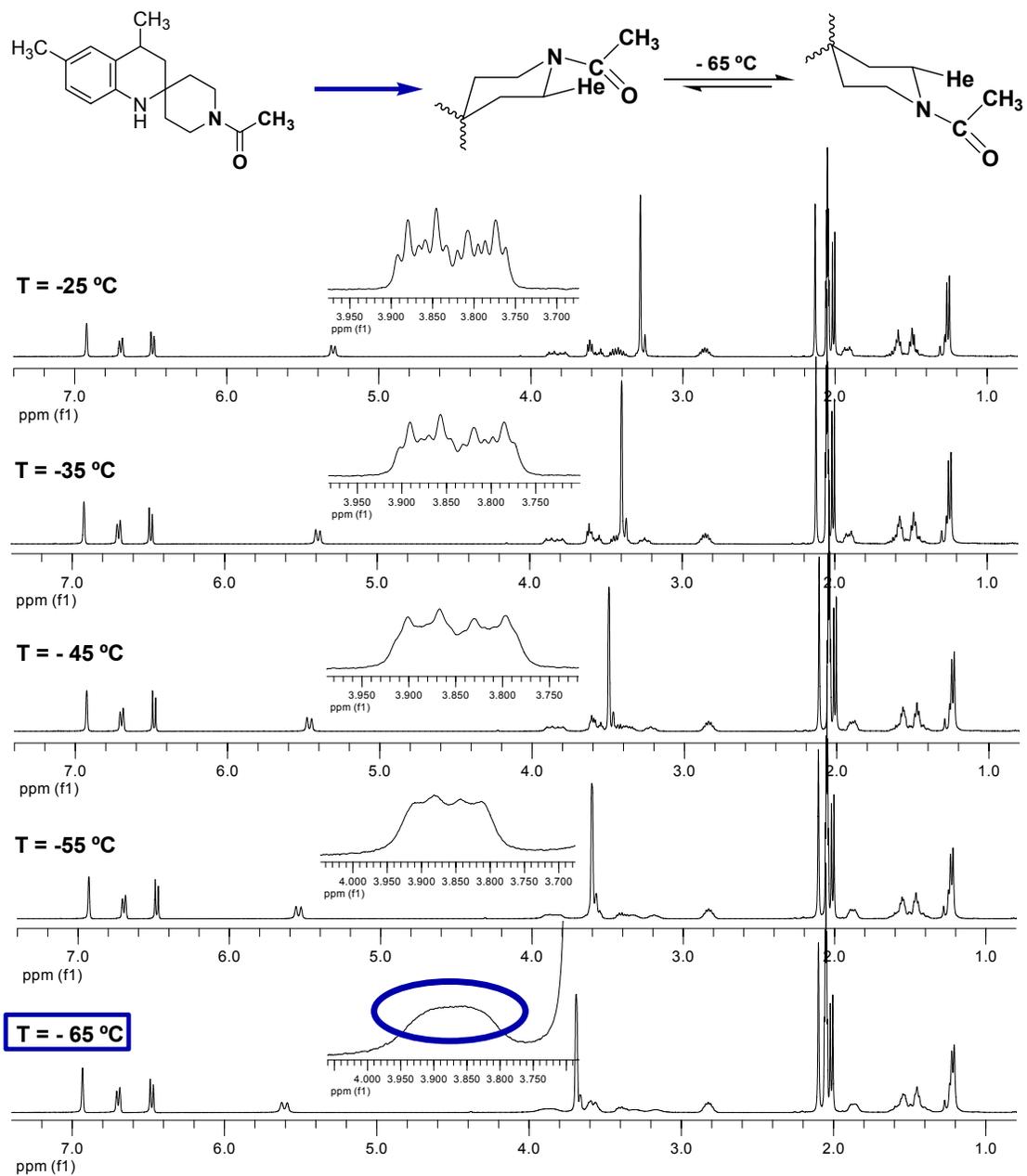
Usando acetona-d6 se realizaron espectros de RMN ^1H entre $-75\text{ }^\circ\text{C}$ y $25\text{ }^\circ\text{C}$, con intervalos de cinco grados (Figura 24). A medida que disminuye la temperatura, puede observarse claramente que las señales correspondientes al hidrógeno piperidínico (δ 3.89-3.79 ppm) del carbono 2-C de la disposición ecuatorial, pasan de ser dos señales independientes a temperaturas superiores a $-25\text{ }^\circ\text{C}$, a un singlete ancho a $-65\text{ }^\circ\text{C}$ (Tabla 19). Este fenómeno es diferente al anterior, la coalescencia a esta temperatura es el indicativo de la desaparición de la barrera rotacional de inversión del anillo piperidínico.

Tabla 19. Resonancia magnética nuclear dinámica para la 1-acetil-4,6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**104**) en acetona-d6.



T ($^\circ\text{C}$)	2-He δ (ppm)	2-He δ (ppm)	$\delta\gamma$ (ppm)
25	3.83 ddd ($J = 13.7, 10.7, 5.1\text{ Hz}$)	3.76 ddd ($J = 13.3, 10.5, 5.5\text{ Hz}$)	0.070
15	3.83 ddd ($J = 13.5, 10.6, 3.8\text{ Hz}$)	3.76 ddd ($J = 13.5, 10.3, 3.7\text{ Hz}$)	0.071
5	3.84 ddd ($J = 13.5, 10.5, 5.2\text{ Hz}$)	3.77 ddd ($J = 13.3, 10.2, 5.0\text{ Hz}$)	0.071
-5	3.85 ddd ($J = 13.5, 10.5, 5.2\text{ Hz}$)	3.78 ddd ($J = 13.3, 10.3, 4.9\text{ Hz}$)	0.072
-15	3.85 ddd ($J = 13.6, 10.4, 4.9\text{ Hz}$)	3.78 ddd ($J = 13.3, 10.1, 4.9\text{ Hz}$)	0.072
-25	3.86 ddd ($J = 13.7, 10.1, 4.8\text{ Hz}$)	3.79 ddd ($J = 13.4, 10.0, 5.0\text{ Hz}$)	0.071
-35	3.81 ddd ($J = 13.7, 9.7, 4.8\text{ Hz}$)	3.87 ddd ($J = 13.7, 9.3, 4.4\text{ Hz}$)	0.065
-45	3.81 bd ($J = 13.2\text{ Hz}$)	3.88 bd ($J = 13.4\text{ Hz}$)	0.071
-55	3.89 bd ($J = 12.2\text{ Hz}$)	3.83 bd ($J = 12.0\text{ Hz}$)	0.067
-65	3.87 bs		-
-75	3.88 bs		-

Figura 24. Espectros de RMN ^1H de la 1-acetil-4,6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**104**) en acetona-d₆.

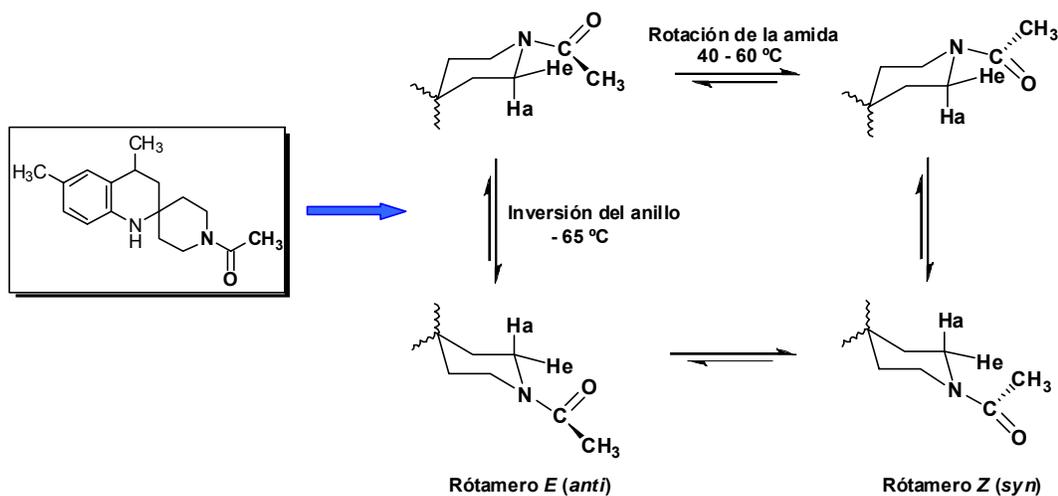


La combinación de los dos procesos dinámicos que ocurren en la espiropiperidina **104**: inversión del anillo y rotación de la amida son mostrados en la Figura 25 (Johnson 1968; Paulsen 1966; Lambert *et al.*, 1967).

La sustitución del nitrógeno complica la inversión del anillo dando dos conforméres no equivalentes, y conectados por la rotación de la amida. En las *N*-acetilspiroperidinas sustituidas en la posición C-4, la conformación preferida se asigna fundamentándose en el desplazamiento de las señales de los protones ecuatoriales de C-2 y C-6 de cada rótamer.

En el equilibrio de rotación de la acetamida, los hidrógenos ecuatoriales están más despartallados en el rótamer *syn* que en el *anti* (Johnson 1968; Paulsen 1966; Lynch *et al.*, 1966). En el caso del compuesto **104**, se podría predecir que el isómero mayoritario también corresponde al *syn*.

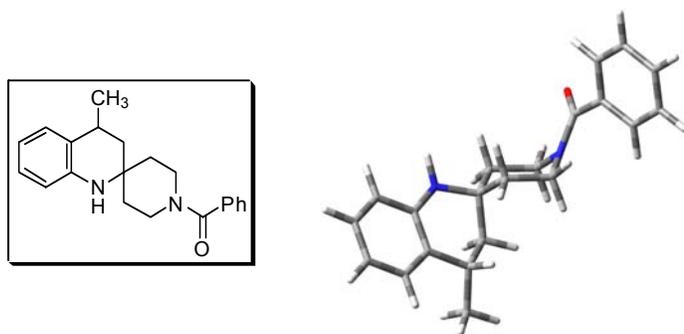
Figura 25. Equilibrio conformacional para la 1-acetil-4'-6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'-*H*)quinolina] (**104**).



A diferencia de las amidas precursoras **91**, **94**, **96**, en los espectros de las benzamidas **102**, **105** y **106** si se observan señales que indican la presencia de los

dos r6tameros a temperatura ambiente. Una minimizaci6n de la geometr3a para el derivado **102**, con el programa Gaussian (Becke 1993; Lee *et al.*, 1988; Hay *et al.*, 1985; Frisch 1995), muestra que el anillo piperid3nico tiene conformaci6n de silla y el dihidroquinol3nico de semi-silla (Figura 26).

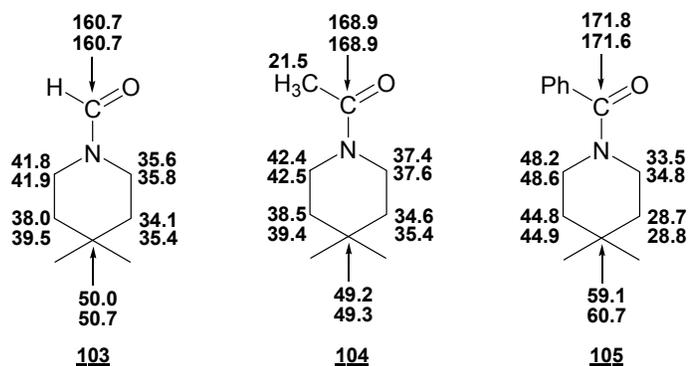
Figura 26. Geometr3a de la 1-benzoil-4,6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**102**).



Los dos is6meros por rotaci6n de las amidas muestran diferentes corrimientos qu3micos en los espectros de ^{13}C , con diferencias marcadas especialmente para los carbonos α y β de la piperidina observ3ndose que el carbono *syn* con respecto al ox3geno carbon3lico est3 protegido comparado con el correspondiente carbono *anti*, lo cual est3 de acuerdo con los reportes de la literatura (Levy *et al.*, 1972; Schnur *et al.*, 1989; Rubiralta 1989) (Figura 27).

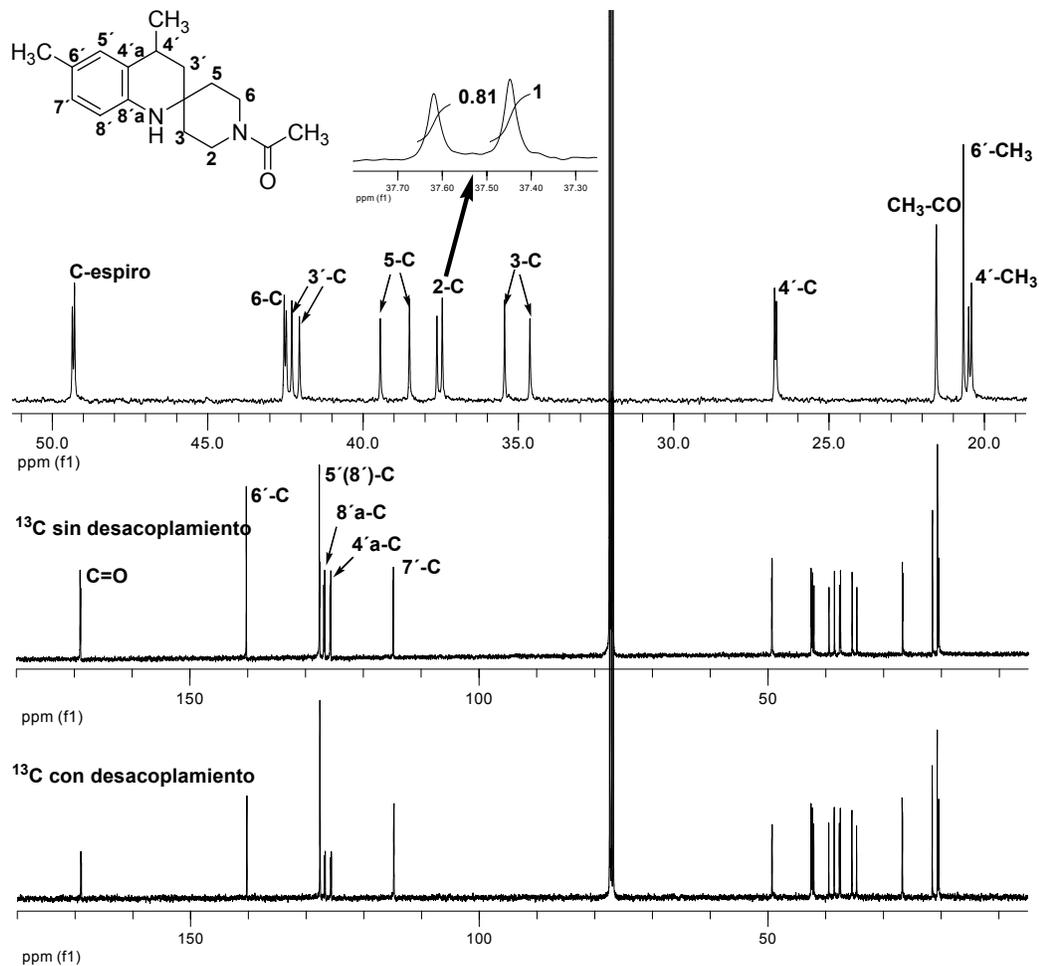
En el espectro de la acetamida **104** (Figura 28), las se3ales para los carbonos de la piperidina resuenan as3: en 34.6/35.4 ppm el 3-C, en 37.4/37.6 ppm los 2-C, en 38.5/39.4 ppm los 5-C, en 42.4/42.5 ppm los 6-C, y en 49.2/49.3 ppm el carbono espiro. En 21.5 ppm aparece el carbono del grupo metilo de la amida, y en 168.9/168.9 ppm el C=O. Los carbonos del anillo dihidroquinol3nico resuenan as3: en 42.0/42.3 ppm aparecen los correspondientes al 3'-C, en 26.6/26.7 ppm el 4'-C, y en 20.4/20.5 ppm el carbono del grupo metilo que se encuentra en 4'-C. El carbono del grupo metilo sobre 6'-C resuena en 20.6 ppm. Los carbonos arom3ticos generan se3ales a campos bajos, entre 114.7 y 140.2 ppm.

Figura 27. Desplazamientos químicos (ppm) en RMN ^{13}C del anillo piperidínico de las amidas **103-105** en CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$.



Usando la misma amida **104**, se realizó un experimento de RMN de ^{13}C desacoplado a ^1H , sin NOE, para corroborar la cuantificación de los rótameros de la amida (Figura 28). Las condiciones del experimento fueron: $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, tiempo entre scans: 20 segundos, scans totales 1024. Para realizar la integración se escogió la señal del carbono 2-C del anillo piperidínico. La relación encontrada fue de 1:0.81, muy similar a la encontrada por resonancia magnética protónica (1:0.84), lo que confirma la proporción en que están presentes estos isómeros.

Figura 28. Espectros de RMN ^{13}C con desacoplamiento de protones y acoplado con NOE, de la 1-acetil-4',6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**104**).



2.4 Estudio de la reacción de migración del grupo acilo bajo condiciones de desbencilación

Como se refirió anteriormente, los productos **100-109** se formaron por dos reacciones consecutivas, una desbencilación y la migración del grupo acilo del nitrógeno dihidroquinolínico al piperidínico. A continuación se describen los estudios realizados para este interesante y novedoso hallazgo.

2.4.1. Establecimiento de la migración. El primer indicio de la migración de los grupos acilo, del nitrógeno dihidroquinolínico al piperidínico, fue el corrimiento hacia campos bajos de los protones de las posiciones 2(6)-C del anillo piperidínico; este desplazamiento indica claramente la influencia de un grupo electroattractor, cuyo efecto anisotrópico hace que las señales de dichos protones estén desplazadas 0.3-0.4 ppm de la posición a la cual deberían aparecer.

Otro hallazgo importante en los espectros es la falta de la señal para el protón unido al nitrógeno de la piperidina (N-H). Si el nitrógeno piperidínico estuviese libre, esta señal debería aparecer alrededor de 2.00 ppm; sin embargo, los espectros no registran señales para éste hidrógeno.

Finalmente, la migración del grupo acilo fue establecida, inequívocamente, con los espectros de RMN de acoplamiento heteronuclear, HMBC; donde se ven claramente las correlaciones entre el carbono carbonílico y los hidrógenos metilénicos unidos a los C-2 y C-6 del anillo piperidínico.

En las formamidas, se observa la correlación anterior y adicionalmente, la correspondiente al protón formílico y los carbonos dos y seis de la piperidina (Figuras 29 y 30).

Figura 29. Espectro HMBC de la 1-formil-4'6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**103**).

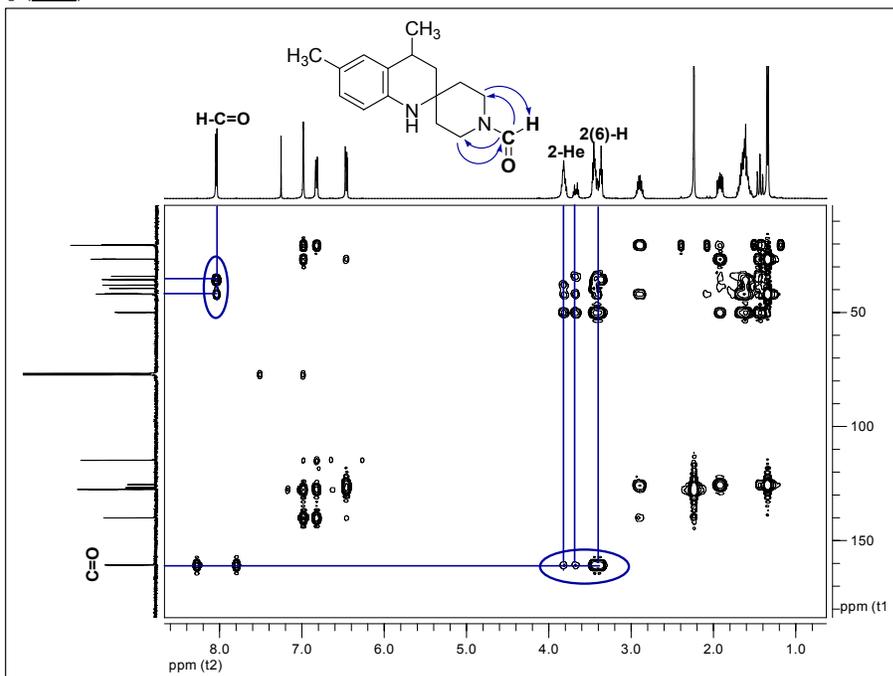
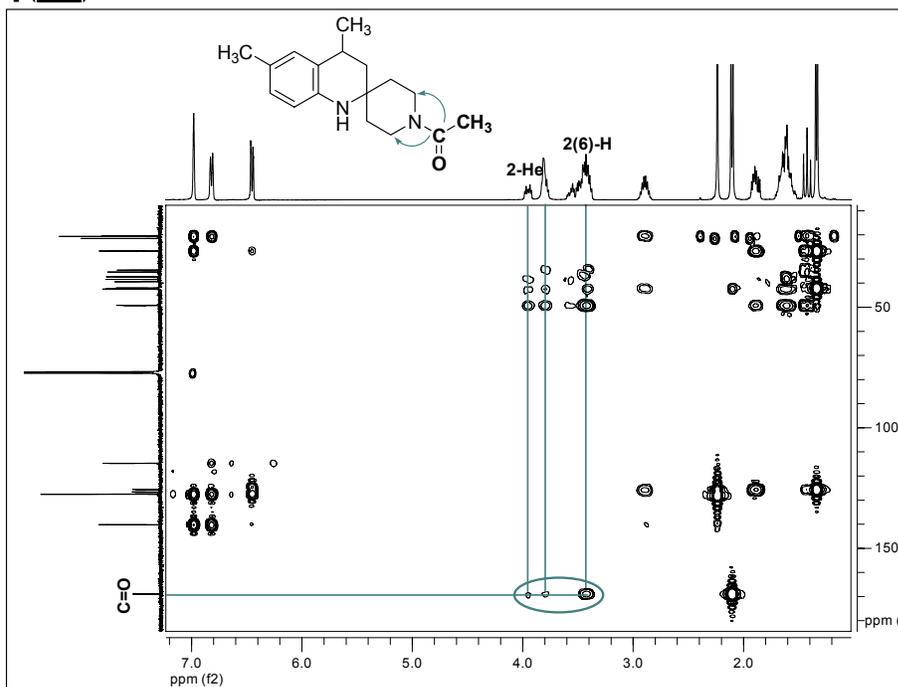


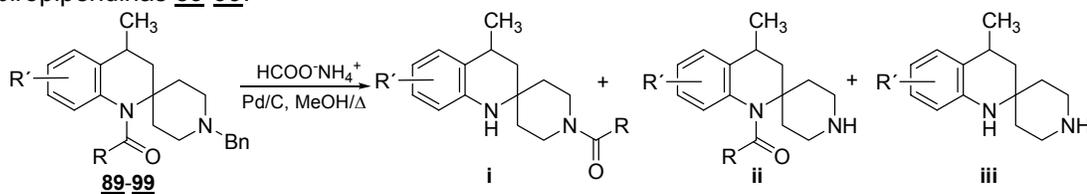
Figura 30. Espectro HMBC de la 1-acetil-4'6'-dimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**104**).



2.4.2. Migración inter- o intramolecular? En las transposiciones es importante determinar si en el cambio estructural los fragmentos resultantes de la ruptura permanecen durante cierto tiempo libres, antes de formar un nuevo enlace para dar el producto transpuesto, o si no es así. Para elucidar si la migración del grupo acilo es de tipo inter- o intramolecular, se realizaron varios tipos de experimentos:

2.4.2.1. Determinación de los fragmentos estructurales. Las masas de reacción sin purificar, de todas las reacciones llevadas a cabo en el estudio de la migración se analizaron por CG-EM, para examinar la presencia de cualquier otro producto de interés formado durante la reacción. En la Figura 31 se observan los productos que podrían generarse: el compuesto **i**, producto de la desbencilación y subsiguiente migración de acilo; el producto desbencilado **ii**, y el posible fragmento de una migración de tipo intramolecular **iii**.

Figura 31. Productos que podrían formarse en la reacción de desbencilación de las espiropiperidinas **89-99**.



Cuando se tienen grupos formilo, acetilo y cloroacetilo en el nitrógeno dihidroquinolínico, la reacción transcurrió completamente hacia el producto **i**, no se encontraron evidencias de los productos **ii** o **iii**.

Durante la reacción de desbencilación de las cloroacetamidas se eliminó el cloro, dando acetamidas como productos finales. En los crudos de reacción de las benzamidas, se encontró una pequeña cantidad (< 10 %) de productos **ii**; en varios intentos de transformar totalmente este producto en el migrado (se realizaron reacciones con una mayor cantidad molar de formiato de amonio y/o

Pd/C, y adicionalmente se aumento el tiempo de reacción), pero la reacción se “estancó” y no fue posible la conversión total.

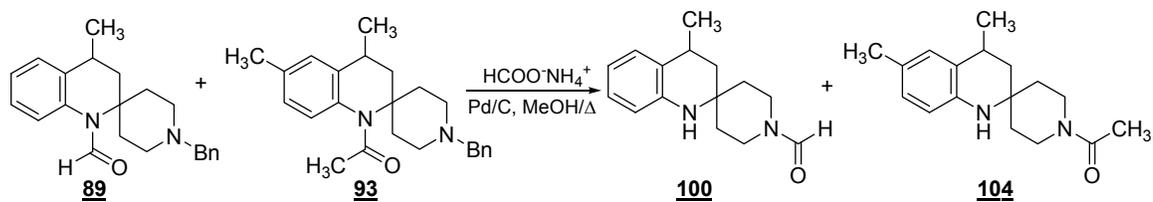
2.4.2.2. Experimentos de cruzamiento. Un método de estudio de los mecanismos de reacción, que es particularmente notable en los rearrreglos moleculares es la técnica de experimentos *crossover*: dos compuestos distintos, pero similares, que separadamente se transponen a velocidades semejantes se someten al mismo tiempo, y en la misma disolución, a una transposición en concentraciones comparables. Después, se analizan los productos de reacción y las proporciones entre ellos (Carroll 1998; Sykes 1975). En esta investigación se realizaron tres experimentos de entrecruzamiento entre amidas y dos experimentos con atrapadores del fragmento acilo.

Reacción de entrecruzamiento con dos espiranos. Se efectuaron tres ensayos con diferentes amidas: en el primer experimento se usó a **89** y **93**, en el segundo a **90** y **98**, y para el tercero se emplearon a **90** y **97** (Figura 32). Las condiciones de reacción para los experimentos fueron las mismas que las utilizadas previamente para obtener los productos transpuestos: relaciones molares de cada componente, disolvente, tiempo de reacción y temperatura, así: se hizo una mezcla equimolar de las amidas (0.5 mmol de cada una), formiato de amonio (5.00 mmol) y Pd/C al 10% (2.5 % molar), en metanol (20 mL), se calentó a reflujo por 10 minutos, seguidamente el catalizador se filtró y una alícuota de la solución metanólica fue analizada por CG-EM.

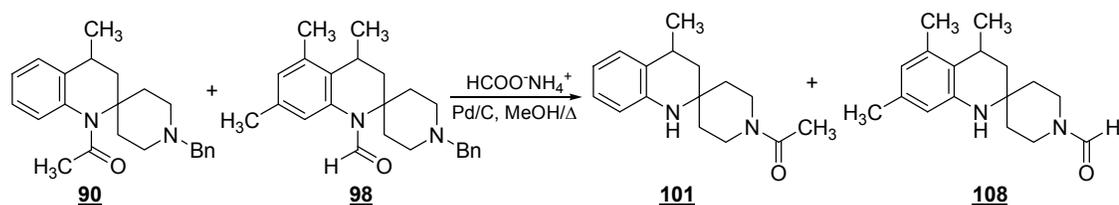
El análisis de los cromatogramas y los espectros de masas no reveló productos de reacciones de tipo intermolecular, solo se encontraron los mostrados en la Figura 32 para cada experimento, los correspondientes a una migración intramolecular.

Figura 32. Experimentos *crossover* entre distintos derivados acilados de las espiropiperidinas.

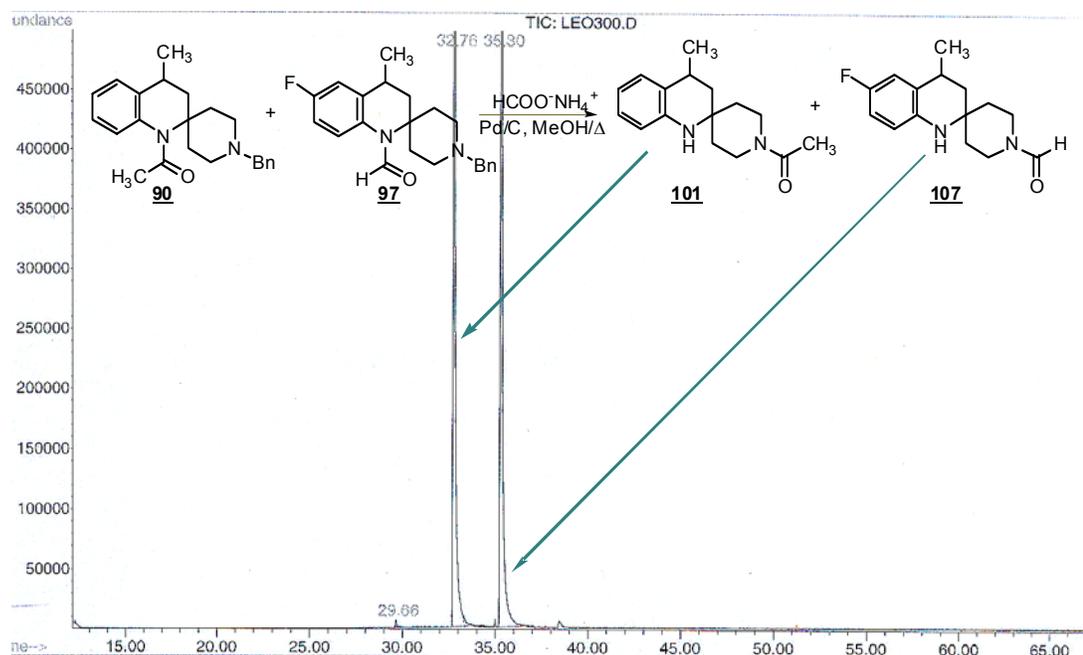
Experimento 1.



Experimento 2.



Experimento 3.

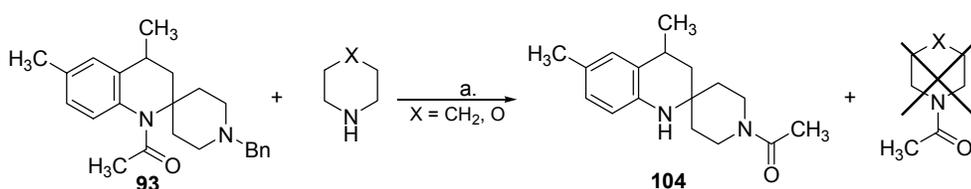


Reacción de atrapado del fragmento acilo con trampas químicas. Es permitido especular que en algún paso de la reacción, el fragmento acilo puede desprenderse del nitrógeno, por eso, se intentó el atrapamiento con un cebo que

lo interceptará. Se consideraron a la piperidina y la morfolina, como los más adecuados, por cumplir con dos condiciones importantes: un poder de nucleofilia similar entre los dos nitrógenos reactantes y la no disposición a formar subproductos alternativos en la reacción.

Se efectuaron los experimentos usando el derivado acetilado **93** y conservando las condiciones de reacción óptimas para obtener la migración (Figura 33). En el análisis de la masa de reacción no se evidenció la formación de *N*-acetilpiperidina o *N*-acetilmorfolina.

Figura 33. Experimento de atrapamiento del fragmento acilo con piperidina.



a. **93** (1 mmol), piperidina o morfolina (1 mmol), $\text{HCOO}^-\text{NH}_4^+$ (5 mmol), Pd/C (2.5% mmol), MeOH (10 mL), $T = 64\text{ }^\circ\text{C}$, $t = 10\text{ min}$.

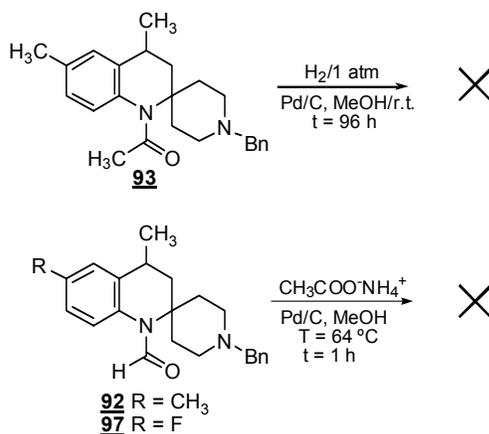
El resultado negativo en las técnicas de entrecruzamiento sugiere que cada molécula reactante no se separa en fragmentos durante la reacción, por lo tanto no se generan los productos mixtos. Interesantemente ningún análisis cromatográfico muestra evidencia de éstos, con lo que se podría concluir que las migraciones transcurren intramolecularmente, pero según las reglas actuales,^{94a} la interpretación de estos resultados no se puede hacer irrefutablemente; la no observación de estos productos no permite afirmar, que no ocurre una disociación, en la que tal vez la recombinación del producto es tan rápida, que los fragmentos no alcanzan a difundirse en el disolvente. La conclusión de una migración de tipo intramolecular del fragmento acilo en los espirosistemas estudiados es aún limitada y sólo podría ser reconfirmada con alguna técnica de marcaje isotópico.

2.4.3. Alcances de la migración. Para establecer los alcances de la migración, se estudiaron otras condiciones de reacción, cambios en el catalizador, variación de la temperatura y disolventes, todo enfocado a obtener más datos del transcurso de la reacción y a determinar si podría suceder en condiciones biológicas (agua y T = 37 °C). En todos los casos se analizó el crudo de reacción por GC-EM.

Lo primero que se realizó fueron experimentos modificando el agente reductor, se probó el hidrógeno molecular, que es el típicamente usado en las reacciones de desbencilación, pero después de cuatro días no se observó ningún cambio, solo se encontró el sustrato, la amida **93** (Figura 34). La desbencilación de estos compuestos posiblemente necesita altas presiones de hidrógeno.

También se ensayó el acetato de amonio, mucho más económico que el formiato, pero no ocurrió ninguna reacción, ni aún prolongando el calentamiento por una hora.

Figura 34. Estudio de la reacción con hidrógeno molecular y acetato de amonio.



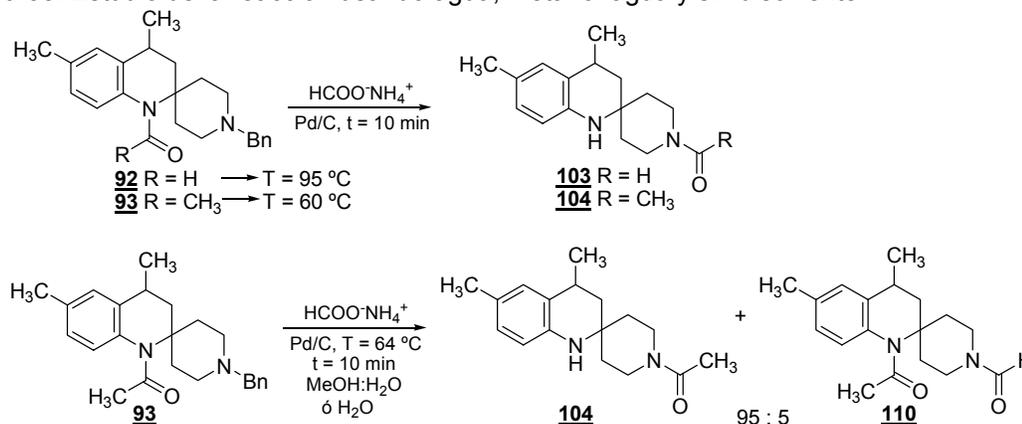
Seguidamente se procedió a cambiar los disolventes, se realizó la reacción en una mezcla de metanol-agua (1:1), agua y sin disolventes (Figura 35).

Las dos reacciones sin disolventes transcurrieron de forma completa hacia el producto migrado. Las temperaturas en cada caso, se utilizaron un poco más arriba del punto de fusión de las amidas precursoras para lograr una homogenización completa de la masa de reacción.

Cuando se utilizó agua o mezclas de metanol-agua, se detectaron dos productos: el migrado y el producto **110**, formado probablemente por la formilación del nitrógeno piperidínico, inmediatamente después de la desbencilación. La proporción entre ellos en ambos casos fue de 95:5.

La utilización de agua como disolvente, disminuye considerablemente los costos de la reacción (usó y secado del metanol) y la hace más amigable ambientalmente.

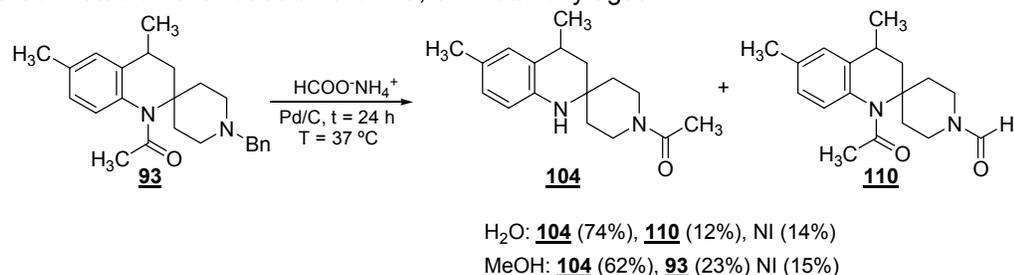
Figura 35. Estudio de la reacción usando agua, metanol-agua y sin disolvente.



Se efectuaron reacciones a 37 °C en agua y metanol con la amida **93**. El monitoreo por cromatografía en capa fina durante la primera hora reveló la

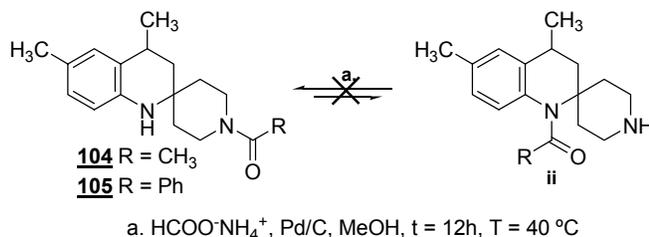
aparición de una mancha con igual R_f que la generada por el producto migrado **104**, pero en pocas cantidades. Se optó por ampliar el tiempo de reacción a 24 horas. En ambos casos el compuesto **104** se formó en buenos rendimientos, pero la reacción ya no fue tan “limpia”, se presenció la aparición de una gran cantidad de señales pequeñas que no pudieron ser identificadas y representaron un 14-15% del total, un porcentaje muy alto de productos secundarios (Figura 36).

Figura 36. Estudio de la reacción a 37 °C, en metanol y agua.



Anteriormente se mencionó que durante las reacciones de las benzamidas se formaba aproximadamente un 10 % del producto desbencilado pero sin migrar, y que no fue posible “empujar” la reacción hasta su conversión total. Este hecho podría representar un equilibrio, que no fue observado con otros grupos acilo. Para descartar o confirmar esta suposición se diseñó una reacción y se aplicó a dos sustratos diferentes. Las amidas migradas **104** y **105** se mezclaron con los mismos reactivos y en las mismas proporciones molares que las utilizadas para prepararlas (Figura 37), pero la temperatura del sistema no se subió hasta el reflujo del metanol, se mantuvo a 40 °C durante 12 horas. Los análisis de CG no mostraron la formación del producto **ii**, por lo cual se concluyó que no es el factor de reversibilidad lo que no permite completar la reacción.

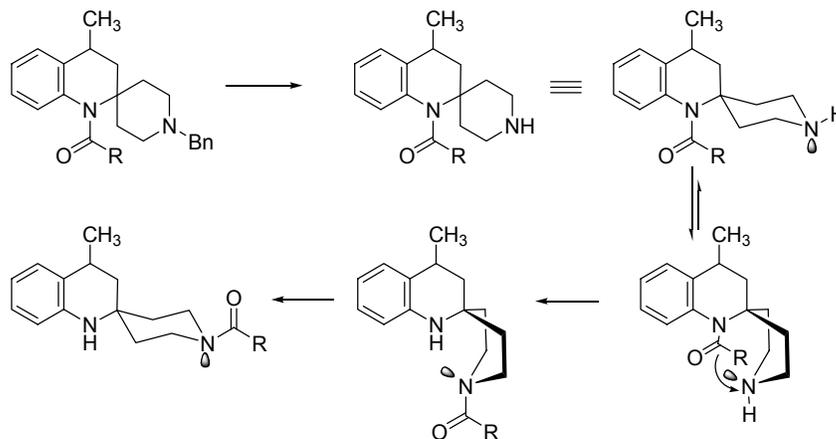
Figura 37. Estudio de la reacción inversa a 40 °C.



Después de este resultado quedó la opción de elevar la temperatura. Para esto, la reacción se llevó a cabo sin disolventes a 124 °C (temperatura de fusión del formiato de amonio), y en etanol y agua a reflujo. La reacción sin disolvente condujo a la misma proporción encontrada anteriormente para los productos **i** y **ii** (~90:10). En las otras dos sólo se observó una intensa descomposición, aprox. cincuenta señales en el cromatograma. El factor por el cual no se logra la migración de forma completa en las benzamidas no pudo ser aclarado.

2.4.4. Explicación de la migración. Los intentos de esclarecer el tipo y los alcances de la migración generaron resultados con los cuales se propone la ruta mostrada en la Figura 38, por la cual podría transcurrir la migración de los grupos acilo en este espirosistema. Un primer paso es la pérdida del grupo bencilo, para formar el intermedio desbencilado; un cambio conformacional del anillo piperidínico de silla a bote, puede disminuir la distancia entre el carbono carbonílico, deficiente de electrones, y el nitrógeno de mayor densidad de carga, el piperidínico y causar la migración del acilo. Después de la migración es posible que se restablezca rápidamente el conformero más estable, dando una estructura final con la geometría que se mostró en la en la Figura 20, en el que el anillo piperidínico tiene conformación de silla.

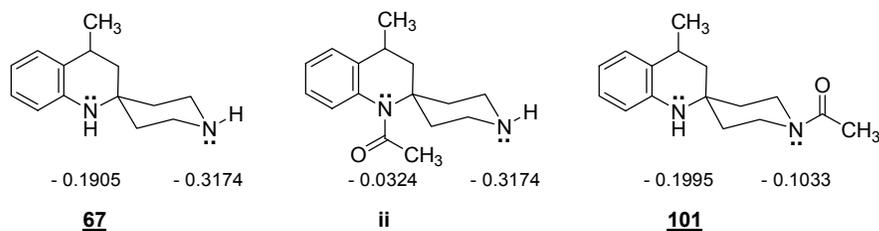
Figura 38. Vía de la migración intramolecular de acilo en los sistemas espiránicos.



Los anteriores postulados también se apoyan en dos tipos de cálculos: a) la densidad de carga sobre los nitrógenos, y b) la geometría del intermedio desbencilado.

a) Aplicando el método PEOE (Partial Equalization of Orbital Electronegativity), y el software PETRA (Parameter Estimation for the Treatment of Reactivity Application) (Gasteiger *et al.*, 1987; Gasteiger *et al.*, 1980; PETRA, web site), al espirano **67**, a la amida **101**, y a la estructura intermedia de la reacción de migración **ii**, se halló que la estructura no acetilada **67** muestra mayor densidad de carga sobre el nitrógeno piperidínico (-0.3174), lo que se manifiesta en un mayor carácter básico de este átomo (Figura 39).

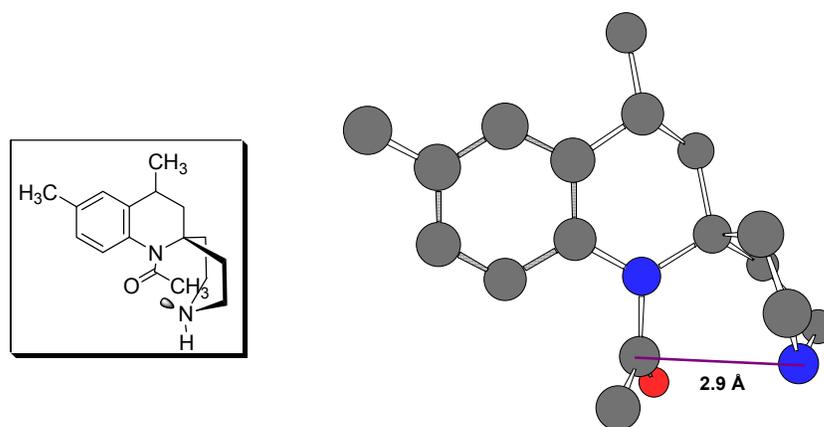
Figura 39. Densidad de carga sobre los nitrógenos en **67**, **101**, y el intermedio de reacción **ii**.



Las cargas atómicas indicadas en las estructuras **ii** y **101** indican que la introducción del grupo carbonilo ocasiona una disminución en la densidad de carga, lo cual se explica debido al carácter electrotomador del grupo carbonilo. Estos cálculos ayudan a explicar por qué el grupo acetilo puede migrar entre los nitrógenos de la estructura, desde uno de baja, a otro de alta densidad de carga.

b) La minimización de la geometría para el intermedio desbencilado de la reacción de la amida **93**, indica una conformación tipo bote para el anillo de la piperidina.⁸⁹ Esta conformación permite el acercamiento del átomo de carbono carbonílico y el nitrógeno piperidínico (distancia entre ellos 2.9 Å) induciendo la migración del acilo al nitrógeno de mayor densidad de carga (Figura 40).

Figura 40. Conformación de bote del anillo piperidínico en el intermedio de reacción de la amida **93**.



3. ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD QUÍMICA DE LAS N-(1-BENCIL PIPERIDINIL-4)-N-ARILAMIDAS COMO ANÁLOGOS FLEXIBLES EN LA MIGRACIÓN DEL GRUPO ACILO

3.1 Antecedentes

Los amplios aspectos biológicos de las piperidinas obligan al desarrollo constante de la preparación efectiva del anillo piperidínico, por ende, la química de sus derivados sobre todo los sustituidos en posición C-4, ha sido siempre un centro de interés para los químicos orgánicos sintéticos (Weintraub *et al.*, 2003; Kuznetsov 1991).

3.1.1. Aminopiperidinas. Dentro de esta serie de piperidinas, se destacan sobremanera las diversas 4-aminopiperidinas, las cuales son importantes intermedios sintéticos para la preparación de varios alcaloides y fármacos. En la literatura abundan los ejemplos de preparación de los derivados las 4-aminopiperidinas, aquí se citan varios artículos de importancia (y de utilidad para nuestro trabajo) para dar un panorama general de estos procesos.

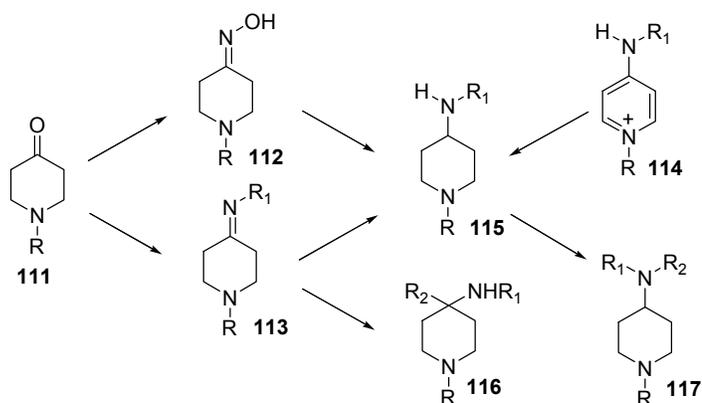
Las más simples 4-aminopiperidinas **115** se pueden preparar a través de la formación de oximas **112** derivadas de las γ -piperidonas de formula general **111** y posterior reducción sea catalítica o química; éstas también pueden obtenerse a partir de las sales de piridinio **114** vía reducción en presencia de Pt o vía la reducción de las bases de Schiff **113**, obtenidas por la reacción entre γ -piperidonas **111** y las correspondientes aminas aromáticas. La reducción se puede realizar con ayuda de los hidruros mixtos de metales y también por hidrogenación catalítica.

La reacción entre las bases de Schiff **113** y reactivos de Grignard (y organolitados) es una ruta tradicional que conduce a la formación de las aminas secundarias **116**.

Para la obtención de aminas secundarias piperidínicas a partir de la γ -piperidona y aminas alifáticas se utiliza la reacción de aminación reductiva, en presencia de los siguientes catalizadores: Pt, Pd, Ni-Re, y también NaBH₄, NaCNBH₃.

La formación de aminas terciarias piperidínicas **117** se puede llevar a cabo con reacciones de alquilación o arilación, por los correspondientes halogenuros de alquilo o arilo, de las aminas secundarias, en presencia de K₂CO₃ y Cu en polvo (Vartanyan 1983) (Esquema 27).

Esquema 27. Rutas generales de obtención de 4-aminopiperidinas.



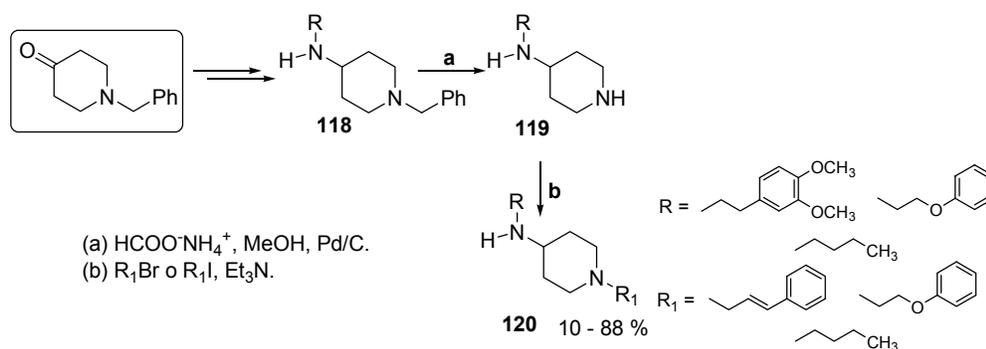
La química de todas las 4-aminopiperidinas es relativamente sencilla y consiste en reacciones de alquilación, arilación, arilsulfonación, acilación, etc. que dan una diversidad enorme de “andamios” moleculares piperidínicos. A su vez, los N-derivados también se utilizan ampliamente en la química medicinal.

Aunque estas transformaciones son sencillas, cada año se desarrollan nuevos procesos en la química de piperidinas, que pueden ser útiles en la búsqueda de nuevos modelos selectivos de alta afinidad con los receptores biológicos.

Las nuevas *N*-alquil-4-*N*-alquilaminopiperidinas **120** fueron sintetizadas usando la reacción de alquilación entre las 4-alquilaminopiperidinas **119**, y halogenuros de alquilo (yoduro de butilo, bromuro de cinnamilo, etc.).

Los sustratos clave, -las *N*-bencil-4-alquilaminopiperidinas **118**- se prepararon a partir de la *N*-bencil-4-aminopiperidina o de la *N*-bencil- γ -piperidona (Teodori *et al.*, 2004)⁹⁹ (Esquema 28). Las piperidinas **120** se desarrollaron como fármacos bloqueadores contra el dolor de tipo neuropático.

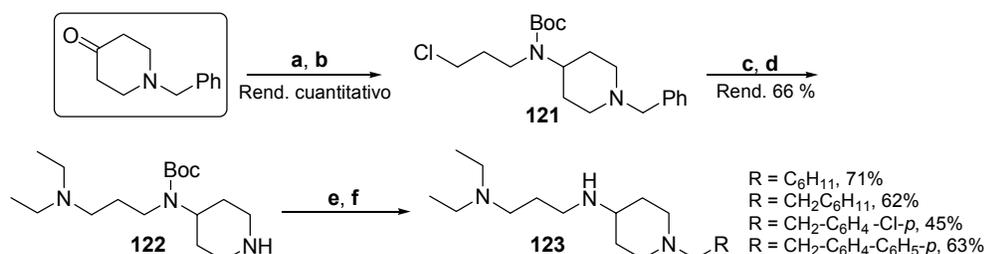
Esquema 28. Preparación de *N*-alquil-4-*N*-alquilaminopiperidinas **120**.



En la búsqueda de nuevos agentes antimaláricos se diseñaron nuevos derivados piperidínicos, cuya ruta sintética comienza con la amino-reducción de la *N*-bencil- γ -piperidona, con 3-cloroaminopropano y $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, en presencia de ácido acético y trietilamina (Brinner *et al.*, 2005). Las aminas secundarias **121** así preparadas, fueron desbenciladas obteniéndose las 4-*N*-Boc-1*H*-piperidinas **122**. Últimas fueron nuevamente alquiladas reductivamente con una serie de aldehídos,

seguida de una eliminación del grupo Boc, para dar los análogos piperidínicos **123** de la cloroquina (Esquema 29).

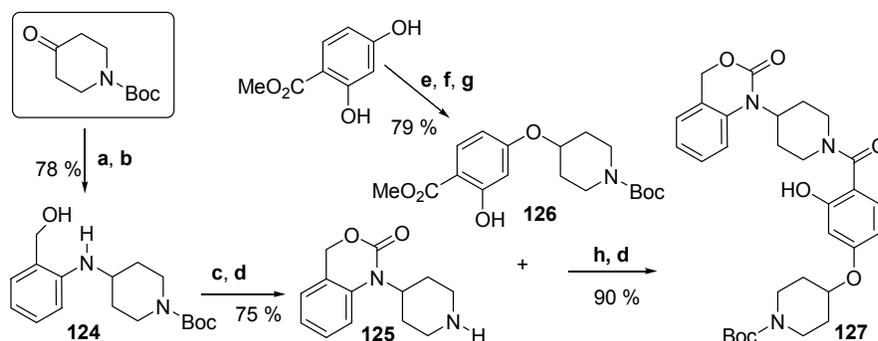
Esquema 29. Preparación de derivados piperidínicos antimaláricos **123**.



(a) NaBH(OAc)₃, AcOH, Et₃N, 3-cloroaminopropano. (b) Boc₂O, THF. (c) Et₂NH, NaI, DMF, 70 °C
 (d) HCOO⁻NH₄⁺, Pd/C, MeOH, EtOAc. (e) RCHO, NaBH(OAc)₃. (f) HCl, dioxano.

Ejemplos donde las 4-aminopiperidinas forman parte del sistema heterocíclico de fármacos potenciales, son bastantes en la literatura química medicinal. Es así, que se encuentran las benzooxazinonas *N*-piperidinil sustituidas **127**, antagonistas no-peptídicos, selectivos de los receptores de la hormona oxitocina. La síntesis convergente de los heterociclos **127** inicia con la aminoreducción de la *N*-Boc- γ -piperidona, con el alcohol 2-aminobencílico, para dar la 4-*N*-arilamino-*N*-Boc-piperidina **124**. Esta última es ciclada al derivado 1-(4-piperidinil)-1,4-dihidrobenz[d][1,3]oxazin-2-ona **125** con trifosgeno. Con este intermedio 4-amino-1*H*-piperidínico y con derivado hidroxipiperidínico **126** se completa la preparación de las piperidinas **127** (Bell *et al.*, 1998) (Esquema 30).

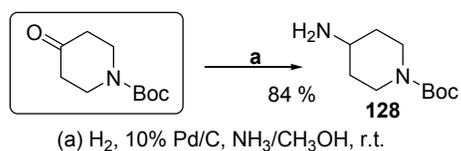
Esquema 30. Preparación de piperidin-benzooxazinonas **127**.



(a) Alcohol 2-aminobencílico, AcOH, tolueno, reflujo. (b) NaCNBH₃, AcOH, tolueno, THF. (c) trifosgeno, DIEA, THF. (d) HCl, EtOAc. (e) N-(tert-butiloxycarbonil)piperidin-4-ol, Ph₃P, DEAD, THF. (f) NaH, MeI, DMF. (g) NaOH, MeOH, H₂O. (h) EDC, HOBT, DIEA, DMF.

Además de la *N*-bencil- γ -piperidona y *N*-Boc- γ -piperidona (productos comerciales), existen otros precursores (productos no comerciales) útiles en la diversificación de las 4-aminopiperidinas, *p.ej.*, - la *N*-Boc-4-aminopiperidina **128**. Su nueva síntesis consistió en la fácil aminación reductiva del producto comercial *N*-Boc- γ -piperidona con hidrógeno molecular y amoníaco en solución metanólica, en presencia de cantidades catalíticas de paladio sobre carbón (Jiang *et al.*, 2004) (Esquema 31).

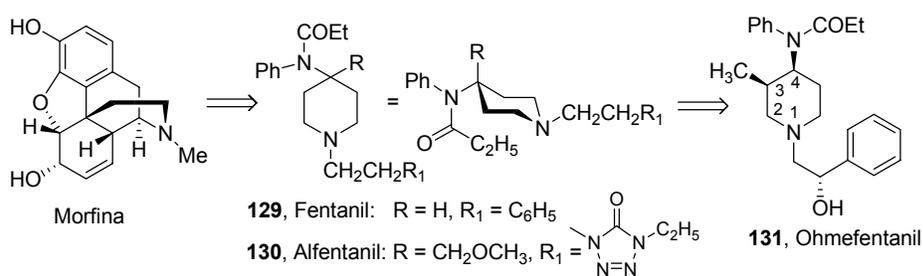
Esquema 31. Conversión de la *N*-Boc- γ -piperidona en la *N*-Boc-4-aminopiperidina (**128**).



La síntesis y química de las 4-aminopiperidinas *N*-sustituidas nos proporcionan un gamma amplio de moléculas potencialmente bioactivas dentro cuales se encuentran *N*-aril(alquil)-*N*-(piperidinil-4)amidas.

3.1.2. N-(Piperidinil-4)amidas. La eliminación del dolor es uno de los problemas centrales de la medicina (Katzung 1993; Lee *et al.*, 2007). En este sentido, los derivados piperidínicos tienen un papel importante en la generación de nuevos fármacos líderes. Gracias a los análisis retro-sintéticos del esqueleto de la morfina, que precedieron a su síntesis total, se reconocieron fragmentos en los que la base primaria es el anillo piperidínico (Gates *et al.*, 1954). El desarrollo de la química de los analgésicos piperidínicos derivados de la morfina resultó en la nueva generación de potentes fármacos contra el dolor. La introducción de un átomo de nitrógeno (amida) entre los anillos, y la extensión del sustituyente en el átomo de nitrógeno piperidínico, proporcionó el fentanil **129**, el alfentanil **130** (Leander 1978) y el analgésico opioide “súper potente” ohmefentanil, **131** (Brine *et al.*, 1995). El isómero 2S, 3R, 4S del ohmefentanil es 20.000-50.000 veces más potente que la morfina en monos rhesus (Figura 41).

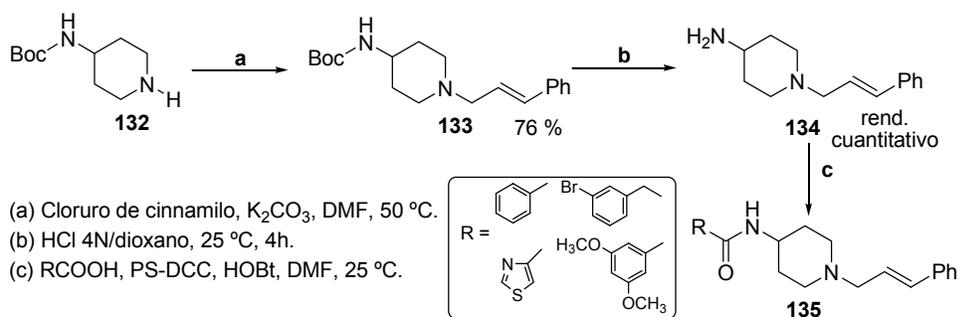
Figura 41. Morfina como prototipo en el desarrollo de nuevos fármacos en base de 4-aminopiperidinas.



El interés sintético y farmacológico por los anteriores prototipos estructurales se ha mantenido en un alto nivel durante más de cincuenta años, desde del descubrimiento del fentanil. Una amplia variedad de moléculas desarrolladas han mostrado que la bioactividad de este tipo de piperidinas depende en gran medida de la naturaleza de la sustitución sobre el nitrógeno endocíclico.

Trabajando en la identificación de antagonistas de la hormona MCH (Vasudevan *et al.*, 2005; Kym *et al.*, 2006) (hormona melanocito concentrante), científicos de los laboratorios Abbott descubrieron una serie de *N*-(piperidinil-4)-benzamidias **135** con esta actividad; su síntesis involucra tres pasos comunes a partir de la 4-*N*-Boc-aminopiperidina **132** vía *N*-alquilación del nitrógeno endocíclico para dar piperidinas **133**, desprotección del grupo Boc y posterior acilación del nitrógeno exocíclico en las 4-aminopiperidinas **134** (Vasudevan *et al.*, 2005) (Esquema 32).

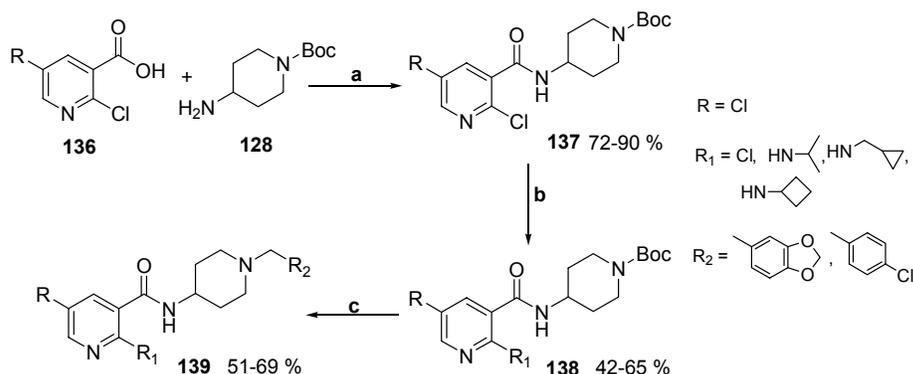
Esquema 32. Síntesis de orto-amino benzamidias **135** como antagonistas de la MCHR1.



Para lograr preparar las *N*-(4-piperidinil)-nicotinamidas **139** como antagonistas del receptor del neuropéptido MCH, se usó la *N*-Boc-4-aminopiperidina **128**, la cual, por un camino común se transformó en los derivados piperidínicos *N*-Boc protegidos **137**. La desprotección de este grupo y su posterior alquilación reductiva con varios aldehídos aromáticos condujo a las nicotinamidas **139** con rendimientos aceptables (Vasudevan *et al.*, 2005) (Esquema 33).

Recientemente, se han publicado varios trabajos sobre nuevos derivados piperidínicos que actúan como antagonistas selectivos del ligando C3aR no-arginina (Denonne *et al.*, 2007) y del receptor CCR8 (Ghosh *et al.*, 2006), inhibidores duales de serotonina (Boot *et al.*, 2006), lo que demuestra que las piperidinas sustituidas no pierden su importancia y siguen siendo de gran relevancia sintética y farmacológica (Källström *et al.*, 2008).

Esquema 33. Nicotinamidas **139** antagonistas de la MCHR1.

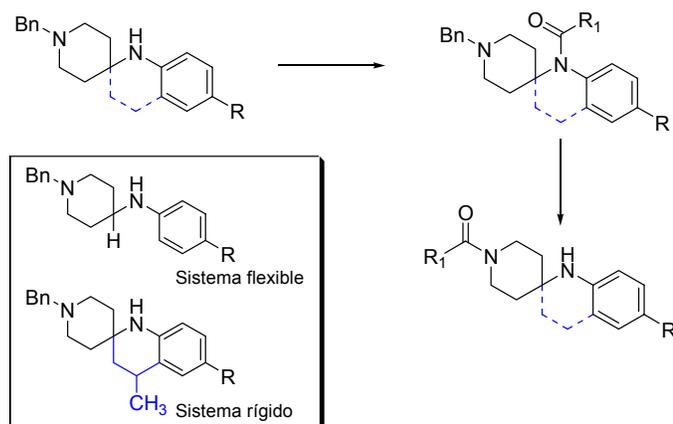


(a) PS-DCC, HOBT, DMF, 25 °C. (b) Aldehídos, N-metilpiperidona, μ w 200 °C, 20 min. (c) i. HCl 4N/dioxano, 25 °C, 4h. ii. R₂CHO, MP-BH₃CN, 1,2-dicloroetano:metanol 1:1, 50 °C, 12 h.

3.3 Preparación de las *N*-(1-bencilpiperidinil-4)-*N*-arilamidas

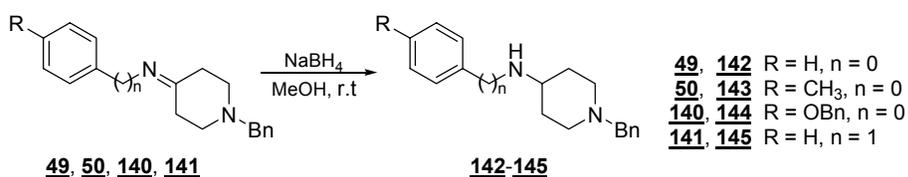
Para determinar los alcances de la migración de grupos acilo en los sistemas flexibles de la piperidina, y para acceder a valiosos derivados, se preparó una serie de amidas acíclicas, estructuralmente similares a los sistemas de la espiropiperidina (Figura 42), y se sometieron a reacciones de desbencilación en las mismas condiciones en que transcurrió la migración en los sistemas rígidos, NH₄⁺COOH/Pd/C/Δ.

Figura 42. Sistemas rígidos y flexibles de la piperidina.



El primer paso del estudio fue la preparación de las aminas **142-145**. Las cetiminas **49**, **50**, **140**, **141** derivadas de anilinas (anilina, p-toluidina, y la p-benzoiloxianilina), o bencilamina, y la *N*-bencil- γ -piperidona, disueltas en metanol, se redujeron con borohidruro de sodio a temperatura ambiente (Esquema 34).

Esquema 34. Síntesis de las 1-bencil-4-*N*-aril(bencil)aminopiperidinas **142-145**.



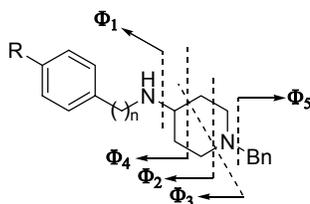
Finalizada la adición del NaBH_4 , se separó el disolvente, se adicionó 20 mL de agua y la masa de reacción se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos se unieron y se secaron sobre sulfato de sodio. Los productos de la reacción se purificaron por destilación fraccionada a presión reducida o por cromatografía en columna sobre alúmina. Los compuestos **142-145** se obtuvieron con buenos rendimientos, entre el 68 y el 88%. En la Tabla 20 se reúnen las constantes físicas y químicas de estos compuestos.

Tabla 20. Constantes físicas y químicas de las 1-bencil-4-*N*-aril(bencil)aminopiperidinas **142-145**.

Nº	Fórmula Molecular	Estado físico	p.eb (°C)/ 7 mmHg	p.f. (°C)	Rto. (%)	IR ν_{N-H} (cm ⁻¹)	P.M. (g/mol)	t_R (min)
142	C ₁₈ H ₂₂ N ₂	Cristales blancos	-	84-85	73	3377	266.38	32.56
143	C ₁₉ H ₂₄ N ₂	Cristales blancos	184-185	97-98	88	3386	280.41	34.49
144	C ₂₅ H ₂₈ N ₂ O	Cristales blancos	-	125-126	68	3379	372.50	48.17
145	C ₁₉ H ₂₄ N ₂	Aceite amarillo, muy viscoso	-	-	83	3346	280.41	32.93

Los estudios de espectroscopia infrarroja de las aminas **142-145** muestran la aparición de una banda de mediana intensidad en la zona de 3346-3386 cm⁻¹, correspondiente a la vibración de tensión del grupo N-H (Tabla 20). En los espectros de masas de estas aminas, se encontraron cuatro iones *diagnósticos* m/z 173 (C₁₂H₁₅N⁺), m/z 146 (C₁₀H₁₂N⁺), m/z 132 (C₉H₁₀N⁺) y m/z 118 (C₈H₈N⁺) productos de las rupturas β (Φ_1 - Φ_4) en los anillos piperidínico y arílico; el pico de base corresponde al ion C₇H₇⁺ (m/z 91), producto de la ruptura bencílica (Tabla 21).

Tabla 21. Iones principales y posible ruta de fragmentación de las 1-bencil-4-*N*-aril(bencil)amino piperidinas **142-145**.



Comp.	<i>m/z</i> , (I, %)					
	M^+	Φ_1	Φ_2	Φ_3	Φ_4	Φ_5
		$[M^+ - ArNH_2]^+$	$[M^+ - BnNCH_3]$	$[M^+ - BnNC_2H_5]$	$[M^+ - BnC_3H_7N]$	$[M^+ - ArNHC_5H_9N]$
142	266(19)	173 (76)	146 (22)	132 (8)	118 (17)	91 (100)
143	280(29)	173(83)	146 (16)	132 (10)	118 (10)	91 (100)
144	372(26)	173(77)	146 (15)	132 (3)	118 (7)	91 (100)
145	280(26)	173 (33)	146 (13)	132 (5)	118 (5)	91 (100)

En los experimentos de RMN 1H se observan dos grupos de señales en zonas distintas: los protones piperidínicos, y los protones aromáticos. En el espectro de la amina **143** (Figura 43), los hidrógenos axiales y ecuatoriales de los carbonos 3 y 5 aparecen a 1.45 (c, $J = 10.4$ Hz) y 2.02 (d, $J = 12.4$ Hz) ppm, respectivamente; a 2.13 (t, $J = 11.6$ Hz) y 2.83 (bd, $J = 11.7$ Hz) ppm se observan los correspondientes a las disposiciones axiales y ecuatoriales de los carbonos dos y seis. El hidrógeno del carbono cuatro de la piperidina resuena a 3.25 ppm como un singlete. Los hidrógenos de los grupos metilo, amino y metileno generan singletes en 2.22, 3.35 y 3.51 ppm respectivamente. Las señales de los protones aromáticos aparecen a campos bajos entre 6.51 y 7.32 ppm. En la Tabla 22 se reúnen los datos de caracterización para cada una de las aminas.

Figura 43. Espectro de RMN ^1H de la 1-bencil-4-*N*-(4-metilfenil)aminopiperidina (**143**).

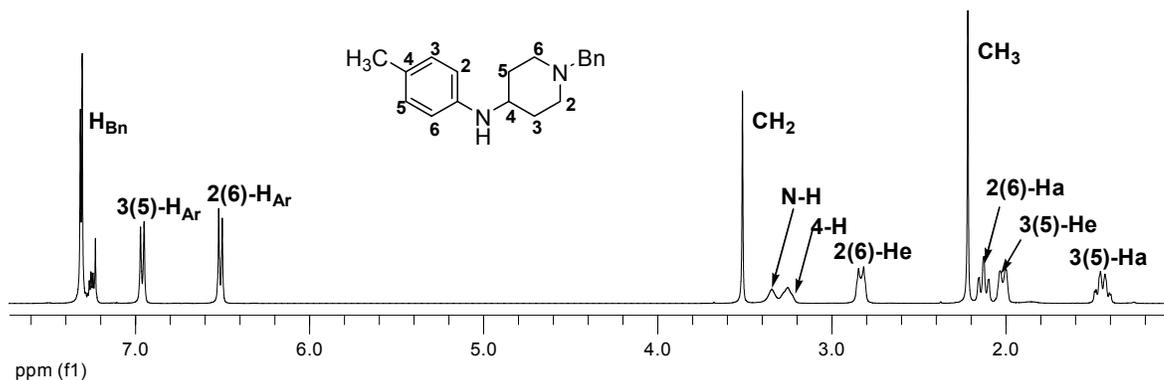
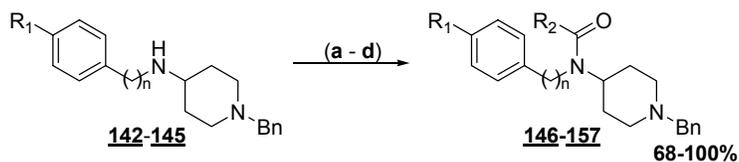


Tabla 22. Datos de caracterización por RMN- ^1H para las 1-bencil-4-*N*-aril(bencil)aminopiperidinas **142-145**.

Comp.	Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz)								
	Piperidínicos					Otros			Arílicos y bencílicos
Nº	3(5)-Ha	3(5)-He	2(6)-Ha	2(6)-He	4-H	N-H	CH ₂ -Ph	R	
142	1.52 (c) $J = 10.3$	2.08 (d) $J = 12.3$	2.19 (td) $J = 11.2, 2.0$	2.89 (bd) $J = 11.8$	3.34 (sp) $J = 3.8$	3.51 (bs)	3.57 (s)	-	6.63-7.38
143	1.45 (c) $J = 10.4$	2.02 (d) $J = 12.4$	2.13 (t) $J = 11.6$	2.83 (bd) $J = 11.7$	3.25 (bs)	3.35 (bs)	3.51 (s)	CH ₃ 2.22 (s)	6.51-7.32
144	1.46 (c) $J = 10.3$	2.03 (d) $J = 12.3$	2.14 (t) $J = 11.5$	2.86 (bd) $J = 11.9$	3.22 (sp) $J = 3.9$	2.84 (bs)	3.53 (s)	OCH ₂ 4.99 (s)	6.57-7.44
145	1.13-1.33 (m)	1.47-1.55 (m)	1.56-1.62 (m)	1.83-1.91 (m)	2.83 (m)	-	3.45 (s)	NCH ₂ 3.55/3.85 (d), $J = 2.7$	7.20-7.31

Las aminas **142-145** se sometieron a reacciones de acilación según las condiciones óptimas ya estudiadas en el capítulo anterior (Esquema 35).

Esquema 35. Síntesis de las *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-*N*-aril(bencil)amidas **146-157**.



a. HCOOH/Ac₂O/Py/0°C. b. Ac₂O/NEt₃/Δ. c. C₆H₅COCl/NEt₃/C₇H₈/r.t.
d. CH₃COCl/NEt₃/CH₂Cl₂/0°C. e. *p*-NO₂C₆H₅/NEt₃/C₇H₈/5°C.

146 R₁ = R₂ = H, n = 0

147 R₁ = H, R₂ = CH₃, n = 0

148 R₁ = H, R₂ = Ph, n = 0

149 R₁ = CH₃, R₂ = H, n = 0

150 R₁ = R₂ = CH₃, n = 0

151 R₁ = CH₃, R₂ = Ph, n = 0

152 R₁ = CH₃, R₂ = CH₂Cl, n = 0

153 R₁ = CH₃, R₂ = *p*-NO₂C₆H₅, n = 0

154 R₁ = OBn = R₂ = CH₃, n = 0

155 R₁ = R₂ = H, n = 1

156 R₁ = H, R₂ = CH₃, n = 1

157 R₁ = H, R₂ = Ph, n = 1

Los tiempos de reacción en general fueron cortos y los rendimientos bastante altos. En su mayoría las amidas se presentaron como sólidos cristalinos de color blanco o amarillo, de puntos de fusión definidos y sus espectros de IR mostraron la señal, intensa y característica, para la vibración del grupo C=O amida en la zona de 1638-1676 cm⁻¹ (Tabla 23).

En sus espectros de masas, el ion molecular es de muy baja intensidad (1-8%); los cationes [M-(COR')]⁺ se forman por la eliminación de los grupos acilo sustituidos desde los iones moleculares, a través de la ruptura Φ₁. Los iones con *m/z* 173 (C₁₂H₁₅N⁺), *m/z* 146 (C₁₀H₁₂N⁺), *m/z* 132 (C₉H₁₀N⁺) y *m/z* 118 (C₈H₈N⁺), provienen de las rupturas β del anillo piperidínico relacionadas con las escisiones Φ₂-Φ₅. El ion pico de base correspondió al ion tropilio con *m/z* 91 (100%).

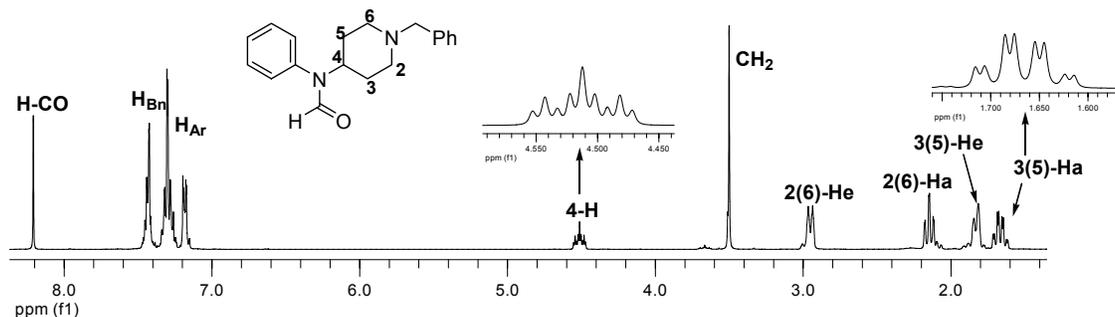
Finalmente, en estas amidas apareció un nuevo ion *diagnostico* con *m/z* 82 (C₅H₈N⁺), no registrado en ninguna serie de compuestos anteriores, proveniente de la ruptura Φ₇. En la Tabla 24 se recogen los iones principales y las posibles escisiones de las amidas **146-157**.

Tabla 23. Constantes físicas y químicas de las *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-*N*-aril(bencil)amidas **146-157**.

Nº	Fórmula Molecular	Estado físico	p.f. (°C)	R (%)	IR $\nu_{N-C=O}$ (cm ⁻¹)	P.M. (g/mol)	t_R (min)
146	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O	Cristales blancos	89-90	97	1669	294.39	37.16
147	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O	Aceite amarillo, viscoso	-	90	1652	308.42	26.43
148	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O	Cristales blancos	90-91	97	1645	370.49	34.58
149	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O	Cristales blancos	66-67	Cuant.	1651	308.42	40.21
150	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O	Cristales blancos	112-113	98	1657	322.44	26.50
151	C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O	Cristales blancos	115-116	93	1638	384.51	37.14
152	C ₂₁ H ₂₅ ClN ₂ O	Cristales blancos	98-99	68	1673	356.89	30.89
153	C ₂₆ H ₂₇ N ₃ O ₃	Cristales amarillos	159-160	98	1676	429.51	50.53
154	C ₂₇ H ₃₀ N ₂ O ₂	Cristales amarillos	130-131	78	1652	414.54	59.02
155	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O	Aceite amarillo, viscoso	-	90	1668	308.42	41.38
156	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O	Aceite incoloro, muy viscoso	-	90	1645	322.44	42.07
157	C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O	Aceite amarillo, muy viscoso	-	92	1636	384.51	39.59

En los espectros de RMN ¹H se observó un similar corrimiento y multiplicidad para los protones piperidínicos en todas las amidas de la serie (Tabla 25). En el espectro de la *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-*N*-fenilformamida (**146**) (Figura 44), los hidrógenos de los carbonos axiales y ecuatoriales de los carbonos 3 y 5 resuenan en 1.62 (cd, $J = 12.2, 3.8$ Hz), y 1.79 (bd, $J = 12.0$ Hz) ppm; como un triplete de dobletes ($J = 11.9, 1.9$ Hz) aparece la señal para los hidrógenos de las disposiciones axiales de los carbonos dos y seis, y como un doblete en 2.91 ppm ($J = 11.8$ Hz) - los ecuatoriales. El protón cuatro de la piperidina generó una triple triplete en 4.47 ppm ($J = 12.2, 4.0$ Hz). El grupo CH₂ bencílico resonó como un singulete en 3.46 ppm. Entre 7.13-7.42 ppm aparecen los hidrógenos aromáticos, y en 8.17 ppm el protón de la formamida como un singulete.

Figura 44. Espectro de RMN ^1H de la *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-*N*-fenilformamida (**146**).



Para lograr la asignación estructural correcta de los hidrógenos de la piperidina, fue necesario recurrir a los experimentos bidimensionales. En la Figura 45 se presenta como ejemplo una ampliación del espectro HMBC de la *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-*N*-(4-metil_fenil)acetamida **150**, en el que se observan los acoplamientos entre el hidrógeno de la posición cuatro (4.62 ppm) y la señal generada por los carbonos C-3 y C-5 de la piperidina a 30.4 ppm. El carbono bencílico (62.8 ppm) acopla con la señal de 2.09 ppm, asignada a los hidrógenos H-2 y H-6 de las disposiciones axiales.

Figura 45. Acoplamientos relevantes en el espectro HMBC de la *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-*N*-(4-metil_fenil)acetamida (**150**).

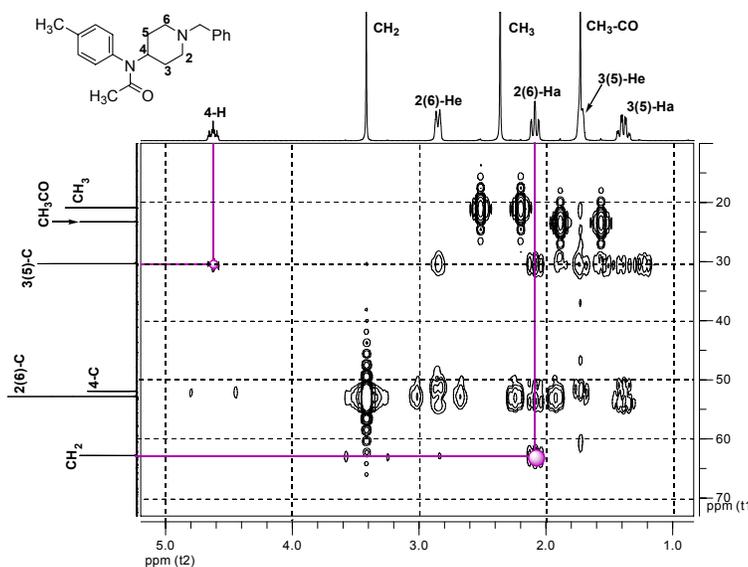
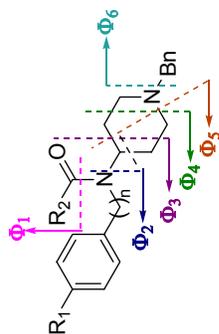


Tabla 24. Iones principales y posible ruta de fragmentación de las *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-*N*-aril(bencil)amidas **146-157**.



Co mp.	<i>m/z</i> , (I, %)							
	M^{+}	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇
146	294 (4)	$[M^{+}-R_2CO]^{+}$ 265 (4)	$[M^{+}-ArNH_2]^{+}$ 173 (26)	$[M^{+}-BnNCH_3]$ 146 (14)	$[M^{+}-BnC_3H_5]$ 132 (14)	$[M^{+}-BnC_3H_7N]$ 118 (10)	$[M^{+}-ArNHC_5H_9N]$ 91 (98)	$[M^{+}-Bn-ArNHCOR_2]^{+}$ 82 (100)
147	308 (4)	265 (7)	173 (17)	146 (13)	132 (11)	118 (10)	91 (100)	82 (84)
148	370 (1)	265 (32)	173 (18)	146 (18)	132 (6)	118 (6)	91 (100)	82 (62)
149	308 (5)	279 (5)	173 (34)	146 (16)	132 (16)	118 (8)	91 (100)	82 (93)
150	322 (4)	279 (5)	173 (16)	146 (12)	132 (12)	118 (7)	91 (100)	82 (83)
151	384 (2)	279 (42)	173 (20)	146 (24)	132 (6)	118 (5)	91 (100)	82 (51)
152	356 (2)	279 (2)	173 (10)	146 (6)	132 (12)	118 (6)	91 (100)	82 (99)
153	429 (1)	279 (28)	173 (16)	146 (24)	132 (9)	118 (6)	91 (100)	82 (77)
154	414 (0)	371 (4)	173 (18)	146 (10)	132 (6)	118 (8)	91 (100)	82 (100)
155	308 (8)	279 (3)	173 (13)	146 (6)	132 (11)	118 (4)	91 (100)	82 (68)
156	322 (7)	279 (3)	173 (15)	146 (10)	132 (8)	118 (4)	91 (100)	82 (76)
157	384 (5)	279 (6)	173 (17)	146 (8)	132 (3)	118 (3)	91 (100)	82 (42)

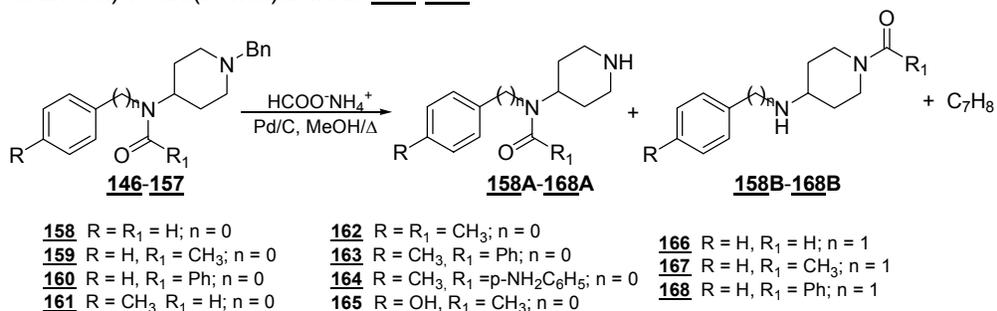
Tabla 25. Caracterización por RMN-¹H para las 1-bencil-4-*N*-aril(bencil)aminopiperidinas **146-157**.

Comp.	Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz)							
	N°	Piperidínicos				Otros		Ar y Bn
3(5)-Ha		3(5)-He	2(6)-Ha	2(6)-He	4-H	CH ₂ -Ph	R	
146	1.62 (cd) <i>J</i> = 12.3, 3.8	1.79 (bd) <i>J</i> = 12.0	2.11 (td) <i>J</i> = 11.9, 1.9	2.91 (bd) <i>J</i> = 11.8	4.47 (tt) <i>J</i> = 12.2, 4.0	3.46 (s)	8.17 (s), H-CO	7.13-7.42
147	1.40 (cd) <i>J</i> = 12.3, 3.8	1.76 (bd) <i>J</i> = 12.3	2.11 (td) <i>J</i> = 11.9, 1.8	2.87 (bd) <i>J</i> = 11.7	4.65 (tt) <i>J</i> = 12.2, 4.0	3.44 (s)	1.74 (s), CH ₃ -CO	7.07-7.42
148	1.58 (cd) <i>J</i> = 12.2, 3.7	1.90 (bd) <i>J</i> = 11.9	2.17 (t) <i>J</i> = 11.5	2.94 (bd) <i>J</i> = 11.7	4.77 (bs) <i>J</i> = 12.2, 4.0	3.48 (s)	-	6.99-7.31
149	1.59 (cd) <i>J</i> = 12.2, 3.8	1.76 (bd) <i>J</i> = 12.2	2.09 (td) <i>J</i> = 11.9, 2.1	2.89 (bd) <i>J</i> = 11.8	4.44 (tt) <i>J</i> = 12.2, 4.0	3.45 (s)	2.37 (s), CH ₃ 8.13 (s), H-CO	7.01-7.30
150	1.39 (cd) <i>J</i> = 12.2, 3.7	1.72 (bd) <i>J</i> = 11.6	2.09 (td) <i>J</i> = 11.8, 1.5	2.85 (bd) <i>J</i> = 11.6	4.62 (tt) <i>J</i> = 12.2, 3.9	3.42 (s)	1.73 (s), CH ₃ -CO 2.36 (s), CH ₃	7.19-7.27
151	1.55 (cd) <i>J</i> = 12.2, 3.5	1.87 (bd) <i>J</i> = 11.7	2.15 (t) <i>J</i> = 11.5	2.92 (bd) <i>J</i> = 11.5	4.74 (bs)	3.46 (s)	2.23 (s), CH ₃	6.85-7.29
152	1.41 (cd) <i>J</i> = 12.2, 3.8	1.76 (bd) <i>J</i> = 12.1	2.10 (td) <i>J</i> = 11.8, 1.8	2.88 (bd) <i>J</i> = 11.7	4.60 (tt) <i>J</i> = 12.2, 3.9	3.44 (s)	2.39 (s), CH ₃ 3.71 (s), CH ₂ -Cl	7.00-7.29
153	1.58 (cd) <i>J</i> = 12.2, 3.6	1.89 (bd) <i>J</i> = 11.7	2.17 (t) <i>J</i> = 11.5	2.94 (bd) <i>J</i> = 11.6	4.74 (bt) <i>J</i> = 11.8	3.48 (s)	2.26 (s), CH ₃	6.86-7.98
154	1.39 (cd) <i>J</i> = 12.2, 3.7	1.71 (bd) <i>J</i> = 11.6	2.10 (td) <i>J</i> = 11.8, 1.5	2.86 (bd) <i>J</i> = 11.6	4.61 (tt) <i>J</i> = 12.1, 3.9	3.43 (s)	1.74 (s), CH ₃ -CO 5.06 (s), CH ₂ -O	6.97-7.46
155	1.30-1.67 (m)		1.78-2.07 (m)	2.76-2.94 (m)	4.44 (s)	3.49 (s)	8.41 (s), H-CO 4.58 (s), CH ₂	7.24-7.34
156	1.48-1.56 (m)		1.85-2.02 (m)	2.79 (bd) <i>J</i> = 12.0	4.51 (bs)	3.37 (s)	1.95 (s), CH ₃ -CO 4.47 (s), CH ₂	7.09-7.26
157	1.55-1.78 (m)		1.97-2.10 (bs)	2.82 (bs)	4.52 (bs)	3.37 (s)	4.73 (bs), CH ₂	7.21-7.40

Para determinar si podría transcurrir o no la migración de los grupos acilo en estos sistemas, después de caracterizadas las amidas, se realizó la desbencilación con

el sistema $\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-/\text{Pd/C}$. La reacción se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el capítulo anterior: una mezcla de cualquiera de los compuestos **146-157** (1.00 mmoles), formiato de amonio (5.00 mmol) y Pd/C al 10% (2.5 % molar), en metanol (20 mL), se calentó a reflujo por 5-30 minutos (Esquema 36). Se filtró el catalizador y una pequeña alícuota de la masa de reacción se analizó por CG-EM, a la restante se le retiró el disolvente, y los productos formados fueron aislados por cromatografía en columna sobre alúmina.

Esquema 36. Productos A y B formados en la reacción de desbencilación de las *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-*N*-aril(bencil)amidas **146-157**.



Los resultados obtenidos para casi todas las reacciones mostraron la formación exclusiva de los productos desbencilados **158A-168A**. Para el caso de las formamidas **158**, **161**, y de los derivados de bencilamina **166-168**, los análisis de CG-EM mostraron que el crudo de reacción estaba formado de dos compuestos con la misma masa nominal: el “desbencilado” (serie A) y el “desbencilado-migrado” (serie B); la relación en la que se formaron se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26. Relaciones (en %) de las amidas de las series **A** y **B** formadas en la desbencilación de las 1-bencil-4-*N*-aril(bencil)aminopiperidinas **146**, **149**, **155-157**.

Nº	158	161	166	167	168
A	13.0	14.2	27.2	35.4	7.04
B	87.0	85.8	72.8	64.6	92.6

Las amidas desbenciladas **A**, son sólidos cristalinos de color blanco o amarillo, con altos puntos de fusión. Al desbencilar la amida **154** se perdieron dos grupos bencilo: el unido al nitrógeno de la piperidina, y el enlazado al oxígeno del grupo benzoiloxi, formándose el fenol **165** con un alto punto de fusión 235-237 °C. En la Tabla 28 se recogen las constantes físicas y químicas de los productos aislados.

En los espectros de IR, la banda característica de la vibración de tensión del grupo C=O aparece en la región de 1620-1669 cm⁻¹, y la correspondiente a la vibración del grupo amino entre 3465 y 3309 cm⁻¹.

Las mezclas de amidas A y B de los compuestos **166-168** fueron prácticamente inseparables por columna cromatográfica de gravedad, por lo que fueron caracterizadas como mezclas.

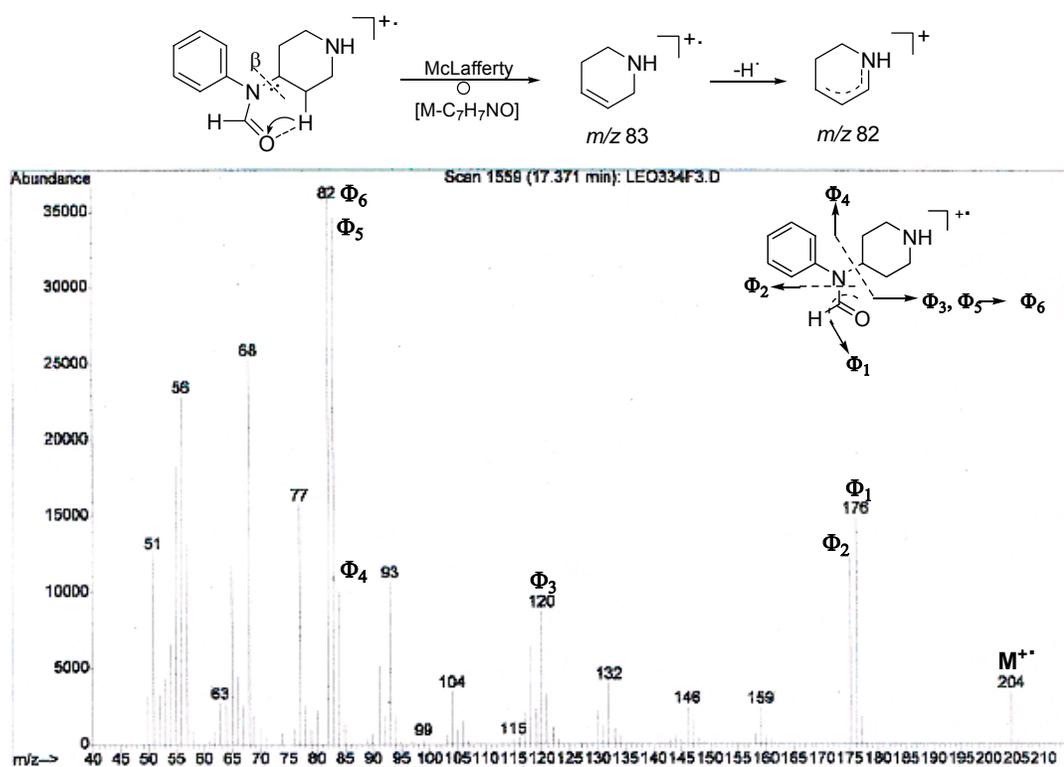
Tabla 27. Constantes físicas y químicas de las *N*-(4-aril(bencil))-*N*-(piperidin-4-il)amidas **158A-168A**, y las 4-*N*-aril(bencil)amino-1-acilpiperidinas **158A-168A**.

Nº	Fórmula Molecular	Estado físico	p.f. (°C)	R (%)	IR (cm ⁻¹) ν _{N-H} /ν _{N-C=O}	P.M. (g/mol)	t _R (min)
158A	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	Cristales blancos	-	97	3344/1655	204.27	17.40
158B	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	Cristales amarillos	-		3343/1669	204.27	20.79
159A	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O	Cristales blancos	129-130	85	3382/1630	218.30	17.71
160A	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O	Cristales blancos	184-186	79	3465/1638	280.36	23.81
161A	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O	Cristales blancos	137-138	82	3355/1645	218.30	18.98
161B	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O	Cristales amarillos	47-48		3309/1655	218.30	21.39
162A	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	Cristales blancos	122-123	81	3462/1651	232.32	19.41
163A	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O	Cristales amarillos	109-111	77	3458/1634	294.39	24.59
164A	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O	Cristales amarillos	170-172	96	3458, 3347, 3218/1620	309.41	30.57
165A	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₂	Cristales amarillos	235-237	94	3441/1641	234.29	23.04
166A	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O	Aceite amarillo, muy viscoso	-	66	3460/1647	218.30	28.47
166B	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O	Aceite amarillo, muy viscoso	-			218.30	27.47
167A	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	Aceite incoloro, muy viscoso	-	83	3425/1635	232.32	20.57
167B	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	Aceite incoloro, muy viscoso	-			232.32	20.37
168A	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O	Aceite incoloro, muy viscoso	-	80	3452/1629	294.39	25.26
168B	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O	Aceite incoloro, muy viscoso	-			294.39	25.43

Los análisis de espectrometría de masas fueron muy útiles en el momento de establecer cual de los productos se formó en la reacción. En el espectro de la amida **158A** (Figura 3.6), el ion molecular es de baja intensidad (9%); como primeras escisiones, Φ_1 y Φ_2 , se encuentran, la pérdida de 28 y 29 unidades, correspondientes a la pérdida de CO y COH[•], generando el catión radical con *m/z*

176 ($C_{11}H_{16}N_2^+$), y el catión con m/z 175 ($C_{11}H_{15}N_2^+$) respectivamente. La ruptura β (Φ_3 y Φ_4) produce iones complementarios con m/z 120 ($C_7H_6NO^+$), y m/z 84 ($C_5H_{10}N^+$). Tal vez los iones más importantes para afirmar que este espectro corresponde a la amida de serie **A**, son los de m/z 83 (I, 95%), y m/z 82 (I, 100%); es posible que estos provengan de la ruptura β (Φ_5 y Φ_6), pero con un reordenamiento previo tipo McLafferty de un hidrógeno del anillo piperidínico, tal como se muestra en la Figura 46. Los iones provenientes de esta ruptura son comunes a todas las amidas **158A-168A**.

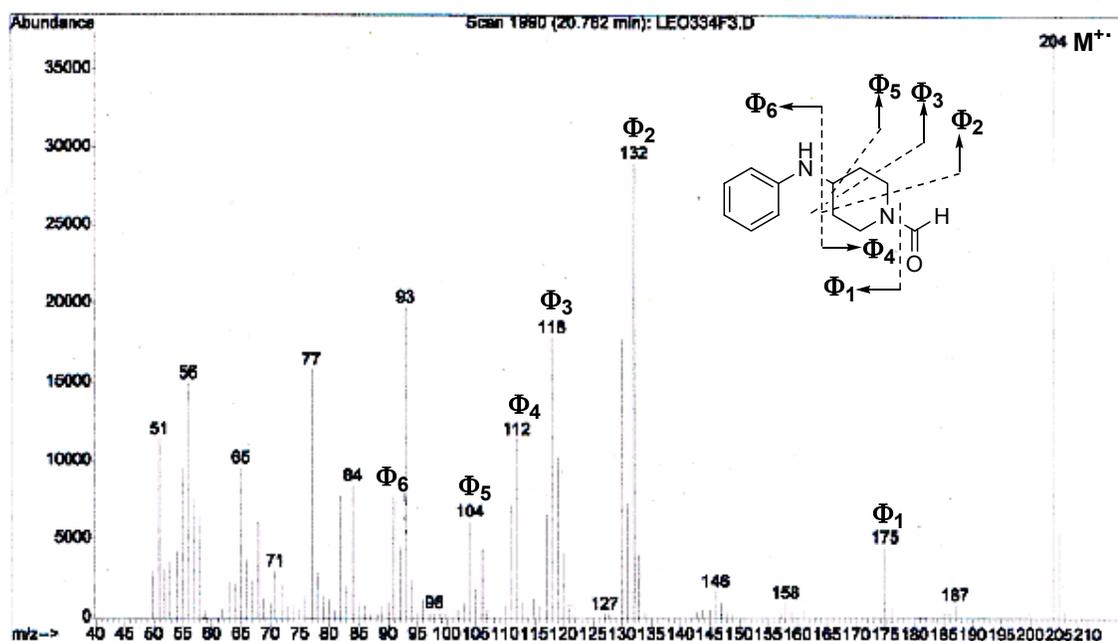
Figura 46. Posible fragmentación y espectro de masas de la *N*-fenil-*N*-(piperidin-4-il)formamida (**158A**).



Las rupturas en el espectro del compuesto **158B** difieren considerablemente de su isómero no migrado (Figura 3.7). El ion molecular es el pico de base del espectro. El catión con m/z 175 [$M-(COH)^+$] se formó por la eliminación del grupo acilo

desde el ion molecular, a través de la ruptura Φ_1 . Las rupturas β del anillo piperidínico (Φ_2 , Φ_3 y Φ_5) desprenden fragmentos que llevan en su estructura el fragmento acilo, generando los cationes con m/z 132 ($C_9H_{10}N^+$), m/z 118 ($C_8H_8N^+$), y m/z 104 ($C_7H_6N^+$). La ruptura β (Φ_4 y Φ_6) condujo a dos iones complementarios con m/z 112 ($C_6H_{10}NO^+$) y m/z 92 ($C_6H_6N^+$).

Figura 47. Posible fragmentación y espectro de masas de la la 4-*N*-(fenilamino)-1-formilpiperidina (**158A**).



Aunque en la posición γ de la serie de compuestos con estructuras **B** hay hidrógenos, los iones con m/z 82 y m/z 83, productos de la ruptura β con transposición McLafferty, son muy poco intensos, quizá la conformación de la piperidina no satisface los requerimientos estructurales de la reacción, y las distancias entre el grupo carbonilo y los protones del anillo piperidínico son mas grandes que en el caso de las estructuras **A** (Figura 48). En las Tablas 28 y 29 se recogen los iones principales en las fragmentaciones de las amidas **158-168**.

Figura 48. Distancias entre el oxígeno carbonílico y los hidrógenos axiales y ecuatoriales del anillo piperidínico en las amidas **158A** y **158B**.

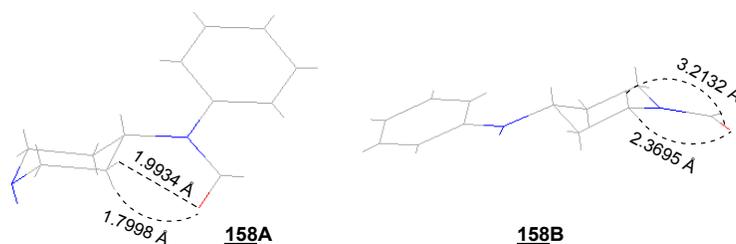


Tabla 28. Iones principales en los espectros de masas de los compuestos **158A-168A**.

Comp.	<i>m/z</i> , (I, %)						
Nº	M ⁺	Φ ₁	Φ ₂	Φ ₃	Φ ₄	Φ ₅	Φ ₆
		[M-CO]	[M-COR]	[M-C ₅ H ₁₀ N]	[M-ArNCOR]	[M-ArNCOHR]	[M-ArNCOHR-H]
158A	204 (9)	176(41)	175 (33)	120 (25)	84 (27)	83 (95)	82 (100)
159A	218 (5)	-	175 (53)	134 (3)	84 (37)	83 (89)	82 (100)
160A	280 (4)	-	175 (80)	-	84 (12)	83 (43)	82 (45)
161A	218 (27)	190(89)	189 (24)	134 (38)	84 (24)	83 (100)	82 (88)
162A	232 (10)	-	189 (37)	-	84 (27)	83 (100)	82 (82)
163A	294 (8)	-	189 (54)	210 (1)	84 (7)	83 (30)	82 (27)
164A	309 (11)	-	189 (46)	-	84 (3)	83 (11)	82 (8)
165A	234 (26)	-	175 (27)	150 (4)	84 (51)	83 (98)	82 (100)
166A	218 (21)	-	189 (7)	134 (12)	84 (50)	83 (63)	82 (78)
167A	232 (14)	-	189 (45)	148 (4)	84 (53)	83 (72)	82 (72)
168A	294 (3)	-	189 (46)	210 (4)	84 (24)	83 (48)	82 (43)

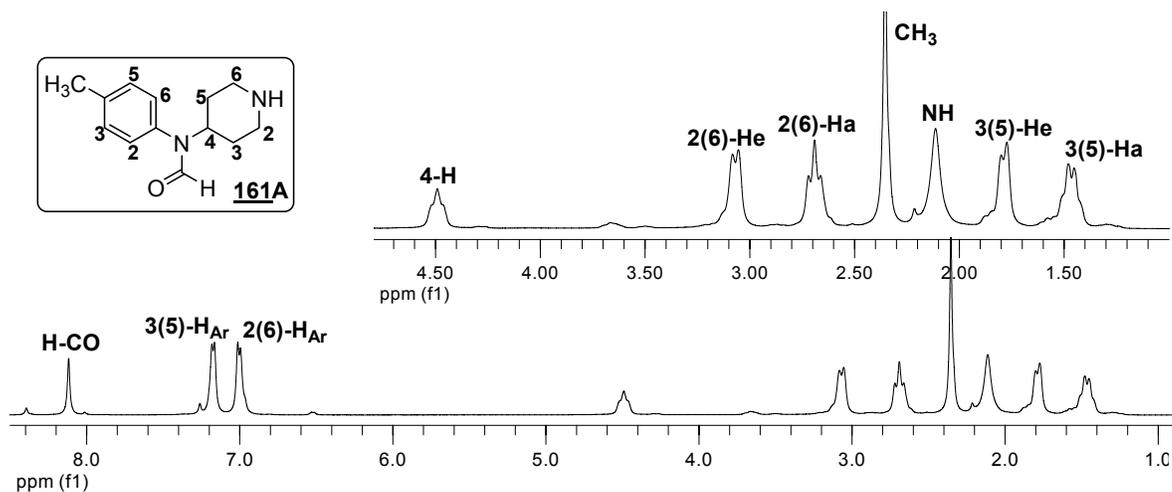
En las benzamidas **160B**, **163B**, **168A**, y **168B**, el pico de base en los espectros es el catión benzoilo, con *m/z* 105 (C₆H₅CO⁺); en el compuesto **164A** es su análogo p-aminobenzoilo con *m/z* 120 (C₆H₅CONH₂⁺); en los compuestos **166-167**, corresponde al catión C₇H₇⁺, formado por ruptura bencílica.

Tabla 29. Iones principales en los espectros de masas de los compuestos **158B**, **161B**, **166B-168B**.

Comp.		<i>m/z</i> , (I, %)					
N°	M ⁺	Φ ₁	Φ ₂	Φ ₃	Φ ₄	Φ ₅	Φ ₆
		[M-COR]	[M-C ₂ H ₅ NCOR]	[M-C ₃ H ₇ NCOR]	[M-ArNH]	[M-C ₄ H ₉ NCOR]	[M-C ₅ H ₉ NCOR]
158B	204 (100)	175 (13)	132 (77)	118 (53)	112 (30)	104 (30)	92 (11)
161B	218 (100)	189 (9)	146 (51)	132 (32)	112 (30)	118 (27)	106 (22)
166B	218 (2)	189 (3)	146 (17)	132 (20)	106 (95)	118 (2)	106 (95)
166B	232 (11)	189 (38)	146 (8)	132 (7)	-	118 (3)	106 (22)
168B	294 (3)	189 (34)	-	132 (5)	-	-	-

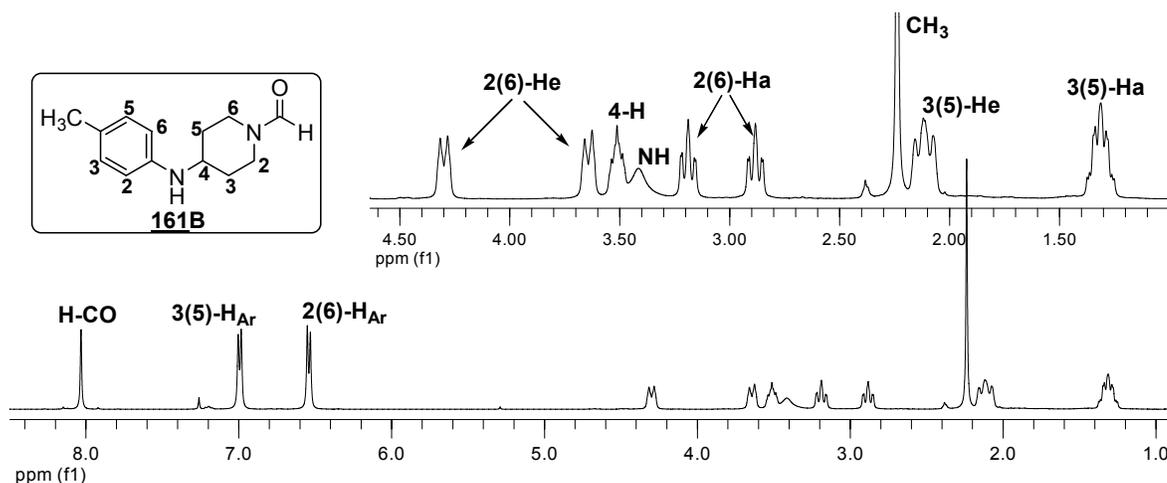
En el espectro de RMN ¹H de la *N*-(4-metilfenil)-*N*-(piperidin-4-il)formamida **161A** (Figura 49), los hidrógenos del anillo piperidínico resuenan así: como dobletes anchos a 1.46 ppm ($J = 10.4$ Hz) y 1.79 ppm ($J = 10.4$ Hz) los correspondientes a los C-3 y C-5 de las disposiciones axiales y ecuatoriales, respectivamente; las señales para los hidrógenos de los carbonos C-2 y C-6 aparecen a 2.69 y 3.07 ppm como un triplete ($J = 11.7$ Hz) y un doblete ancho ($J = 11.0$ Hz). El protón del C-4 aparece como un triplete ancho ($J = 12.0$ Hz) bastante desplazado a campos bajos, a 4.49 ppm. El hidrógeno del grupo amino aparece a 2.11 ppm, y los protones del grupo metilo a 2.35 ppm, ambos como singuletes. A campos bajos resuenan los hidrógenos aromáticos a 7.00 y 7.17 ppm, y el singulete asignado al protón de la formamida a 8.12 ppm.

Figura 49. Espectro de RMN ^1H de la amida **161A**.



Sustancialmente diferente es el espectro de la 4-*N*-(4-metilfenilamino)-1-formilpiperidina **161B** (Figura 50). Los diferentes ambientes magnéticos promovidos por la presencia del el átomo de oxígeno de la amida hizo que los protones asignados a las disposiciones axiales y ecuatoriales de los carbonos piperidínicos C-2 y C-6 presentaran diferentes corrimientos y fueron claramente observables en el espectro. También es importante mencionar el desplazamiento de mas de una parte por millón (de 4.49 ppm a 3.42 ppm) del hidrógeno de la posición cuatro, esto a causa de la desaparición del efecto de desapantallamiento de la amida. En la Tabla 30 se recoge el análisis de RMN ^1H de esta serie de compuestos.

Figura 50. Espectro de RMN ^1H de la amida **161B**.



Adicionalmente, es importante comentar la disposición espacial del hidrógeno del C-4 en las series de compuestos de este capítulo. En las amidas **146-154** y en las amidas serie A (**158A-165A**), este protón tiene una constante de acoplamiento axial-axial grande: $^3J_{4a,3a} = 11.8-12.2$ Hz, y una constante pequeña $^3J_{4a,3e}$ entre 4.0 y 3.6 Hz, correspondiente al acoplamiento axial-ecuatorial (Figura 51). El valor de las J indica sin duda, que el hidrógeno del carbono C-4 tiene una disposición axial.

Figura 51. Ejemplos de los acoplamientos del hidrógeno del C-4 con los hidrógenos del C- α .

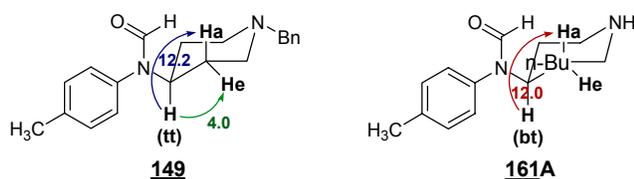


Tabla 30. Datos de caracterización por RMN-¹H para las *N*-(4-*aril*(bencil))-*N*-(piperidin-4-il)amidas **158A-168A**, y para las 4-*N*-*aril*amino-1-formilpiperidinas **158B** y **161B**.

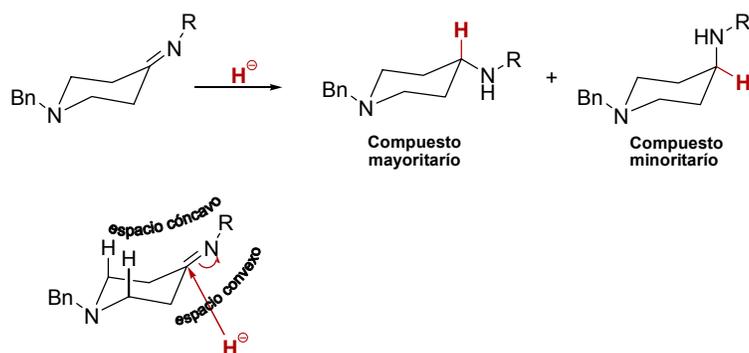
Comp.	Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz)							
	Piperidínicos					Otros		Arílicos y
Nº	3(5)-Ha	3(5)-He	2(6)-Ha	2(6)-He	4-H	N-H	R	Bencilicos
158A	1.60-1.98 (m)		2.87 (td) <i>J</i> = 12.8, 3.8	3.18 (bd) <i>J</i> = 12.6	4.44 (tt) <i>J</i> = 11.8, 4.0	-	8.12 (s), H-CO	7.29-7.48
158B	1.27-1.39 (m)	2.08-2.17 (m)	2.89 (ddd) <i>J</i> = 13.6, 11.2, 3.3 3.19 (ddd) <i>J</i> = 13.2, 11.2, 3.1	3.65 (bd) <i>J</i> = 13.4 4.30 (bd) <i>J</i> = 13.5	3.51-3.58 (m)	3.54	8.03 (s), H-CO	6.60-7.18
159A	1.20 (m)	1.74 (bd) <i>J</i> = 12.8	2.67 (td) <i>J</i> = 12.2, 1.7	2.99 (bd) <i>J</i> = 12.2	4.68 (tt) <i>J</i> = 12.1, 3.8	1.49(s)	1.70 (s), CH ₃ -CO	6.51-7.38
160A	1.48 (td) <i>J</i> = 12.2, 3.7 1.79 (td) <i>J</i> = 12.8, 3.8	1.85 (bd) <i>J</i> = 12.0 2.04 (bd) <i>J</i> = 13.9	2.11 (d) <i>J</i> = 11.5 2.91 (dd) <i>J</i> = 12.8, 1.9	2.97 (bd) <i>J</i> = 12.6 3.38 (bd) <i>J</i> = 12.6	4.37 (bs)	-	-	6.97-7.21
161A	1.46 (bd) <i>J</i> = 10.4	1.79 (bd) <i>J</i> = 10.7	2.69 (t) <i>J</i> = 11.7	3.07 (bd) <i>J</i> = 11.0	4.49 (bt) <i>J</i> = 12.0	2.11 (bs)	2.35 (s), CH ₃ 8.12 (s), H-CO	7.00-7.17
161B	1.25-1.37 (bt), <i>J</i> = 12.4	2.12 (bt) <i>J</i> = 14.0	2.88 (td) <i>J</i> = 13.6, 2.9 3.19 (td) <i>J</i> = 13.6, 2.5	3.64 (bd) <i>J</i> = 13.4 4.30 (bd) <i>J</i> = 13.4	3.51 (bs)	3.42 (bs)	2.24 (s), CH ₃ 8.03 (s), H-CO	6.54-6.99
162A	1.21 (cd) <i>J</i> = 12.2, 4.1	1.73 (bd) <i>J</i> = 12.3	2.68 (td) <i>J</i> = 12.3, 1.9	3.00 (bd) <i>J</i> = 12.2	4.67 (tt) <i>J</i> = 12.1, 3.8	1.47 (bs)	1.71 (s), CH ₃ -CO 2.35 (s), CH ₃	7.92-7.16
163A	1.42 (cd) <i>J</i> = 12.3, 4.1	1.90 (bd) <i>J</i> = 11.9	2.75 (t) <i>J</i> = 11.9	3.09 (bd) <i>J</i> = 12.2	4.81 (bs)	2.16 (bs)	2.22 (s), CH ₃	6.85-7.21
164A	1.57 (cd) <i>J</i> = 12.3, 3.7	1.86 (bd) <i>J</i> = 12.2	2.12 (td) <i>J</i> = 11.9, 1.7	2.85 (bd) <i>J</i> = 11.6	4.70 (tt) <i>J</i> = 12.1, 3.7	1.87 (s)	2.26 (s), CH ₃ 3.70 (s), NH ₂	6.37-7.09
165A	1.39 (cd) <i>J</i> = 12.9, 3.6	1.78 (bd) <i>J</i> = 12.4	2.88 (td) <i>J</i> = 12.9, 1.8	3.16 (bd) <i>J</i> = 12.5	4.60 (tt) <i>J</i> = 12.1, 3.6	1.85 (s)	1.62 (s), CH ₃ -CO 8.36 (s), OH	6.84-6.98

Aunque podría pensarse que las adiciones de nucleófilos pequeños, como el hidruro proveniente del borohidruro de sodio, a las cetiminas para reducir el doble enlace, ocurriría indistintamente por ataque axial y ecuatorial, sin ninguna

selectividad, y no esperando preferencia hacia la formación de uno de los isómeros, es claro que la formación de las 1-bencil-4-*N*-aril(bencil)aminopiperidinas **142-145**, transcurrió de manera altamente selectiva. Esto podría explicarse usando los reportes de la literatura de adición de H^{\ominus} a las cetonas cíclicas y ciclohexanonas (Bruckner 2002; Eliel 1994).

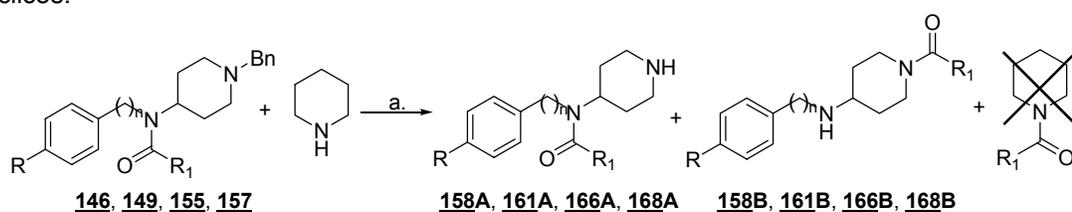
La diaestereoselectividad de la adición de donores de hidruro a cetonas cíclicas está dada por el impedimento estérico al que este expuesto el reactivo atacante, los sustratos convexos/cóncavos son generalmente atacados por el lado convexo (Bruckner 2002). En el caso de la adición del H^{\ominus} proveniente de un donador de hidruro poco “demandante” estéricamente como el $NaBH_4$, se da un ataque preferentemente axial. Actualmente la explicación más favorecida es la siguiente: la dirección electrónica preferida para el ataque del donador de hidruro al doble enlace $C=O$ es aquella en la que los dos enlaces $C-H$ de las posiciones α vecinas están exactamente opuestas a la trayectoria de aproximación del nucleófilo. Solo los enlaces $C-H$ axiales en las posiciones α pueden ser antiperiplanares mientras que los enlaces $C-H$ ecuatoriales no pueden. En el ataque de agentes reductores no demandantes estéricamente, este efecto stereoelectrónico es completamente efectivo para una reducción altamente estereoselectiva. En la Figura 52 se ilustra la adición de hidruro y el posible estado de transición preferido, a través del cual podría transcurrir la reducción de las cetiminas derivadas de la γ -piperidona.

Figura 52. Posible estereoquímica de la adición de hidruro a las cetiminas.



La migración de los grupos acilo en los sistemas acíclicos también tiene la posibilidad de ser de tipo inter- o intramolecular. En los cuatro casos en los que se encontró evidencia de migración, se realizó la reacción utilizando piperidina como sustrato para atrapar el acilo (Esquema 37). En ninguno de los análisis se encontró *N*-formalpiperidina o *N*-benzoilpiperidina, indicando así que una transposición puede ser de tipo intramolecular.

Esquema 37. Reacciones de atrapamiento del fragmento acilo con piperidina en los sistemas acíclicos.



a. 93 (1 mmol), piperidina (1 mmol), $\text{HCOO}^-\text{NH}_4^+$ (5 mmol), Pd/C (2.5% mmol), MeOH (10 mL), T = 64 °C, t = 10 min.

158A,B R = R₁ = H; n = 0 ; 161A,B R = CH₃, R₁ = H; n = 0; 166A,B R = H, R₁ = H; n = 1; 168A,B R = H, R₁ = Ph; n = 1

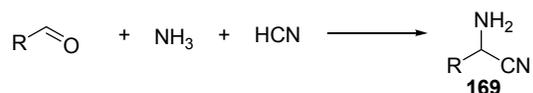
4. ESTUDIO QUÍMICO DE LAS (ESPIRO)PIPERIDINAS C-4 SUSTITUIDAS. PREPARACIÓN DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA Y SUS ANÁLOGOS

4.1 Antecedentes

Algunos aspectos químicos de las moléculas piperidínicas, de interés en nuestra investigación, se mencionaron en los capítulos anteriores. En esta sección se estimó conveniente desarrollar el estudio químico de algunas moléculas sintetizadas, enfocándose en la participación de la piperidina en reacciones clásicas de sustitución nucleófila y tipo Strecker multi-componentes, en un intento de desarrollar prototipos de compuestos duales, útiles en la creación de nuevos fármacos.

4.1.1 Reacción de Strecker Es la primera reacción multi-componente que no pierde actualidad (Carey 1999). El resultado de la reacción entre aldehídos, aminas y el “ion cianuro”, son los α -aminonitrilos primarios **169** (Esquema 38), sustratos versátiles y valiosos en la química orgánica (Enders *et al.*, 2000; Spino 2004; Wirth 1997; Yet 2001).

Esquema 38. Reacción de Strecker “clásica”.

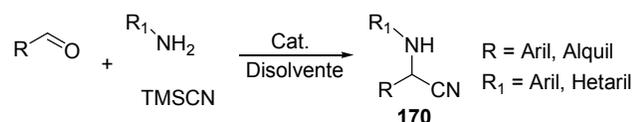


Uno de los varios retos de la obtención de estos derivados es el problema de la síntesis asimétrica. A pesar de los avances en el desarrollo de la catálisis asimétrica, la obtención de α -aminonitrilos quirales requiere más estudios (sobre

todo, en los procesos multi-componentes) sobre los catalizadores, sustratos y disolventes que favorecerían el proceso. Existe cierta evidencia de que en la reacción de Strecker “clásica”, que involucra el uso de “cianuro” (proveniente del ácido HCN) como un nucleófilo, que compite con la amina por el aldehído, se favorece la formación previa de las cianohidrinas, para dar luego los α -aminonitrilos. La formación de últimas moléculas parece ser más lenta vía el ataque del “cianuro” a los iones iminio intermediarios (List *et al.*, 2006).

Como posibles fuentes posibles del “ion cianuro” se mencionan, además del HCN y el KCN (utilizados por Strecker) los siguientes reactivos: $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CN}$ (Atherton *et al.*, 2004), Et_2AlCN (Harusawa *et al.*, 1979), Bu_3SnCN (Nakamura *et al.*, 2004) y otros. Todos estos reactivos son tóxicos y no todos son fáciles a manejar en la reacción. Últimamente, el trimetilsililcianuro (TMSCN) está utilizándose con éxito en la generación de diversos α -aminonitrilos secundarios **170**, si bien este reactivo es también tóxico y muy caro. Aunque se reportó que la reacción tipo Strecker (Esquema 39) se puede realizar sin el empleo de un catalizador en un disolvente orgánico (MeCN) (Vachal *et al.*, 2002) o en líquidos iónicos ($[\text{bmim}]\text{BF}_4$) (Martínez *et al.*, 2005) se han propuesto varios catalizadores, tolerantes al agua, que es el principal problema del proceso multi-componente entre aldehídos, aminas primarias y el reactivo “fuente del ion cianuro”.

Esquema 39. Reacción tipo Strecker multi-componente con el TMSCN.



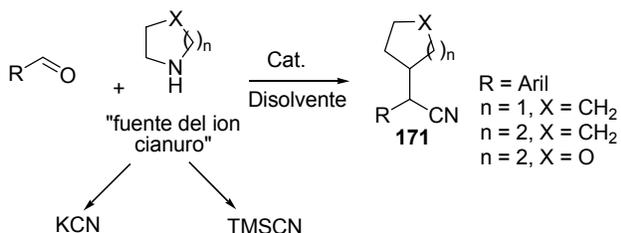
Usando el TMSCN, se probaron diferentes ácidos de Lewis como catalizadores (Tabla 31), en condiciones suaves la reacción mostró alta eficiencia: los rendimientos oscilan entre 75-95%. Los ejemplos son abundantes cuando se usan los aldehídos aromáticos, las anilinas y las bencilaminas.

Tabla 31. Catalizadores y disolventes empleados en la reacción tipo Strecker multi-componente con el TMSCN.

Catalizador/Medio de reacción	Ref.
Yb(OTf) ₃ , La(OTf) ₃ , TMSOTf y otros/CH ₂ Cl ₂	Yadav <i>et al.</i> , 2003
Fe(Cp) ₂ PF ₆ /libre de disolvente	Prakash <i>et al.</i> , 2007
Fe(ClO ₄) ₃ /MeCN	Khan <i>et al.</i> , 2008
NiCl ₂ /MeCN	Oskooie <i>et al.</i> , 2007
BiCl ₃ /MeCN	De 2005
CeCl ₃ /MeCN	De <i>et al.</i> , 2004
SiO ₂ -OSO ₃ H/ CH ₂ Cl ₂	Pasha 2007
Montmorillonita KSF/ CH ₂ Cl ₂	Chen <i>et al.</i> , 2005
I ₂ /MeCN	Yadav <i>et al.</i> , 2004
Me ₂ S ⁺ BrBr ⁻ /MeCN	Royer <i>et al.</i> , 2005

Cuando en este esquema se emplean las aminas secundarias cíclicas, como la pirrolidina, la piperidina y la morfolina se obtienen los α -aminonitrilos terciarios **171** (Esquema 40).

Esquema 40. Reacción tipo Strecker multi-componente con las aminas cíclicas.



Sin embargo, la información química de estos α -aminonitrilos terciarios utilizando el TMSCN es escasa (Oskooie *et al.*, 2007; De 2005; Royer *et al.*, 2005), sobre todo, en derivados basados en el anillo piperidínico (Pasha 2007). Otra forma de efectuar la preparación de los α -aminonitrilos **171** (Esquema 40) es vía las condiciones "clásicas" de Strecker: la ruta sintética consiste en el tratamiento de un aldehído (o cetona) con el cianuro de potasio (o de sodio) y una sal de amina.

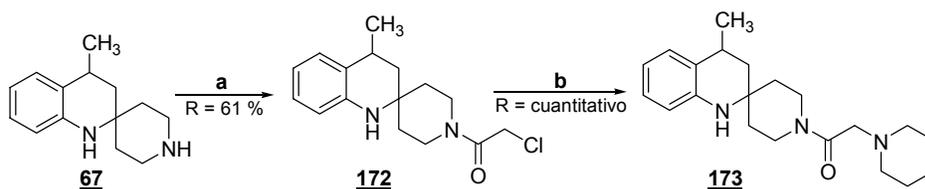
La reacción se lleva a cabo en las soluciones acuosas y el “work-up” es casi siempre laborioso. Por eso, nuevos protocolos para su preparación aparecen constantemente. Por ejemplo, Ranu y colaboradores reportaron que una cantidad catalítica de InCl_3 (30 % mol) favorece esta reacción multi-componente, utilizando THF como disolvente, lo que permite evitar el pesada tarea de aislamiento del producto (Das *et al.*, 2006). Recientemente, se ha propuesto otro catalizador, el $\text{K}_5\text{CoW}_{12}\text{O}_{40}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, que es no tóxico, reutilizable y eficiente. La reacción se efectúa en MeCN (Ranu *et al.*, 2002).

Esta novedosa información fue útil para la preparación de α -aminonitrilos en esta investigación.

4.2 Sustitución nucleófila de las 1-cloroacetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolinas]

Los productos espiránicos descritos en el capítulo I, son sustratos valiosos para acceder a complejos derivados piperidínicos, por eso se realizó una reacción de sustitución nucleófila, con piperidina sobre el derivado *N*-cloroacetilado **172** (Esquema 41).

Esquema 41. Preparación de la 4'-metil-1-(2-piperidin-1-ilacetil)-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**173**).



a. $\text{ClCH}_2\text{COCl}/\text{NEt}_3/\text{DMF}/T = 0\text{ }^\circ\text{C}/t = 1\text{ h}$. b. Piperidina/ $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{DMF}/T = \text{r.t.}/t = \text{inmediato}$.

La preparación del producto **173** se realizó en dos etapas a partir del espirano **67**; la primera consistió en la acilación del nitrógeno piperidínico, usando cloruro de cloroacetilo en dimetilformamida como disolvente, los rendimientos de esta reacción fueron de un 61%. En el segundo paso, la piperidina recién destilada se adicionó en una sola porción al derivado cloroacetilado disuelto en DMF, la reacción fue inmediata.

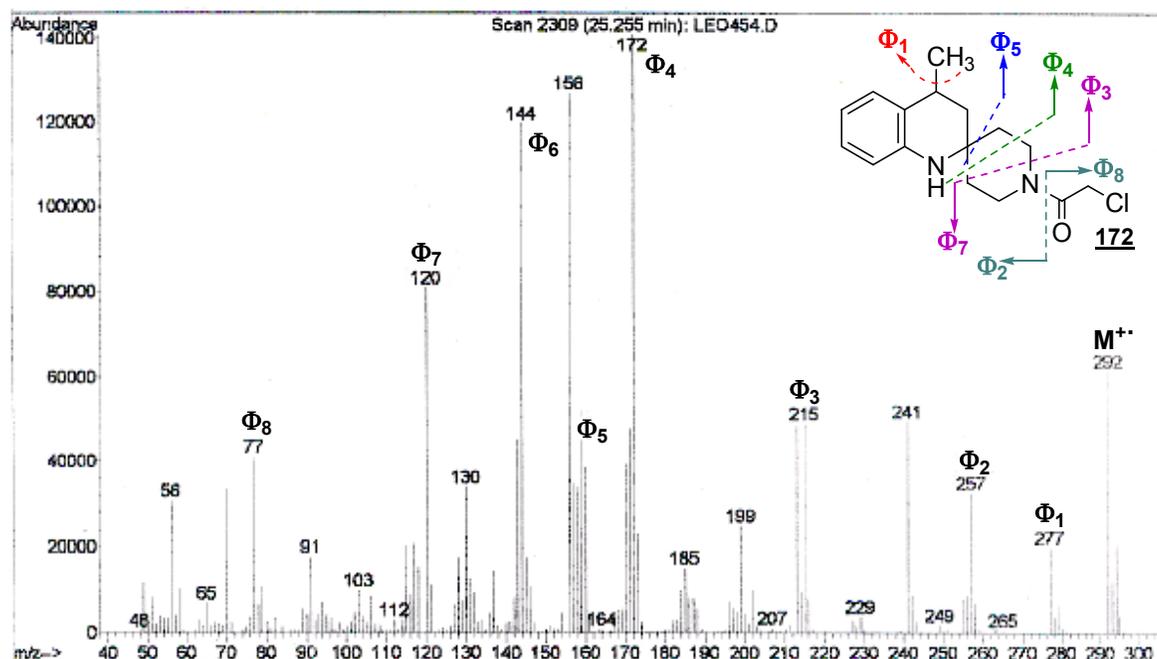
El producto **172** se obtuvo con un rendimiento del 61%, como cristales blancos con punto de fusión 129-130°C. En su espectro de IR la vibración correspondiente al C=O del grupo amida aparece en 1629 cm⁻¹, como una banda intensa (Tabla 32). El compuesto **173** se preparó cuantitativamente como cristales blancos, con punto de fusión 116-117 °C; en el espectro IR la banda correspondiente al grupo amida se observó en 1629 cm⁻¹.

Tabla 32. Constantes físicas y químicas de las espiropiperidinas **172**, **173**.

Nº	Fórmula Molecular	Estado físico	p.f. (°C)	R (%)	IR (cm ⁻¹) ν _{N-H} /ν _{N-C=O}	P.M. (g/mol)	t _R (min)
172	C ₁₆ H ₂₁ ClN ₂ O	Cristales blancos	129-130	61	1629	292.80	25.25
173	C ₂₁ H ₃₁ N ₃ O	Cristales blancos	116-117	Cuant.	1629	341.49	30.33

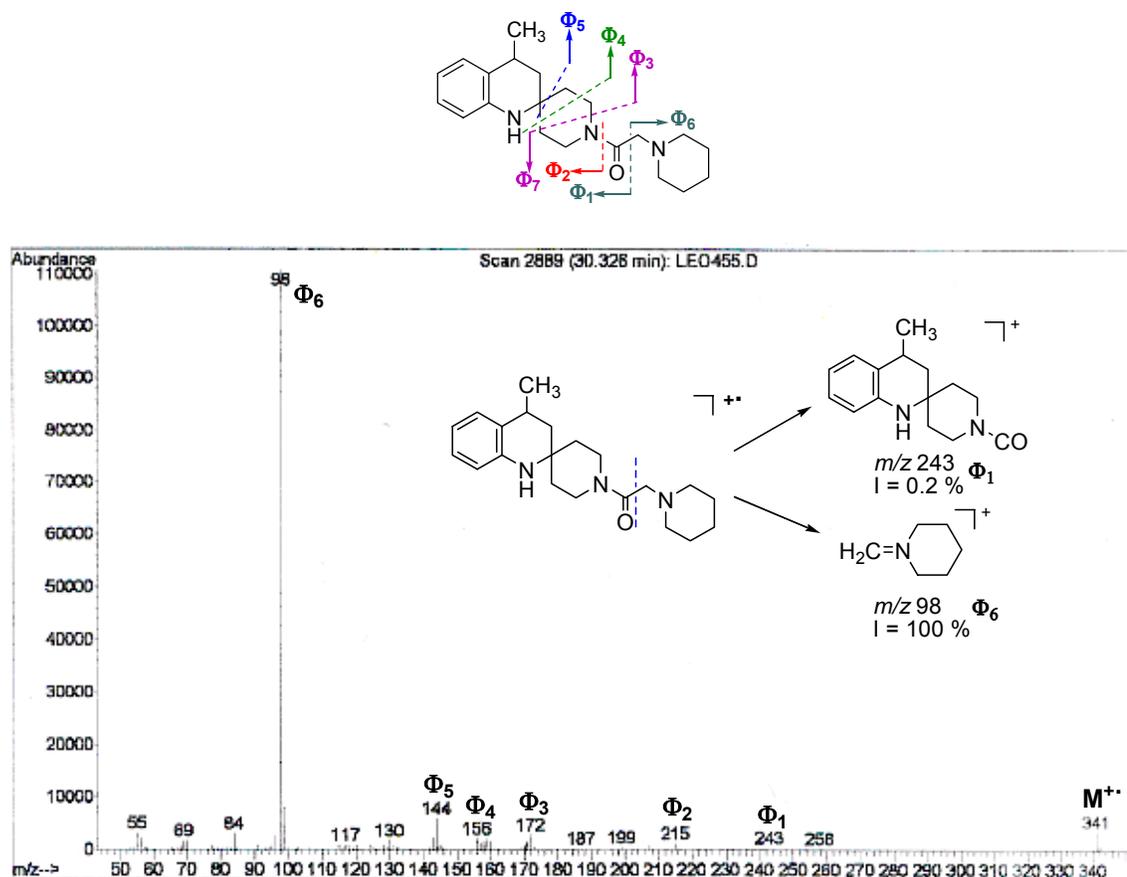
El espectro de masas de **172** es muy rico en fragmentaciones, se presentan las rupturas características ya mencionadas para los espiranos y además, se logró observar los iones generados por la escisión del grupo cloroacetilo con *m/z* 77 (³⁵ClCH₂CO⁺) y *m/z* 79 (³⁷ClCH₂CO⁺), y su ion complementario con *m/z* 215 (C₁₄H₁₉N₂⁺) (Figura 53).

Figura 53. Espectros de masas y posible fragmentación de la 1-(2-cloroacetil)-4'-metil-3',4'-dihidrospiro [piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**172**).



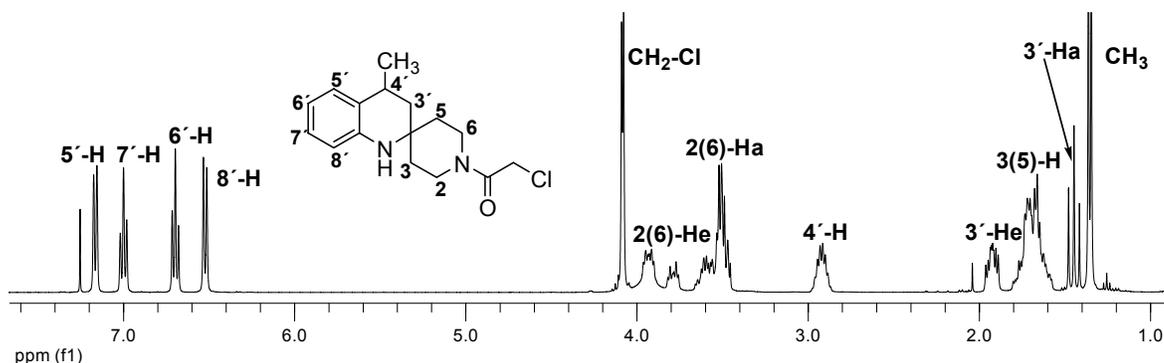
El espectro de masas del derivado **173**, al contrario que el de su precursor, muestra una fragmentación muy pobre. La intensidad del ion molecular es bastante baja, 3%; los iones fragmento correspondientes a las rupturas características para estos sistemas están presentes, aunque con intensidades muy pequeñas. El pico de base corresponde a un ion con m/z 98 ($C_6H_{12}N^+$), formado por una ruptura β al nitrógeno piperidínico, que coincide con la escisión α al carbonilo (Φ_6); esta ruptura también formó el ion complementario con m/z 243, con una intensidad menor al 1% (Figura 54).

Figura 54. Espectro de masas y posible fragmentación de la 4'-metil-1-(2-piperidin-1-ilacetil)-3',4'-dihidro espiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**173**).



En el espectro de RMN de protones del derivado cloroacilado **172** se observan dos grupos de señales para los protones piperidínicos: entre 1.58-1.80 ppm, como un multiplete aparecen los hidrógenos unidos a los carbonos tres y cinco, y entre 3.45-3.86 ppm los correspondientes a dos y seis. Los hidrógenos del anillo dihidroquinolínico generan cinco tipos de señales, así: los hidrógenos del grupo metilo resuenan como un doblete a 1.35 ppm ($J = 6.7$ Hz), el hidrógeno 3'-Ha resuena como un triplete a 1.45 ppm ($J = 12.7$ Hz). El protón 3'-He aparece a 1.94 ppm como un ddd ($J = 13.0, 10.6, 5.5$ Hz). El hidrógeno 4'-H resuena a 2.92 ppm como un sexteto ($J = 6.1$ Hz). Los hidrógenos aromáticos aparecen a campos bajos entre 6.52-7.16 ppm (Figura 55).

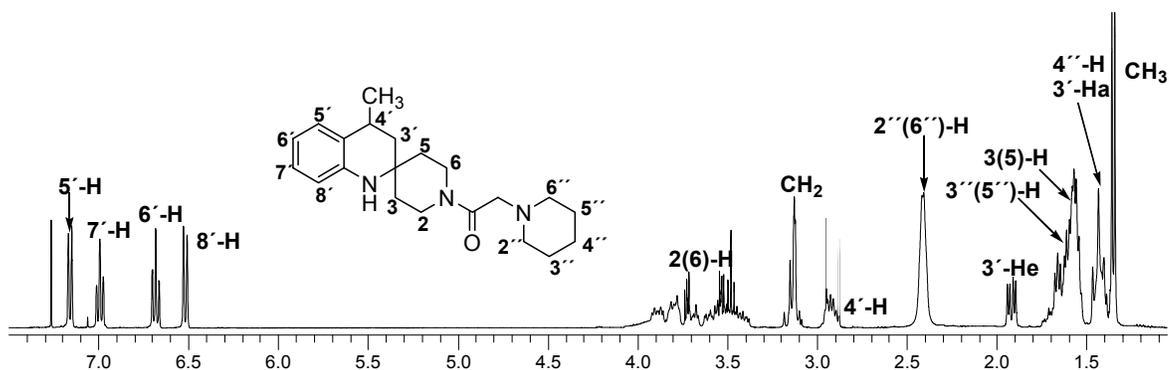
Figura 55. Espectro de RMN ^1H de la 1-(2-cloroacetil)-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**172**).



El desplazamiento químico de los protones de las disposiciones axiales y ecuatoriales de los carbonos dos y seis, en el anterior espectro, indica la presencia de dos conformeros causados por la rotación del enlace C-N amida.

En el espectro de protones del compuesto **173**, mostrado en la Figura 56, las señales en la zona alifática son más complejas que en el compuesto precursor. Los protones del grupo metilo resuenan a 1.35 ppm como un doblete ($J = 6.7$ Hz), entre 1.39-1.47 ppm aparecen mezcladas en un multiplete las señales de los protones 3'-Ha y 4''-H, así mismo aparecen las señales de los 3(5)-C y de los 3''(5'')-C entre 1.54 y 1.71 ppm. A 1.92 ppm como un doblete de dobletes ($J = 13.1, 5.5$ Hz), resuena el hidrógeno ecuatorial del carbono 3'-C. Los cuatro protones piperidínicos 2''(6'')-H aparecen como un singulete ancho a 2.41 ppm, y los 2(6)-H entre 3.38 y 4.02 ppm como un multiplete. El hidrógeno dihidroquinolínico 4'-H resuena a 2.94 ppm como un sexteto ($J = 6.1$ Hz). Los protones del grupo $-\text{CH}_2$ aparecen a 3.13 ppm como un singulete. Los hidrógenos aromáticos no presentan cambios apreciables en su multiplicidad o corrimiento con respecto al compuesto anterior, resuenan a campos bajos entre 6.52-7.16 ppm.

Figura 56. Espectro de RMN ^1H de la 4'-metil-1-(2-piperidin-1-ilacetil)-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**173**).



4.3 Preparación del alcaloide piperidínico *girgenшонina* y sus análogos

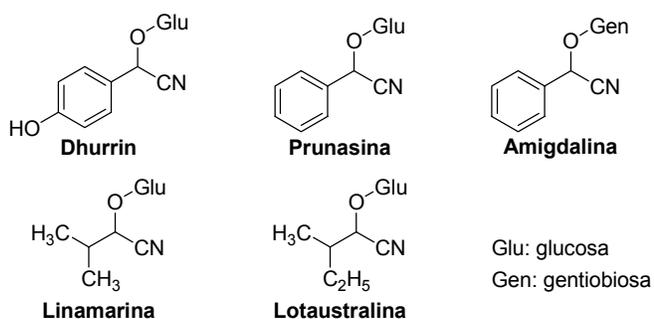
En la literatura se encuentra que una gran parte del estudio químico de las piperidinas se ha enfocado hacia la preparación de derivados con el grupo ciano, con el interés particular de aprovechar la reactividad de éste en la síntesis de alcaloides, sus análogos y una amplia variedad de intermedios de alto valor sintético (Rafiee *et al.*, 2007).

La clase más familiar de toxinas de plantas son los alcaloides. Estas sustancias han sido usadas desde tiempos inmemoriales con propósitos de envenenamientos, pero los efectos fisiológicos de los alcaloides en el hombre, ha hecho que se estudien y se utilicen en la medicina moderna con una amplia variedad de propósitos. El término alcaloide cubre un enorme rango de estructuras, desde la coniina, una simple piperidina monocíclica aislada de *Conium maculatum*, la atropina, la toxina bicíclica de la *Atropa belladonna*, a los alcaloides hexa- y heptacíclicos como la solanina extraída de *Solanum tuberosum* y la estricnina de *Strychnos nux-vomica* (Rubiralta *et al.*, 1991).

Uno de los ejemplos más intrigantes es la presencia de alcaloides y glicósidos cianogénicos en las plantas. La cianogénesis es la habilidad de las plantas y otros

organismos de sintetizar compuestos que liberan ácido prúsico por hidrólisis. Una de las clásicas fuentes de HCN son las semillas de *Prunus amygdalus*, las almendras amargas, que contienen la amigdalina, una toxina glicosídica (también presente en el cereal *Sorghum vulgare*, y en las semillas de los melocotones). Estas toxinas están presentes en alrededor de 2000 especies de plantas (100 familias) y tal vez las más comunes son la linamarina y la lotaustralina, el dhurrin y la prunasina (Figura 57).

Figura 57. Estructuras de los glicósidos cianogénicos.



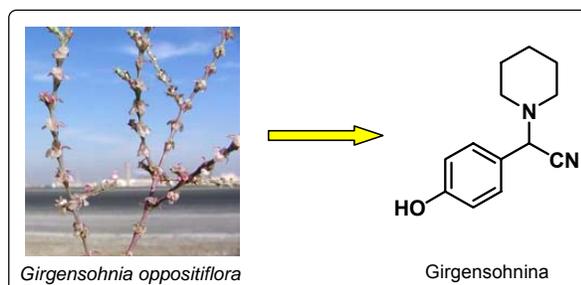
El HCN es tóxico a todo el espectro de organismos por inhibición del sistema de transporte de electrones en el citócromo, pero muchas especies se han adaptado al cianuro en la dieta. Los caracoles y las babosas se alimentan de tréboles, las ovejas que se alimentan con forrajes de cereales que contienen estas toxinas, pueden llegar a consumir diariamente una dosis de 15-50 mg/kg de peso, cuando una dosis de 2.4 mg/kg de peso puede matar una oveja no adaptada. Se estima que la población del occidente de África que tiene como base de su alimentación la harina proveniente de las raíces de la mandioca o yuca (*Manihot esculenta*) consume una dosis diaria de 35 mg de HCN, la mitad de la dosis letal.

La amigdalina, componente principal del *laetrile*, es un controversial agente anticancerígeno (usado en México sin aprobación de la FDA) (Harborne 2002), la

taxiphyllina, aislada del *Taxus canadensis*, mostró una potente actividad inhibitoria de la tirosinasa, esta enzima está directamente involucrada en la pigmentación de la piel y en el inicio de los melanomas en este órgano (Moertel *et al.*, 1982; Widmalm *et al.*, 2003). En la medicina tradicional de Malasia se usan las decocciones de la *Phyllagathis rotundifolia* en el tratamiento de la malaria y la fiebre, los estudios fitoquímicos mostraron la presencia, en esta planta, de siete alcaloides cianogénicos, entre ellos la prunasina (Cheng *et al.*, 2005; Kasraee 2002; Towers *et al.*, 1964).

El alcaloide girgensohnina fue aislado con un rendimiento del 0.04% de los pétalos verdes de la *Girgensohnia oppositiflora* (Fam. Chenopodiaceae) (Yurashevsky *et al.*, 1946), un arbusto que crece en los desiertos de Rusia e Irán (Figura 58); este es uno de los pocos casos en los que se han aislado compuestos cianogénicos sin unión glicosídica, y que presentan en su estructura el anillo de la piperidina. Aunque su elucidación estructural y síntesis fueron reportadas en 1946, en la literatura no hay mención acerca de sus bioactividades.

Figura 58. *Girgensohnia oppositiflora* en floración y el alcaloide girgensohnina.

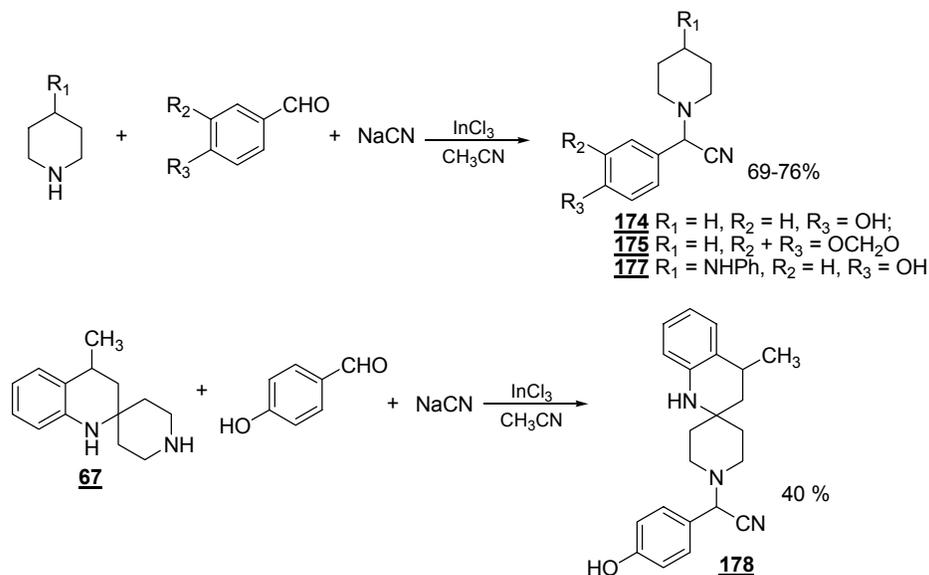


La presencia del fragmento piperidínico con el grupo amino libre en ciertas moléculas preparadas en esta investigación, nos llevó a proponer la síntesis de algunos análogos y del alcaloide mismo. La primera síntesis de este producto

natural se realizó a partir de piperidina, p-hidroxibenzaldehído, NaHCO₃ y KCN, usando agua como disolvente, con un rendimiento del 56% (Yurashevsky *et al.*, 1946).

Recurriendo a la reacción de Strecker multi-componente, se usó: piperidina, el espirano **67**, y la amina **176** como sustratos de reacción, el p-hidroxibenzaldehído (o piperonal) como el componente aldehídico, NaCN, cantidades catalíticas de InCl₃ (5% mol), en acetonitrilo como disolvente, se logró preparar la girsensohnina y sus análogos **175**, **177** y **178** (Esquema 42). En un procedimiento característico, todos los reactivos se mezclaron y se dejaron en agitación vigorosa por una noche, a continuación se adicionó agua helada, y se recogieron los cristales por filtración; después de lavarlos profusamente con agua para eliminar los residuos de reactivos inorgánicos, el producto se secó y purificó.

Esquema 42. Síntesis del alcaloide *girsensohnina* **174**, y sus análogos **175**, **177** y **178**.



Todos los aminonitrilos se obtuvieron como sólidos cristalinos, de color blanco o naranja, con rendimientos satisfactorios, entre 69-76% para los derivados sencillos de piperidina y de un 40% para la piperidina espiránica **178** (Tabla 33).

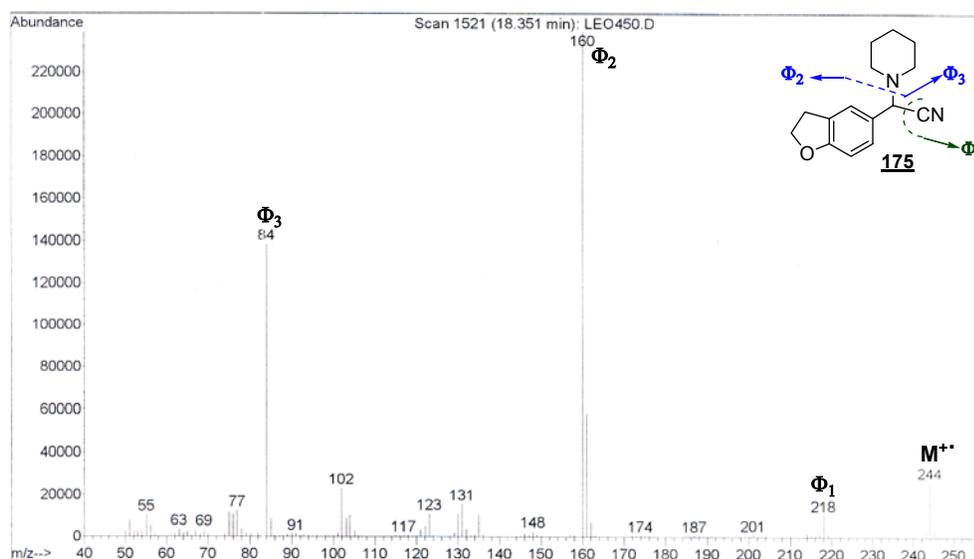
Tabla 33. Constantes físicas y químicas de la girgensohnina y sus análogos.

Nº	Fórmula Molecular	Estado físico	p.f. (°C)	R (%)	IR _{V_{N-H}/V_{C≡N}} (cm ⁻¹)	P.M. (g/mol)	t _R (min)
174	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O	Cristales blancos	115-117	76	2232	216.28	16.19
175	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	Cristales blancos	76-77	69	2218	244.29	18.35
176	C ₁₁ H ₁₆ N ₂	Cristales blancos	99-100	64	3298	176.26	12.58
177	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O	Cristales naranjas	125-127	72	3365/2228	307.39	-
178	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O	Cristales blancos	175-177	40	3318/2231	347.45	-

Posiblemente, la eficiencia de la reacción es mucho mayor a la reportada en la Tabla anterior, en todos los casos es preferible caracterizar y utilizar estas sustancias sin someterlas a recristalizaciones o columnas cromatográficas, cualquiera de estos procesos llevaron a una intensa y rápida descomposición de los productos. La pureza de los compuestos antes de la purificación es bastante alta > 95% (determinada por CG). En los espectros de infrarrojo se observa una banda con débil intensidad entre 2218-2232 cm⁻¹, atribuible a la vibración de tensión del grupo C≡N (Tabla 33).

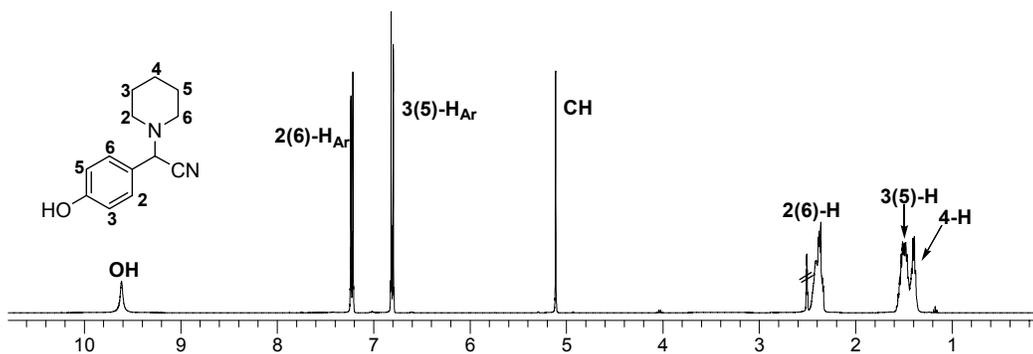
Como ejemplo de los análisis por espectrometría de masas, en la Figura 59 se presenta el espectro y la posible fragmentación principal de **175**; en este se pueden observar las rupturas típicas de la serie de compuestos: la pérdida del grupo ciano, ruptura Φ_1 , que generó el catión con m/z 218 (C₁₃H₁₆NO₂⁺), y la escisión del enlace C-N que une la piperidina con el resto de la molécula, que dio los iones complementarios con m/z 160 (C₉H₆NO₂⁺) y m/z 84 (C₅H₁₀N⁺), rupturas Φ_2 , y Φ_3 .

Figura 59. Espectro de masas y posible fragmentación del 2-(3,4-dioximetilfenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (**175**).



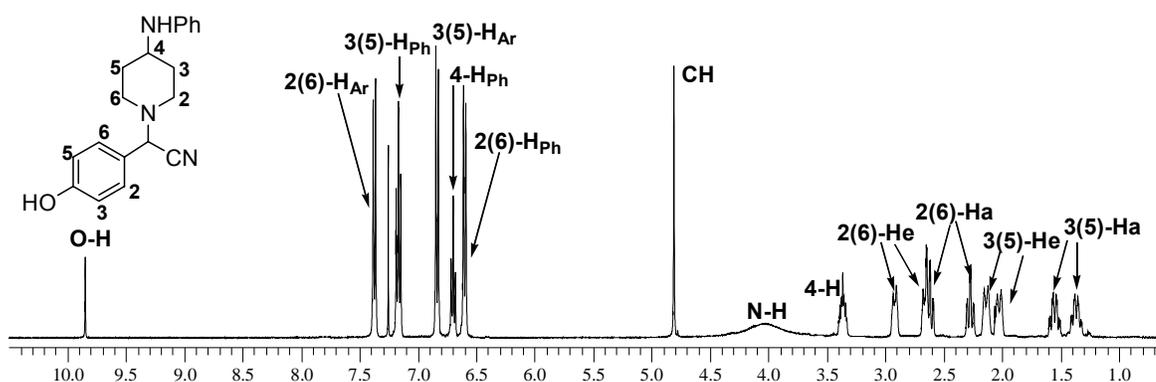
Los espectros de RMN de la girgensohnina **174** (Figura 60) y su análogo **175** son bastante sencillos. En la zona alifática se encuentran tres grupos de señales: como multipletes entre 1.37-1.41, 1.45-1.57 y 2.33-2.46 ppm se encuentran las señales de los protones de los carbonos cuatro, tres y cinco y dos y seis, respectivamente; a 5.11 ppm resuena, en forma de singulete, el hidrógeno α al grupo ciano. A campos bajos aparecen las señales de los protones aromáticos, a 6.80 y 7.22 ppm, y el OH fenólico como un singulete ancho a 9.61 ppm.

Figura 60. Espectro de RMN ^1H de la girgensohnina **174**.



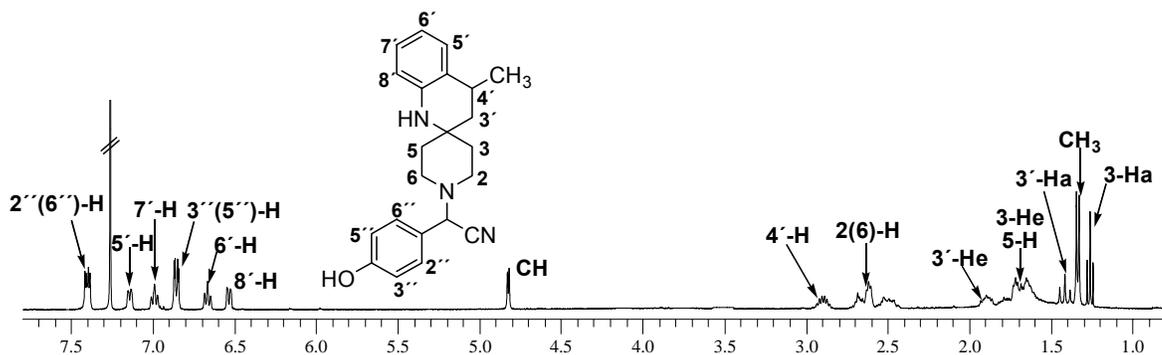
Los espectros de RMN ^1H de los análogos más complejos del alcaloide, los derivados **177** y **178**, son ricos en señales; para el compuesto **177** los protones piperidínicos aparecen perfectamente diferenciados en el rango de 1.37 y 3.36 ppm, como se observa en la Figura 61. La señal para el hidrógeno α al nitrilo se presenta como un singulete a 4.81 ppm, y la señal del protón fenólico a 9.85 ppm. Los hidrógenos aromáticos de los grupo fenilo y arílico resuenan entre 6.60 y 7.37 ppm.

Figura 61. Espectro de RMN ^1H del compuesto **177**.



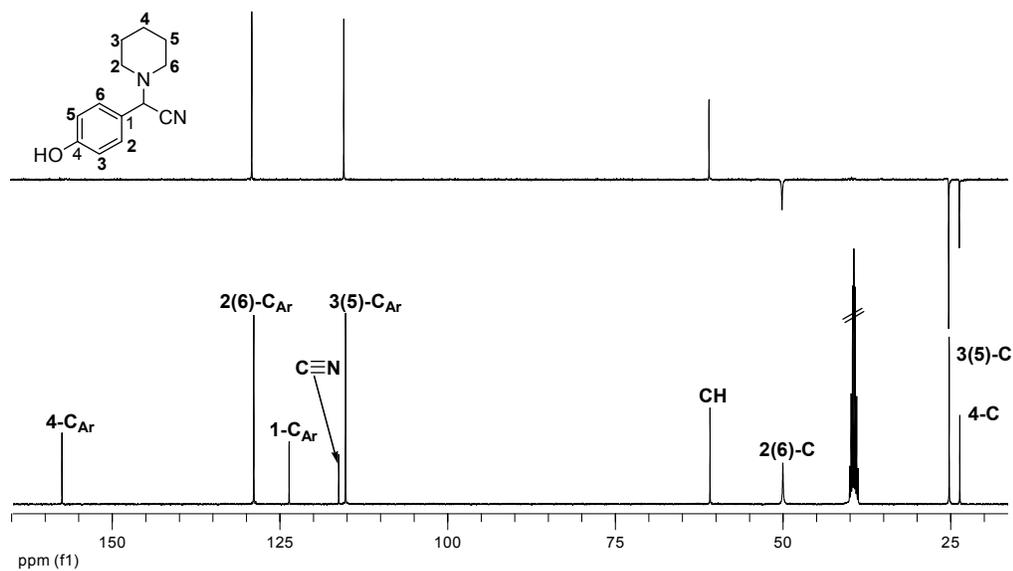
En el espectro del compuesto **178**, las señales de los protones piperidínicos y dihidroquinolínicos aparecen como multipletes, con muy poca resolución entre 1.27 y 2.89 ppm. A 4.82 ppm resuena la señal del hidrógeno unido al carbono que contiene el grupo nitrilo. Los protones aromáticos aparecen a 6.53-7.40 ppm, como se muestran en la Figura 62.

Figura 62. Espectro de RMN ^1H del compuesto **178**.



Otro punto importante en la caracterización de los aminonitrilos son los espectros de RMN de ^{13}C . En los compuestos de la serie, el carbono del grupo $\text{C}\equiv\text{N}$ resuena a 116.2, 115.9, 115.6 y 116.5 ppm para los compuestos **174**, **175**, **177** y **178**, respectivamente. El carbono directamente unido al grupo ciano resuena, en la girsensohnina, a 60.9 ppm (Figura 63), a 61.0 ppm en **175**, y a 61.8 ppm en los compuestos **177** y **178**.

Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C de la girsensohnina **174**.



5. PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE MOLÉCULAS CON EL FRAGMENTO 4-PIRIDILMETIL HACIA NUEVOS SISTEMAS PIPERIDÍNICOS

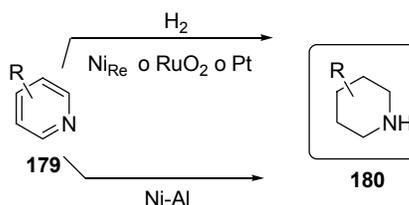
5.1 Antecedentes

En los capítulos I y III se mencionó que una de las posibilidades de obtención del anillo piperidínico y tetrahydroquinolínico es la reducción directa de la piridina y quinolina, respectivamente. Como ambos heterociclos son producidos industrialmente, las quinolinas y piridinas son sustratos valiosos para generar las moléculas piperidínicas. Los procesos reductivos más utilizados para la obtención del anillo piperidínico (tetrahydroquinolínico) son i) la hidrogenación catalítica por metales bien sea heterogénea u homogénea (Rylander 1979); ii) la hidrobioración (Joule *et al.*, 1995) y iii) la hidrogenación por la transferencia del hidrógeno (“*hydrogen transfer hydrogenation*”), donde el hidrógeno es reemplazado por las moléculas-dadoras de hidrógeno (Brieger *et al.*, 1974). Los tres procesos tienen sus ventajas y desventajas, y su utilización depende de la compatibilidad con las funcionalidades sobre el anillo piridínico (quinolínico), lo que a veces, limita generar las correspondientes piperidinas (tetrahydroquinolinas).

Los procesos de hidrogenación requieren, en general, de condiciones severas (temperaturas y presiones altas) y, por consiguiente, de equipos más sofisticados. Además, hay que tener en cuenta que la mezcla de hidrógeno y aire es potencialmente explosiva. Por ejemplo, la hidrogenación de las piridinas **179** sobre el níquel Raney ofrece las correspondientes piperidinas **180** solo a altas temperaturas (100-200 °C), y alta presión (150-300 atm) (Esquema 43). Con el uso de dióxido de rutenio en esta hidrogenación, no se mejoran las condiciones de

la reacción (Freifelder *et al.*, 1961); no obstante, se puede evitar usar este entorno tan drástico, realizando la reducción con amalgama de Ni-Al, en presencia de una base diluida (NaOH) (Lunn *et al.*, 1986); como es muy reactivo, este sistema debe ser usado con cuidado ya que muchas funciones del anillo piridínico pueden ser transformadas.

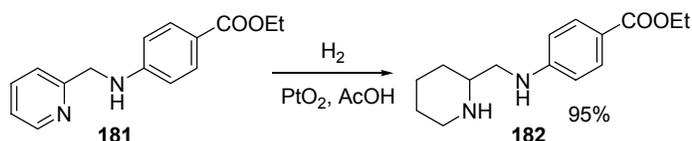
Esquema 43. Hidrogenación de derivados piridínicos usando diversos catalizadores metálicos.



La piridina y sus derivados simples **179** se reducen fácilmente hasta las piperidinas **180** con el platino o el óxido de platino (catalizador de Adams) en presencia de ácido acético, este último protege al catalizador del envenenamiento por el átomo nitrógeno básico (Rylander *et al.*, 1979; Hamilton 1928; Hutchison *et al.*, 1989).

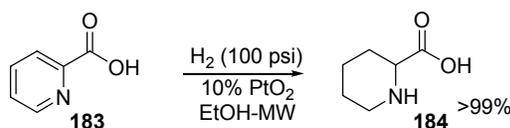
Igual al platino, su óxido (PtO₂) también ha sido empleado con éxito en la formación de moléculas piperidínicas (Hutchison *et al.*, 1989). Se reportó que la reducción, promovida por este catalizador, de la *N*-aril-*N*-(2-piridilmetil)amina **181** conduce a la formación del derivado piperidínico **182** con excelentes rendimientos (95%) (Mertes *et al.*, 1970) (Esquema 44). Desgraciadamente, es un único ejemplo de la hidrogenación de las piridinas con el fragmento piridilmetilamino hacia las moléculas piperidínicas y el desarrollo del método señalado no ha sido continuado.

Esquema 44. Reducción de la *N*-aril-*N*-(2-piridilmetil)amina empleando óxido de platino como catalizador.



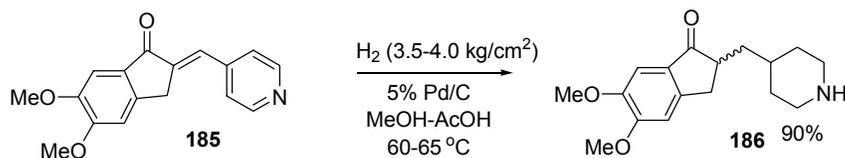
Otro ejemplo más reciente donde el anillo piridínico se convierte en el derivado piperidínico es de Vanier (Vanier 2007), quien reportó la preparación del ácido piperidínico **184** a partir del ácido picolínico **183**, utilizando hidrogenación asistida por microondas bajo altas presiones de hidrógeno (Esquema 45).

Esquema 45. Síntesis del ácido piperidínico por hidrogenación del ácido picolínico.



Al cambiar de estos catalizadores muy caros por otro, -el paladio sobre carbón (Pd/C)-, relativamente económico, se logró reducir el anillo piridínico del compuesto **185**, precursor del fármaco donepezil (ver Fig. 1) hasta el derivado piperidínico **186** (Elati *et al.*, 2006) (Esquema 46). Aunque el rendimiento del producto piperidínico fue bueno, esta reacción se acompaña con la formación de productos colaterales, difíciles de separar.

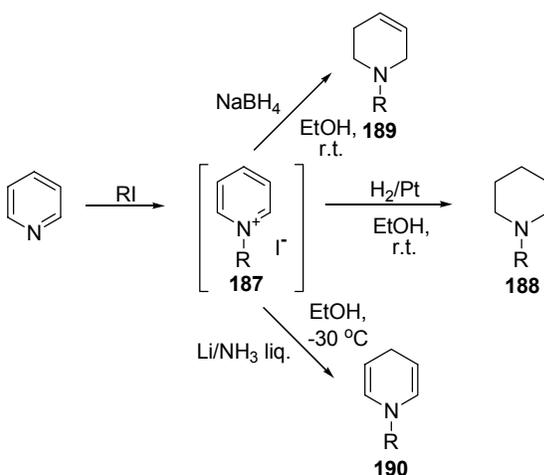
Esquema 46. Reducción de un intermedio en la síntesis del donepezil.



El sistema reductor $\text{H}_2\text{-PdOH/C}$ (catalizador de Pearlman) también funciona bien para la reducción de las piridinas hasta respectivas piperidinas (Armour *et al.*, 1996).

Otra forma de reducir el anillo piridínico hasta la piperidina **188**, es a través de la reducción de sus sales **187**, que se preparan fácilmente por reacción entre la piridina y el ioduro de alquilo. Existe una amplia gama de agentes reductores, *p. ej.* el H_2/Pt , el NaBH_4 , el Li/NH_3 , etc., (Rylander 1979). Dependiendo de la naturaleza del agente reductor, se pueden preparar diferentes formas reducidas del anillo piridínico **189**, **190** (Esquema 47).

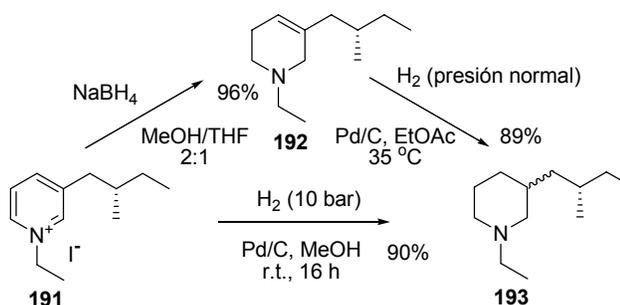
Esquema 47. Reducción de las sales de piridina.



Este método, a veces, es muy útil cuando se trata de la preparación de piperidinas N-alquiladas. Combinando los reactivos mencionados se logró sintetizar la stenusina **193**, un alcaloide repelente de los escarabajos del género *Stenus*. Su síntesis se basó en la reducción de la sal piridínio **191** usando hidrógeno en presencia de Pd/C o el NaBH_4 . Este último agente redujo la sal hasta el derivado

192, el cual fue hidrogenado hasta la stenusina. Ambas rutas dieron buenos resultados (Gedig *et al.*, 2007) (Esquema 48).

Esquema 48. Preparación de la stenusina por reducción de derivados piridínicos.



Últimamente, la hidrogenación por transferencia del hidrógeno está catalogada como una herramienta poderosa en la reducción de los heterociclos. En esta reacción el hidrógeno es remplazado por las moléculas-dadoras de hidrógeno, *p.* *ej.* ciclohexano, ciclohexadieno, hidracina, ácido fórmico, ácido fosfínico, formiato de amonio. Este último que es un agente versátil (Ram *et al.*, 1988), se usó en nuestra investigación con diferente propósitos.

Igual a las sales piridinio, los piridin-*N*-óxidos también han sido empleado con éxito para la obtención de moléculas piperidínicas. Utilizando el sistema $\text{HCOONH}_4/10\% \text{ Pd/C}$, Zacharie y col. desarrollaron un procedimiento sencillo de reducción de los *N*-óxidos **194** hasta las correspondientes piperidinas **195** (Zacharie *et al.*, 2001) (Esquema 49). Las ventajas de este procedimiento son: la simpleza del experimento, los buenos rendimientos (Tabla 34) y condiciones suaves.

Esquema 49. Obtención de piperidinas por reducción de los *N*-óxidos de piridina.

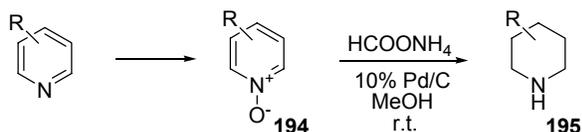


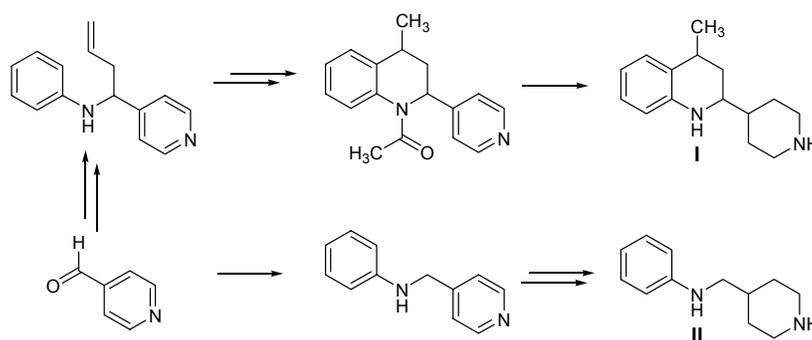
Tabla 34. Rendimientos de la reducción de *N*-óxidos de piridina con el sistema formiato de amonio-Pd/C.

195	R	%
a	H	95
b	3-Me	100
c	4-Me	84
e	2-COOMe	84
f	4-COOH	99
g	2-NHCH ₂ CH ₂ Ph	90

Aunque otros métodos propuestos para reducir el anillo piridínico han sido reportados (Larock 1999), los mencionados arriba, sobre todo, con el sistema HCOONH₄/Pd/C es atractivo por su simpleza, y eficacia, y puede servir para lograr el objetivo de esta etapa de la investigación.

El sistema heterocíclico de la 2-(4-piperidinil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolina **I** es desconocido en la literatura química, por eso, en esta investigación se propuso el diseño e implementación de una ruta para prepararlo, a partir de las 4-metil-1,2,3,4-tetrahidro-2-(4'-piridil)quinolinas (Figura 64). Los precursores pueden obtenerse a partir de sustancias económicas y de fácil acceso como son las anilinas y el 4-piridincarboxaldehído, utilizando la ruta patentada por Kuznetsov y col. (Kuznetsov *et al.*, 1991) y desarrollada en nuestro laboratorio (Kuznetsov *et al.*, 1994; Vargas *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2002; Kouznetsov *et al.*, 2004). Así mismo, se puede usar un camino similar para preparar sus análogos no-rígidos, las *N*-(piperidin-4-ilmetil)aminas **II**.

Figura 64. Ruta propuesta para la preparación de las 2-(4-piperidinil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolinas y las *N*-(piperidin-4-ilmetil)aminas.



La preparación de los sistemas **I** y **II** es importante sin duda alguna, pero mucho más la de todos los intermedios con el anillo de la piridina; esta sección del trabajo hizo parte del subprograma X: Química Fina Farmacéutica, proyectos X-2 y X-7: Síntesis de Moléculas Bioactivas. Análogos de Productos Naturales de Origen Iberoamericano, del CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo). La contribución de nuestro grupo ha sido el desarrollo de nuevos antifúngicos y antiparasitarios con las estructuras de las *N*-aril-*N*-(piridilmetil)aminas, *N*-aril-*N*-[1-(piridil)but-3-enil]aminas (homoalilaminas), y las 4-metil-2-piridil-1,2,3,4-tetrahydro quinolinas (Kouznetsov *et al.*, 2008; Suvire *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2006; Kouznetsov *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2003).

5.2 Preparación de las *N*-(piperidin-4-ilmetil)anilinas, a partir de sus respectivas aldiminas

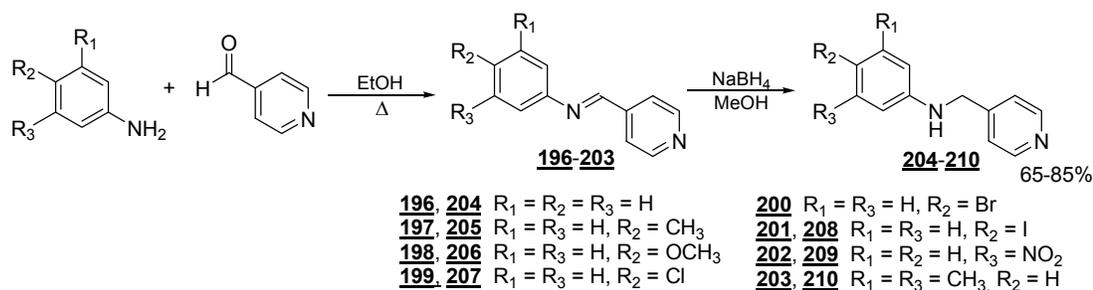
La condensación de aminas y aldehídos heteroaromáticos ha generado una popular clase de *N*-aril(hetaryl) iminas (Layer 1963; Needleman *et al.*, 1962). La facilidad de transformación del doble enlace imina C=N (en reacciones de adición y cicloadición) ha sido usado muy fructíferamente en la elaboración de un gran número de agroquímicos, fármacos y en la preparación de químicos finos. La

reducción de iminas usando diversos agentes reductores es un viejo, pero eficaz método para la preparación de numerosas e importantes aminas secundarias (Hutchins *et al.*, 1991). Los heterociclos nitrogenados se encuentran frecuentemente entre las estructuras fármacoforas privilegiadas, los derivados piridínicos figuran entre los buenos candidatos para el *bioscreening* en diversos tipos de actividades (Kleemann *et al.*, 1999; Evers *et al.*, 2005).

Las aldminas **196-203** se obtuvieron por calentamiento a reflujo, durante 1-2 horas, de una mezcla equimolar de la anilina, o sus derivados, (0.056 moles) y el 4-piridincarboxaldehído (0.056 moles), en 100 mL de etanol anhidro (Esquema 5.8). Los análisis de CG indicaron un rendimiento cuantitativo de la reacción, por esto, algunas iminas se usaron directamente y sin purificación previa en las siguientes reacciones, y en algunos casos se aislaron por recristalización para ser analizadas. Las iminas se obtuvieron con altos rendimientos, como sólidos cristalinos o aceites muy viscosos.

Una vez elaborados los precursores, se procedió a reducirlos con un exceso de NaBH₄ en metanol para generar las aminas secundarias **204-210**, en unos razonables buenos rendimientos del 65-85% (Esquema 50).

Esquema 50. Preparación de las *N*-aril-*N*-(piridin-4-ilmetil)aminas **196-203**, y las *N*-aril-*N*-(piridin-4-ilmetil)aminas **204-210**.



Después de ser purificados por cromatografía en columna, y recristalización a partir de mezclas de heptano y acetato de etilo, en diferentes proporciones, los compuestos **204-210** se obtuvieron como sólidos cristalinos (Tabla 35).

En los espectros de infrarrojo de los compuestos imínicos **196-203** se observó la banda de vibración del grupo C=N entre 1618-1628 cm^{-1} y para las aminas **204-210**, la banda de vibración para el grupo N-H entre 3250-3292 cm^{-1} . En los espectros de masas el ion molecular de las iminas es el pico de base, lo cual confirmó la fórmula bruta de éstas.

Tabla 35. Constantes físicas y químicas de las aldminas **196-203** y las aminas **204-210**.

Nº	Fórmula Molecular	Estado físico	p.f. (°C)	R (%)	IR (cm^{-1}) $\nu_{\text{C=N}}/\nu_{\text{N-H}}$	P.M. (g/mol)	t_R (min)
196	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2$	Cristales amarillos	70-71	Cuantitativo	1618	182.22	13.66
197	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2$	Cristales amarillos	98-99	Cuantitativo	1623	196.23	15.40
198	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$	Aceite rojo	-	Cuantitativo	1628	212.25	18.95
199	$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_2$	Cristales amarillos	84-85	Cuantitativo	-	216.67	17.27
200	$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{BrN}_2$	Cristales amarillos	103-104	Cuantitativo	-	261.12	19.46
201	$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{IN}_2$	Aceite rojo	-	Cuantitativo	-	308.12	-
202	$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	Cristales naranjas	-	Cuantitativo	-	227.22	-
203	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2$	Aceite incoloro	-	Cuantitativo	-	210.27	-
204	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2$	Cristales blancos	100-101	81	3263	184.24	15.08
205	$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2$	Cristales incoloros	69-70	85	3292	198.26	-
206	$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$	Cristales amarillos	72-73	79	3288	214.26	19.90
207	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_2$	Cristales amarillos	91-92	80	3271	218.68	19.88
208	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{IN}_2$	Cristales blancos	106-107	69	3383	310.13	32.41
209	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$	Cristales amarillos	89-90	65	3250	229.24	32.82
210	$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2$	Cristales amarillos	93-94	85	3273	212.29	18.52

Los espectros de RMN ^1H de las aminas **204-210** son bastante sencillos, en el de la *N*-(3,5-dimetilfenil)-*N*-(piridin-4-ilmetil)amina **210** los grupos metilo resuenan a 2.24 ppm como un singulete, el hidrógeno de los grupos amina y metileno aparecen también como singuletes a 4.12 y 4.39 ppm, respectivamente. Los protones aromáticos aparecen a campos bajos: a 6.24 y 6.43 ppm los sustituidos en los carbonos dos, seis y cuatro del anillo arílico, a 7.33 ppm como un doblete ($J = 4.4$ Hz) los de las posiciones C-3 y C-5 del anillo de piridina, y a 8.57 ppm como un doblete de dobletes ($J = 4.4, 1.5$ Hz) los unidos a los carbonos C-2 y C-6 de este heterociclo. En la Figura 65 se muestra como ejemplo el espectro de **210**, y en la Tabla 36 se recoge el análisis para las restantes aminas.

Figura 65. Espectro de RMN ^1H de la *N*-(3,5-dimetilfenil)-*N*-(piridin-4-ilmetil)amina (**210**).

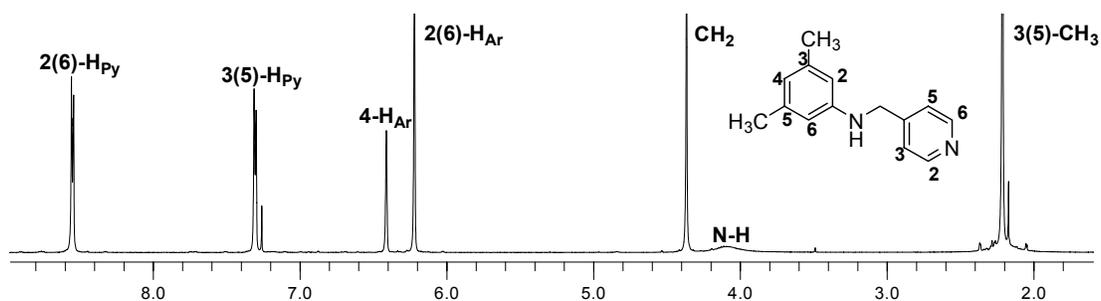


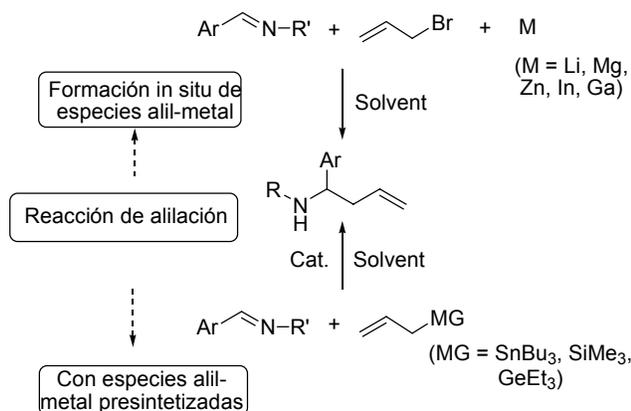
Tabla 36. Datos de caracterización por RMN-¹H para las *N*-4-*N*-(piridin-4-ilmetil)aminas **204-210**.

Comp.	Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz)						
N°	Piridínicos		Arílicos		Otros		
	2(6)-H _{Py}	3(5)-H _{Py}	2(6)-H _{Ar}	3(5)-H _{Ar}	N-H	CH ₂ -N	R
204	8.55 (dd) <i>J</i> = 6.0, 1.6	7.29 (d) <i>J</i> = 5.9	6.58 (dd) <i>J</i> = 8.5, 0.8	7.17 (td) <i>J</i> = 7.4, 1.0	-	4.37 (s)	4-H _{Ar} 6.74 (t), <i>J</i> = 7.4
205	8.54 (dd) <i>J</i> = 4.2, 1.5	7.31 (d) <i>J</i> = 4.2	6.50 (d) <i>J</i> = 8.4	6.98 (d) <i>J</i> = 8.3	4.15 (s)	4.36 (s)	CH ₃ 2.23 (s)
206	8.52 (d) <i>J</i> = 5.3	7.27 (d) <i>J</i> = 5.0	6.53 (d) <i>J</i> = 8.7	6.75 (d) <i>J</i> = 8.7	4.08 (bs)	4.30 (s)	OCH ₃ 3.71 (s)
207	8.55 (d) <i>J</i> = 4.9	7.29 (d) <i>J</i> = 5.2	6.51 (d) <i>J</i> = 8.6	7.12 (d) <i>J</i> = 8.7	-	4.36 (s)	-
208	8.57 (dd) <i>J</i> = 4.4, 1.5	7.43 (dd) <i>J</i> = 6.8, 2.0	6.38 (dd) <i>J</i> = 6.8, 2.5	7.28 (dd) <i>J</i> = 4.4, 1.5	-	4.38 (s)	-
209	8.61 (dd) <i>J</i> = 4.5, 1.8	7.28-7.33 (m)	2-H _{Ar} 7.28-7.33 (m) 6-H _{Ar} 6.87 (ddd) <i>J</i> = 8.3, 2.5, 0.8	5-H _{Ar} 7.42 (t) <i>J</i> = 2.3	4.69 (s)	4.48 (s)	4-H _{Ar} 6.74 (ddd) <i>J</i> = 8.1, 2.3, 1.0
210	8.57 (dd) <i>J</i> = 4.4, 1.5	7.33 (bd) <i>J</i> = 4.4	6.24 (2)	7.17 (td) <i>J</i> = 7.4, 1.0	4.12 (s)	4.39 (s)	3(5)-CH ₃ 2.24 (s) 4-H _{Ar} 6.43 (s)

5.3 Preparación de las 4-*N*-*N*-[1-(4-piridil)buten-3-il]aminas a partir de respectivas aldiminas. Generación de nuevas tetrahydroquinolinas C-2 γ -piridil sustituidas

La adición de alilo al enlace imino C=N de derivados carbonílicos es el método más eficiente y confiable para la preparación estereo- y, a veces, enantioselectiva de homoalilaminas; los recientes desarrollos en su síntesis muestran, que la adición de un nucleófilo carbonado, como el fragmento alílico, a bases de Schiff es posible de dos formas: i) utilizando la especie alil-metal “presintetizada”, como en el tradicional procedimiento de Grignard-Barbier, y ii) generando la especie *in situ*, prestando atención especial a metodologías amigables ambientalmente (Figura 66) (Kouznetsov *et al.*, 2008).

Figura 66. Formación de homoalilaminas - 4-*N*-aril-*N*-1-(arilbuten-3-il)aminas.



Varias especies organometálicas (compuestos alílicos de Li, Mg, Cu and Zn) han sido usadas exitosamente en la alilación de iminas, pero los reactivos de organoindio son muy interesantes, porque son estables frente al agua y al aire. En contraste a la riqueza de química carbonílica, la alilación, mediada por el indio, de las aldiminas en medio acuoso, todavía es muy limitada (Kumar *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2001; Vilaivan *et al.*, 2001; Vilaivan *et al.*, 2005; Legros *et al.*, 2003; Källström *et al.*, 2007; Andrews *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2007).

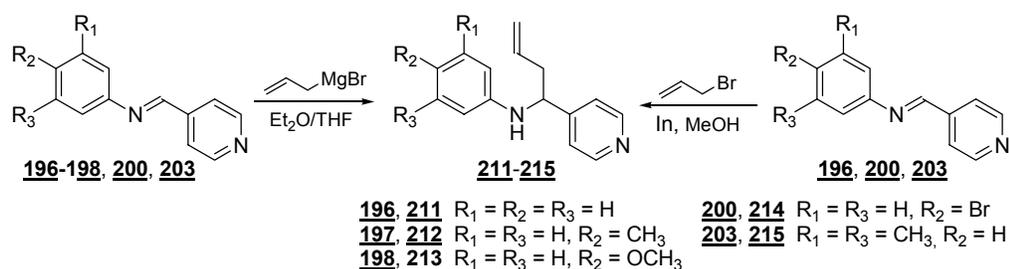
Vilaivan y col. reportaron por primera vez que la alilación tipo Barbier de aldiminas inactivadas, con bromuro de alilo (3 equiv.), en presencia de polvo de indio (2 equiv.) y metanol anhidro, transcurrió rápidamente para dar homoalilaminas en buenos rendimientos (Vilaivan *et al.*, 2001).

Las trifluorometil aldiminas también pueden reaccionar en condiciones de Barbier en presencia de magnesio, indio o zinc (Legros *et al.*, 2003). Otro metal atractivo y comercialmente disponible para mediar reacciones de preparación de homoalilaminas es el galio (Wang *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2004); este metal se usó con éxito en alilaciones de aldiminas realizadas en condiciones libres de

disolvente (Andrews *et al.*, 2004). Si se comprara los extensos estudios de alilación de derivados de iminas mediados por Zn, estas reacciones de alilación han recibido mucho menos escrutinio (van der Sluis *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006).

La nueva serie de homoalilaminas **211-215** fue elaborada por la adición nucleófila del fragmento alílico al enlace C=N de las respectivas aldminas **196-198**, **200** y **203**, usando el procedimiento de Grignard, con la especie alil-metal (alil-magnesio) presintetizada, a partir del bromuro de alilo y magnesio metálico en éter etílico, como se describió en el Cap. I, pero también usando reacciones tipo Barbier, generando la especie alil-indio *in situ*. Para realizar este último procedimiento, una mezcla de bromuro de alilo (3 mmol), indio en polvo (1.5 mmol), y las aldminas **196-198**, **200** y **203** (1 mol), en metanol anhidro, a temperatura ambiente, se agitó vigorosamente hasta que se observó la completa disolución del metal (3-4 h) y el monitoreo por CCF mostró la desaparición total de la imina (Esquema 51). En la Tabla 37 se recogen las constantes fisicoquímicas aminas homoalílicas **211-215**.

Esquema 51. Síntesis de las homoalilaminas **211-215** con el fragmento γ -piridil.



Cada uno de los procedimientos mostró ventajas y desventajas: el tradicional Grignard requiere del secado y uso de disolventes tóxicos y costosos como el éter etílico y el tetrahidrofurano, el tiempo requerido para preparar el alilmagnesiano, la adición de la imina a este, la extracción del producto es muy largo, y la reacción

debe mantenerse bajo vigilancia constante por el alto desprendimiento de calor que genera.

La extracción también es muy dispendiosa y el éter contaminado con bromuro de alilo, no es recuperable. Pero a cambio, el producto se obtiene casi limpio y los rendimientos son bastante buenos.

En el procedimiento con indio, las principales dificultades son: 1) el indio en polvo es bastante costoso, lo que no viabiliza la preparación de grandes cantidades de muestra para realizar síntesis multi-etápicas, y 2) el producto es difícil de aislar de la masa de reacción, por la gran cantidad de resinas formadas, y se requieren de varias columnas y recristalizaciones para obtener de una pureza aceptable los productos.

Tabla 37. Constantes físicas y químicas de las homoalilaminas **211-215**.

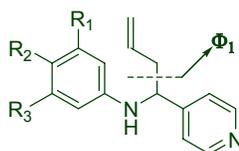
Nº	Fórmula Molecular	Estado físico	p.f. (°C)	R (%) Grignard	R (%) Barbier	IR (cm ⁻¹) ν _{N-H}	P.M. (g/mol)	t _R (min)
211	C ₁₅ H ₁₆ N ₂	Aceite amarillo	-	81	62	3287	224.30	17.27
212	C ₁₆ H ₁₈ N ₂	Cristales blancos	95-96	73	-	3273	238.33	19.27
213	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O	Aceite amarillo	-	60	-	3294	254.33	21.32
214	C ₁₅ H ₁₅ BrN ₂	Cristales amarillos	81-83	53	53	3275	303.20	22.15
215	C ₁₇ H ₂₀ N ₂	Cristales blancos	91-92	74	70	3293	252.35	19.99

Los espectros de IR de las homoalilaminas mostraron la aparición de la señal correspondiente a la vibración de tensión del NH entre 3273 y 3293 cm⁻¹, como una banda de mediana intensidad. En los espectros de masas los iones moleculares son de baja intensidad, menores a un 5%, la fragmentación más característica en esta serie de compuestos, es la pérdida del radical alilo [M-41]⁺, generando los cationes ArNHCHPy⁺, que corresponden al pico de base (Tabla 38).

Estas características se habían observado en estudios anteriores y son comunes en todos los casos (Mikaya *et al.*, 1991).

Como ejemplo, en la Figura 67 se muestra el espectro de masas de la homoalilamina **213**, que tiene un peso molecular de 254.33 g/mol; en este se puede observar el ion molecular con baja intensidad, del 5%, y la pérdida de 41 unidades correspondiente al fragmento alílico para dar el pico base con m/z 213.

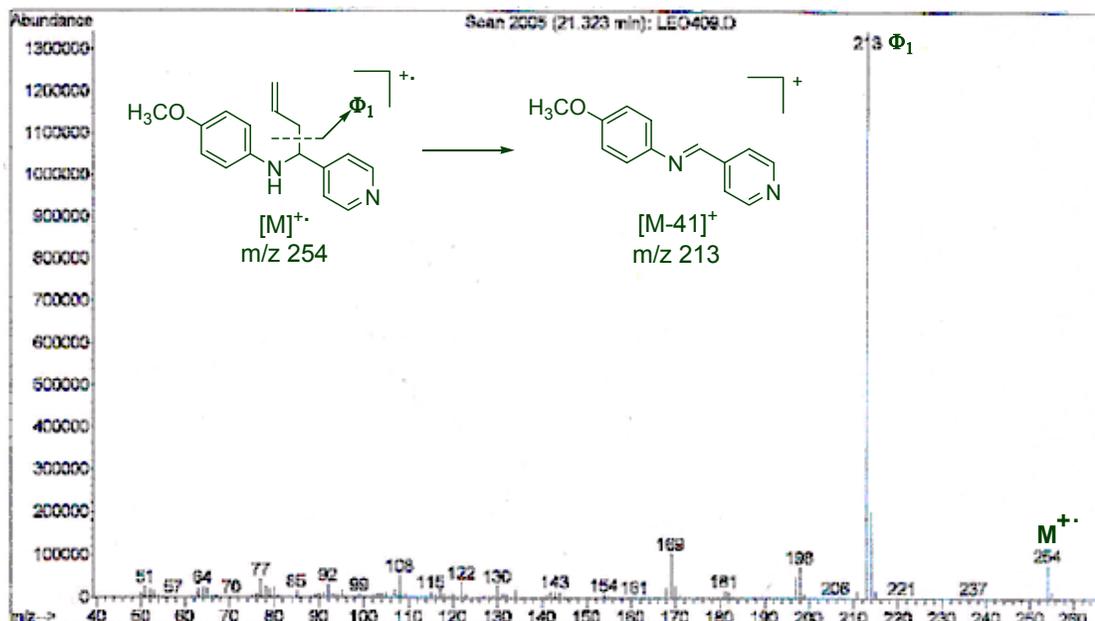
Tabla 38. Posible fragmentación e iones principales en los espectros de masas de las homoalilaminas **211-215**.



Comp.	m/z , (I, %)	
	M^+	Φ_1
		$[M-C_3H_5]^+$
211	224 (3)	183 (100)
212	238 (4)	197 (100)
213	254 (5)	213 (100)
214	302 (5)	261 (100)
215	252 (3)	211 (100)

La confirmación más sólida de la estructura de las homoalilaminas preparadas fueron los análisis de resonancia magnética nuclear. Los espectros de RMN 1H de las homoalilaminas **211-214**, son similares entre sí, y se caracterizan por la presencia de tres grupos de señales en zonas distintas: Protones aromáticos (arílicos, piridínicos), los protones olefínicos (el fragmento $-CH=CH_2$) y los protones alifáticos ($-CH_2$, $-CH$ y los grupos alquilo unidos al anillos aromático).

Figura 67. Espectro de masas y fragmentación principal de la 4-*N*-(4-metoxifenil)-*N*-[1-(4-piridil)buten-3-il]amina (**213**).



En el espectro de RMN ¹H del compuesto **215**, (Figura 68), la primera señal que se observa a campos altos, es la correspondiente a los dos grupos metilos del anillo arílico, como un singulete a 2.15 ppm, entre 2.41-2.62 ppm resuenan los hidrógenos del grupo -CH₂, como un singulete ancho a 4.07 ppm aparece la señal del protón del NH, el hidrógeno del grupo -CH resuena como un doble doblete ($J = 7.7, 5.0$ Hz) a 4.35 ppm. Las señales olefinicas aparecen entre 5.20-5.15 (CH₂=) y 5.65-5.76 (=CH) como multipletes. A 6.08, 6.34, 7.29 y 8.54 resuenan los hidrógenos de los anillos arílico y piridínico respectivamente. En la Tabla 39, se pueden encontrar los corrimientos, multiplicidad, y constantes de acoplamiento para todos los protones de los compuestos **211-215**.

Figura 68. Espectro de RMN ^1H del 4-*N*-(3,5-dimetilfenil)-*N*-[1-(4-piridil)buten-3-il]amina (**215**).

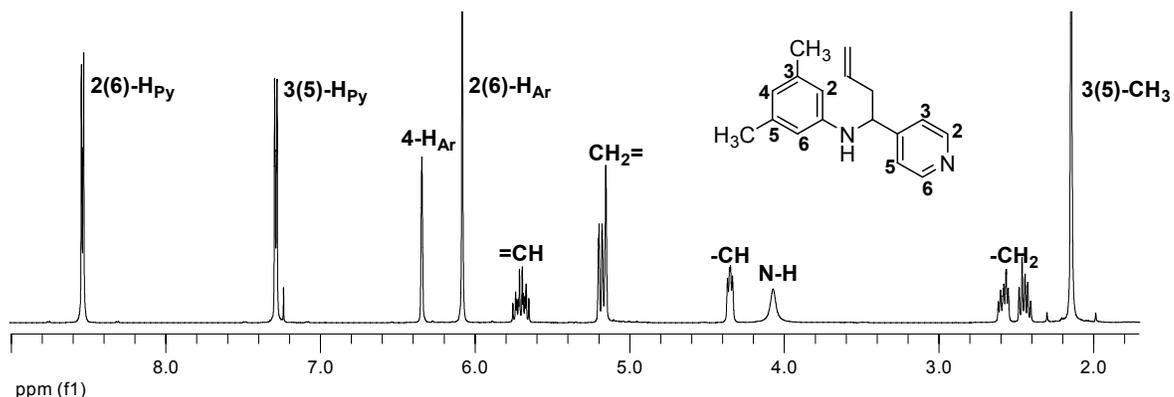


Tabla 39. Datos de caracterización por RMN- ^1H para las 4-*N*-aril-*N*-[1-(4-piridil)buten-3-il]aminas **211-215**.

Comp. N°	Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz)									
	Olefínicos		Otros			Piridínicos		Arílicos		R
	CH ₂ =	=CH	-CH ₂	-CH	N-H	2(6)-H _{Py}	3(5)-H _{Py}	2(6)-H _{Ar}	3(5)-H _{Ar}	
211	5.18-5.24 (m)	5.66-5.80 (m)	2.43-2.66 (m)	4.38 (dd) <i>J</i> = 7.9, 5.0	4.19 (bs)	8.56 (dd) <i>J</i> = 5.0, 1.6	7.31 (dd) <i>J</i> = 4.4, 1.6	6.45 (d) <i>J</i> = 8.5	7.10 (td) <i>J</i> = 7.7, 1.0	4-H _{Ar} 6.69 (t), <i>J</i> = 7.3
212	5.18 (s) 5.21 (d) <i>J</i> = 7.8	5.68-5.78 (m)	2.43-2.64 (m)	4.34 (dd) <i>J</i> = 7.7, 5.0	4.09 (bs)	8.55 (dd) <i>J</i> = 4.6, 1.4	7.31 (dd) <i>J</i> = 4.7, 1.1	6.38 (d) <i>J</i> = 8.4	6.91 (d) <i>J</i> = 8.0	CH ₃ 2.20 (s)
213	5.16 (s) 5.20 (d) <i>J</i> = 6.0	5.67-5.77 (m)	2.41-2.61 (m)	4.29 (dd) <i>J</i> = 8.0, 5.0	-	8.53 (dd) <i>J</i> = 4.5, 1.5	7.29 (d) <i>J</i> = 6.0	6.40 (d) <i>J</i> = 8.9	6.68 (d) <i>J</i> = 8.9	OCH ₃ 3.68 (s)
214	5.17-5.23 (m)	5.63-5.78 (m)	2.42-2.67 (m)	4.34 (m)	4.19 (s)	8.55 (dd) <i>J</i> = 4.4, 1.6	7.27 (dd) <i>J</i> = 3.9, 1.7	6.31 (dd) <i>J</i> = 8.8, 2.0	7.16 (dd) <i>J</i> = 8.8, 2.0	-
215	5.20-5.15 (m)	5.65-5.76 (m)	2.41-2.62 (m)	4.35 (dd) <i>J</i> = 7.7, 5.0	4.07 (s)	8.54 (dd) <i>J</i> = 4.5, 1.5	7.29 (dd) <i>J</i> = 4.7, 1.3	6.08 (s)	7.17 (td) <i>J</i> = 7.4, 1.0	3(5)-CH ₃ 2.15 (s) 4-H _{Ar} 6.34 (s)

En la actualidad los derivados hidrogenados de la quinolina son de especial interés como pesticidas, preservativos químicos, p.ej., las 2,2,4-trimetil-6-etoxi(etil)-1,2-dihidro quinolinas se usan como antioxidantes para estabilizar las drogas veterinarias de tipo lipídico; otros compuestos similares son excelentes inhibidores de la polimerización de las olefinas, los aceites y los plásticos), como intermedios en procesos de síntesis, pero especialmente en la medicina por su

amplio espectro de actividades biológicas. Se han descubierto derivados de la 1,2,3,4-tetrahidroquinolina con actividad analgésica, anticancerígena, anticonceptiva, anticoagulante, antiarrítmica, virúcida, entre otras (Kouznetsov *et al.*, 1998; Gringauz *et al.*, 1997; Lednicer *et al.*, 1984).

Por estas importantes aplicaciones, los químicos orgánicos han desarrollado una amplia variedad de metodologías para obtener este tipo de derivados. Los métodos más generales para obtener las tetrahidroquinolinas envuelven la ciclación intramolecular de derivados sustituidos de anilina o de bencenos monosustituidos, la cicloadición intermolecular [4+2], donde se usan como productos de partida las bases de Schiff y la reducción de sus análogos aromáticos. Las diversas rutas y condiciones se encuentran ampliamente revisadas (Kouznetsov *et al.*, 1998).

Las primeras 4-metil-2-(2-,3-,4-)piridil-tetrahidroquinolinas fueron sintetizadas en 1994 por hidroarilación intramolecular de las 4-*N*-aril-*N*-4-[2(3,4)-piridilbuten-3-il]aminas en condiciones ácidas (Kuznetsov *et al.*, 1994; Vargas 2001). Continuando con estos estudios, se prepararon cinco nuevas tetrahidroquinolinas con el fragmento 4-piridil (Esquema 52).

La síntesis de estos productos consistió en el tratamiento con ácido sulfúrico al 85%, o ácido polifosfórico, de las homoalilaminas (preparadas por el procedimiento de Grignard), disueltas previamente en la mínima cantidad necesaria de diclorometano. La mezcla se calentó con agitación vigorosa a 80-90 °C durante 1-5 horas. La mezcla se enfrió a 0 °C y se llevó a pH 12 por tratamiento con solución acuosa concentrada hidróxido de amonio. Se extrajo con diclorometano y las capas orgánicas se secaron sobre sulfato de sodio. El disolvente se separó y las tetrahidroquinolinas se aislaron por cromatografía de columna sobre alúmina, como sólidos cristalinos (Tabla 40). La reacción de

ciclación de la homoalilamina **215** transcurrió hacia la formación del ácido quinolin-sulfónico **220**.

Esquema 52. Preparación de las 4-metil-2-(4-piridil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolinas **216-219** y el ácido 4,5,7-trimetil-2-(4-piridil)quinolin-8-sulfónico **220**.

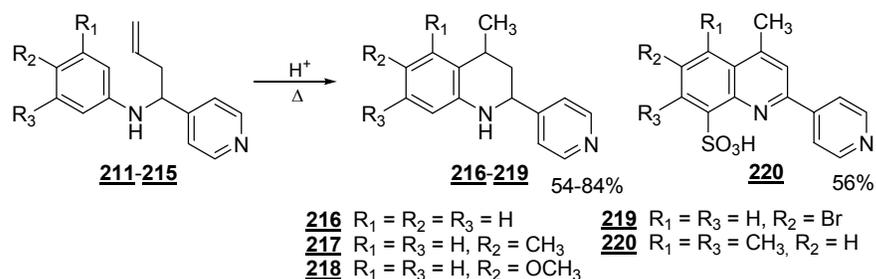


Tabla 40. Constantes físicas y químicas de los productos **216-220**.

Nº	Fórmula Molecular	Estado físico	p.f. (°C)	R (%)	IR (cm ⁻¹) ν _{N-H}	P.M. (g/mol)	t _R (min)
216	C ₁₅ H ₁₆ N ₂	Cristales blancos	88-90	84	3266	224.30	20.06/20.29
217	C ₁₆ H ₁₈ N ₂	Cristales blancos	138-139	72	3299	238.33	21.78/21.84
218	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O	Cristales amarillos	113-115	54	3267	254.33	22.74
219	C ₁₅ H ₁₅ BrN ₂	Cristales amarillos	104-106	68	3256	303.20	23.30/24.05
220	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	Cristales verdes	239-240	56	1265, 1180, 710	328.39	26.06

La estructura de nuevos derivados heterocíclicos **216-219** se estableció por métodos fisicoquímicos. En sus espectros de IR aparece la banda ν_{NH} entre 3256 y 3499 cm⁻¹, que siguen siendo intensas como en sus precursores. En el ácido sulfónico **220** el enlace S=O posee un considerable carácter de enlace sencillo, debido a la unidad estructural -SO₃H, por eso, en su espectro de IR aparecen tres bandas: la tensión asimétrica en 1265 cm⁻¹, la tensión simétrica en 1180 cm⁻¹ y en 710 cm⁻¹ la tensión del S-O.

Los datos de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y de RMN ¹H y ¹³C indican que los compuestos **216-219** se formaron como mezcla de

dos isómeros geométricos. Estos diaestereoisómeros se derivan de la diferente orientación espacial (*cis*- y *trans*-) de los sustituyentes en las posiciones C-2 y C-4.

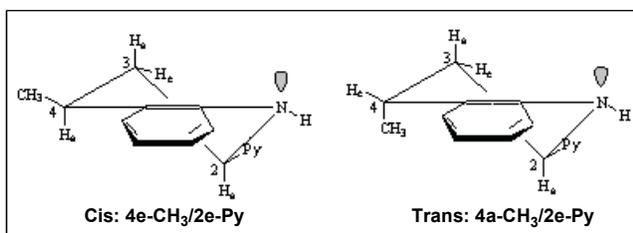
Los cromatogramas de estos compuestos mostraron la formación preferencial de uno de los isómeros (Tabla 41), y los espectros de RMN ^1H indicaron que el diaestereoisómero *cis*, es el mayoritario.

Tabla 41. Relación en % de los isómeros *cis/trans* de las tetrahydroquinolinas **216-219**.

N°	216	217	218	219
Isómero <i>Cis</i>	68	79	88	91
Isómero <i>Trans</i>	32	21	12	9

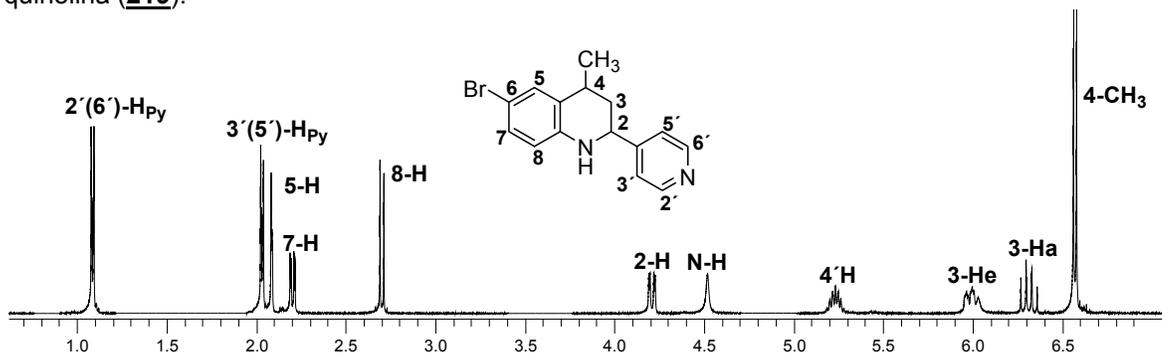
Las dos formas diferentes (*cis*-, *trans*-) ya habían sido evidenciadas en los estudios de RMN- ^1H de moléculas similares (Garbarino 2004). En dichos estudios también se estableció que las tetrahydroquinolinas 2,4-disustituidas existen básicamente en conformación de “semi-silla”. Según los datos de RMN- ^1H , los isómeros *cis*-ee son mayoritarios, especialmente cuando el sustituyente en C-2 es un anillo (hetero)aromático (Kuznetsov *et al.*, 1994; Vargas 2001). Nuestros resultados están de acuerdo con este estudio. Los isómeros se pueden representar como se muestran en la Figura 69.

Figura 69. Representación espacial de los isómeros *cis*-2e,4e, *trans*-2e,4a de las tetrahydroquinolinas.



En los espectros de RMN de ^1H de los productos finales se pueden encontrar las señales características que genera el anillo tetrahydroquinolínico. Para el caso del isómero *cis* de la 6-bromo-4-metil-(4-piridil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolina **219** (Figura 70), los hidrógenos del grupo metilo, unido al carbono C-4, resuenan a 1.33 ppm como un doblete ($J = 6.8$ Hz); a 1.67 y 2.09 ppm aparecen los hidrógenos de las disposiciones axial y ecuatorial del carbono C-3 como un cuatriplete ($J = 11.5$ Hz) y un triplete ($J = 13.1$ Hz); el protón enlazado al carbono C-4 resuena como un septeto ($J = 6.4$ Hz) a 3.10 ppm; a 4.05 ppm aparece un singulete ancho, asignado al protón del NH; el hidrógeno unido al carbono C-2 resuena a 4.46 ppm como un doble doblete ($J = 11.2, 2.9$ Hz). Las señales correspondientes a los protones aromáticos, arílicos y piridínicos aparecen en el rango de 6.45-8.59 ppm.

Figura 70. Espectro de RMN ^1H del isómero *cis* de la 6-bromo-4-metil-2-(4-piridil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolina (**219**).

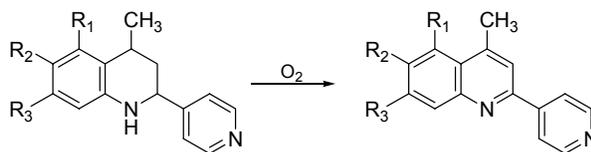


Los desplazamientos, multiplicidad y constantes de acoplamiento para los isómeros *cis* de las tetrahydroquinolinas **216-219** se pueden encontrar resumidos en la Tabla 42.

En los análisis de CG-EM de los crudos de reacción de todas las ciclaciones, se encontró la señal de un compuesto ($< 10\%$) con cuatro unidades de masa menos, que el correspondiente al de las tetrahydroquinolinas; la explicación más razonable para la formación de estos productos, es la oxidación, por acción del oxígeno del

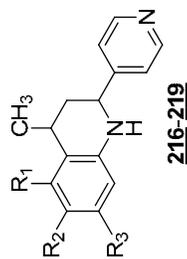
aire, del anillo tetrahydroquinolínico, formándose como producto secundario las quinolinas aromáticas (Figura 71).

Figura 71. Quinolinas formadas en el proceso de ciclación de las homoalilaminas **211-214**.



La accesibilidad de los productos de partida hizo posible la obtención de nuevas tetrahydroquinolinas con el fragmento piridil en posición C-2, no descritos en la literatura química.

Tabla 42. Datos de caracterización por RMN-1H para los isómeros *cis* de las 4-metil-2-(4-piridil)-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas **216-219**.



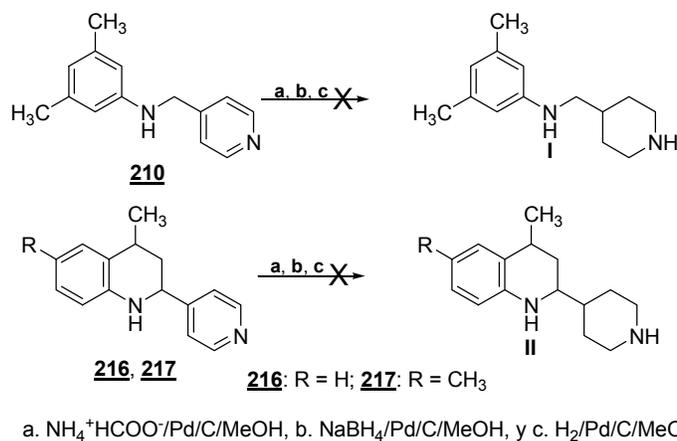
216 R₁ = R₂ = R₃ = H
217 R₁ = R₃ = H, R₂ = CH₃
218 R₁ = R₃ = H, R₂ = OCH₃
219 R₁ = R₃ = H, R₂ = Br

Comp.	Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento (Hz)													R
	Tetrahidroquinolinos													
	2-H	3-Ha	3-He	4-H	4-CH ₃	N-H	5-H	6-H	7-H	8-H	2(6)-H _{Py}	3(5)-H _{Py}		
216	4.47 (dd) J = 11.3, 2.8	1.70 (q) J = 12.7	2.11 (ddd) J = 12.9, 4.3, 3.0	3.13 (sp) J = 6.0	1.34 (d) J = 6.8	4.00 (s)	7.18 (d) J = 7.7	6.74 (td) J = 7.4, 0.9	7.03 (t) J = 7.6	6.56 (dd) J = 7.9, 0.9	7.35 (dd) J = 4.7, 1.3	8.58 (dd) J = 4.5, 1.5	-	
217	4.43 (dd) J = 11.3, 2.6	1.69 (q) J = 11.6	2.10 (ddd) J = 12.9, 5.3, 2.1	3.12 (sp) J = 6.6	1.34 (d) J = 6.8	3.86 (s)	7.00 (s)	-	6.86 (d) J = 8.0	6.50 (d) J = 8.0	7.35 (dd) J = 4.5, 1.4	8.58 (dd) J = 4.4, 1.6	6-CH ₃ 2.26 (s)	
218	4.40 (dd) J = 11.2, 2.3	1.69 (q) J = 11.6	2.11 (ddd) J = 13.0, 5.5, 2.7	3.13 (sp) J = 6.3	1.33 (d) J = 6.8	-	6.79 (d) J = 2.7	-	6.65 (dd) J = 8.6, 2.8	6.56 (d) J = 8.6	7.36 (dd) J = 4.6, 1.6	8.58 (dd) J = 4.6, 1.6	OCH ₃ 3.76 (s)	
219	4.46 (dd) J = 11.2, 2.9	1.67 (q) J = 11.5	2.09 (bt) J = 13.1	3.10 (sp) J = 6.4	1.33 (d) J = 6.8	4.05 (bs)	7.27 (d) J = 2.2	-	7.11 (dd) J = 8.5, 2.3	6.45 (d) J = 8.5	7.34 (dd) J = 4.4, 1.6	8.59 (dd) J = 4.5, 1.6	-	

5.4 Estudio sintético hacia nuevas tetrahydroquinolinas C-2 γ -piperidinil sustituidas

El último paso de síntesis en esta investigación fue la hidrogenación del anillo piridínico para intentar obtener los sistemas de la *N*-(piperidin-4-ilmetil)anilina **I** y la 4-metil-2-(piperidin-4-il)-1,2,3,4-tetrahydroquinolina **II**. Sus precursores (las aminas **210**, **216** y **217**) se sometieron a reducción con los sistemas: $\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-/\text{Pd}/\text{C}/\text{MeOH}$, $\text{NaBH}_4/\text{Pd}/\text{C}/\text{MeOH}$, y $\text{H}_2/\text{Pd}/\text{C}/\text{MeOH}$ (Esquema 53). Según los análisis de CG-EM todas estas reacciones solo condujeron a la descomposición de los sustratos.

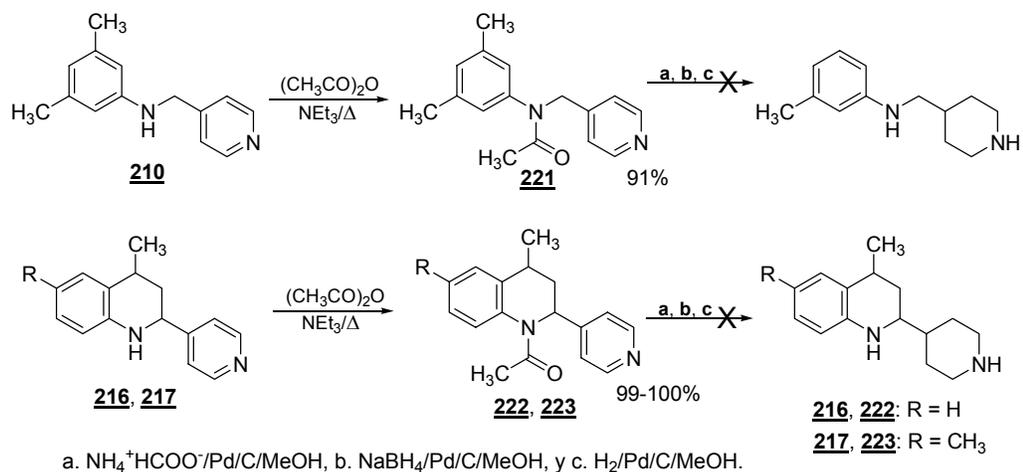
Esquema 53. Intentos de reducción del anillo piridínico a partir de los sustratos **210**, **216** y **217**.



Se procedió entonces a proteger los grupos amino, se prepararon las acetamidas **221**, **222**, y **223**, por acilación con anhídrido acético a reflujo de la amina **210** y las tetrahydroquinolinas **216** y **217**. Estas amidas se obtuvieron con muy altos rendimientos, del 91, 99 y 100%, respectivamente (Esquema 54).

Teniendo protegido el nitrógeno se realizaron nuevamente los intentos de reducción con los mismos sistemas del Esquema anterior, pero de igual forma solo se obtuvieron compuestos de degradación.

Esquema 54. Preparación de las amidas **221**, **222** y **223**, e intentos de reducción del anillo piridínico a partir de éstas.



6. PROSPECCIÓN BIOLÓGICA DE LAS NUEVAS MOLÉCULAS OBTENIDAS. BÚSQUEDA DE NUEVOS AGENTES TERAPÉUTICOS

6.1 Antecedentes

Los medicamentos pueden ser considerados los milagros de la modernidad. Estos clusters de átomos altamente estructurados, y relativamente pequeños, son los principales agentes terapéuticos de la medicina moderna. Muchas de las “moléculas milagro” pueden salvar vidas humanas, prolongar la vida, aliviar el dolor y el sufrimiento, al tiempo que se obtienen ganancias, por su venta, de billones de dólares por año; el desarrollo de cada uno de ellos es arduo y costoso, con enormes inversiones en su desarrollo, pero también con grandes beneficios.

Los fármacos modernos han sido obtenidos principalmente de fuentes naturales y por síntesis de laboratorio. La compleja y diversa maquinaria biosintética produce sustancias que son usadas directamente o como intermedios avanzados que al ser manipulados por los químicos, conducen a incrementos y mejoramiento en sus actividades.

En el curso del descubrimiento de un nuevo compuesto cabeza de serie, para generar nuevos candidatos a fármacos, se inventan, desarrollan y expanden dramáticamente otros campos: las plataformas tecnológicas, computacionales, las ciencias bioquímicas y biomédicas, y en especial, la invención de rutas y metodologías sintéticas versátiles para lograr el entendimiento de la arquitectura de las moléculas orgánicas, y los principios generales que gobiernan sus estructuras. La optimización de los perfiles farmacológicos requiere de un gran

número de análogos, que deben ser preparados por caminos efectivos de síntesis orientados a la diversidad. La búsqueda de compuestos bioactivos es el punto de partida para el proceso de descubrimiento de los fármacos, y es una necesidad ineludible e inaplazable en respuesta a las enfermedades para las cuales la terapéutica existente no resulta eficiente, o es inexistente.

Para enfrentar la búsqueda de compuestos bioactivos se requiere:

una actividad biológica blanco, y una vez seleccionada, se necesita de la participación de dos componentes indispensables:

- compuestos a ser ensayados
- bioensayos apropiados a ser utilizados.

Para realizar el trabajo que se reseña en esta investigación, se seleccionaron como blanco terapéutico: i) las infecciones fúngicas en humanos, ii) la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, iii) actividad antioxidante.

Los ensayos de actividad antimicótica fueron realizados durante la pasantía doctoral en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional del Rosario en Rosario-Argentina, bajo la dirección de la Dra. Susana Zacchino. Los estudios de actividad antioxidante e inhibición de la enzima acetilcolinesterasa fueron realizados en el LQOBio, implementando las técnicas en el caso de la inhibición enzimática y desarrollando una nueva para el atrapamiento del radical ABTS. A continuación detallamos el modo de realización de estos estudios y los resultados obtenidos.

6.2 Actividad fungicida

6.2.1. Importancia de la búsqueda de compuestos antifúngicos. Los hongos están presentes en el aire, en el suelo y también en el tracto gastrointestinal de los humanos y animales. Usualmente no causan serios problemas, porque el sistema natural de defensa del organismo es capaz de combatirlos. Sin embargo, existe un gran número de enfermos con el sistema inmune deficiente y muchas infecciones ponen en riesgo su vida, particularmente, los pacientes tratados con quimioterapias agresivas contra la leucemia y ciertos tipos de cáncer, los que se someten a trasplantes de órganos, los enfermos de SIDA y los recién nacidos prematuros, entre otros. A pesar de que la medicina ha conseguido aumentar la vida de estos pacientes, un gran número de estos individuos sufren infecciones fúngicas que los llevan a la muerte.

El incremento de la cantidad de enfermos inmuno-comprometidos ha aumentado notoriamente en los últimos años (San Blas *et al.*, 2004; Richardson 1994; Chung *et al.*, 1998). Este continuo aumento de la incidencia de infecciones fúngicas, junto con el incremento gradual en la resistencia a los tratamientos en uso actual hace necesario encontrar nuevos compuestos antifúngicos. Como consecuencia, se está realizando considerable esfuerzo en la búsqueda de nuevos compuestos líderes, con mecanismos de acción definidos, que pueden servir como punto de partida para el desarrollo de nuevos antifúngicos más seguros y más potentes que los usados actualmente (Fostel *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004).

6.2.2. Características de los hongos causantes de infecciones fúngicas en humanos. Los hongos son organismos eucariotes, heterótrofos, cuyas células, a diferencia de las células de mamíferos, presentan paredes celulares (San Blas *et al.*, 2004). Desde el punto de vista estructural, los hongos se pueden dividir en dos tipos morfológicos básicos: levaduras y hongos filamentosos. Esta división no es

estática, ya que algunos hongos son dimórficos, es decir pueden cambiar su morfología entre filamentosos y levaduriformes, dependiendo de las condiciones ambientales (Kurtzman *et al.*, 1998).

-Hongos levaduriformes

Las levaduras son células sencillas, ovales o redondas, de 2 a 10 μm de diámetro que están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se encuentran tanto en frutas, granos, miel y otros alimentos, como en el suelo, aire, piel y mucosas de mamíferos (Figura 72.a). Existen más de 600 especies conocidas de levaduras, distribuidas en 60 géneros taxonómicos, de las cuales sólo aprox. 20 son capaces de producir enfermedades en humanos y animales. Dentro de ellas, las más aisladas como agentes causantes de infecciones fúngicas en el hombre está la *Candida albicans*, y otras especies del género *Candida* (*C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, etc) y el *Cryptococcus neoformans* (Kurtzman *et al.*, 1998).

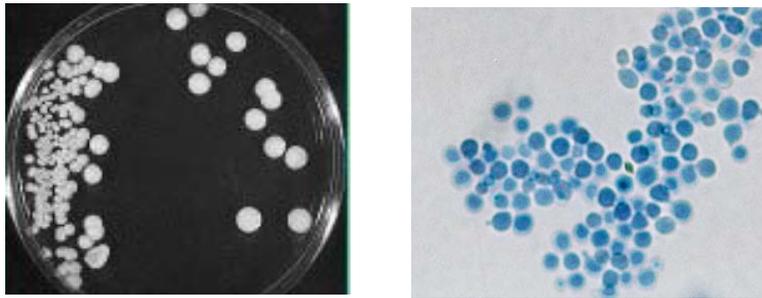
-Hongos filamentosos

Las unidades fundamentales de estos hongos son estructuras filiformes llamadas hifas, que en conjunto forman un micelio. Generalmente las hifas son multinucleadas, de 2 a 30 μm de diámetro pudiendo llegar a tener varios cientos de micrómetros de longitud (Figura 72.b) (Saral 1991). Los hongos filamentosos más importantes como productores de infecciones en humanos son los del género *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus* y *A. fumigatus*) y un grupo de hongos pertenecientes a los géneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum*, que se conocen en conjunto como dermatofitos (San Blas *et al.*, 2004). Del género *Trichophyton*, las especies más comúnmente aisladas en humanos son *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, mientras que del género *Microsporum* son dos las especies que afectan al hombre: *M. canis*, que se hospeda principalmente en animales

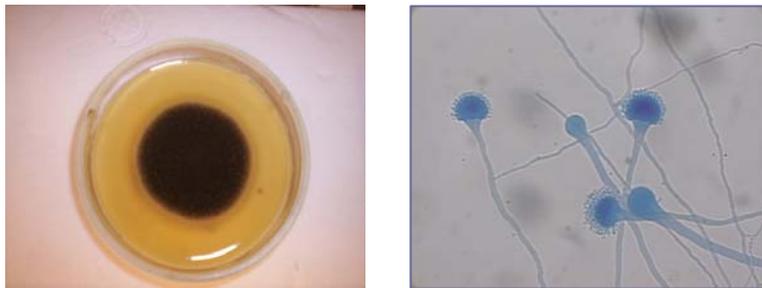
(gatos y perros) y *M. gypseum*, que se encuentra en el suelo. Del género *Epidermophyton*, el *E. floccosum* es el dermatofito más aislado de infecciones fúngicas en humanos (Weitzmann *et al.*, 1995).

Figura 72. Imágenes de macro y micromorfología de los hongos observados a ojo desnudo y con microscopio óptico (400x): a) levaduras, b) hongos filamentosos.

a) *Candida sp.*

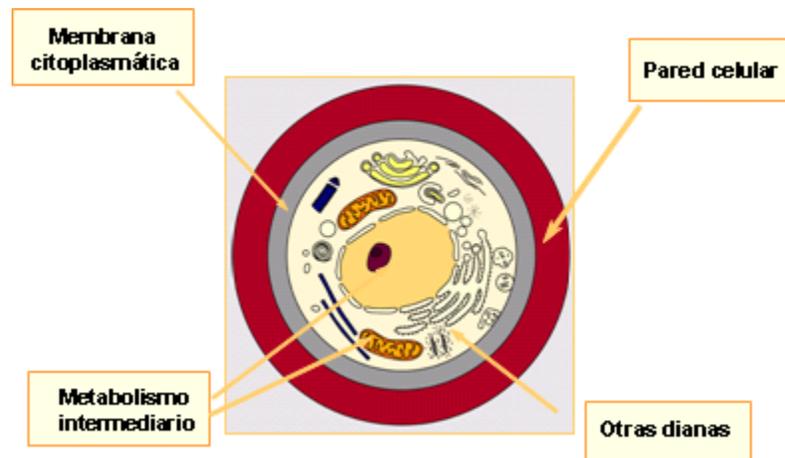


b) *Aspergillus sp.*



6.2.3. Estructuras y mecanismos de acción de los principales antifúngicos en uso clínico. En la Figura 73 se presenta un esquema simplificado de la célula fúngica, donde se indican los principales blancos de acción de los antifúngicos disponibles en clínica. Los principales blancos celulares y algunos ejemplos de antifúngicos actualmente utilizados para el control de las micosis en plantas y en humanos se darán a continuación.

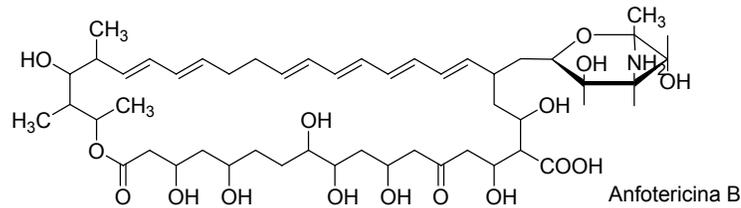
Figura 73. Esquema de la célula fúngica con los principales blancos de ataque de agentes antifúngicos.



6.2.3.1. La membrana celular. La misma funciona como una barrera de permeabilidad, regulando el transporte de pequeñas moléculas y la transmisión de señales. Dado que los esteroides presentes en ella son similares a los presentes en células de mamíferos, muchos de los antifúngicos en uso actual interactúan con ellos o inhiben su síntesis. Como ejemplos se puede mencionar a:

i) **Los polienos:** Los más importantes son la anfotericina B (Figura 74) y la nistatina, estos fármacos interactúan con ergosterol de las membranas, formando canales en ella, con el consecuente aumento de la permeabilidad a cationes univalentes ocasionando la muerte celular (Denning 2004). Ambos compuestos han mostrado toxicidad, pero es particularmente importante en la anfotericina B. Este polieno, que después de 30 años de uso aun es el fármaco de elección para muchas micosis sistémicas, es extremadamente tóxico para humanos, produciendo neurotoxicidad (Groll *et al.*, 1998).

Figura 74. Estructura de la anfotericina B.



ii) Los azoles: interaccionan con el citocromo P-450, inhibiendo la desmetilación en carbono 14 de lanosterol, precursor de ergosterol, como consecuencia de esta inhibición, se produce acumulación de lanosterol, el cual es incapaz de reemplazar al ergosterol en la membrana citoplasmática, produciendo cambios en la permeabilidad celular, en la estructura de la membrana y en la actividad de sus enzimas, resultando en la inhibición del crecimiento celular (Li *et al.*, 2004; Barrett-Bee *et al.*, 1992).

Los primeros azoles desarrollados fueron los imidazoles (ketoconazol, miconazol y clotrimazol) (Figura 75), los cuales mostraron serios efectos secundarios tales como: inhibición de la biosíntesis de hormonas sexuales, y toxicidad hepática (Barrett-Bee *et al.*, 1992). Luego se desarrollaron los triazoles: fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol (Di Domenico 1999) (Figura 76), los cuales ganaron mucha notoriedad entre todos los agentes antifúngicos, debido a su reducida toxicidad, respecto de los imidazoles, y la posibilidad de múltiples formas de administración. Sin embargo, la resistencia a triazoles está informada cada vez con más frecuencia, especialmente contra especies de *Candida*. Otro problema de los azoles es que son fungistáticos y no fungicidas produciendo recurrencias (Kelly *et al.*, 1995).

Figura 75. Estructuras de algunos imidazoles.

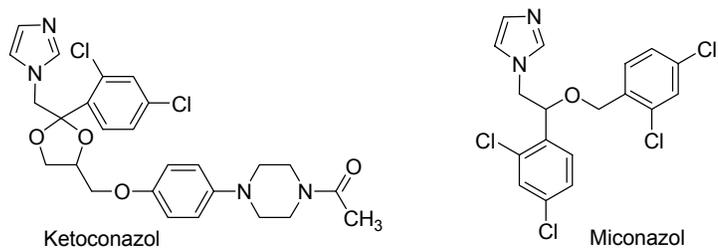
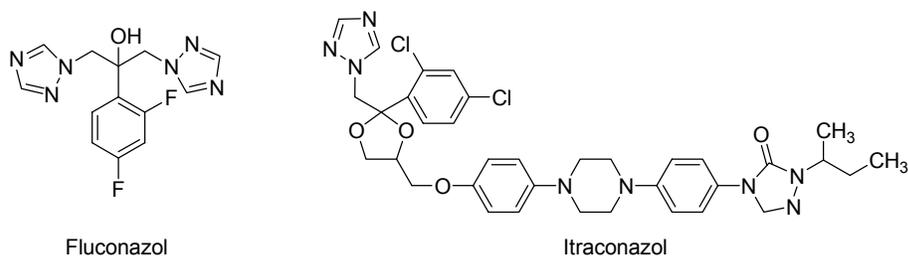
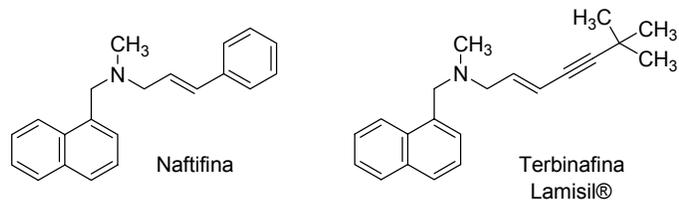


Figura 76. Estructuras de algunos triazoles.



iii) Las alilaminas: las más importantes de este grupo son la naftifina y la terbinafina (Figura 77), inhiben la escualeno epoxidasa, resultando en la depleción de ergosterol y la acumulación de esteroides tóxicos en la membrana (Fostel *et al.*, 2000).

Figura 77. Estructuras químicas de alilaminas.

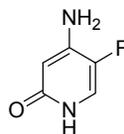


A pesar de que estos fármacos son selectivos, ya que la enzima fúngica es varios órdenes de magnitud menos sensible que la de hongos a la inhibición por alilaminas, se han reportado serios problemas gastrointestinales (3-4%), y alergias

(1%) como efectos secundarios (Barrett-Bee *et al.*, 1992; Oehlschlager *et al.*, 2002).

6.2.3.2. Síntesis de ADN y de proteínas. Los agentes que actúan interfiriendo con la síntesis y función del ADN y el ARN (Fostel *et al.*, 2000), son análogos estructurales de nucleosidos. La 5-fluorocitosina (Figura 78), el antifúngico más usado de esta clase de compuestos, es una pirimidina fluorada que altera el metabolismo normal de las células fúngicas induciendo la síntesis defectuosa de los ácidos nucleicos.

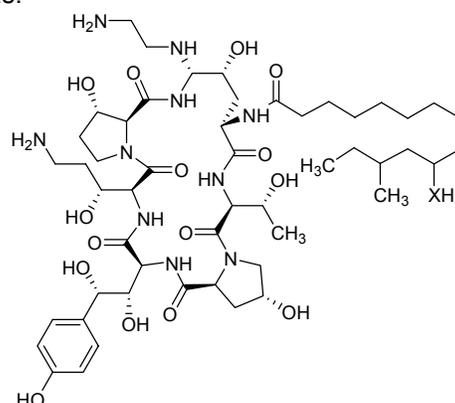
Figura 78. Estructura de la 5-fluocitosina.



6.2.3.3. La pared celular fúngica. La pared celular fúngica actúa como barrera protectora, evita la ruptura osmótica y confiere forma; es esencial para el crecimiento y viabilidad del hongo (Selitrennikoff 1995). Dado que la pared está completamente ausente en las células de mamíferos, los antifúngicos que actúan por este mecanismo son selectivos, ya que no modifican ningún sistema bioquímico del huésped, resultando muy atractivos para su uso en clínica (Pérez *et al.*, 2004). Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de β -(1,3)-glucano y de quitina, polímeros esenciales para la estructura de la pared fúngica, debido a la inhibición de la enzima 1,3- β -glucanosintetasa, ocasionando la lisis celular. Entre los antifúngicos cuyo blanco de acción es la pared se pueden mencionar a las equinocandinas (Letscher-Bru *et al.*, 2003; Chandrasekar *et al.*, 2002; Bartizal *et al.*, 1997; Bouza *et al.*, 2002; Deresinski *et al.*, 2003; Keating *et al.*, 2001; Petraitiene *et al.*, 2002). Se trata de lipopéptidos derivados de un producto aislado del caldo de cultivo del hongo *Glarea lozoyensis*, que se encontró

en una muestra de agua de una charca cercana al río Lozoya en España. Para uso en clínica humana han sido desarrollados tres compuestos semi-sintéticos a partir de la molécula original: la anidulafungina (LY303366 y VER-002), la micafungina (FK463), y la caspofungina (MK0991). Los dos primeros se hallan en Fase III de ensayos clínicos en situaciones de candidiasis. La caspofungina (Figura 79) fue la primera equinocandina aprobada por la *Federal Drug Administration* y la Agencia Europea del Medicamento, para el tratamiento de la aspergilosis invasora en pacientes que no responden o no toleren el tratamiento antifúngico convencional, y para la candidiasis invasora en adultos no neutropénicos. Es un fármaco altamente embriotóxico en ratas y conejos.

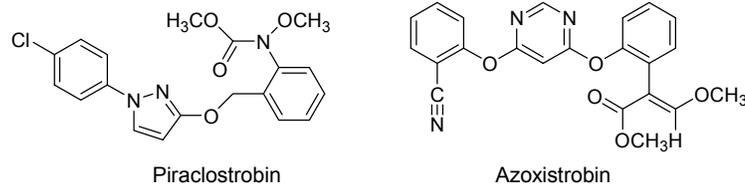
Figura 79. Estructura base de las equinocandinas.



50 g - 336 U\$ (en Estados Unidos)

6.2.3.4. La respiración mitocondrial. Algunos fungicidas utilizados en plantas actúan a nivel de este blanco, actúan como inhibidores del transporte de electrones (estrobilurinas), y son los fungicidas de última generación utilizados contra hongos fitopatogénicos (Figura 80). Bloquean la transferencia de electrones a nivel del complejo bc_1 de la cadena de transporte de electrones (Fostel *et al.*, 2000).

Figura 80. Estructura de dos estrobilurinas.



La similitud de los aspectos bioquímicos entre el hombre y los hongos ha hecho que la búsqueda de fármacos antifúngicos seguros y efectivos se haya dificultado enormemente. A pesar del progreso considerable en la terapia de antifúngicos, subsisten todavía muchos problemas sin resolver; Todos los fármacos en uso clínico presentan alguna de las siguientes desventajas:

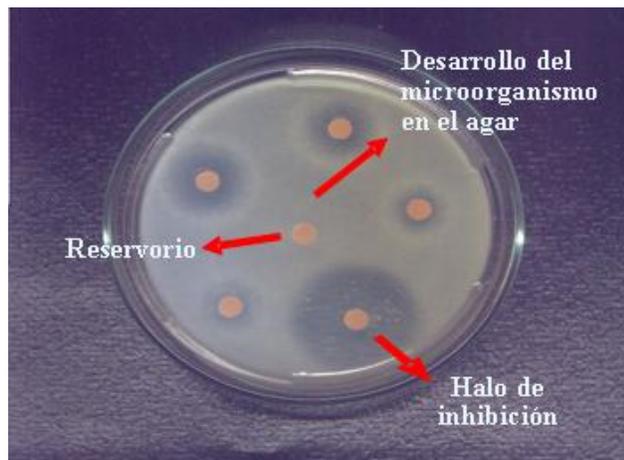
- a) no poseen amplio espectro de acción;
- b) no son selectivas para el hongo sino que producen bloqueos metabólicos al propio huésped produciendo toxicidad;
- c) inhiben el crecimiento (fungistáticas) pero no matan al hongo (fungicidas) produciendo recurrencia;
- d) llevan al desarrollo de resistencia.

Por estas razones existe un consenso general de la necesidad de nuevos compuestos antifúngicos que en lo posible actúen por un mecanismo de acción selectivo, los cuales pueden ser alternativas para el desarrollo de nuevas drogas antifúngicas más efectivas y en lo posible más seguras para el tratamiento de las infecciones fúngicas tan difíciles de erradicar (San Blas *et al.*, 2004; Onishi *et al.*, 2000).

6.2.4. Bioensayos para determinar actividad antifúngica. Para la detección de esta actividad, existen dos métodos generales, los moleculares y los celulares, pero los métodos más comunes son los bioensayos con células enteras, estos se clasifican en: a) de difusión; b) bioautográficos y c) de dilución.

6.2.4.1. Métodos de difusión. En estos métodos el compuesto a probar, contenido en un reservorio (discos de papel, agujeros en el medio de cultivo ó cilindros sobre su superficie), se pone en contacto con un medio sólido (por ej. agar) inoculado con un hongo determinado. Luego de un tiempo adecuado de incubación, se mide el diámetro o el radio de la zona clara (donde no hubo crecimiento fúngico) alrededor del reservorio (Figura 81).

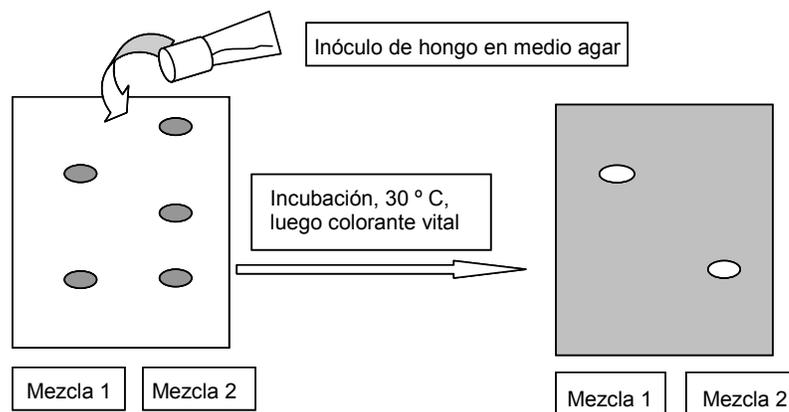
Figura 81. Método de difusión en agar con discos de papel.



La información que brinda es cualitativa, útil para determinar la sensibilidad del microorganismo a un determinado compuesto, pero no para establecer comparaciones de la potencia antifúngica de distintos compuestos.

6.2.4.2. Métodos bioautográficos. La bioautografía es un método cualitativo útil para la localización de compuestos antifúngicos en un cromatograma de un extracto o mezclas complejas. En la bioautografía en capa de agar, un medio de agar previamente inoculado con el hongo prueba es aplicado sobre la placa cromatográfica ya desarrollada. Los compuestos se difunden al agar y las zonas de inhibición del crecimiento son visualizadas con un colorante vital (Figura 82) (Rahalison *et al.*, 1991). Esta metodología es usada con hongos de crecimiento rápido entre los cuales se encuentran *Candida albicans* (San Blas 1991), *Cryptococcus neoformans* (Orabi *et al.*, 1991), *Saccharomyces cerevisiae* (Majinda *et al.*, 2001), *Aspergillus fumigatus* y *A. niger* (Magalhaes *et al.*, 2001).

Figura 82. Método bioautográfico en capa de agar.

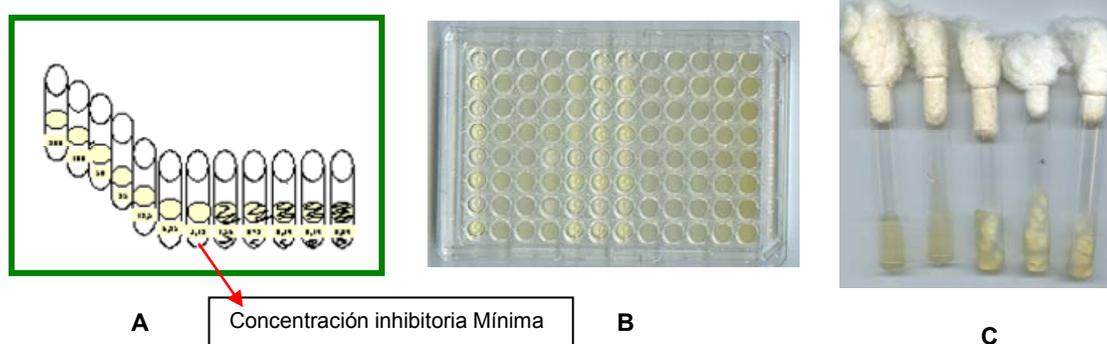


6.2.4.3. Métodos de dilución. En este tipo de métodos, las diluciones de la muestra a evaluar se mezclan homogéneamente con un medio sólido (dilución en agar) ó líquido (dilución en caldo) al cual se le agrega un inóculo con el hongo a probar. Se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la menor concentración a la cual se inhibe totalmente el crecimiento del microorganismo (Figura 83). De acuerdo con los volúmenes finales de trabajo, el método se puede

clasificar en macro ó microdilución. Tienen la ventaja de ser cuantitativos y de poder ser usados tanto con muestras solubles en hidro- y lipofílicas.

Las pruebas pueden ser extendidas para proveer información sobre la concentración fungicida mínima (CFM), que es la mínima concentración a la que produce la muerte del hongo (Vanden Berghe *et al.*, 1991). Su determinación da una información adicional a la que proporciona la CIM.

Figura 83. Distintos tipos de métodos de dilución: A) macrodilución en caldo; B) microdilución en caldo; C) macrodilución en agar.

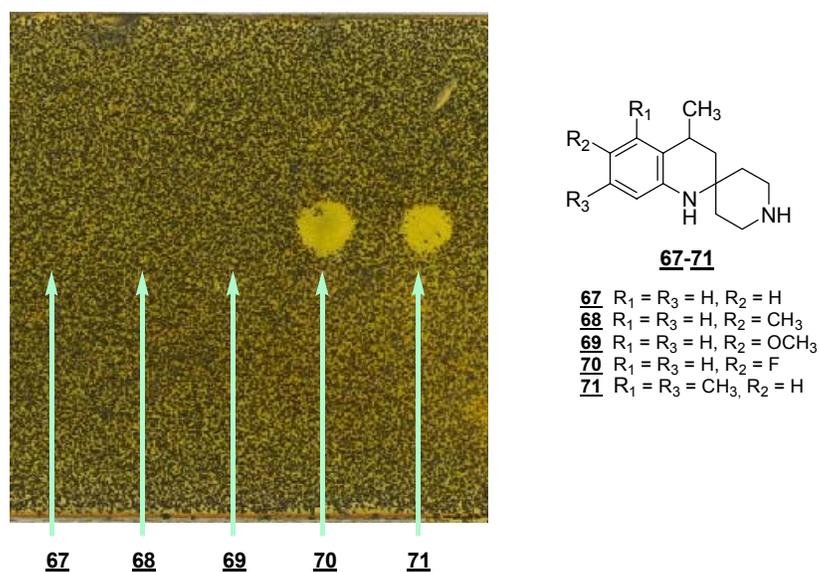


6.2.5. Resultados de los bioensayos para determinar la actividad antifúngica

6.2.5.1. De los ensayos bioautográficos. Al abordar el análisis de casi una centena de compuestos, lo primero que determinó fue la sensibilidad de las levaduras frente a los derivados piperidínicos y piridínicos, utilizando el *Cryptococcus neoformans* en ensayos bioautográficos. Para esto, se sembraron 10 μ L de una solución de 10 μ g/mL, de todos los compuestos, en placas de capa fina. Las placas se sometieron a esterilización con luz UV durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se vertió el inóculo (suspensión del hongo en agar con una concentración de 1×10^5 células/mL) de forma homogénea en toda la placa, y se dejó en incubación a 30 °C durante un día. Se procedió a rociar con el colorante

vital MTT, (cloruro de metiltiazoliltetrazolio), a una concentración de 1 mg/mL. Este compuesto de color amarillo se convierte en formazán, intensamente coloreado de azul, por esto, en las zonas en que el hongo está metabólicamente activo, se observa un halo amarillo producido por el compuesto que inhibe el desarrollo fúngico, sobre un fondo azul. En la Figura 84 podemos observar la placa para la serie de dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolinas] **67-71**.

Figura 84. Actividad antifúngica por bioautografía de los compuestos **67-71**, frente a *C. neoformans*, sobre placa de CCF a 10 µg/mL.

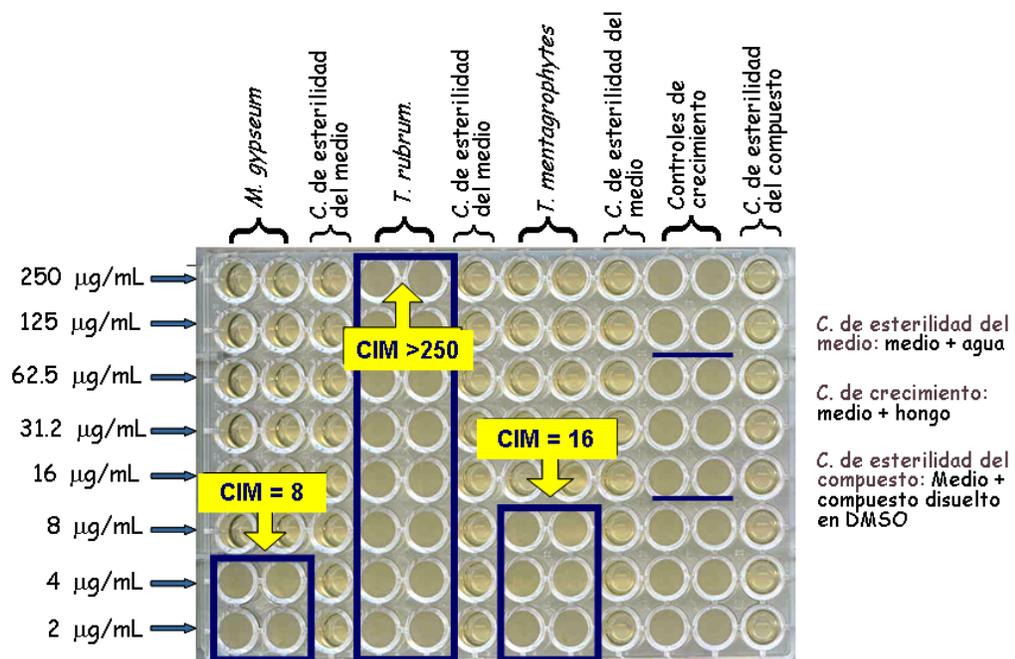


Si bien los resultados de este tipo de experimentos son cualitativos, en las placas realizadas para los derivados piperidínicos muy pocos compuestos mostraron inhibición del crecimiento del hongo, indicando poca o nula actividad, caso contrario al comportamiento de las piridinas, que en todos los casos mostraron el halo amarillo, indicativo de una actividad apreciable.

6.2.5.2. Determinación de las CIM. Usando la metodología de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos, y siguiendo los lineamientos del Comité Nacional

de Estándares para Laboratorios Clínicos (USA) para levaduras el protocolo M27-A2 (NCCLS, 2002-a) y para hongos filamentosos el M38A (NCCLS, 2002-b), se obtuvieron los valores para las concentraciones inhibitorias mínimas. Esta técnica de screening es muy útil porque requiere poca cantidad de muestra y es bastante más económica y rápida que las otras mencionadas. Para cuantificar el valor de la CIM las muestras se disolvieron en DMSO a una concentración de 12.5 mg/mL y se redisolieron en medio Saboreau hasta una concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Con esta solución se realizaron las diluciones seriadas en el medio de cultivo, tal como se muestra en la Figura 85.

Figura 85. Determinación de la CIM.

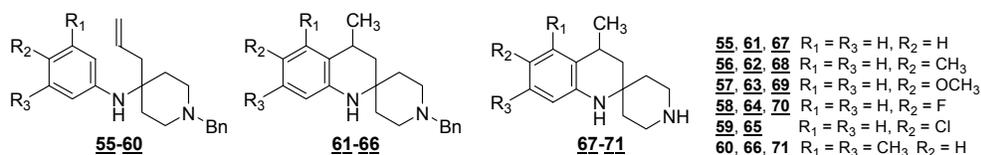


A la microplaca conteniendo las diluciones, se le agregó el inóculo con concentración de 1×10^4 - 1×10^6 UFC/mL (UFC: unidades formadoras de colonias). En cada una de las placas se realizaron tres blancos: de esterilidad del medio de cultivo, de crecimiento fúngico y de esterilidad del compuesto. Las placas se

incubaron en cámara oscura y húmeda a 30°C durante dos días para las levaduras y de 5-15 días para los hongos filamentosos, dependiendo del crecimiento en la cubeta control.

Los compuestos usados en clínica: Ketoconazol (Ket.), Anfotericina B (Anf.), Terbinafina (Terb.), Fluconazol (Flu.), Voriconazol (Vor), Itraconazol (Itr.), y 5-Fluocitosina (5-Flu) fueron usados como controles positivos. Las CIM y CFM obtenidas con los paneles de hongos levaduriformes y filamentosos se recogen en las Tablas 43-52 mostradas a continuación.

Tabla 43. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos **55-71** frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos.



N°	Actividad (CIM $\mu\text{g/mL}$)									
	<i>Ca</i> ¹	<i>Cr</i> ²	<i>Sc</i> ³	<i>Cn</i> ⁴	<i>Afu</i> ⁵	<i>Af</i> ⁶	<i>An</i> ⁷	<i>Mg</i> ⁸	<i>Tr</i> ⁹	<i>Tm</i> ¹⁰
55	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	250	250	250
56	>250	>250	>250	250	>250	>250	>250	62.5	125	125
57	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
58	>250	>250	>250	125	>250	>250	>250	62.5	62.5	62.5
59	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
60	>250	>250	>250	125	>250	>250	>250	125	125	250
61	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
62	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
63	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
64	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
65	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	125	125	125
66	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
67	250	250	250	>250	>1000	>1000	>1000	500	500	500
68	>250	>250	250	250	>1000	>1000	>1000	500	250	250
69	250	250	250	250	>1000	>1000	>1000	250	250	250
70	>250	>250	>250	250	>1000	>1000	>1000	500	500	500
71	250	250	250	250	>1000	>1000	>1000	500	250	250
Amp.	1	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	-	-	-
Ket.	0.5	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.25	0.05	0.025	0.025
Terb.	-	-	-	-	-	-	-	0.04	0.01	0.04

¹*Candida albicans* ATCC 10231

⁴*Cryptococcus neoformans* ATCC 32264

⁷*Aspergillus niger* ATCC 9029

¹⁰*Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972.

²*Candida tropicalis* C 131

⁵*Aspergillus fumigatus* ATCC 26934

⁸*Microsporium gypseum* C 115

³*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

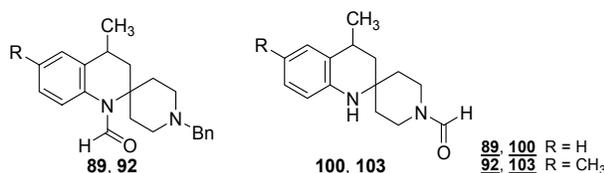
⁶*Aspergillus flavus* ATCC 170

⁹*Trichophyton rubrum* C 113

La actividad antifúngica de cada uno de los compuestos **55-71** fue determinada frente al panel de hongos antes mencionado, a partir de 250 µg/mL, y en algunos casos a partir de 1000 µg/mL. Los resultados mostraron que solamente los dermatofitos *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* fueron sensibles a las homoalilaminas **56**, **58**, **60** y la tetrahydroquinolina **65**, con CIMs menores a 250 µg/mL. El compuesto más activo con valores de CIMs de 65 µg/mL, para los tres casos, fue el derivado clorado **58**. Solamente las dihidroespiroquinolinas desbenciladas **67-71** mostraron alguna efectividad contra las levaduras, con CIMs de 250 µg/mL. Los demás compuestos fueron inactivos frente al resto de los hongos evaluados. La inefectividad mostrada por los anteriores derivados piperidínicos, y los indicios mostrados en las bioautografías, hizo que se escogieran solo una serie de amidas y sus respectivos análogos migrados; como se puede observar en la Tabla 44, los resultados de actividad para ellas también son bajos CIMs > 250 µg/mL, solamente en los ensayos con el compuesto **103** se evidenció actividad contra *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* con valores de CIM iguales a 250 µg/mL.

Así mismo, se realizaron estudios frente al mismo panel de hongos, para las aminas y amidas acíclicas, protegidas y desbenciladas, derivadas de la anilina (compuestos **143**, **149-151**, **161A-163A**) y de la bencilamina (compuestos **145**, **155-157**, **166A-168A**). En las Tablas 45 y 46 se recogen las concentraciones inhibitorias mínimas encontradas para estas series.

Tabla 44. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos **89**, **92**, **100** y **103** frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos.



N°	Actividad (CIM $\mu\text{g/mL}$)									
	Ca ¹	Ct ²	Sc ³	Cn ⁴	Afu ⁵	Aff ⁶	An ⁷	Mg ⁸	Tr ⁹	Tm ¹⁰
89	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
92	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
100	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
103	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	250	250	250
Amp.	1	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	-	-	-
Ket.	0.5	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.25	0.05	0.025	0.025
Terb.	-	-	-	-	-	-	-	0.04	0.01	0.04

¹*Candida albicans* ATCC 10231

²*Candida tropicalis* C 131

³*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

⁴*Cryptococcus neoformans* ATCC 32264

⁵*Aspergillus fumigatus* ATCC 26934

⁶*Aspergillus flavus* ATCC 170

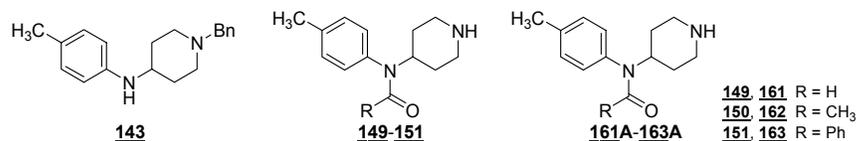
⁷*Aspergillus niger* ATCC 9029

⁸*Microsporium gypseum* C 115

⁹*Trichophyton rubrum* C 113

¹⁰*Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972.

Tabla 45. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos **143**, **149-151**, **161A-163A** frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos.



N°	Actividad (CIM $\mu\text{g/mL}$)									
	Ca ¹	Ct ²	Sc ³	Cn ⁴	Afu ⁵	Aff ⁶	An ⁷	Mg ⁸	Tr ⁹	Tm ¹⁰
143	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
149	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
150	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
151	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	250	250	250
161A	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
162A	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
163A	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Amp.	1	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	-	-	-
Ket.	0.5	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.25	0.05	0.025	0.025
Terb.	-	-	-	-	-	-	-	0.04	0.01	0.04

¹*Candida albicans* ATCC 10231

²*Candida tropicalis* C 131

³*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

⁴*Cryptococcus neoformans* ATCC 32264

⁵*Aspergillus fumigatus* ATCC 26934

⁶*Aspergillus flavus* ATCC 170

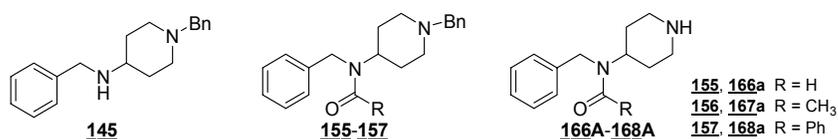
⁷*Aspergillus niger* ATCC 9029

⁸*Microsporium gypseum* C 115

⁹*Trichophyton rubrum* C 113

¹⁰*Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972.

Tabla 46. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos **145**, **155-157**, **166A-168A** frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos.



N°	Actividad (CIM $\mu\text{g/mL}$)									
	<i>Ca</i> ¹	<i>Cr</i> ²	<i>Sc</i> ³	<i>Cn</i> ⁴	<i>Afu</i> ⁵	<i>Aff</i> ⁶	<i>An</i> ⁷	<i>Mg</i> ⁸	<i>Tr</i> ⁹	<i>Tm</i> ¹⁰
145	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	125	125	125
155	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	125	125	125
156	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
157	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	250	250	250
166A	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
167A	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
168A	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Amp.	1	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	-	-	-
Ket.	0.5	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.25	0.05	0.025	0.025
Terb.	-	-	-	-	-	-	-	0.04	0.01	0.04

¹*Candida albicans* ATCC 10231

²*Candida tropicalis* C 131

³*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

⁴*Cryptococcus neoformans* ATCC 32264

⁵*Aspergillus fumigatus* ATCC 26934

⁶*Aspergillus flavus* ATCC 170

⁷*Aspergillus niger* ATCC 9029

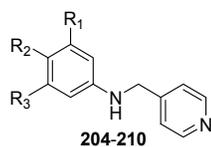
⁸*Microsporium gypseum* C 115

⁹*Trichophyton rubrum* C 113

¹⁰*Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972.

Un comportamiento muy diferente es el presentado por los derivados piridínicos **204-219**. En estas series se encontró una actividad muy alta contra los hongos filamentosos. En la Tabla 47 se encuentran los resultados para las aminas sencillas **204-210**, hallándose CIMs entre 6.25-12.5 $\mu\text{g/mL}$ contra tres de los dermatofitos de mayor importancia clínica: *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. Tan importante como el hallazgo anterior, es encontrar que el panel de levaduras también es sensible a la acción de estas aminas. La menor CIM encontrada fue de la del compuesto **208**, con un valor de 25 $\mu\text{g/mL}$, contra el *Cryptococcus neoformans* (Tabla 47).

Tabla 47. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos **204-210** frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos.



204 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$ **208** $R_1 = R_3 = \text{H}, R_2 = \text{I}$
205 $R_1 = R_3 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_3$ **209** $R_1 = R_2 = \text{H}, R_3 = \text{NO}_2$
206 $R_1 = R_3 = \text{H}, R_2 = \text{OCH}_3$ **210** $R_1 = R_3 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$
207 $R_1 = R_3 = \text{H}, R_2 = \text{Cl}$

N°	Actividad (CIM $\mu\text{g/mL}$)									
	Ca ¹	Cf ²	Sc ³	Cn ⁴	Afu ⁵	Aff ⁶	An ⁷	Mg ⁸	Tr ⁹	Tm ¹⁰
204	>250	250	>250	>250	250	250	250	125	25	25
205	100	50	100	50	100	200	100	50	25	25
206	>250	>250	>250	>250	250	>250	>250	250	250	250
207	31.2	31.2	62.5	62.5	125	125	125	62.5	62.5	62.5
208	50	50	50	25	50	100	50	12.5	6.25	12.5
209	100	100	50	50	100	200	100	12.5	6.25	12.5
210	250	250	250	50	100	200	100	25	25	25
Amp.	1	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	-	-	-
Ket.	0.5	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.25	0.05	0.025	0.025
Terb.	-	-	-	-	-	-	-	0.04	0.01	0.04

¹ *Candida albicans* ATCC 10231

² *Candida tropicalis* C 131

³ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

⁴ *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264

⁵ *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934

⁶ *Aspergillus flavus* ATCC 170

⁷ *Aspergillus niger* ATCC 9029

⁸ *Microsporium gypseum* C 115

⁹ *Trichophyton rubrum* C 113

¹⁰ *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972.

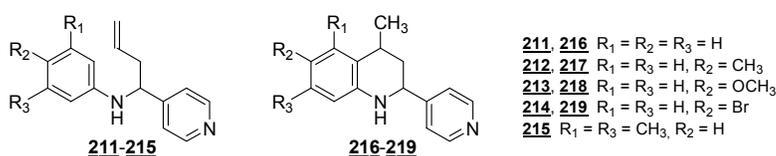
El *C. neoformans* (Figura 86) es un hongo es muy preocupante para los enfermos de SIDA; se dice que la mayoría de ellos muere de criptococosis, por esto encontrar compuestos que sean activos contra los *Criptococcus* es muy interesante desde el punto de vista farmacológico. Es importante comentar que este hongo es un patógeno verdadero, ocasionando infecciones aun en los sistemas inmunes sanos. Los demás hongos del panel son patógenos oportunistas (hongos con baja virulencia que manifiestan su patogenicidad en pacientes inmunodeprimidos).

Del mismo modo, las nuevas estructuras con el fragmento alílico (compuestos **211-215**) y con el anillo tetrahydroquinolínico (compuestos **216-219**), presentaron una pronunciada actividad antifúngica (Tabla 48).

Figura 86. Micromorfología del *Cryptococcus neoformans* con microscopio óptico (400x), teñido con tinta china.



Tabla 48. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos **211-219** frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos.



N°	Actividad (CIM $\mu\text{g/mL}$)										
	Ca ¹	Cf ²	Sc ³	Cn ⁴	Afu ⁵	Afl ⁶	An ⁷	Mc ⁸	Mg ⁹	Tr ¹⁰	Tm ¹¹
211	250	250	125	250	250	250	250	-	125	250	62.5
212	>250	100	62.5	≤125	250	250	>250	50	25	>12.5≤50	50
213	>250	>250	>250	250	>250	>250	>250	-	62.5	125	125
214	>250	>250	250	>250	>250	>250	>250	-	16	16	31.2
215	250	250	250	>250	>250	>250	>250	-	125	250	125
216	125	125	125	125	31.2	31.2	31.2	-	8	8	8
217	>250	100	100	≤25	>250	>250	>250	50	25	≤50	25
218	125	125	125	125	31.2	125	250	-	62.5	62.5	62.5
219	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	-	125	125	125
Amp.	1	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	50	-	-	-
Ket.	0.5	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.25	15	0.05	0.025	0.025
Terb.	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.04	0.01	0.04

¹*Candida albicans* ATCC 10231

²*Candida tropicalis* C 131

³*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

⁴*Cryptococcus neoformans* ATCC 32264

⁵*Aspergillus fumigatus* ATCC 26934

⁶*Aspergillus flavus* ATCC 170

⁷*Aspergillus niger* ATCC 9029

⁸*Microsporium gypseum* C 115

⁹*Trichophyton rubrum* C 113

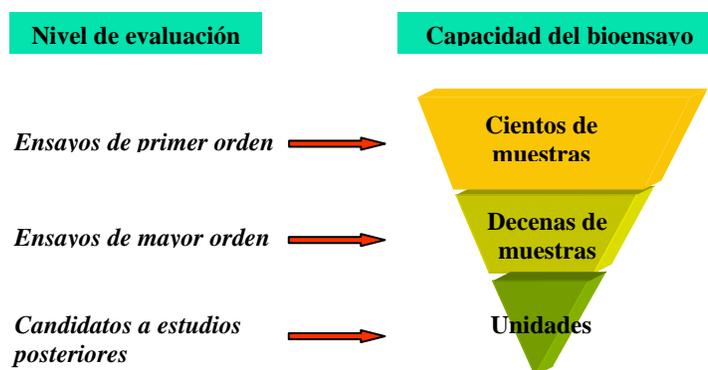
¹⁰*Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972.

Hay que resaltar a molécula **216**, ésta presentó actividad en todo el panel de hongos; los valores de CIM para las *Candidas* fueron en todos los casos de 125 $\mu\text{g/mL}$, para los dermatofitos de 8 $\mu\text{g/mL}$ y es particularmente activo contra los tres *Aspergillus*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, los de mayor virulencia causantes de

la mayor cantidad de infecciones sistémicas en humanos, con una concentración inhibitoria mínima de 31.2 µg/mL. La homoalilamina **212** y su análogo ciclado **217** se probaron en el dermatofito *Microsporium canis*, causante de una gran cantidad de dermatomicosis en animales y humanos. La sensibilidad de este microorganismo fue particularmente alta, de 50 µg/mL.

6.2.5.3. Determinación de la CFM. Cuando se encuentran compuestos que tienen marcada bioactividad, hay que proseguir con estudios de un orden mayor, utilizando las muestras que a juicio del investigador sean de importancia. La determinación del valor de la CIM es un ensayo de primer orden, es una prueba que se aplica a un gran número de muestras iniciales para determinar si tienen o no actividad; su función es descartar los compuestos inactivos y proveer muestras activas para continuar con los estudios. Los ensayos de mayor orden, son pruebas más complejas que permiten profundizar en el estudio de la actividad de los compuestos activos. Son de baja capacidad, costosos y su realización requiere de un mayor equipamiento. En la Figura 87 muestra el proceso de evaluación y cómo se va reduciendo el número de muestras a medida que se avanza en su estudio.

Figura 87. Distintos niveles de evaluación y comparación de la cantidad de muestras evaluadas a medida que se avanza en el proceso.



Continuando con los ensayos de mayor orden, se determinó la CFM o concentración fungicida mínima (definida como la mínima concentración de compuesto que no produce la muerte del hongo). Este ensayo es importante para determinar si los microorganismos son sensibles o resistentes al compuesto probado. Para realizar estos estudios se escogieron los compuestos **214** y **216**, y los hongos *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. Una vez determinada la CIM por el método de microdilución en caldo, se tomó una alícuota de 50 μl de cada pocillo, donde no hubo desarrollo fúngico y se colocó en tubos sobre 150 μl de Agar-Sabouraud glucosa. Se incubó la nueva serie a 28 °C y se observó si hubo crecimiento fúngico (Figura 88). Los resultados de la CFM son valores que se encuentran en el rango de 16-62.5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 49).

Figura 88. Esquema de la metodología para determinar la concentración fungicida mínima (CFM). Los números debajo de los tubos indican las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ del compuesto prueba.

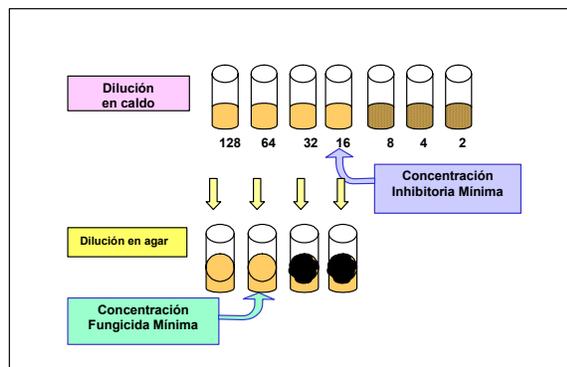
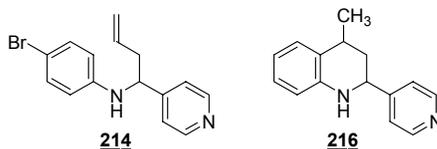


Tabla 49. Valores para la CIM 100 y la CFM ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos **214** y **216** actuando contra *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.



N°	Actividad ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>Mg</i> ¹ CIM ₁₀₀ /CFM	<i>Tr</i> ² CIM ₁₀₀ /CFM	<i>Tm</i> ³ CIM ₁₀₀ /CFM
214	16/31.2	16/62.5	31.2/62.5
216	8/16	8/31.2	8/62.5

¹*Microsporum gypseum* C 115

²*Trichophyton rubrum* C 113

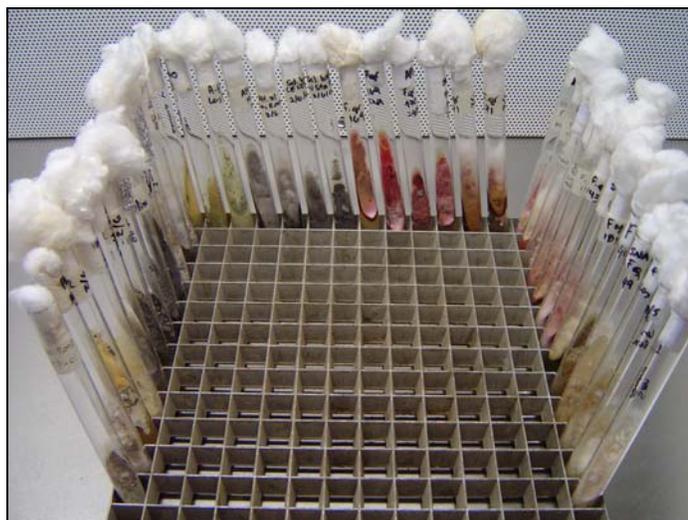
³*Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972

Estos números son muy interesantes, porque están mostrando que los compuestos son fungicidas a bajas concentraciones.

6.2.5.4. Determinación del valor de la CIM en diversas cepas de *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes* aislados clínicamente. Para evaluar la importancia real de la actividad de las aminas **208** y **209**, se probaron en paneles de hongos aislados clínicamente: nueve *C. neoformans*, suministrados por el Instituto Malbran (Buenos Aires), siete *Trichophyton rubrum* y cuatro *T. mentagrophytes* proporcionados por el CEREMIC (Centro de Referencia en Micología, de la Universidad Nacional del Rosario).

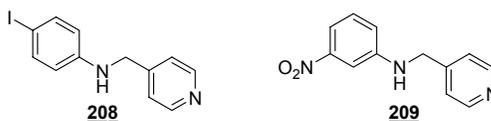
La primera etapa fue conseguir el crecimiento y esporulación del hongo en las cantidades necesarias para obtener las suspensiones de 1×10^4 - 1×10^6 conidias/mL (Figura 89). Para esto se realizaron tantos repiques como fueron necesarios en tubos de Khan, conteniendo como medio de cultivo Agar-Saboreau. Posteriormente se determinaron las CIMs para cada una de las cepas, los resultados se muestran en las Tablas 50-52.

Figura 89. Tubos de Khan conteniendo los diferentes hongos en crecimiento.



En los ensayos se encontró una actividad similar o un poco menor (en el rango de valores de CIM = 25-100 $\mu\text{g/mL}$), que el hallado contra las cepas estándares. Considerando que estos aislados clínicos son resistentes a los tratamientos convencionales, la sensibilidad de ellos aun es alta frente a estas dos aminas.

Tabla 50. CIM ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos **208** y **209** actuando contra cepas aisladas clínicamente de *Cryptococcus neoformans*.



Nº	Actividad (CIM $\mu\text{g/mL}$)									
	Cn ¹	Cn ²	Cn ³	Cn ⁴	Cn ⁵	Cn ⁶	Cn ⁷	Cn ⁸	Cn ⁹	Cn ¹⁰
208	25	100	25	50	50	50	50	50	100	100
209	50	100	50	100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Anf.	0.25	0.13	0.06	0.25	0.25	0.25	0.13	0.25	0.06	0.50
Flu.	-	7.8	3.9	3.9	15.6	1.9	31.2	31.2	3.9	7.8
Itra.	-	<0.01	0.25	<0.01	<0.01	<0.01	0.25	0.50	<0.01	<0.01
5-Flu.	-	7.8	3.9	3.9	-	15.6	7.8	7.8	3.9	7.8
Vor.	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.030	0.25	0.50	0.015	0.030

¹*Cryptococcus neoformans* ATCC 32264

²*Cryptococcus neoformans* IM 983040 (Díbelo)

³*Cryptococcus neoformans* IM 972724 (Agula 2306)

⁴*Cryptococcus neoformans* IM 042074 (Vigo 5888)

⁵*Cryptococcus neoformans* IM 00319 (Figuroa 2567)

⁶*Cryptococcus neoformans* IM 972751 (Melgarejo 2719)

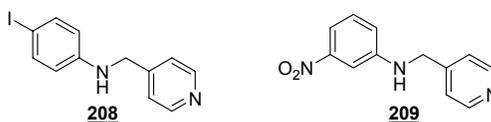
⁷*Cryptococcus neoformans* IM 031631 (Paz 5220)

⁸*Cryptococcus neoformans* IM 031706 (Paz 3778/2)

⁹*Cryptococcus neoformans* IM 961951 (Ambrosini 399)

¹⁰*Cryptococcus neoformans* IM 052470 (Señorans N 287)

Tabla 51. CIM ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos **208** y **209** actuando contra cepas aisladas clínicamente de *Trichophyton rubrum*.



N°	Actividad (CIM $\mu\text{g/mL}$)						
	Tr^1	Tr^2	Tr^3	Tr^4	Tr^5	Tr^6	Tr^7
208	6.25	25	25	25	25	25	50
209	6.25	50	50	50	50	50	50
Anf.	-	1.56	1.56	3.2	1.56	3.12	3.12
Ket.	0.025	1.56	6.25	6.25	6.25	6.25	3.12
Terb.	0.01	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.003

¹*Trichophyton rubrum* C 113

²*Trichophyton rubrum* C 110

³*Trichophyton rubrum* C 133

⁴*Trichophyton rubrum* C 135

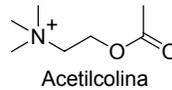
⁵*Trichophyton rubrum* C 136

⁶*Trichophyton rubrum* C 137

⁷*Trichophyton rubrum* C 140

Los compuestos con MIC $<20 \mu\text{g/mL}$ pueden considerarse como candidatos a futuros desarrollos, por esto, **208** y **209** representan la cabeza de serie para el desarrollo de nuevos antifúngicos contra *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum*, y *Trichophyton mentagrophytes*. La siguiente observación es evidente: los compuestos que contienen el fragmento 4-piridil son los más activos de la investigación, mostrando muy buenas actividades antifúngicas contra los dermatofitos particularmente contra *T. rubrum*. Este hongo es el responsable de aproximadamente 80-93% de infecciones crónicas y recurrentes por dermatofitos en humanos. Es el agente etiológico de la *Tinea unguium* (causante de infecciones invasivas en uñas), de la *Tinea manuum* (infecciones en las áreas interdigitales y palmares de las manos) y la *Tinea pedis* (pie de atleta), y es el hongo prevalente en las infecciones en los países desarrollados, encontrándose en un 50% y 90% de todas las infecciones de uñas en pies y manos, respectivamente (Kouznetsov *et al.*, 2008).

Figura 90. Estructura de la acetilcolina.



Hay dos tipos de receptores conocidos, sensibles a la ACh, los muscarínicos y los nicotínicos. Los muscarínicos están asociados al sistema nervioso central (SNC) y al músculo cardíaco; los efectos de esta unión provoca una disminución del trabajo del corazón y de la presión sanguínea, la constricción de los bronquios, el incremento en la salivación, aumento de la peristaltismo intestinal, mueve y acomoda los fluidos en los ojos para la visión cercana y la contracción de las pupilas. Los receptores nicotínicos se encuentran en el SNC, en el motor y en las placas de las sinapsis entre los nervios y los músculos esqueléticos causando contracción. En el SNC la estimulación por la ACh está asociada a los procesos cognitivos y a la memoria.

La ACh en las sinapsis tiene un tiempo de vida relativamente corto, a causa de las grandes cantidades de acetilcolinesterasa (AChE), una enzima que hidroliza el enlace éster en la molécula, disminuyendo o terminando la transmisión de la sinapsis colinérgica por una rápida hidrólisis del neurotransmisor (Cummings *et al.*, 2000). En los últimos años se han encontrado otras funciones además de la transmisión nerviosa, incluyendo algunos roles como: la expresión anómala de las AChEs presente en varios tipos de carcinomas, la adhesión a proteínas, el crecimiento de las neuritas y la producción de fibras amiloides, estas últimas son características presentes en los cerebros de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA).

6.3.2. Enfermedad de Alzheimer (EA) e importancia de la búsqueda de compuestos inhibidores de la acetilcolinesterasa. La EA es un proceso neurodegenerativo, lento y progresivo, clínicamente caracterizado por un paulatino deterioro de las funciones cognitivas e intelectuales (Boyd 2000), que se traduce en pérdida de la memoria, incapacidad del individuo afectado para hacer por sí mismo las actividades vitales rutinarias, pudiendo presentarse también cuadros de ansiedad, irritabilidad, depresión o alucinaciones. La EA es la tercera causa de mortalidad entre los adultos mayores de 65 años en los países desarrollados, después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Cacabelos 2000). Teniendo en cuenta además el aumento de la expectativa de vida media en estas sociedades, y el hecho de que la incidencia de la EA aumenta con la edad, así como sus devastadores efectos, parece evidente que la EA representa un grave problema de salud pública y previsiblemente ha de ser una de las patologías más relevantes en el siglo XXI en el mundo occidental.

A pesar de la naturaleza multifactorial de la EA (Haass *et al.*, 1998), las estrategias que se han diseñado en el estudio de fármacos para su tratamiento se han dirigido básicamente hacia dos objetivos: a) El péptido β -amiloide ($A\beta$) y b) La neurotransmisión colinérgica. La primera estrategia se orienta hacia la prevención de los procesos neurodegenerativos que finalmente provocan el daño irreversible en el cerebro.

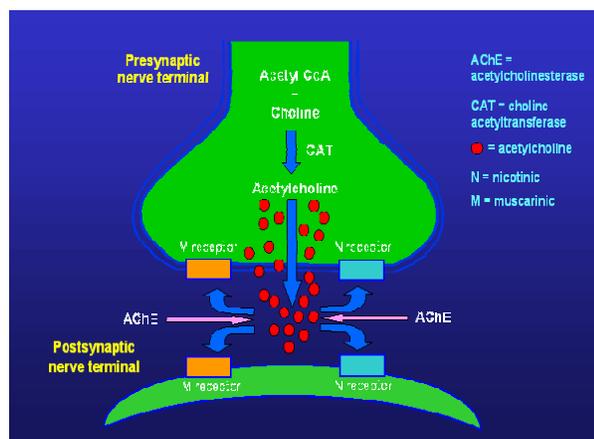
La EA está neurohistopatológicamente caracterizada por la aparición de placas seniles extracelulares, mayoritariamente formadas por placas del péptido β -amiloide ($A\beta$) (Talaga 2001), redes o nudos neurofibrilares debidos a la hiperfosforilación de la proteína tau, y la degeneración o atrofia de las neuronas colinérgicas. Por lo tanto, cualquier agente que impida la génesis y depósito de $A\beta$ será útil para impedir el progreso de la enfermedad. En cualquier caso, a pesar del reciente desarrollo de inhibidores de la agregación de placas amiloides (Bartus *et*

al., 1982), estas aproximaciones están aún en su desarrollo inicial, y no hay datos clínicos al respecto.

La segunda aproximación para el tratamiento de la EA se basa en la llamada “hipótesis colinérgica” (García 2003), que postula que los síntomas que presentan los pacientes de EA son el resultado de la deficiente transmisión colinérgica y el déficit en el nivel de neurotransmisores, principalmente acetilcolina (ACh).

De los múltiples neurotransmisores implicados en la patogenia y fisiopatología de la EA, el mejor caracterizado es el colinérgico. La sinapsis colinérgica (Figura 91) asegura su funcionalidad mediante la síntesis de ACh por acción de la enzima colinoacetilasa, también conocida como colino-acetil-transferasa (CAT). Esta enzima es sintetizada en el soma de las neuronas colinérgicas, siendo posteriormente transportada hacia el axón, donde va a intervenir en la síntesis de ACh a partir de sus precursores fisiológicos acetil-coenzima A y colina. La colina procede del medio extracelular, donde existe a concentraciones micromolares bajas. Una vez liberada, la ACh se va a unir a receptores muscarínicos (M) y nicotínicos (N) presentes tanto a nivel presináptico como a nivel postsináptico.

Figura 91. Esquema de una sinapsis colinérgica.



Una vez ejercida su acción sobre los diferentes receptores colinérgicos, la ACh va a ser rápidamente eliminada de la hendidura sináptica mediante la acción de la acetilcolinesterasa (AChE). La AChE degrada la ACh en colina y ácido acético, siendo la colina recaptada en su mayor parte por la terminal presináptica para ser reutilizada en la síntesis de nueva ACh.

Según el esquema de funcionamiento fisiológico de una sinapsis colinérgica, los investigadores identificaron varias aproximaciones terapéuticas que contribuirían a mejorar la neurotransmisión deficitaria: (i) precursores de la síntesis de acetilcolina, (ii) agonistas/antagonistas de los receptores muscarínicos, (iii) agonistas de los receptores nicotínicos, (iv) inhibidores de la acetilcolinesterasa, y (v) moduladores de los receptores nicotínicos neuronales.

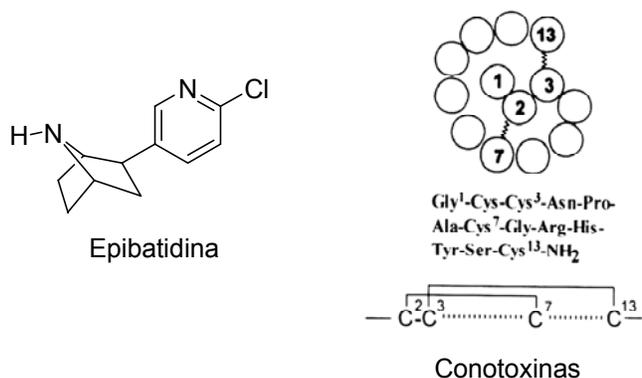
Cualquiera de estos acercamientos podría generar un fármaco para tratar la EA, pero la ineffectividad y la elevada incidencia de efectos adversos periféricos de tipo parasimpático sobre el corazón (bradicardia), glándulas (hipersecreción), fibra lisa (hiperperistaltismo intestinal, calambres abdominales, náuseas, vómitos), y corta duración en la acción han frenado el desarrollo de muchos agentes terapéuticos.

El fármaco ideal para tratar la EA debe ser súperselectivo, debe ser capaz de mejorar los procesos cognitivos, pero, para evitar efectos adversos debería mostrar una baja o nula afinidad por los receptores nicotínicos musculares y por los receptores $\alpha 3$, que parecen asociarse a los efectos adversos gastrointestinales y cardíacos por estimulación de estos receptores ubicados a nivel de los ganglios periféricos.

Moléculas súperselectivas y con muy bajo IC_{50} suelen poseer también una alta toxicidad. Por ejemplo, la epibatidina (Figura 92), aislada hace un poco más de una década a partir de un extracto de la piel de una rana ecuatoriana, es mil veces más potente que la nicotina, pero, por eso mismo, nunca podrá utilizarse

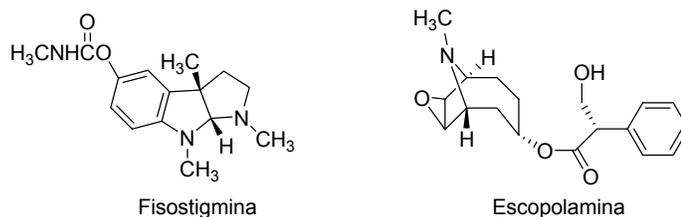
terapéuticamente. Igual se puede decir de los antagonistas selectivos naturales que se identificaron y caracterizaron partiendo del veneno de caracoles marinos de la clase Gasterópodos (*Conus geographus*, *C. striatus*, *C. marmoreus*) llamadas α -conotoxinas.

Figura 92. Estructuras de la epibatidina y las conotoxinas.



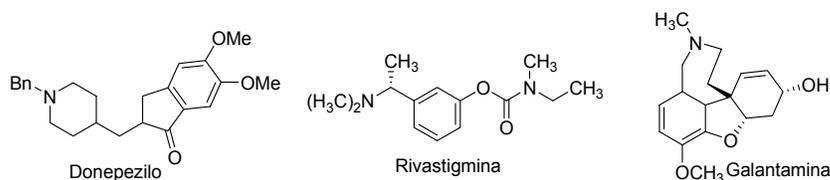
Inhibidores de la AChE (IsAChE). Los inhibidores de la acetilcolinesterasa se pueden dividir en dos clases: los fármacos y los pesticidas. El mayor uso se da en la agricultura, en el control de los insectos y otros artrópodos. Este uso se ha extendido a la farmacia desde que los IsAChE son usados como insecticidas contra los piojos. Estos agentes también han sido usados con motivos más siniestros, como venenos en algunas sociedades y agentes de guerra química. Los IsAChE originales fueron desarrollados a partir de compuestos organofosforados y se enlazan irreversiblemente a las AChEs (Houghton *et al.*, 2006). En medicina los IsAChE se emplean frecuentemente para suplir la deficiencia de ACh. La aplicación más antigua que se conoce es el tratamiento oftalmológico del glaucoma con el alcaloide fisostigmina (Figura 93). También son usados frecuentemente como antídotos de las toxinas en el tratamiento de las intoxicaciones con los alcaloides del tropano como la atropina (*Atropa belladonna*, *Datura stramonium*) y escopolamina (*Hyoscyamus niger*) (Houghton *et al.*, 2006).

Figura 93. Estructura de la fisostigmina y la escopolamina.



La hipótesis colinérgica y los bajos niveles de ACh en el cerebro, condujo a una nueva aplicación para los IsAChE. La única estrategia farmacoterápica que ha demostrado, hasta ahora, cierta eficacia para detener el progreso de la enfermedad de Alzheimer, es la encaminada a evitar la degradación de la acetilcolina, con la pretensión de contrarrestar su déficit cerebral. Los fármacos que inhiben de forma reversible la acetilcolinesterasa cerebral, como el donepezilo, la rivastigmina o la galantamina (Figura 94), evitan la degradación del neurotransmisor y de esta manera favorecen la elevación de los niveles de acetilcolina en la hendidura sináptica (Houghton *et al.*, 2006).

Figura 94. Fármacos usados en el tratamiento de la EA.



El donepezilo es de origen sintético, mientras que la galantamina es un alcaloide que fue aislado de la campanilla de invierno caucasiana (*Galanthus nivalis*) en 1952. La mayoría del trabajo original sobre este alcaloide se realizó en los países del Este entre 1950-1960. Sólo en los últimos 10-20 años se le ha prestado atención en occidente. La galantamina (Reminyl®), por su actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa, ha sido usada durante muchos años para revertir los efectos de los relajantes musculares, y en 2001 fue aprobada por la FDA para el

tratamiento de la EA (García 2003). La rivastigmina (Exelon®) es un análogo de la fisostigmina, desarrollado para ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y actuar sobre el SNC. Estos fármacos son costosos, en la Tabla 53 se recogen los precios en pesos colombianos obtenidos por una cotización en Servifarma de Bucaramanga, y solo tienen algo de efectividad en las primeras fases de la enfermedad.

Tabla 53. Costo de los medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de la demencia de Alzheimer.

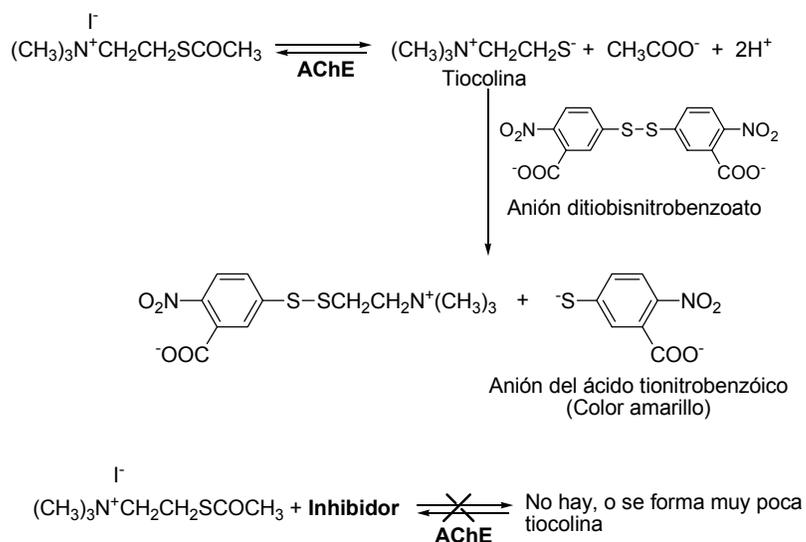
Medicamento	Forma farmacéutica/ concentración	Tratamiento diario	Laboratorio fabricante	Precio
Reminyl® Galantamina	4 mg	8mg dos veces al día	Janssen Cilag	\$102.800 caja x 14 tab.
Exelon® Rivastigmina	3 mg	6 mg dos veces al día	Novartis	\$198.600 Caja x 28 tab.
Eranz® Donepezilo	5 mg	10 mg una vez al día	Wyeth	\$424.700 caja x 28 tab.

Los efectos secundarios para todos estos medicamentos son pronunciados y similares. Entre las reacciones adversas citadas como *muy frecuentes* y *frecuentes* se mencionan: náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, pérdida del apetito y de peso, somnolencia, temblor, fatiga, confusión, cefalea, síncope, alucinaciones, hepatitis, úlceras gástricas y duodenal, hemorragias gastrointestinales, comportamientos agresivos, entre otros.

Actualmente hay una intensa búsqueda de IsAChE de origen natural y sintético, menos tóxicos, que puedan ser utilizados como agroquímicos contra las plagas y ayuden a paliar los devastadores efectos de la demencia de Alzheimer (Fang *et al.*, 2008; Decker *et al.*, 2008; Miyazawa *et al.*, 2005; Perry *et al.*, 2002; Miyazawa *et al.*, 1998; Barbosa *et al.*, 2006, Ferreira *et al.*, 2006). Por esto, nos propusimos implementar un ensayo y cuantificar el potencial de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa de las nuevas moléculas sintetizadas.

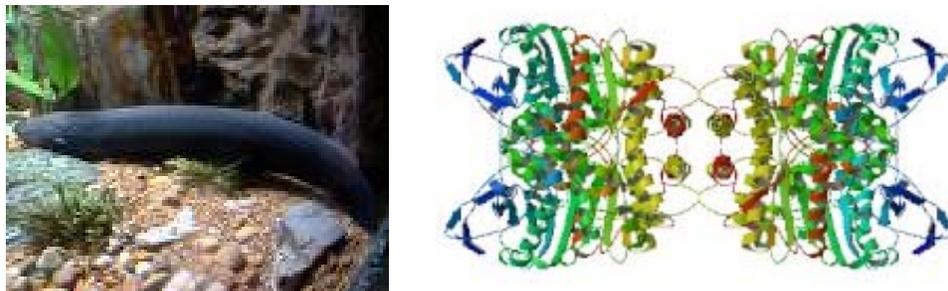
6.3.3. Ensayo para determinar la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa. El método usado para la determinación de la actividad de la AChE es el propuesto por Ellman (Ellman *et al.*, 1961). En este procedimiento la actividad de la enzima es medida fotométricamente, a 412 nm, por el incremento del color amarillo producido por la tiocolina procedente de la hidrólisis de la acetilcolina, cuando ésta reacciona con el ion ditiobisnitrobenzoato para formar el anión del ácido tiobisnitrobenzónico que es de color amarillo (Esquema 55). De esta manera es posible establecer la actividad acetilcolinesterásica de tejidos, extractos, suspensiones celulares, etc.

Esquema 55. Reacción para determinar la actividad inhibitoria de la AChE.



La enzima utilizada en esta investigación proviene del órgano eléctrico del pez *Electrophorus electricus*, y está compuesta de doce subunidades catalíticas (Figura 95) y es junto con la extraída de la *Torpedo californica*, las más similares a la predominante en las uniones neuromusculares de los mamíferos (Massoulié *et al.*, 1982; Conti-Tronconi *et al.*, 1982; Massoulié *et al.*, 1991).

Figura 95. Pez *Electrophorus electricus* y estructura tridimensional de la enzima.*



* <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

En un procedimiento tradicional los compuestos a probar se disolvieron en buffer fosfato salino, en concentraciones seriadas desde 1×10^{-3} hasta 1×10^{-7} M y se le adicionó la enzima, la reacción se dejó transcurrir durante media hora y se le adicionó la solución sustrato, que está compuesta del ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzóico y el yoduro de acetiltiocolina. Después de cinco minutos se leyó la absorbancia, a 412 nm, en un lector de microplacas. Los ensayos para los compuestos de referencia (galantamina y fisostigmina) y para cada muestra fueron realizados por sextuplicado.

En las Figuras 96 y 97 se observa el diseño y una microplaca de 96 pocillos, realizando el screening por duplicado para dos muestras, con diluciones seriadas desde la concentración C_1 hasta la C_2 . Se incluye un blanco para cada muestra y para cada concentración, y dos filas de control, para determinar el 100 % de actividad enzimática sin ningún tipo de inhibidor. Los cálculos de las IC_{50} se realizaron a partir de las curvas obtenidas de graficar la concentración vs el % de inhibición, utilizando el software SoftMax Pro 5.2 de Molecular Devices. La IC_{50} fue definida como la concentración requerida para conseguir el 50% del efecto inhibitorio máximo.

Figura 96. Esquema una microplaca de 96 pocillos para la determinación de la inhibición enzimática.

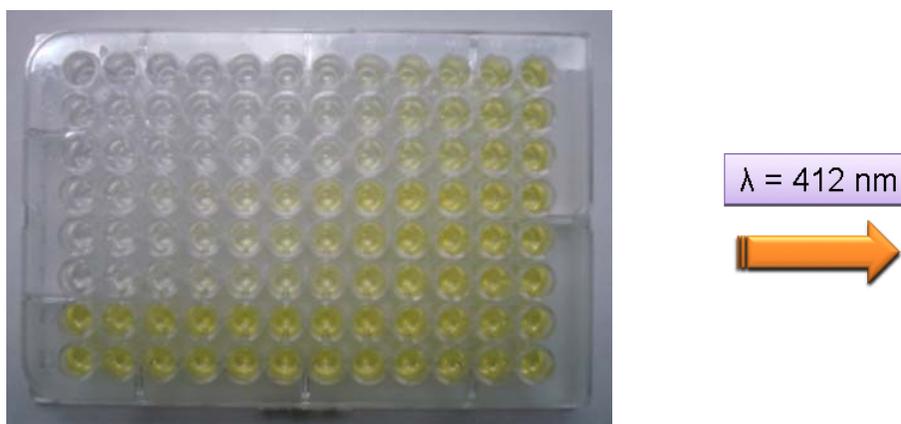
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂
Muestra 1												
Muestra 1												
Blanco												
Muestra 2												
Muestra 2												
Blanco												
Control												
Control												

* C₁-C₁₂: concentraciones;

Control: necesario para determinar la actividad de la enzima sin ningún tipo de inhibidor;

Blanco: necesario para restar cualquier absorción causada por los reactivos.

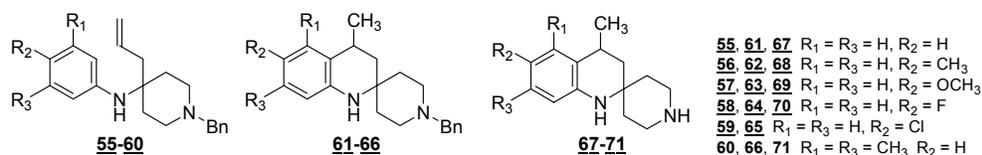
Figura 97. Fotografía de una microplaca experimental, y ecuación para calcular el % de inhibición a partir de las absorbancias medidas.



6.3.4. Resultados de los ensayos de inhibición. Los perfiles de inhibición revelaron algunos resultados muy interesantes (Tablas 54-59): casi todas las muestras probadas lograron inhibir la acción de la acetilcolinesterasa, y en muchos casos estuvieron en el orden de 10^{-5} M. Las homoalilaminas **66-60** inhibieron en el rango de concentración de 1.36×10^{-4} y 8.93×10^{-5} M, pero ninguna mostró actividad prominente (Tabla 54). Tal vez, la serie más interesante fue la de las dihidroespiroquinolinas **61-66**, con valores de IC_{50} entre 2.63×10^{-5} y 8.50×10^{-5} M. El compuesto más activo es el derivado clorado **65**. En lo que concierne a sus

análogos **67-71**, la desbencilación ocasionó la pérdida de actividad, con inhibiciones en el orden de concentraciones de 10^{-4} M. El derivado fluorado **70** no mostró actividad suficiente para medir la IC_{50} .

Tabla 54. Valores de IC_{50} para los compuestos **55-71**.

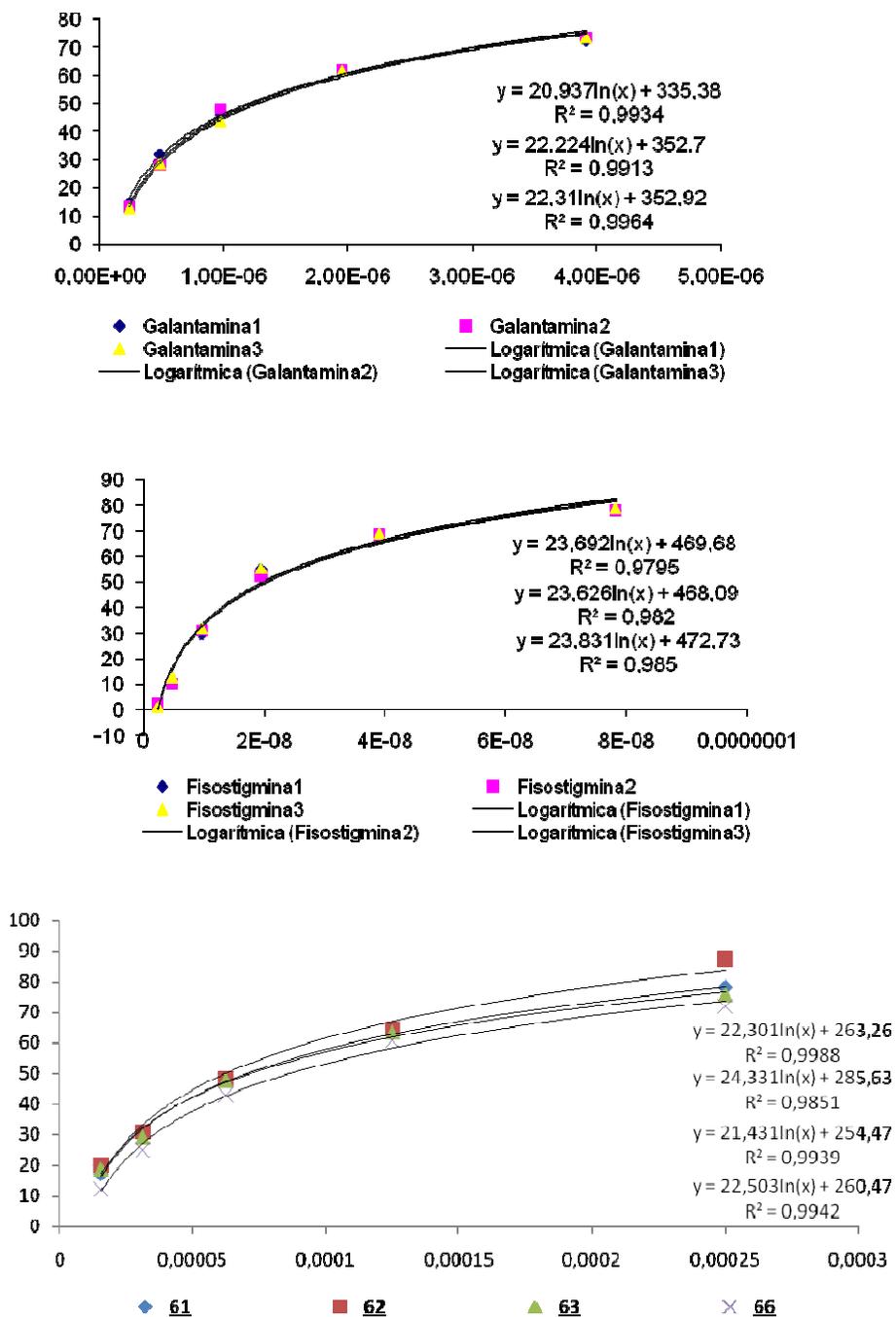


Nº	Actividad inhibitoria (IC_{50})		
	IC_{50} ($\mu g/mL$)	IC_{50} (M)	CV%
55	43.7±1.2	1.36E-04±4E-06	2.6
56	33.3±0.7	1.09E-04±2E-06	2.2
57	36.0±1.3	1.07E-04±4E-06	3.5
58	41.3±0.3	1.23E-04±1E-06	0.8
59	27.8±1.0	8.56E-05±3E-06	3.5
60	30.5±0.5	8.93E-05±2E-06	1.8
61	20.5±1.4	6.70E-05±5E-06	6.9
62	20.0±0.1	6.25E-05±3E-07	0.5
63	23.4±1.0	6.97E-05±3E-06	4.5
64	20.3±0.1	6.26E-05±4E-07	0.7
65	9.0±0.2	2.63E-05±6E-07	2.3
66	28.5±0.7	8.50E-05±2E-06	2.6
67	31.6±0.7	1.46E-04±3E-06	2.1
68	47.3±1.5	2.05E-04±7E-06	3.3
69	53.0±0.8	2.15E-04±3E-06	1.5
70	n.i	-	-
71	40.5±0.9	1.66E-04±4E-06	2.2
Gal.	0.30±0.01	1.06E-06±4E-08	3.5
Fis.	0.0056±0.0001	2.02E-08±4E-10	2.1

n.i: inhibe menos del 50% a la máxima concentración probada.

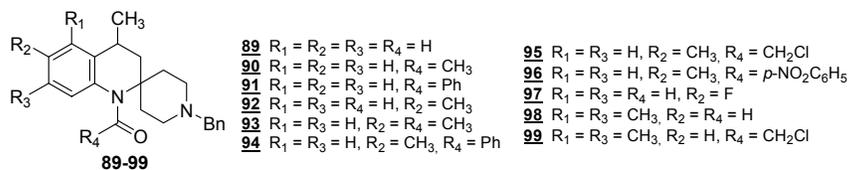
En la Figura 98 se presentan como ejemplo las gráficas de concentración vs % de inh. para la serie de compuestos **61-66**. El porcentaje de inhibición se calculó con la ecuación: $Inh. A_{412} (\%) = 100 - [(AE - AB)/(AC - AB)] \times 100$. A partir de la ecuación de cada curva se extrajo la información para determinar el IC_{50} .

Figura 98. Graficas de los ensayos de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por galantamina, fisostigmina y los compuestos **61-63** y **66**.



Los resultados de las amidas **89-99** fueron, en la gran mayoría de los casos bastante pobres, o bien la inhibición fue casi nula o baja, el mejor compuesto de esta serie fue el derivado acetilado **93** con un IC_{50} de 8.55×10^{-5} M (Tabla 55).

Tabla 55. Valores de IC_{50} para los compuestos **89-99**.

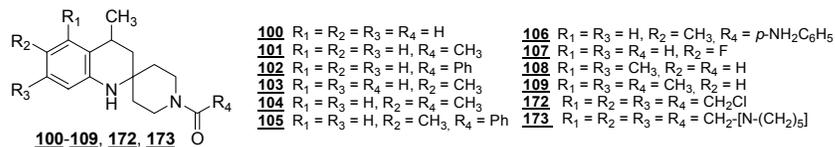


Nº	Actividad inhibitoria (IC_{50})		
	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} (M)	CV%
89	n.i	-	-
90	n.i	-	-
91	n.i	-	-
92	n.i	-	-
93	31.0 ± 0.3	$8.55E-05 \pm 8E-07$	1.0
94	n.i	-	-
95	36.5 ± 0.1	$9.19E-05 \pm 2E-07$	0.2
96	49.0 ± 0.8	$1.04E-04 \pm 2E-06$	1.6
97	32.2 ± 1.4	$9.15E-05 \pm 4E-06$	4.2
98	n.i	-	-
99	60.0 ± 1.6	$1.46E-04 \pm 4E-06$	2.7
Gal.	0.30 ± 0.01	$1.06E-06 \pm 4E-08$	3.5
Fis.	0.0056 ± 0.0001	$2.02E-08 \pm 4E-10$	2.1

n.i: inhibe menos del 50% a la máxima concentración probada.

En los compuestos en los que el grupo amida se encuentra sobre el nitrógeno piperidínico (**100-109**, **172**, y **173**) la actividad se recupera parcialmente, encontrándose que los IC_{50} del orden de 10^{-5} M corresponden en casi todos los casos a estructuras en los que el grupo amida es voluminoso, por ejemplo: en la molécula **102** ($IC_{50} = 4.29 \times 10^{-5}$ M) es un grupo benzoilo, en la amida **106** ($IC_{50} = 5.67 \times 10^{-5}$ M) un p-aminobenzoilo (Tabla 56).

Tabla 56. Valores de IC₅₀ para las amidas **100-173**.

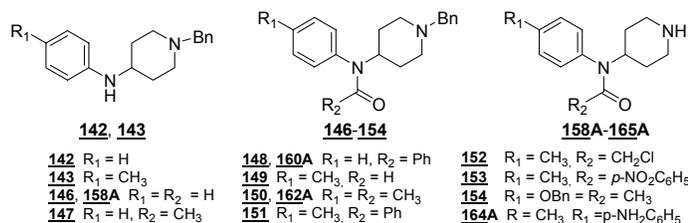


Nº	Actividad inhibitoria (IC ₅₀)		
	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (M)	CV%
100	43.8±0.0	1.79E-04±2E-08	0.0
101	52.2±2.1	2.02E-04±8E-06	4.1
102	13.7±0.0	4.29E-05±1E-07	0.3
103	40.8±0.5	1.58E-04±2E-06	1.2
104	41.2±0.3	1.51E-04±1E-06	0.7
105	40.1±0.8	1.20E-04±2E-06	2.0
106	19.8±0.3	5.67E-05±1E-06	1.7
107	n.i	-	-
108	n.i	-	-
109	14.2±0.5	4.95E-05±2E-06	3.2
172	27.3±0.8	9.33E-05±3E-06	2.8
173	30.0±1.2	8.78E-05±3E-06	3.8
Gal.	0.30±0.01	1.06E-06±4E-08	3.5
Fis.	0.0056±0.0001	2.02E-08±4E-10	2.1

n.i: inhibe menos del 50% a la máxima concentración probada.

La determinación del potencial terapéutico de las aminas y amidas acíclicas, listadas en la Tabla 57, indica que la rigidez estructural de sus análogos descritos en las Tablas 54-57, no es el factor preponderante para la actividad. Por ejemplo, resulta sorprendente encontrar una actividad similar entre la dihidroespiroquinolina **61** (IC₅₀ 6.70x10⁻⁵ M, o 20.5 µg/mL) y su análogo flexible, la amina **142** (IC₅₀ 6.57x10⁻⁵ M, o 17.5 µg/mL).

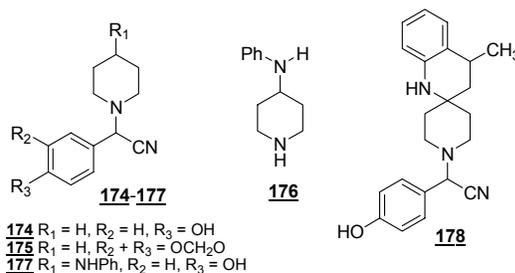
Tabla 57. Valores de IC₅₀ para los derivados acíclicos de piperidina.



N°	Actividad inhibitoria (IC ₅₀)		
	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (M)	CV%
142	17.5±0.2	6.57E-05±9E-07	1.4
143	44.2±1.8	1.58E-04±6E-06	4.0
146	48.9±1.7	1.66E-04±6E-06	3.6
147	20.7±0.6	6.71E-05±2E-06	3.0
148	27.8±1.3	7.51E-05±4E-06	4.7
149	43.5±2.7	1.41E-04±9E-06	6.3
150	61.0±0.5	1.89E-04±2E-06	0.9
151	28.9±0.9	7.52E-05±2E-06	3.1
152	58.7±1.3	1.64E-04±4E-06	2.2
153	22.4±0.7	5.22E-05±2E-06	3.3
154	31.3±0.1	7.55E-05±2E-06	0.4
158A	16.1±0.2	7.86E-05±1E-06	1.3
160A	17.3±0.9	6.19E-05±3E-06	4.9
162A	35.7±1.4	1.54E-04±6E-06	4.0
164A	21.9±0.5	7.07E-05±2E-06	2.5
Gal.	0.30±0.01	1.06E-06±4E-08	3.5
Fis.	0.0056±0.0001	2.02E-08±4E-10	2.1

Ninguna bioactividad ha sido reportada hasta el momento para el alcaloide girsensohnina **174** y sus análogos, por esto, se los sometió a estudio. Él y su análogo derivado del piperonal **175** manifestaron una actividad inhibitoria apreciable, con IC₅₀ de 9.31x10⁻⁵ y 8.15x10⁻⁵ M, respectivamente. Los derivados más complejos **177** y **178** inhiben la enzima, pero en un orden de actividad menor (Tabla 58).

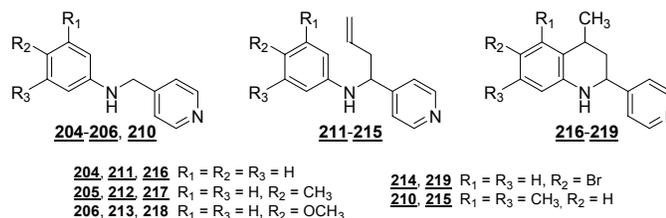
Tabla 58. Valores de IC₅₀ para los compuestos **174-178**.



N°	Actividad inhibitoria (IC ₅₀)		
	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (M)	CV%
Piperidina	4.45±0.1	5.22E-05±7E-07	1.4
N-Bencil-γ-piperidona	16.9±0.7	8.91E-05±4E-06	4.2
174	20.1±0.2	9.31E-05±9E-07	1.0
175	19.9±0.8	8.15E-05±3E-06	3.9
176	19.9±0.4	1.13E-04±2E-06	2,2
177	34.3±0.7	1.12E-04±2E-06	2.0
178	41.6±0.2	1.20E-04±4E-07	0.4
Gal.	0.30±0.01	1.06E-06±4E-08	3.5
Fis.	0.0056±0.0001	2.02E-08±4E-10	2.1

Finalmente, se determinaron las inhibiciones para los derivados piridínicos (Tabla 59). En la serie de aminas sencillas **204-206**, **210** la mejor actividad fue la mostrada por la amina **204**, con un IC₅₀ de 4.83x10⁻⁵ M, pero a excepción de **210** todas resultaron tener un orden de inhibición en 10⁻⁵ M. La serie de homoalilaminas **211-215** presentó una actividad menor, en el orden de 10⁻⁴ M, pero todos los derivados tetrahydroquinolínicos fueron activos, con IC₅₀ entre 6.70-9.78x10⁻⁵. Moléculas con estas estructuras no han sido reportadas aun en la literatura como inhibidores de la acetilcolinesterasa.

Tabla 59. Valores de IC₅₀ para los compuestos derivados de piridina.



N°	Actividad inhibitoria (IC ₅₀)		
	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (M)	CV%
204	8.9±0.2	4.83E-05±9E-07	1.9
205	19.0±0.6	9.57E-05±3E-06	3.3
206	13.2±0.3	6.14E-05±1E-06	2.1
210	38.5±1.8	1.81E-04±9E-06	4.7
211	21.1±0.3	9.43E-05±1E-06	1.4
212	35.4±1.3	1.48E-04±5E-06	3.6
213	50.1±2.0	1.97E-04±8E-06	4.0
214	32.1±0.6	1.06E-04±2E-06	1.8
215	28.9±0.4	1.15E-04±2E-06	1.6
216	19.4±0.1	8.66E-05±5E-07	0.6
217	16.0±0.4	6.70E-05±1E-06	2.2
218	22.2±0.0	8.72E-05±2E-07	0.2
219	29.7±0.3	9.78E-05±9E-07	0.9
Gal.	0.30±0.01	1.06E-06±4E-08	3.5
Fis.	0.0056±0.0001	2.02E-08±4E-10	2.1

En la implementación del método y la prueba de los compuestos, no se encontró ningún caso en el que la muestra se comportara como un inhibidor irreversible de la enzima, todos se unieron a la enzima de forma reversible, lo cual es un punto favorable en estos estudios, un bloqueo de la enzima llevaría a una intensa toxicidad aguda y crónica (Massoulié *et al.*, 1991).

Actualmente las investigaciones sobre fármacos están enfocadas a la creación de compuestos duales, en los que se combinan dos anillos farmacóforos, y como: (i) las sustancias preparadas en esta investigación presentaron atractivas actividades inhibitorias de la acetilcolinesterasa, (ii) las investigaciones en el tratamiento de la demencia de Alzheimer están orientadas hacia compuestos que actúen sobre más de una diana biológica, (iii) la combinación de los anillos de la piperidina (piridina) y la tetrahydroquinolina, a través de una espiro-unión o de un enlace de tipo C-C,

generó nuevos modelos estructurales, de los cuales la literatura química ofrece poca información farmacológica, se decidió buscar un método y determinar las propiedades antioxidantes que ellas podrían presentar.

6.4 Actividad antioxidante

6.4.1. Importancia de la búsqueda de compuestos antioxidantes. Esta actividad es, tal vez, la más importante que puede presentar cualquier fármaco dual, porque a fin de cuentas la oxidación es esencial para muchos organismos vivos, todas las células deben producir energía a partir de los combustibles biológicos (Hamilton *et al.*, 1997). Pero el oxígeno es muchas veces descrito como “una espada de doble filo”, porque además de ser el ingrediente vital para en la producción de energía intracelular también es el responsable por las especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO son productos normales del metabolismo y pueden formarse por diferentes vías, endógenas o exógenas: 1) la respiración aeróbica estimula a los leucocitos y a los macrófagos, que juegan un rol importante en la defensa contra los agentes infecciosos. Las ERO también son importantes mediadores en el daño de las estructuras celulares y han sido asociados a mas de 100 patologías, como el envejecimiento, la arterioesclerosis, el cáncer, la diabetes, etc. causadas por el cambio en los carbohidratos, ADN, lípidos, proteínas y otros como mutaciones, ruptura de las membranas mitocondriales, inactivación de enzimas y destrucción de tejidos; 2) las fuentes exógenas de radicales libres incluyen, entre otras, el fumar tabaco, las radiaciones ionizantes, los disolventes orgánicos, los pesticidas (Koşar *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008).

Recientes estudios han encontrado que los procesos inflamatorios están directamente asociados a la enfermedad de Alzheimer (Stuchbury *et al.*, 2005). Los péptidos amiloides presentan en las placas seniles, encontradas en los

cerebros de los enfermos de Alzheimer, pueden inducir procesos inflamatorios en los que las ERO son liberadas junto con otros componentes (Stuchbury *et al.*, 2005; Vina *et al.*, 2004). Las ERO son las causantes de daños celulares a nivel estructural y actúan como mensajeros secundarios en la inflamación.

También, fueron observados daños oxidativos antes de la formación de las placas amiloides (Moreira *et al.*, 2005), por esto, los antioxidantes que pueden “atrapar” las ERO además de atenuar la inflamación, pueden actuar como agentes neuroprotectores y ser usados para prevenir o tratar esta patología (Calabrese *et al.*, 2003; Gibson *et al.*, 2005).

Compuestos como el ácido lipoico y la vitamina E, son antioxidantes que han sido sometidos a estudios clínicos para determinar la protección neuronal contra la formación de placas amiloideas. Aunque los datos aun son limitados, los hallazgos para el ácido lipoico muestran efectos positivos sobre la progresión de la enfermedad en los pacientes de Alzheimer (Zhang *et al.*, 2001; Hager *et al.*, 2001). Los resultados de las pruebas clínicas para la vitamina E indicaron que es útil para frenar durante algún tiempo la evolución de la enfermedad (Sung *et al.*, 2004; Kontush *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2005; Zandi *et al.*, 2004).

El incesante flujo de ERO de fuentes endógenas y exógenas resulta en un deterioro continuo y acumulativo de los componentes celulares alterando muchas de sus funciones. Todas las membranas celulares (fosfolípidos) son especialmente vulnerables a la oxidación debido a su alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados; lo mismo sucede en los alimentos debido a que los lípidos hacen parte de casi todos ellos (Hamilton *et al.*, 1997; Gordon *et al.*, 2001).

Los radicales son especies que contienen uno o más electrones desapareados capaces de existir independientemente. La presencia de electrones desapareados hace a estos radicales altamente reactivos y aunque están presentes en bajas

concentraciones pueden causar daños a los materiales y a los blancos biológicos (De Zwart *et al.*, 1999; Willcox *et al.*, 2004). Por esto, actualmente, se ha incrementado la búsqueda de antioxidantes para ser usados en la industria no solo como bases de nuevos fármacos, también como aditivos en la conservación de los alimentos, de los artículos cosméticos, los plásticos, etc. y para tener alternativas y sustituir los antioxidantes sintéticos, BHA y BHT, debido a las restricciones de carcinogenicidad que éstos presentan (Kohen *et al.*, 2002; Lanigan *et al.*, 2002). Por este motivo, se ha fomentado la selección de fuentes de origen natural y sintético para la investigación y desarrollo de nuevos antioxidantes.

6.4.2. Métodos para determinación de la actividad antioxidante. La actividad o capacidad antioxidante se puede definir como la habilidad de un compuesto para reducir pro-oxidantes (Nguyen *et al.*, 2003) y la eficacia de estos antioxidantes depende del tipo de oxidante (Prior *et al.*, 1999). No obstante, se debe tener en cuenta el mecanismo por el cual el antioxidante ejerce su efecto (por ej., atrapamiento de radicales, descomposición catalítica, supresión pro-oxidante) y funciones, velocidad de atrapamiento, selectividad del sustrato o medio (por ej., fase acuosa, superficie o lipídica), concentración efectiva (moles de radicales atrapados por mol de antioxidante), distribución, localización, destino de los radicales derivados de los antioxidantes, interacción con otros antioxidantes y metabolismo (Prior *et al.*, 1999, Niki *et al.*, 2000), y estos factores se deben considerar y evaluar separadamente.

Hay numerosos reportes sobre mediciones de reactividades hacia radicales de compuestos antioxidantes y mezclas complejas (Nguyen *et al.*, 2003). Las reactividades se miden siguiendo la cinética del antioxidante con radicales estables como α,α -difeníl- β -picrilhidracilo (DPPH) (Antolovich *et al.*, 2002) y 2,6-di-ter-butí-4-(4-metoxifenil)-fenoxilo (Blois *et al.*, 1958), empleando técnicas espectroscópicas (UV-VIS, etc.) y/o utilizando métodos inhibitorios, en los cuales

la especie radicalaria se genera y el efecto del antioxidante se mide a partir de la inhibición de la reacción de referencia (e.j. radical $\cdot\text{OH}$ generado por reacción Fenton, reacciones de decoloración de compuestos de referencia: reacción de la *N,N'*-difeníl-*p*-fenilendiamina (DPPD), del ácido 2,2'-azino-*bis*-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) (ABTS), etc. (Willcox *et al.*, 2004; Prior *et al.*, 1999).

Entre todos los métodos existentes para determinar la actividad antioxidante, lo más acertado sería escoger un método que involucre sistemas de peroxidación lipídica en membranas, utilizando para esto, los hígados de ratas criadas en bioterios, para lograr resultados lo más cercanos posibles a los que se obtendrían en sistemas *in vivo*. El costo de desarrollar e implementar estos bioensayos en el LQOBio es bastante alto y por esto fue escogida como metodología de trabajo el *ensayo de capacidad antioxidante equivalente al Trolox* (TEAC), más asequible a nuestras condiciones.

El TEAC es extensamente aplicado para valorar la cantidad de radicales que pueden ser atrapados por un antioxidante (AO) (Mukai *et al.*, 1987). En este ensayo, un antioxidante se adiciona a una solución preformada de catión radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ y después de un tiempo fijo, el catión radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ remanente se cuantifica espectrofotométricamente. La reducción en la concentración del catión radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ inducida por cierta concentración de un antioxidante se relaciona con la concentración de trolox y proporciona el valor TEAC de dicho antioxidante (Miller *et al.*, 1993).

El ensayo TEAC modificado usa radicales $\text{ABTS}^{\cdot+}$ preformados por oxidación del ABTS con persulfato de potasio (PDS) (Miller *et al.*, 1993).²⁶⁰ La ventaja de utilizar este método es su rapidez, su amplio rango de valores de pH, y su utilización tanto en sistemas de medios orgánicos como acuosos (Re *et al.*, 1999).

El mayor problema asociado con el ensayo TEAC, es que se observan diferencias sustanciales en los valores reportados, por ejemplo: los TEAC de quercetina, rutina y crisina varían entre 3.1-6.4, 2.4-5.6 y 1.4-2.4, respectivamente (Arts *et al.*, 2004; Buenger *et al.*, 2006). Las variaciones no pueden ser atribuidas a los procedimientos, ya que realizando el mismo procedimiento para una sustancia en particular, el valor de TEAC puede variar. Bajo las condiciones en las cuales el ensayo se realiza, la reacción entre la mayoría de antioxidantes y el catión-radical es incompleta, lo que conlleva a la subestimación del valor TEAC para estos antioxidantes, por lo cual, hubo necesidad de ajustar el método para tener en cuenta todos los subproductos generados en la reacción, determinando adecuadamente el valor de la capacidad antioxidante total.

Durante varios años en nuestros laboratorios se ha estudiado la actividad antioxidante de muestras de origen natural y sintético (Kouznetsov *et al.*, 2002; Stashenko *et al.*, 2008; Puertas *et al.*, 2002; Stashenko *et al.*, 2004). La realización de estos bioensayos ha mostrado que el procedimiento “tradicional” (Re *et al.*, 1999) tiene varios inconvenientes: es muy laborioso, la cantidad de muestra (200 mg-500 mg) y disolventes requeridas es muy grande y hay diferencias sustanciales en los valores de TEAC para las muestras que tienen una cinética de reacción muy lenta o múltiples cinéticas, debidas a la presencia de más de un grupo funcional reactivo en la molécula, o en el caso de los extractos de origen natural, a la complejidad en la composición de éstos.

Por esta razón, propusimos una forma de resolver estas dificultades, y así, convertir esta metodología tediosa, en una muy eficiente, que permita hacer un cribado de un gran número de muestras en poco tiempo (aprox. ~ 10 muestras/h) y con datos más cercanos a los valores “verdaderos”.

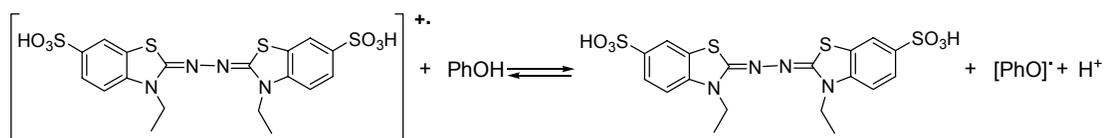
Se formularon dos modificaciones a la metodología: la primera, aumentar el tiempo de reacción hasta su finalización y la segunda, realizar el *screening* en

microplacas, disminuyendo en forma dramática la cantidad de sustancia necesaria para el ensayo (0.1-0.5 mg), los volúmenes de disolvente (< 5 mL x muestra), y posibilitando de esta forma el procesamiento eficiente y rápido de un gran número de muestras y un manejo amigable de los datos.

Es muy importante comentar que estas modificaciones al *ensayo de capacidad antioxidante equivalente al Trolox*, fue una investigación realizada conjuntamente con Amner Muñoz Acevedo Qco. MSc., estudiante del programa de Doctorado en Química de la Escuela de Química de la UIS.

6.4.3. Resultados de los ensayos de capacidad antioxidante equivalente al Trolox. El ensayo de actividad antioxidante se basa en la reacción de atrapamiento del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ por un determinado sustrato (Esquema 56).

Esquema 56. Reacción entre un antioxidante de tipo fenol y $ABTS^{+\bullet}$.



Antes de realizar esta reacción, es necesario generar el catión radical del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Para esto, a una solución acuosa de ABTS se le adiciona persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), y se deja transcurrir la reacción durante 16 h a temperatura ambiente y en ausencia de luz. La adición de los antioxidantes al catión-radical preformado (de color azul/verdoso) ocasiona decoloración de la solución que puede ser medida a cualquiera de los tres máximos de absorción del catión-radical: 645 nm, 734 nm y 815 nm. El porcentaje de inhibición se determina como una función de la concentración y así mismo, se

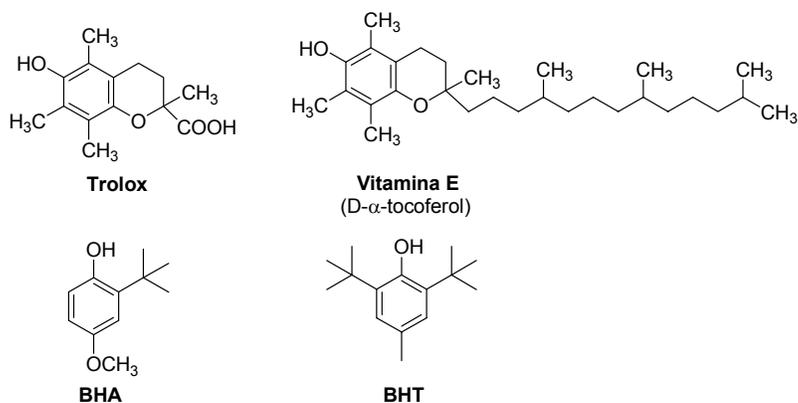
calcula la reactividad relativa del Trolox, bajo las mismas condiciones, con la siguiente ecuación:

$$\text{TEAC} = \frac{\text{mmol Trolox}}{\text{mmol antioxidante}} = \frac{m_1}{m_2}$$

Donde: m_1 = pendiente de la curva del trolox
 m_2 = pendiente de la curva del antioxidante

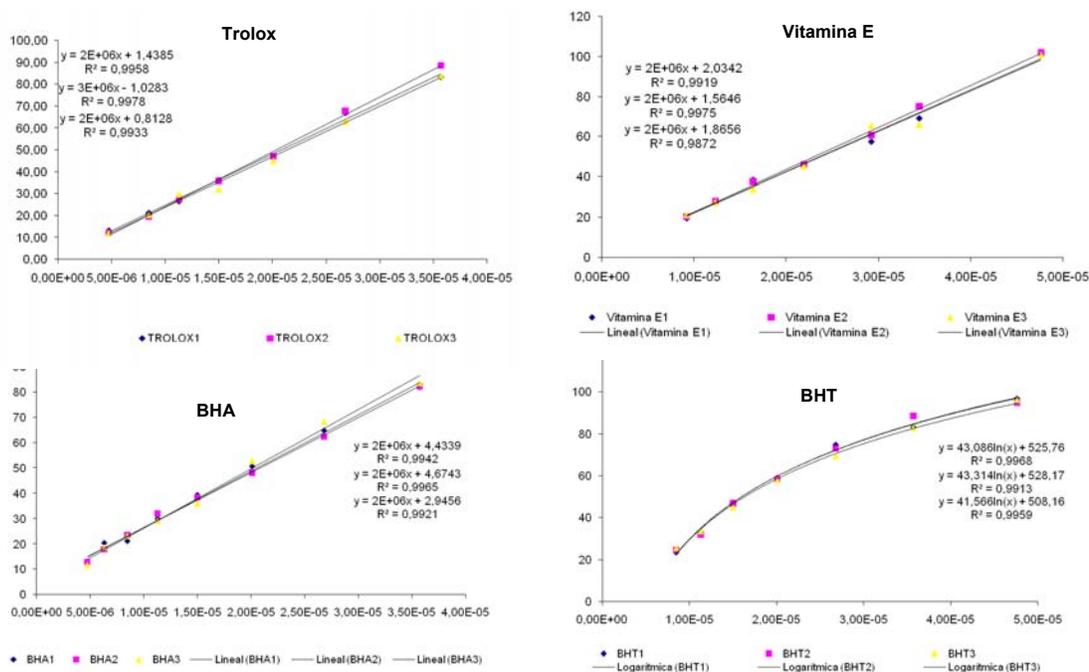
Al iniciar la implementación de cualquier bioensayo es fundamental determinar los valores de actividad para las sustancias escogidas como “controles”, para las cuales los valores de actividad están divulgados ampliamente en la literatura y han sido repetidos muchas veces (Tabla 6.18). En este caso se determinó el TEAC para la vitamina E, el BHT, y el BHA, usando el Trolox como referencia (Figura 99). Todos los ensayos se realizaron por sextuplicado.

Figura 99. Estructura química del Trolox y de los antioxidantes usados como control.



El primer paso fue obtener en el laboratorio las curvas % de inhibición vs concentración para el Trolox y los antioxidantes, y las correspondientes ecuaciones de las curvas determinar las pendientes (Figura 100).

Figura 100. Graficas del efecto de la inhibición del ABTS por los antioxidantes Trolox, vit. E, el BHA y el BHT, como % inhibición vs concentración, con absorbancias medidas a los 30 min de reacción.



En la Figura 100 y en la Tabla 60 se puede observar claramente el problema matemático del ensayo TEAC. Algunos antioxidantes generan una recta en la cual es muy fácil obtener el valor de pendiente, pero en el caso del BHT la forma es logarítmica. Para determinar el valor de TEAC del BHT y sustancias que presenten el mismo comportamiento, los investigadores seleccionan un rango de inhibición y linealizan la curva para determinar un valor de pendiente. Por esto el valor de TEAC dependerá más del rango seleccionado que del valor verdadero, observándose diferencias sustanciales en los valores reportados. Estas variaciones no se pueden atribuir al procedimiento, puesto que los datos se extrajeron de la misma curva.

En la Tabla 60 se recogen los valores encontrados por el método estándar (Re, et al)⁷⁵ y los obtenidos en esta investigación.

Tabla 60. Comparación de valores TEAC de las sustancias “control” obtenidos por métodos de Re, *et al.* y el propuesto.

AO	Método Re, <i>et al.</i>		Método propuesto			
	TEAC (m AO/ m Trolox)		TEAC (IC_{50} Trolox/ IC_{50} AO)			
	Lectura 6 min		Lectura 6 min		Lectura 30 min	
	m	TEAC	IC_{50}	TEAC	IC_{50}	TEAC
Trolox	$2,37 \times 10^6$	-	$2,08 \times 10^{-5}$	-	$2,09 \times 10^{-5}$	-
Vit E	$2,49 \times 10^6$	$1,05 \pm 0,03$	$2,54 \times 10^{-5}$	$0,82 \pm 0,02$	$2,35 \times 10^{-5}$	$0,89 \pm 0,01$
BHA	$2,21 \times 10^6$	$0,95 \pm 0,01$	$2,08 \times 10^{-5}$	$1,00 \pm 0,02$	$2,05 \times 10^{-5}$	$1,02 \pm 0,04$
BHT	$1,01 \times 10^6$ (20-50% inh.)	$0,42 \pm 0,02$	$3,83 \times 10^{-5}$	$0,54 \pm 0,01$	$1,61 \times 10^{-5}$	$1,29 \pm 0,04$
	$4,05 \times 10^5$ (50-80% inh.)	$0,17 \pm 0,002$	-	-	-	-

m : pendiente de la curva %inh. vs. conc.

En el procedimiento estándar (Re *et al.*, 1999) las lecturas en el espectrofotómetro se realizan a los seis minutos, y así iniciamos la toma de datos en nuestros experimentos, pero después del tiempo de medición las soluciones seguían decolorándose. Al disponer el LQOBio de un equipo en el que es posible realizar experimentos en modo de cinética, nos dimos a la tarea tomar datos cada minuto durante el tiempo que fuera necesario para que las curvas mostraran el punto final de la reacción. Efectivamente, la reacción para casi todas las muestras probadas no terminaba a los seis minutos, lo que indica que el resultado a los 6 minutos es sólo estimado y no representa el valor del punto final del equilibrio basado en la oxidación. Los tiempos de reacción se ajustaron individualmente para cada muestra encontrándose que la finalización, para el 95% de ellas, estuvo entre 20-30 minutos (~150 muestras de origen sintético y natural).

La evolución de las diferentes cinéticas de reacción depende de la naturaleza del antioxidante probado. Tres tipos de comportamientos se observaron: rápido para el BHA, intermedio para la Vitamina E (Vit E) y lento para el BHT (Figura 6.29).

El BHA reaccionó rápidamente con ABTS alcanzando el equilibrio entre los primeros 5 minutos. El segundo tipo de comportamiento, para la Vit E, fue

intermedio con decoloración entre los 5-15 minutos. Estos tipos de cinéticas presentaron curvas lineales, sugiriendo que los subproductos de oxidación no participan en la reacción con ABTS^{•+} y en consecuencia, no contribuyen a la actividad anti-radicalaria. El BHT reaccionó lentamente con el ABTS obteniéndose una curva logarítmica, siendo un posible indicativo de cinética compleja y que los subproductos de oxidación posiblemente coadyuven en la actividad antioxidante.

De acuerdo con la información reportada por Arts, *et al.*, se especula que el valor de TEAC de las moléculas con cinética lenta es la contribución de varias sustancias: sustancia “padre” y productos radicalarios provenientes del compuesto “padre”. Para aquellos compuestos que presentan cinéticas de oxidación complejas, la capacidad antioxidante relativa, determinada con cortos tiempos de ensayo, pueden significativamente subestimar la capacidad antioxidante total. La capacidad antioxidante absoluta de compuestos individuales puede ser determinada sólo cuando las reacciones han alcanzado condiciones cercanas al equilibrio (estado estacionario o *plateau*) (Ozgen *et al.*, 2006).

En el ensayo de ABTS modificado, el valor “verdadero” del TEAC para el BHT es de 1.3, mucho mayor que los valores reportados (0.2-0.7) por la metodología de referencia. El bajo valor de TEAC reportado, comparado con el valor “verdadero” se debe al hecho que la reacción no finaliza bajo las condiciones usadas para determinar el TEAC. Al comparar los valores TEAC entre las sustancias “control” (BHT, BHA y Vit E), por la metodología modificada, se encuentra que sus valores estuvieron muy cercanos; lo que concuerda, con los datos reportados por Brand-Williams por el método del decoloramiento del radical DPPH[•], que presenta un mecanismo similar al del catión radical ABTS) donde BHT, BHA y Vit E, tienen valores de ARP (poder antiradicalario) similares y cercanos: BHT (4.20) ≥ BHA (4.17) > Vit E (4.0) (Brand-Williams *et al.*, 1995).

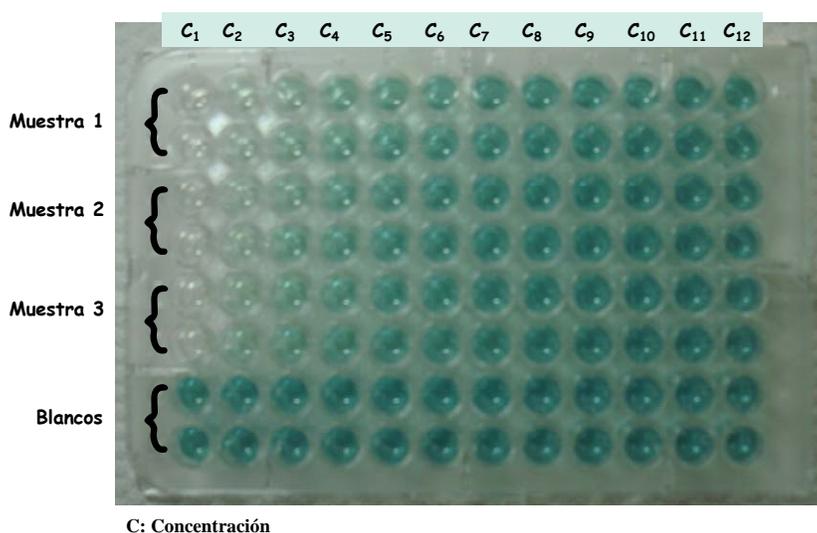
Otra modificación del método fue su escalado a microplacas. Tradicionalmente se usan las celdas de cualquier colorímetro o espectrofotómetro, pero la cantidad de muestra requerida para preparar las soluciones es prohibitiva, además de los altos volúmenes de disolventes, las tediosas diluciones, y la gran cantidad de tiempo y material necesario para realizar los ensayos.

La cantidad necesaria de solución stock para realizar doce diluciones seriadas (por sextuplicado) fue de 600 μl , de una concentración 1×10^{-3} M. La cantidad de muestra utilizada osciló entre 0.1-0.5 mg dependiendo del peso molecular del compuesto. Con este mínimo requerimiento es posible determinar la actividad de muchas muestras, de las que casi nunca los químicos orgánicos disponen en cantidad suficiente. Las cantidades de disolventes también se disminuyen considerablemente, el tiempo necesario para realizar el ensayo en una microplaca es de alrededor de cinco minutos, reduciendo así, los costos por muestra y el tiempo de análisis.

En la Figura 101 se observa una microplaca que contiene tres muestras, con sus respectivos duplicados, doce concentraciones para cada una y dos filas de blancos. El volumen total de cada pocillo es de 210 μL , (10 μL de muestra + 200 μL de la solución del catión radical).

En este trabajo se probaron 61 muestras junto con las sustancias de control, empleando las modificaciones propuestas a la metodología: (i) 30 minutos de reacción, (ii) cálculo del TEAC con los IC_{50} , y (iii) escalado a microplacas. Los resultados se recogen en las Tablas 61-66.

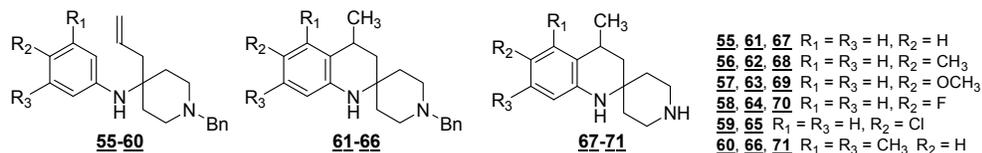
Figura 101. Fotografía de una microplaca usada en la determinación de capacidad antioxidante total.



La evaluación de esta actividad mostró asombrosos resultados para muchos de los compuestos preparados en esta investigación. En la serie de las homoalilaminas **55-60**, los valores de TEAC mostraron dependencia de los grupos funcionales presentes en las estructuras; la presencia del metoxilo en **57**, un sustituyente electrodonador, arrojó el mayor valor de TEAC de la serie: 1.411 (Tabla 61).

Otro grupo donador de electrones, el metilo, fue el causante de la importante actividad presentada por la dihidroespiroquinolina **62**, (TEAC 1.726) y su análogo desbencilado **68** (TEAC 1.124), actividades superiores a los antioxidantes comerciales. Aunque este grupo influye de forma importante, las dihidroquinolinas sin sustituyentes **61** y **67**, y las 5'(7')-dimetil-sustituidas **66** y **71** también presentaron actividades notables con valores de de 1.391, 1.281, 0.915, 0.895, respectivamente. En las sustancias con grupos electroatrayentes como fluor y cloro **65**, **65**, **70**, la actividad disminuyó considerablemente.

Tabla 61. Valores de TEAC para los compuestos **55-71**.

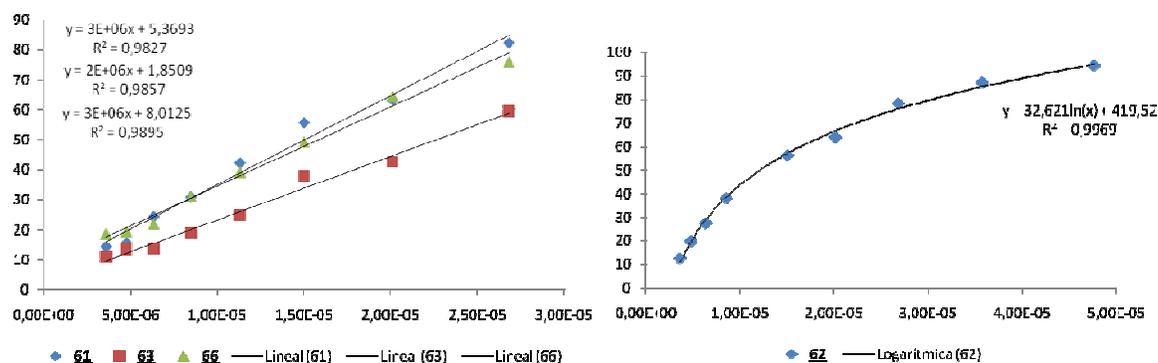


Nº	TEAC	IC ₅₀ (µM)	CV%
55	0.258±0.01	79.83±2E-06	2.7
56	0.284±0.01	73.59±2E-06	3.1
57	1.411±0.03	14.79±2E-07	1.3
58	0.426±0.02	49.00±1E-06	2.5
59	0.208±0.01	100.3±2E-06	2.3
60	0.235±0.02	87.96±4E-06	4.8
61	1.391±0.01	14.83±4E-07	2.4
62	1.726±0.01	11.95±1E-07	1.1
63	1.153±0.01	17.87±4E-07	2.3
64	0.585±0.02	35.25±9E-07	2.5
65	0.381±0.01	54.18±1E-06	2.2
66	1.281±0.05	16.10±3E-07	2.1
67	0.915±0.03	22.53±3E-07	1.5
68	1.124±0.01	18.35±1E-07	0.6
69	0.739±0.01	27.90±2E-08	0.1
70	0.300±0.00	69.53±7E-07	1.1
71	0.895±0.04	23.32±4E-07	1.5
Vit. E	0.888±0.01	23.52±5E-07	1.9
BHA	1.021±0.04	20.46±3E-07	1.7
BHT	1.294±0.04	16.13±2E-07	1.1

Es interesante notar que la presencia de los dos nitrógenos libres y disponibles para estabilizar el radical en los compuestos **67-71**, no mejoró la actividad.

Como ejemplo de las graficas generadas por el efecto de la inhibición del ABTS por los compuestos anteriores, en la Figura 102 se muestran las gráficas rectas de **61**, **63**, **66**. El compuesto **62** reaccionó lentamente con el ABTS obteniéndose una curva logarítmica. Entre un 90-95% de todas las sustancias probadas mostró este tipo de curvas, por eso, es tan importante la determinación del TEAC utilizando los IC₅₀, y no reportar valores subjetivos proporcionados por una linealización en un determinado rango.

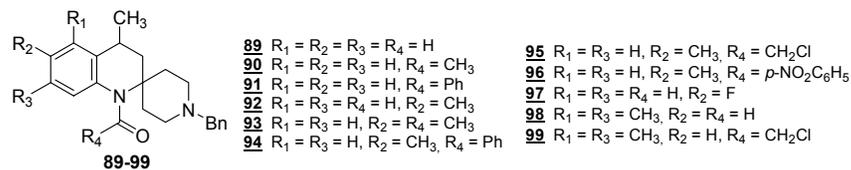
Figura 102. Efecto de la inhibición del ABTS por los antioxidantes **61**, **63**, **66**, como % inhibición vs concentración, con absorbancias medidas a los 30 min de reacción.



Una pérdida total de la actividad se registró en las amidas **89-99** (Tabla 62). Los valores de TEAC, sin importar cual grupo acilo este sustituido sobre el nitrógeno, son muy bajos, entre 0.00 y 0.017 como máximo para la amida **90**.

Al ensayar las estructuras **100-173**, con grupos amida sobre el nitrógeno piperidínico, nuevamente se recobró la actividad (Tabla 63). La formamida **100** (TEAC 1.234), y la acetamida **101** (TEAC 1.291) presentaron la mayor actividad inhibitoria del catión-radical $ABTS^+$ de toda la serie, pero la cloroacetamida **162** y el compuesto-híbrido **173** también presentaron actividades importantes, con valores de TEAC de 1.096 y 1.094 respectivamente. La formamida **107** sustituida con un átomo de fluor en la posición C-6, tuvo la menor actividad de todas las ensayadas, TEAC 0.386. Los demás compuestos tuvieron buenas actividades, aunque similares o menores a la vit. E.

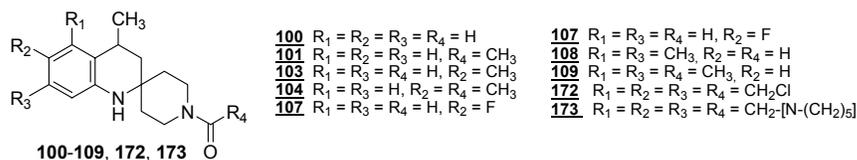
Tabla 62. Valores de TEAC e IC₅₀ para los compuestos **89-99**.



Nº	TEAC	IC ₅₀ (µM)	CV%
89	0.015±0,0001	1.411±1E-05	0.8
90	0.017±0,0002	1.236±5E-06	0.4
91	0.014±0,00002	1.460±2E-05	1.5
92	0.009±0,0004	2.256±1E-04	6.1
93	0.015±0,0006	1.420±4E-05	2.6
94	0.013±0,0004	1.563±2E-05	1.4
95	0.011±0,0002	1.929±1E-06	0.1
96	n.i.		
97	0.010±0,001	2.164±1E-04	4.9
98	0.012±0,0007	1.660±6E-05	3.9
99	0.011±0,0002	1.800±6E-05	3.1
Vit. E	0.888±0.01	23.52±5E-07	1.9
BHA	1.021±0.04	20.46±3E-07	1.7
BHT	1.294±0.04	16.13±2E-07	1.1

n.i: inhibe menos del 50% a la máxima concentración probada.

Tabla 63. Valores de TEAC e IC₅₀ para los compuestos **100-173**.

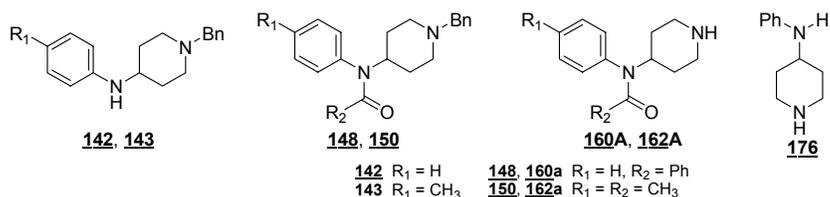


Nº	TEAC	IC ₅₀ (µM)	CV%
100	1.234±0,04	16.93±3E-07	2.0
101	1.291±0,01	15.97±1E-07	0.7
103	0.762±0,03	27.10±2E-06	5.7
104	0.751±0,01	27.45±9E-07	3.1
107	0.386±0,01	53.45±3E-06	5.0
108	0.887±0,05	23.25±8E-07	3.6
109	0.596±0,01	36.23±1E-06	3.7
172	1.096±0,05	18.82±6E-07	3.1
173	1.094±0,05	18.86±5E-07	2.9
Vit. E	0.888±0.01	23.52±5E-07	1.9
BHA	1.021±0.04	20.46±3E-07	1.7
BHT	1.294±0.04	16.13±2E-07	1.1

De los anteriores hallazgos podemos afirmar que: Aunque los grupos sustituyentes son importantes, la presencia de actividad en todos los compuestos ciclados **61-71**, y las amidas **100-173**, expresa que hay dos factores preponderantes ligados con la actividad: la presencia del esqueleto de la 3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolina] y el nitrógeno dihidroquinolínico libre.

El comportamiento anterior se conserva en los análogos acíclicos recogidos en la Tabla 64. Las aminas sencillas **142** y **143**, y **176** presentan buena actividad (TEAC 0.643, y 0.793), aunque considerablemente menores a sus análogos cíclicos **61** y **62** (TEAC 1.391 y 1.726). La amina **176** (TEAC 0.915), análogo flexible del espirano **67** (TEAC 0.944), presentó prácticamente la misma actividad inhibitoria. Las amidas derivadas de **142** y **143**, los compuestos **148**, **150**, **160A** y **162A**, en las que el nitrógeno esta protegido con grupos amida, no mostraron ninguna actividad apreciable.

Tabla 64. Valores de TEAC e IC₅₀ para las aminas y amidas acíclicas.

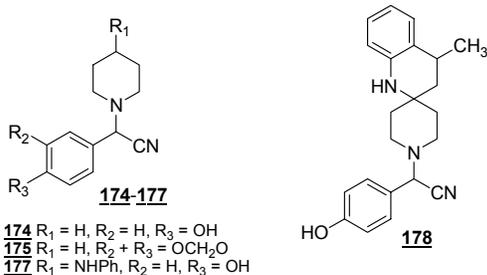


Nº	TEAC	IC ₅₀ (µM)	CV%
142	0.643±0,01	32.44±8E-07	2.3
143	0.793±0,04	26.35±9E-07	3.3
148	n.i.		
150	0.002±7.80E-06	9359±1E-04	1.3
160A	0.008±0.001	2496±3E-04	12.2
162A	0.004±0.0003	4898±2E-04	4.7
176	0.944±0,02	21.84±2E-07	0.8
Vit. E	0.888±0.01	23.52±5E-07	1.9
BHA	1.021±0.04	20.46±3E-07	1.7
BHT	1.294±0.04	16.13±2E-07	1.1

n.i: inhibe menos del 50% a la máxima concentración probada.

Del mismo modo, el alcaloide girgensohnina y sus análogos fueron sometidos a los ensayos. Ninguno de ellos presentó actividad apreciable a excepción del compuesto **178** con un valor de TEAC de 1.108 (Tabla 65). Es fácil presuponer que esta actividad es debida a la estructura base de los espiranos y no al fragmento del acetonitrilo.

Tabla 65. Valores de TEAC e IC₅₀ para la girgensohnina y sus análogos.

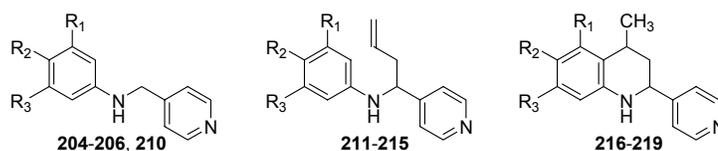


Nº	TEAC	IC ₅₀ (µM)	CV%
174	0.034±0,0008	601.6 ±2E-05	4.0
175	n.i		
177	0.141±0,002	146.5±2E-07	0.2
178	1.108±0,02	18.61±1E-07	0.6
Vit. E	0.888±0.01	23.52±5E-07	1.9
BHA	1.021±0.04	20.46±3E-07	1.7
BHT	1.294±0.04	16.13±2E-07	1.1

n.i: inhibe menos del 50% a la máxima concentración probada.

Los derivados piridínicos muestran un comportamiento similar a los piperidínicos (Tabla 66). Las aminas sencillas presentan buena actividad, en algunos casos con TEAC muy superiores a los antioxidantes control, por ejemplo, la amina **206** derivada de la 4-metoxianilina y el 4-piridincarboxaldehído presentó el mayor valor de TEAC (1.896) encontrado en esta investigación. En la serie de homoalilaminas **211-215**, solo molécula **212** con un grupo metoxilo como sustituyente presentó actividad apreciable, pero toda la serie de tetrahydroquinolinas **216-219** presentó inhibición relevante, mayores a la vit. E y al BHA.

Tabla 66. Valores de TEAC e IC₅₀ para los compuestos piperidínicos.



204, 211, 216 R₁ = R₂ = R₃ = H
205, 212, 217 R₁ = R₃ = H, R₂ = CH₃
206, 213, 218 R₁ = R₃ = H, R₂ = OCH₃
214, 219 R₁ = R₃ = H, R₂ = Br
210, 215 R₁ = R₃ = CH₃, R₂ = H

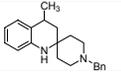
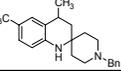
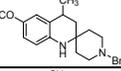
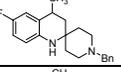
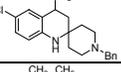
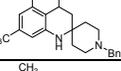
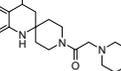
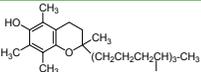
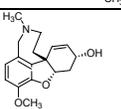
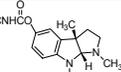
Nº	TEAC	IC ₅₀ (µM)	CV%
204	0.599±0.003	34.44±4E-07	1.2
205	1.016±0.004	20.28±3E-07	1.3
206	1.896±0.07	10.88±2E-07	2.0
210	1.055±0.02	19.55±9E-09	0.0
211	0.029±0.002	716.2±3E-05	4.6
212	0.017±0.00001	1197±2E-05	1.7
213	1.005±0.03	20.52±2E-07	1.2
214	n.i.		
215	0.045±0.00	460.8±1E-05	2.4
216	1.252±0.01	16.47±1E-07	0.7
217	1.144±0.02	18.02±2E-08	0.1
218	0.989±0.04	20.85±5E-07	2.6
219	1.150±0.00	18.13±6E-08	0.3
Vit. E	0.888±0.01	23.52±5E-07	1.9
BHA	1.021±0.04	20.46±3E-07	1.7
BHT	1.294±0.04	16.13±2E-07	1.1

n.i.: inhibe menos del 50% a la máxima concentración probada.

Por último se decidió medir y comparar la actividad antioxidante e inhibitoria de la acetilcolinesterasa, de la vitamina E y los compuestos que poseían las dos actividades con valores relevantes, y que además tienen otra característica importante en los estudios farmacológicos, la mayoría de compuestos de la serie debe presentar similares actividades (Tabla 67).

Aunque los trabajos no lo mencionan (Sung *et al.*, 2004; Zandi *et al.*, 2004), es posible que la vitamina E sea capaz de retrasar y prevenir la progresión del Alzheimer no solo por su actividad atrapadora de radicales, si no que también por la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, la IC₅₀ medida en el LQOBio fue de 9.76E-05 M. De los compuestos preparados en esta investigación, los más interesantes son sin duda alguna las espiropiperidinas **61-66**, y el compuesto-híbrido **173**.

Tabla 67. Comparación de la actividad antioxidante e inhibitoria de la acetilcolinesterasa de los compuestos más activos.

N°	Estructura	Actividad antioxidante		Actividad acetilcolinesterasica	
		TEAC	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μg/mL)	IC ₅₀ (M)
61		1.391	14.83	20.5	6.70E-05
62		1.726	11.95	20.0	6.25E-05
63		1.153	17.87	23.4	6.97E-05
64		0.585	35.25	20.3	6.26E-05
65		0.381	54.18	9.0	2.63E-05
66		1.281	16.10	28.5	8.50E-05
173		1.094	18.86	30.0	8.78E-05
Vit. E		0.888	23.52	42.0	9.76E-05
Galantamina		-	-	0.305	1.06E-06
Fisostigmina		-	-	0.006	2.02E-08

Si bien el análisis de tantos compuestos con estructuras diversas es complejo, se identificó como estructura base a la 3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'H)quinolina], toda la serie presenta actividad antioxidante, desde moderada a muy alta, e importantes actividades inhibitorias (10^{-5} M). Teniendo en cuenta los valores reportados en la Tabla anterior, es posible proponer al compuesto **62** como la cabeza de la serie, un atractivo candidato que puede ser sometido fácilmente a modificaciones en sus varios puntos de diversidad estructural y continuar los estudios farmacológicos.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Aspectos Generales.

7.1.1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos de partida. Todos los productos de partida comerciales empleados (Aldrich, Merck, Sigma, Fluka) fueron usados directamente sin purificación previa, a excepción de la piperidina, que fue destilada antes de su utilización.

Todos los disolventes utilizados como eluyentes en cromatografía fueron destilados previamente a su uso. y los usados en las reacciones secados con los agentes deshidratantes adecuados. Así, el cloruro de metileno se destiló sobre cloruro de calcio y se almacenó sobre tamiz molecular de 4Å. El éter dietílico y el tetrahidrofurano se mantuvieron a reflujo sobre sodio-benzofenona durante 5 horas y seguidamente se destilaron previamente a su uso. El 1,4-dioxano se destiló sobre sodio y se almaceno sobre sodio hilado. El cloroformo se destiló sobre pentóxido de fósforo y se almacenó sobre tamiz molecular de 4Å. El metanol se mantuvo a reflujo sobre magnesio durante 4 horas y posteriormente se destiló previamente a su uso. El acetonitrilo y la acetona se destilaron y almacenaron sobre tamiz molecular de 4Å.

En las reacciones a alta temperatura, se emplearon baños de aceite mineral utilizando una placa calefactora dotada de termómetro de contacto. Las temperaturas de reacción se refieren siempre a temperaturas de baño.

Las purificaciones en cromatografía de columna, se llevaron a cabo sobre un soporte de óxido de aluminio neutro (grado de actividad I, 70-230 Mesh) y utilizando como eluyentes mezclas de disolventes en proporciones adecuadas (éter de petróleo, acetato de etilo, metanol). La cromatografía en capa fina se realizó empleando placas de gel de sílice 60, con indicador F254, sobre soporte de aluminio, revelándose las mismas por exposición a la luz UV o utilizando vapores de yodo.

7.1.2. Técnicas Analíticas.

7.1.2.1. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Se utilizaron los espectrómetros Bruker AMX-400, Bruker AC-300, utilizando el disolvente deuterado adecuado en cada caso, cloroformo, dimetilsulfóxido, agua o acetona. Los valores de los desplazamientos químicos (δ) están expresados en ppm, en los espectros de ^1H , utilizando como referencia interna el tetrametilsilano, y referidos a la señal residual del disolvente para los de ^{13}C . Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Las abreviaturas utilizadas para indicar la multiplicidad de las señales son las siguientes: (s) = singlete, (bs) = singlete ancho, (d) = doblete, (t) = triplete, (c) = cuatriplete, (cd) = cuatriplete de dobletes, (q) = quintuplete, (m) = multiplete, (dd) = doblete de dobletes, (dt) = doblete de tripletes, (sext) = sexteto, (sp) = septeto.

7.1.2.2. Espectroscopia infrarroja. Los espectros de infrarrojo se llevaron a cabo en un espectrómetro Infracum FT-02, empleando pastillas de bromuro potásico (para los sólidos) o ventanas de cloruro de sodio (para líquidos). Sólo se reportan las bandas de absorción más características, expresadas en cm^{-1} .

7.1.2.3. Cromatografía de gases-Espectrometría de masas. Los espectros de masas se obtuvieron en un cromatógrafo de gases HP 5890 A serie II acoplado al detector selectivo de masas HP 5972, con ionización por impacto de electrones (70 eV). Para la determinación de los porcentajes de los isómeros se utilizó una columna capilar HP 5 (5 % fenil-polidimetilsiloxano, de 30 m x 0.25 mm x 0.25 mm). Para todos los compuestos clorados se reportan los datos correspondientes al isótopo ^{35}Cl .

7.1.2.4. Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). Se utilizó un espectrómetro Finnigan-Mat 95 con fragmentación por impacto electrónico (70eV).

7.1.2.5. Lector de microplacas. Las microplacas se leyeron en un lector VERSAMAX de Molecular Devices a la longitud de onda especificada.

7.1.2.6. Puntos de fusión. Los puntos de fusión se midieron en un fusiómetro Fisher Johnson y no han sido corregidos.

7.2 Capítulo primero

7.2.1. Síntesis de las *N*-(1-bencilpiperidin-4-iliden)-*N*-arilaminas (49-54). La preparación de estos compuestos se llevó a cabo según el procedimiento general para la síntesis de cetiminas puesto a punto en nuestro laboratorio. Una mezcla de la *N*-bencil-4-piperidona (0.045 moles), la correspondiente anilina (0.050 moles) y 0.1 mL de ácido acético glacial, en 150 mL de tolueno anhidro, se calentó a reflujo, adaptando una trampa de Dean-Stark, durante 0.5-2 horas; seguidamente se retiró el disolvente y el residuo resultante se purificó por destilación fraccionada a presión reducida, para rendir las correspondientes iminas puras. Algunas de ellas cristalizaron el enfriarse.

7.2.2. Síntesis de las 4-alil-4-*N*-arilamino-1-bencilpiperidinas (55-60). A una solución etérea (200 mL) de bromuro de alilmagnesio, preparada con 26 mL (36.3 g, 0.30 moles) de bromuro de alilo y 12.15 g (0.5 moles) de magnesio, se adiciono lentamente las cetiminas **49-54** (0.10 moles), disueltas en éter dietílico anhidro. Después de la adición la masa de reacción se enfrió a 0° C y se trató con agua y cloruro de amonio. Se extrajo con éter (4 x 50 mL). Los extractos orgánicos se unieron y se secaron sobre sulfato de sodio. Se separó el disolvente y el producto de la reacción se purificó por destilación fraccionada a presión reducida, para rendir las correspondientes aminas puras. Algunas de ellas cristalizaron lentamente.

7.2.3. Síntesis de las 1-bencil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolinas] (61-66). A 1.0 g de cualquiera de los compuestos **55-60** disueltos en la mínima cantidad necesaria de diclorometano, se adicionó, a 0 °C, 2 mL de ácido sulfúrico al 85 % (v/v). La mezcla se calentó a 80-90 °C durante 1-5 horas con agitación vigorosa. La masa de reacción se vertió sobre hielo y se llevo a pH 12 con hidróxido de amonio concentrado. Se extrajo con diclorometano (4 x 25 mL). Los extractos orgánicos se unieron y se secaron sobre sulfato de sodio. Se separó el disolvente y el producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina. Para el compuesto **63**, con grupo sustituyente metoxi, se usó ácido polifosfórico como catalizador de la reacción, en una relación p/p de 1:2.

7.2.4. Síntesis de las 1-*H*-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolinas] (67-71). Una mezcla de cualquiera de las espiropiperidinas **61-66** (1.00 mmoles), formiato de amonio (5.00 mmol) y Pd/C al 10% (2.5 % molar), en metanol (5 mL), se calentó a reflujo por 5-10 minutos. El disolvente se retiro a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.3 Capítulo segundo.

7.3.1. Formilación (Para los compuestos: 89, 92, 97 y 98). Una solución de anhídrido acético fórmico, preparada a partir de anhídrido acético (2.00 mmoles), ácido fórmico (3.00 mmoles), y piridina (2 gotas), a 0 °C, se adicionó a las espiropiperidinas (61, 62, 64 y 66) (1.00 mmoles), en una sola porción. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 0.5-1 hora. Al final de la reacción se llevó el pH a 7-8 con hidróxido de amonio y se extrajo con diclorometano (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se unieron, se lavaron con agua para eliminar la piridina, y se secaron sobre sulfato de sodio. Se separó el disolvente y el producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.3.2. Acetilación (Para los compuestos: 90 y 93). Las espiropiperidinas (61 y 62) (1.00 mmoles) se calentaron a reflujo durante 1-2 hora con anhídrido acético (3.00 mmoles) en presencia de NEt_3 (2 gotas). El progreso de la reacción se monitoreó por TLC. Al final de la reacción el pH se llevó hasta 7-8 con hidróxido de amonio y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos se unieron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El residuo aceitoso se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.3.3. Benzoilación (Para los compuestos: 91 y 94). A una mezcla de cualquiera de las espiropiperidinas (61 y 62) (1.00 mmol) y NEt_3 (1 mmol), en tolueno anhídrido (20 mL), a 0 °C, se les adicionó gota a gota el cloruro de benzoilo (2 mmol) disuelto en tolueno (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 2-3 horas monitoreando el progreso de la reacción por TLC. Al final de la reacción se enfrió a 0 °C y se elevó el pH hasta 7-8 con hidróxido de amonio. Se extrajo con diclorometano y los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio y se

concentraron. El residuo aceitoso se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.3.4. Cloroacetilación (Para los compuestos: 95 y 99). A una mezcla de cualquiera de las espiropiperidinas (62 y 66) (1 mmol) y NEt₃ (1 mmol), en diclorometano anhidro (20 mL), a 0 °C, se les adicionó gota a gota, muy lentamente, el cloruro de cloroacetilo (2 mmol) disuelto en diclorometano (10 mL). La mezcla se mantuvo en agitación a 0 °C por 1-2 horas, monitoreando el progreso de la reacción por TLC. Al final de la reacción se llevó el pH hasta 7-8 con hidróxido de amonio. Se extrajo con diclorometano y los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.3.5. *p*-Nitrobenzoilación (Para el compuesto: 96). A una mezcla de la espiropiperidina (62) (1.49 g, 4.65 mmol) y NEt₃ (0.46 g, 1 mmol), en tolueno anhidro (20 mL), a 0 °C, se le adicionó, en pequeñas porciones, el cloruro de *p*-nitrobenzoilo (1.73 g, 9.30 mmol). La reacción ocurrió de forma inmediata. Al final de la adición se llevó el pH hasta 7-8 con hidróxido de amonio. Se extrajo con diclorometano y los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El residuo sólido se purificó en CC sobre alumina.

7.3.6. Síntesis de las 1-acil-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'-H) quinolinas] (100-109). Una mezcla de cualquiera de las amidas 89-99 (1.00 mmoles), formiato de amonio (5.00 mmol) y Pd/C al 10% (2.5 % molar), en metanol (20 mL), se calentó a reflujo por 7-15 minutos. Se filtró el catalizador y se retiró el disolvente. Los productos 100-109 se purificaron por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.4 Capítulo tercero

7.4.1. Síntesis de las 1-bencil-4-N-aril(bencil)aminopiperidinas (142-145). A cualquiera de las cetiminas 49, 50, 140 y 141 (0.03 mol) disueltas en metanol, se les adicionó borohidruro de sodio (0.09 mol) en porciones muy pequeñas y con agitación vigorosa. Finalizada la adición, se separó el disolvente, se adicionó 20 mL de agua y la masa de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). Los extractos orgánicos se unieron y se secaron sobre sulfato de sodio. Se separó el disolvente y el producto de la reacción se purificó por destilación fraccionada a presión reducida o por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.4.2. Formilación (Para los compuestos: 146, 149, y 155). Una solución de anhídrido acético fórmico, preparada a partir de anhídrido acético (2.00 mmoles), ácido fórmico (3.00 mmoles), y piridina (2 gotas), a 0 °C, se adicionó a las aminopiperidinas (142, 143 o 145) (1.00 mmoles), en una sola porción. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 0.5-1 hora. Al final de la reacción se llevó el pH a 7-8 con hidróxido de amonio y se extrajo con diclorometano (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se unieron, se lavaron con agua para eliminar la piridina, y se secaron sobre sulfato de sodio. Se separó el disolvente y el producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.4.3. Acetilación (Para los compuestos: 147, 149, 156). Las aminopiperidinas (146-145) (1.00 mmol) se calentaron a reflujo durante 1-2 hora con anhídrido acético (3.00 mmoles) en presencia de NEt₃ (2 gotas). El progreso de la reacción se monitoreó por TLC. Al final de la reacción el pH se llevó hasta 7-8 con hidróxido de amonio y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos se unieron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.4.4. Benzoilación (Para los compuestos: 148, 151 y 157). A una mezcla de cualquiera de las aminopiperidinas (142, 143 o 145) (1 mmol) y NEt_3 (1 mmol), en tolueno anhidro (20 mL), a 0 °C, se les adicionó gota a gota el cloruro de benzoilo (2 mmol), disuelto en tolueno (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 2-3 horas monitoreando el progreso de la reacción por TLC. Al final de la reacción se enfrió a 0 °C y se elevó el pH hasta 7-8 con hidróxido de amonio. Se extrajo con diclorometano y los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.4.5. Cloroacetilación (Para el compuesto 152). A la aminopiperidina 143 (2.00 g, 7.13 mmol) y NEt_3 (0.35 g, 3.5 mmol), en diclorometano anhidro (30 mL), a 0 °C, se le adicionó gota a gota, muy lentamente, el cloruro de cloroacetilo (1.69 g, 15 mmol) disuelto en diclorometano (20 mL). La mezcla se mantuvo en agitación a 0 °C por 1 hora, monitoreando el progreso de la reacción por TLC. Al final de la reacción se llevó el pH hasta 7-8 con hidróxido de amonio. Se extrajo con diclorometano y los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.4.6. *p*-Nitrobenzoilación (Para el compuesto: 153). A una mezcla de la aminopiperidina 143 (1.50 g, 5.35 mmol) y NEt_3 (0.27 g, 2.50 mmol), en tolueno anhidro (40 mL), a 0 °C, se le adicionó, en pequeñas porciones, el cloruro de *p*-nitrobenzoilo (1.99 g, 10.7 mmol). La reacción ocurrió de forma inmediata. Al final de la adición se llevó el pH hasta 7-8 con hidróxido de amonio. Se extrajo con diclorometano y los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.4.7. Síntesis de las *N*-(4-*aryl*(*bencil*))-*N*-(piperidin-4-*il*)amidas (158A-168A) y las 4-*N*-*aryl*(*bencil*)amino-1-*acil*piperidinas (158B-168B). Una mezcla de cualquiera de las amidas 146-157 (1.00 mmoles), formiato de amonio (5.00 mmol) y Pd/C al 10% (2.5 % molar), en metanol (20 mL), se calentó a reflujo por 5-30 minutos. Se filtró el catalizador y se retiró el disolvente. El producto se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.5. Capítulo cuarto

7.5.1. Procedimiento para el compuesto 172. A una solución de la piperidina 67 (0.42 g, 1.94 mmoles), trietilamina (0.20 g, 1.94 moles), en dimetilformamida (20 mL), se le adicionó cloruro de cloroacetilo (0.44 g, 3.88 mmoles), gota a gota, disuelto en 10 mL de DMF, a 0°C. La reacción se mantuvo en agitación a esta temperatura durante una hora. La masa de reacción se trató con agua y se llevó a pH = 8 con carbonato de sodio; se extrajo con éter etílico (3 x 10 mL). Las fases orgánicas se unieron y se lavaron con solución de cloruro de sodio acuoso. El extracto se secó sobre sulfato de sodio, se retiró el disolvente y el producto se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.5.2. Procedimiento para el compuesto 173. A una solución del derivado cloroacetilado 172 (0.12 g, 0.41 mmoles), en dimetilformamida (10 mL), se le adicionó carbonato de potasio sólido (0.11 g, 0.82 mmoles), y la piperidina recién destilada (0.07 g, 0.82 mmoles). Al terminar la adición la masa de reacción se trató con agua y se extrajo con éter etílico. Las fases orgánicas se lavaron con solución acuosa saturada de cloruro de sodio, y se secaron sobre sulfato de sodio. Se separó el disolvente y el residuo sólido se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.5.3. Procedimiento para la *Girgensohnina* 174. En un reactor del tamaño adecuado se pesó la piperidina (1.96 g, 0.023 moles), se adicionó 25 mL de acetonitrilo, el 4-hidroxibenzaldehído (2.56 g, 0.021 moles), y el tricloruro de indio (0.25 g, 1.13 mmoles). Se dejó en agitación durante media hora y transcurrido este tiempo se agregó el NaCN (1.54 g, 0.032 moles), en pequeñas porciones sólidas, y se dejó con agitación vigorosa toda la noche a temperatura ambiente. Finalizada la reacción, se adicionó agua helada (20 mL) y el sólido formado se filtró en un embudo capa filtrante, y se lavó con agua helada (5 x 10 mL). El sólido húmedo se introdujo en un desecador con KOH sólido durante varios días, cambiando periódicamente las granallas del desecante, hasta eliminar toda la humedad del producto. El alcaloide se purificó por cromatografía en columna rápida sobre alúmina. La preparación de los compuestos: 175, 177 y 178 se prepararon con un procedimiento similar al anterior, pero utilizando piperonal en vez de 4-hidroxibenzaldehído en la preparación del compuesto 175. El compuesto 176 se obtuvo por desbencilación de la amina 142, en las condiciones descritas previamente en el capítulo I para los derivados espiránicos 67-71.

7.6. Capítulo quinto

7.6.1. Síntesis de las *N*-4-*aryl-N*-(piridin-4-ilmetil)aminas (196-203). Una mezcla equimolar de la anilina, o sus derivados, (0.056 moles) y el 4-piridincarboxaldehído (0.056 moles) en 100 mL de etanol anhidro, se calentó a reflujo durante 1-2 horas. Seguidamente el disolvente se retiró, y el sólido resultante se recristalizó a partir de mezclas de heptano/acetato de etilo. Algunas iminas se usaron directamente y sin purificación previa en las siguientes reacciones.

7.6.2. Síntesis del las *N*-4-*aril-N*-(piridin-4-ilmetil)aminas (204-210). A cualquiera de los compuestos 196-199 y 201-203 (5.00 mmoles) disueltos en metanol, se les adicionó borohidruro de sodio (15.0 mmol) en porciones muy pequeñas y con agitación vigorosa. Finalizada la adición, se separó el disolvente, se adicionó 20 mL de agua y la masa de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se unieron y se secaron sobre sulfato de sodio. Se separó el disolvente, y el producto de la reacción se purificó por destilación fraccionada a presión reducida o por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.6.3. Síntesis de las 4-*N*-*aril-N*-[1-(4-piridil)buten-3-il]aminas (211-215).
Procedimiento de Grignard. A una solución etérea (200 mL) de bromuro de alilmagnesio, preparada con 26 mL (36.3 g, 0.30 moles) de bromuro de alilo y 12.15 g (0.5 moles) de magnesio, se adiciono lentamente la aldimina (196-198, 200 o 203) (0.10 moles), disuelta en tetrahidrofurano anhidro. Después de la adición, la masa de reacción se enfrió a 0° C y se trató con agua y cloruro de amonio. Se separó rápidamente la fase orgánica y la masa acuosa se extrajo con éter (4 x 50 mL). Los extractos orgánicos se unieron y se secaron sobre sulfato de sodio. Se separó el disolvente y el producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina. **Procedimiento de Barbier:** A una mezcla de las aldiminas 196, 200 o 203 (1 mmol) e indio en polvo (170 mg, 1.5 mmol) en metanol absoluto (10 mL), se adicionó bromuro de alilo (365 mg, 3 mmol). La reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente hasta que el indio se disolvía (1-4 h), o hasta que la CCF indicara que la reacción finalizó. La masa de reacción se enfrió a 0 °C y se diluyó con solución acuosa saturada de NH₄Cl y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos se combinaron y secaron sobre Na₂SO₄. El producto se purifico por cromatografía de columna sobre alumina, usando las mezclas adecuadas de éter de petróleo/acetato de etilo como eluentes.

7.6.4. Síntesis de las 4-metil-2-(4-piridil)-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas (216-219), y la quinolina 220. A 2.0 g de cualquiera de los compuestos 211-215 disueltos en la mínima cantidad necesaria de diclorometano, se adicionó, a 0 °C, 4 mL de ácido sulfúrico al 85 % (v/v). La mezcla se calentó a 80-90 °C durante 1-5 horas con agitación vigorosa. La masa de reacción se vertió sobre hielo y se llevo a pH 12 con hidróxido de amonio concentrado. Se extrajo con diclorometano (4 x 25 mL). Los extractos orgánicos se unieron y se secaron sobre sulfato de sodio. Se separó el disolvente y el producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina. Para el compuesto 213, con grupo sustituyente metoxi, se usó ácido polifosfórico como catalizador de la reacción, en una relación p/p de 1:2.

7.6.5. Acilación de las aminas 210, 216 y 217. Los derivados piridínicos (210, 216 y 217) (1.00 mmoles) se calentaron a reflujo durante 1-2 hora con anhídrido acético (3.00 mmoles) en presencia de NEt₃ (2 gotas). El progreso de la reacción se monitoreo por CCF. Al final de la reacción el pH se llevo hasta 7-8 con hidróxido de amonio y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos se unieron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. Los productos de la reacción (compuestos 221, 222, y 223) se aislaron por cromatografía en columna sobre alúmina.

7.7 Capítulo sexto

7.7.1. Ensayos de actividad antifúngica

7.7.1.1. Microorganismos. Los microorganismos usados para la evaluación antifúngica fueron provistos por: i) La Colección de Cultivos Tipo de Estados Unidos (*American Type Culture Collection*, ATCC, Rockville, MD): *Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Aspergillus flavus*

ATCC 9170, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, *Aspergillus niger* ATCC 9029, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972. ii) Por el Centro de Referencia en Micología (C, CEREMIC), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Suipacha 531-(2000)-Rosario, Argentina: *Candida tropicalis* C 131, *Trichophyton rubrum* C 110, *Trichophyton rubrum* C 113, *Trichophyton rubrum* C 133, *Trichophyton rubrum* C 135, *Trichophyton rubrum* C 136, *Trichophyton rubrum* C 137, *Trichophyton rubrum* C 140, *Microsporum canis* C 112, *Microsporum gypseum* C 115, *Epidermophyton floccosum* C 114, *Trichophyton mentagrophytes* C 108, *Trichophyton mentagrophytes* C 364, *Trichophyton mentagrophytes* C 539, *Trichophyton mentagrophytes* C 738. iii) Por el Instituto Malbran (IM), Buenos Aires, Argentina: *Cryptococcus neoformans* IM 983040 (Díbelo), *Cryptococcus neoformans* IM 972724 (Agula 2306), *Cryptococcus neoformans* IM 042074 (Vigo 5888), *Cryptococcus neoformans* IM 983036 (Martinez 1456), *Cryptococcus neoformans* IM 00319 (Figuroa 2567), *Cryptococcus neoformans* IM 972751 (Melgarejo 2719), *Cryptococcus neoformans* IM 031631 (Paz 5220), *Cryptococcus neoformans* IM 031706 (Paz 3778/2), *Cryptococcus neoformans* IM 961951 (Ambrosini 399), *Cryptococcus neoformans* IM 052470 (Señorans N 287).

7.7.1.2. Medio de cultivo. Se utilizó Saboreau 2x: Se pesó en un recipiente adecuado 2.0 g de peptona de carne, 4.0 g de glucosa y 2.0 g de extracto de levadura, se agregó agua destilada hasta completar el 100 mL de volumen y se esterilizó la solución.

7.7.1.3. Preparación de los inóculos. El inóculo es la forma en la que se incorporan los hongos a los ensayos antifúngicos. Para su preparación se utilizaron estructuras del hongo discretas fácilmente cuantificables (levaduras para hongos levaduriformes y conidias generadas por reproducción asexual para hongos filamentosos). Se realizó el recuento en una cámara de Neubauer bajo microscopio, y se ajustó a una concentración final de 1×10^4 - 1×10^6 levaduras (ó

conidias, o UFC)/mL. Las suspensiones se conservaron en viales a 4 °C. La viabilidad de estos inóculos fue evaluada mediante repiques periódicos.

7.7.1.4. Procedimiento para los hongos levaduriformes. Una ó dos colonias de un cultivo de la levadura obtenido por incubación durante 48 h a 28°C en Sabouraud-glucosa, se transfirieron a un tubo conteniendo agua destilada estéril. Se realizó el recuento de microorganismos en cámara de Neubauer y se diluyó el inóculo hasta alcanzar una concentración final de 1×10^4 - 1×10^6 levaduras/mL.

7.7.1.5. Procedimiento para los hongos filamentosos. Para inducir la formación de conidias se hicieron crecer los hongos filamentosos en un medio de agar papa-dextrosa a 28-30 °C por 7-14 días. Se desprendió el hongo de la superficie del tubo con un gancho estéril y el micelio se transfirió a un erlenmeyer que contenía agua destilada estéril y perlas de vidrio. Se agitó por rotación durante 5 min, y se filtró a través de gasa estéril contenida en un embudo de vidrio. Las conidias se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 15 min, y se eliminó el sobrenadante, resuspendiendo el sedimento en agua destilada (x3). Una gota de la suspensión de conidias se contaron en una cámara de Neubauer, y si era necesario se diluía hasta alcanzar una concentración final de 1×10^4 - 1×10^6 conidias/mL.

7.7.1.6. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). El ensayo se realizó en medio líquido, por el método de dilución en caldo (Saboreau 2x), en microplacas de 96 pocillos con un volumen final de 200 µl, siguiendo los lineamientos del Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos para levaduras M27-A2 (NCCLS, 2002-a) y para hongos filamentosos M38A (NCCLS, 2002-b).

Se usó Ketoconazol (Janssen Pharmaceutica), Anfotericina B (Sigma Chemical Co.) y Terbinafina (Novartis), Fluconazol (Pfizer), Itraconazol (Janssen-Cilag), 5-

Fluocitosina y Voriconazol (Pfizer) como controles positivos. Los ensayos se repitieron por cuadruplicado.

Se definió la **CIM** (o CIM₁₀₀): como la mínima concentración de compuesto puro que fue capaz de inhibir totalmente el crecimiento del hongo después del tiempo de incubación.

7.7.1.7. Determinación de la Concentración Fungicida Mínima (CFM). Después de determinar la CIM por el método de microdilución en caldo, se tomó una alícuota de 50 µl de cada pocillo donde no hubo desarrollo fúngico y se colocó en tubos sobre 150 µl de Agar-Sabouraud glucosa. Se incubó la nueva serie a 28 °C y se observó si hubo crecimiento fúngico. El ensayo fue realizado en medio sólido (Agar-Sabouraud) en tubos de Kahn con un volumen final de 500 µl. Se incubaron los tubos durante 24, 48 ó 72 h hasta 15 días a 28-30 °C (de acuerdo con crecimiento fúngico). Los ensayos se realizaron por triplicado. Se definió la CFM como la mínima concentración de compuesto que produjo la muerte del hongo.

7.7.2. Ensayo de inhibición *in vitro* de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE).

Se colocaron 50 µl de una solución del compuesto a probar (en concentraciones seriadas desde 1×10^{-3} hasta 1×10^{-7} M), disuelto en buffer fosfato salino y 50 µl de la AChE (0.25 U/mL). La placa se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y se adicionaron 100 µL de la solución sustrato de pH 7.5. A los cinco minutos de iniciada la reacción se leyó la absorbancia, a 412 nm, en un lector de microplacas VERSAmax. Se usó galantamina y fisostigmina como compuestos de referencia. Los ensayos se realizaron por sextuplicado. Los cálculos de las IC₅₀ y las gráficas se realizaron con el software SoftMax Pro 5.2 de Molecular Devices.

7.7.3. Ensayo de decoloración del radical ABTS^{•+}. Método propuesto en la literatura por Re, et al. La solución de ABTS^{•+} se diluyó con etanol hasta alcanzar una absorbancia de 0,700 (\pm 0,20) a 734 nm. Se prepararán soluciones *stock* de las sustancias de interés, las cuales se diluirán hasta que, después de introducir una alícuota de 30 μ L de estas soluciones a la nueva solución de ABTS^{•+} (3 mL), se produzca una inhibición entre 20-80% de la absorbancia del blanco. Después de la adición de 30 μ L del posible antioxidante a la solución diluida de ABTS^{•+} en etanol, la absorbancia se leyó 1 min después de la mezcla inicial hasta 6 min.

8. CONCLUSIONES

1. Se diseñó y desarrolló una original y eficiente ruta de cuatro etapas, para preparar el núcleo de las 1-*H*-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolinas] a partir de la 1-bencil-4-piperidona y anilinas, reactivos económicos y comercialmente disponibles. El método tiene siguientes ventajas: condiciones suaves de reacción, excelentes rendimientos y simplicidad en su desarrollo.
2. Durante este desarrollo se encontraron las condiciones óptimas del proceso de desbencilación con el sistema $\text{HCOO}^-\text{NH}_4^+/\text{Pd}/\text{C}$, reduciendo considerablemente el tiempo de reacción y simplificando el tratamiento de la masa de reacción.
3. Todos los precursores y los productos finales del esquema desarrollado fueron analizados por un conjunto de métodos físico-químicos, cuyos datos confirman las estructuras de los compuestos reportados.
4. Durante del análisis espectroscópico de series de los productos finales se encontró que la 1-*H*-4',5',7'-trimetil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolina] (**71**) presenta un equilibrio conformacional causado por los grupos voluminosos vecinales, el 5'-CH₃ y el 4'-CH₃.

5. Las nuevas 1-*H*-4'-metil-3',4'-dihidroespiro[piperidina-4,2'-(1'*H*)quinolinas] reúnen interesantes características físico-químicas y biológicas para ser empleadas en la metodología-DOS.
6. Por primera vez, fue detectado, estudiado y confirmado el proceso de transferencia de grupos acilo (tipo N \square N) dentro de una misma molécula.
7. Según los experimentos realizados, es posible que la migración del grupo acilo sea de tipo intramolecular.
8. La reacción de migración es fácil de realizar, económica y limpia, lo que hace a estos productos sustratos valiosos para acceder a complejos derivados piperidínicos.
9. La funcionalización de las espiropiperidinas con grupos amida, introdujo nuevos grados de complejidad estructural a estos heterociclos, por esto, la caracterización fue un trabajo bastante complejo, que requirió de una amplia variedad de experimentos de RMN para lograr la asignación correcta de todas las señales y sus correlaciones.
10. Gracias a la rígida arquitectura molecular que adoptó la amida **91**, en una relación tipo W, fue posible determinar su conformero más estable a temperatura ambiente. Estos estudios son muy importantes, porque de la conformación particular y la libertad conformacional que puede asumir un sistema, dependerá su interacción con los sistemas enzimáticos a nivel biológico y sus requerimientos (ej. la velocidad de reacción).

11. Durante esta etapa se prepararon diversas *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-*N*-aril(bencil)amidas apropiadas para el estudio comparativo de la migración de los grupos acilo. Mediante el análisis espectroscópico se obtuvieron nuevos datos físico-químicos de estas amidas piperidínicas, que serán útiles en la caracterización de nuevas moléculas de este tipo.
12. En el estudio de la desbencilación de las *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-*N*-aril(bencil)amidas se encontró que la migración de los grupos acilo tiene lugar, es novedosa y desconocida, al igual que en las espiropiperidinas.
13. Los hallazgos encontrados para los sistemas flexibles sometidos a desbencilación arrojaron la siguiente conclusión: en las *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-*N*-aril(bencil)amidas la migración transcurrió: a) preferentemente en las formamidas, b) rápidamente, c) no se encontraron evidencias de transposición de tipo intermolecular.
14. Los productos preparados son atractivos *sintones* para someterlos a estudios biológicos y químicos, por la diversidad de sitios reactivos y grupos funcionales que presentan en sus estructuras.
15. Por primera vez, fue detectado, estudiado y confirmado el proceso de transferencia de grupos acilo (tipo N \rightarrow N) dentro de una misma molécula.
16. Según los experimentos realizados, es posible que la migración del grupo acilo sea de tipo intramolecular.

17. La reacción de migración es fácil de realizar, económica y limpia, lo que hace a estos productos sustratos valiosos para acceder a complejos derivados piperidínicos.
18. La funcionalización de las espiropiperidinas con grupos amida, introdujo nuevos grados de complejidad estructural a estos heterociclos, por esto, la caracterización fue un trabajo bastante complejo, que requirió de una amplia variedad de experimentos de RMN para lograr la asignación correcta de todas las señales y sus correlaciones.
19. Gracias a la rígida arquitectura molecular que adoptó la amida **91**, en una relación tipo W, fue posible determinar su conformero más estable a temperatura ambiente. Estos estudios son muy importantes, porque de la conformación particular y la libertad conformacional que puede asumir un sistema, dependerá su interacción con los sistemas enzimáticos a nivel biológico y sus requerimientos (ej. la velocidad de reacción).
20. Utilizando dos reacciones simples tipo S_N2 se obtuvo la primera molécula híbrida de la serie piperidínica, la 4'-metil-1-(2-piperidin-1-ilacetil)-3',4'-dihidroespiro [piperidina-4,2'-(1'-H)quinolina] (**173**).
21. Usando el InCl₃ como catalizador (5% mol) se propuso una excelente modificación *one-pot* de la reacción de Strecker que permitió preparar el alcaloide girsensohnina en forma simple, eficiente y rápida.

22. Aplicando esta modificación desarrollada a la reacción de Strecker para la preparación de los análogos del alcaloide girsenosina, se logró demostrar su alcance sintético en la generación de una nueva serie de compuestos, guiada por un producto natural.
23. El análisis espectroscópico realizado para esta nueva serie de compuestos confirmó solidamente sus estructuras; la información espectroscópica adquirida será útil para los estudios fitoquímicos de las plantas que contienen estos tipos de alcaloides.
24. Se prepararon nuevas series de aminas estructuralmente diversas: *N*-aril-*N*-(4-piridilmetil)aminas y *N*-aril-*N*-[1-(4-piridil)but-3-enil]aminas (homoalilaminas), cuya estructura molecular fue confirmada por métodos espectrales.
25. Se realizaron dos métodos diferentes para la obtención de las *N*-aril-*N*-[1-(4-piridil)but-3-enil]aminas utilizando el magnesio y el indio como metales generadores de las especies alil-metal buscando mejorar las condiciones de su preparación. Al finalizar el estudio se reafirmó la eficiencia del procedimiento Grignard como un método práctico para la generación de nuevas homoalilaminas.
26. Se amplió el alcance sintético del método de construcción de las 1,2,3,4-tetrahidroquinolinas 2,4-disustituidas a partir de aldiminas, utilizando la reacción de hidroarilación intramolecular de aminoalquenos como etapa clave.
27. Teniendo los sistemas de las *N*-aril-*N*-(4-piridilmetil)aminas y 4-metil-2-(4-piridil)-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas, se analizó su reactividad frente a diversas

condiciones de reducción del presente anillo piridínico. En las condiciones probadas no fue posible obtener las moléculas deseadas.

28. La evaluación de la actividad antifúngica arrojó el descubrimiento de compuestos particularmente activos contra *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, los de mayor virulencia causantes de la mayor cantidad de infecciones sistémicas en humanos. Los estudios mostraron que ellos son fungicidas y no fungistáticos a bajas concentraciones, hallazgo importante para los candidatos a desarrollos de nuevos antifúngicos.
29. Se consiguió implementar la metodología de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, ensayo importante en la búsqueda de compuestos que pueden ser útiles para el desarrollo de fármacos para tratar la enfermedad de Alzheimer. Por suerte muchos de los compuestos probados presentaron actividades importantes en el orden de 10^{-5} M.
30. El desarrollo de importantes modificaciones a la metodología tradicional usada para medir la actividad anti-radicalaria condujo a resultados más confiables, solucionándose así el problema de amplios rangos en los valores y/o la subestimación de la capacidad captadora de radicales, logrando de esta forma determinar el valor verdadero de la *capacidad antioxidante total*, que permitirá una correcta evaluación y utilización de los antioxidantes.
31. El *screening* por microdilución en placas permitió hacer un cribado de un gran número de muestras en poco tiempo, con un gran ahorro en las cantidades de reactivos, disolventes, uso de equipos y lo más importante, con mínimas cantidades de sustancia.

32. La evaluación de los compuestos preparados en esta investigación dio como resultado, el descubrimiento de estructuras con actividad antioxidante, muy superior en algunos casos, a los antioxidantes comerciales.
33. Es posible proponer al derivado espiropiperidínico **62** como cabeza de serie para el desarrollo de un fármaco dual contra la enfermedad de Alzheimer, con actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa y poderosa actividad antioxidante.

9. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, R. Hydrogenolysis of benzyl groups attached to oxygen, nitrogen, or sulphur. *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, New York, **1967**, 5, pp. 263-326.

AKASOFU, S.; KIMURA, M.; KOSASA, T.; OGURA, H. and SAWADA, K. Protective effect of donepezil in primary-cultured rat cortical neurons exposed to *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) toxicity. *Eur. J. Pharmacology* **2006**, 530, pp. 215-222.

ALVARO, G. and SAVOIA, D. Addition of organometallic reagents to imines bearing stereogenic N-substituents. stereochemical models explaining the 1,3-asymmetric induction. *Synlett* **2002**, pp.651-673.

ANDERSEN, K.; LILJEFORS, T.; HYTTEL, J. and PERREGAARD, J. Serotonin 5-HT₂ receptor, dopamine D₂ receptor, and α_1 adrenoceptor antagonists. Conformationally flexible analogues of the atypical antipsychotic sertindole. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, pp. 3723-3738.

ANDREWS, P. C.; PEATT, A. C. and RASTON, C. L. Indium metal mediated synthesis of homoallylic amines in poly(propylene)glycol (PPG). *Green Chem.* **2004**, 6, pp. 119-122.

ANDREWS, P.C.; PEATT, A.C. and RASTON, C.L. Gallium metal mediated allylation of carbonyl compounds and imines under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, pp. 243-248.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S. and ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **2002**, 127, pp.183-198.

ARMOUR, D. R.; CHUNG, K. M. L.; CONGREVE, M.; EVANS, B. *et al.* Tetrazole NK1 receptor antagonists: The identification of an exceptionally potent orally active antiemetic compound. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, pp. 1015-1020.

ARNAO, M. B.; CANO, A. and ACOSTA, M. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Rad. Res.* **1999**, 31, pp. S89-96.

ARTS, M. J. T. J.; DALLINGA, J. S.; VOSS, H.-P.; HAENEN, R. M. M. G. and BAST, A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.* **2004**, 88, pp.567-570.

ARYA, P.; JOSEPH, R.; GAN, Z. and RAKIC, B. Exploring new chemical space by stereocontrolled diversity-oriented synthesis. *Chemistry & Biology* **2005**, 12, pp. 163-180.

ATHERTON, J. H.; BLACKER, J.; CRAMPTON, C. and GROSJEAN, C. The Strecker reaction: kinetic and equilibrium studies of cyanide addition to iminium ions. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, pp. 2567-2571.

AVENDAÑO, L. C. *Introducción a la Química Farmacéutica*. Segunda edición, McGraw- Hill, Madrid, **2000**, pp. 251-258.

BALDWIN, J. Rules for Ring Closure. Ciba Foundation Symposium 53: Further perspectives in organic chemistry, **1978**, Elsevier, New York, pp. 85.

BALDWIN, J. E. Rules for ring closure. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**, pp. 734-738.

BARBIER, P. *Compt. Rend.* **1898**, 128, pp. 110.

BARBOSA J. M. *et al.* Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2006**, 16, pp. 258-285.

BARLOCCO, D.; CIGNARELLA, G.; GIARDINA, G. A. M. and TOMA, L. The opioid-receptor-like 1 (ORL-1) as a potential target for new analgetics. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, pp. 275-282.

BARLUENGA, J.; TRINCADO, M.; RUBIO, E. and GONZÁLEZ, J. M. Intramolecular arylation reactions of alkenes: a flexible approach to chromans and tetrahydroquinoline derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, pp. 3416-3417.

BARNARD, E. A. The peripheral nervous system. Plenum, New York, **1974**, pp. 201-224.

BARREN, J. P.; BAGHEL, S. S. and MCCLOSKEY, P. J. Reductive dechlorination of chlorinated aromatics. *Synth. Commun.* **1993**, 23, pp. 1601-1609.

BARRETT-BEE, K. and RYDER, N. Biochemical aspects of ergosterol biosynthesis inhibition. Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy. Chapman and Hall, Nueva York, **1992**, pp. 410-436.

BARTIZAL, K.; GILL, C. J.; ABRUZZO, G. K. *et al.* In vitro preclinical evaluation studies with echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,82). *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, pp. 2326-2332.

BARTUS, R. T.; DEAN III, R. L.; BEER, B. and LIPPA, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **1982**, 217, pp. 408-414.

BA-SAIF, S.; LUTHRA, A. K. and WILLIAMS, A. "Concerted acetyl group transfer between substituted phenolate ion nucleophiles: variation of transition-state structure as a function of substituents. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, pp. 2647-2652.

BA-SAIF, S.; LUTHRA, A. K. and WILLIAMS, A. "Concertedness in acyl group transfer in solution: a single transition state in acetyl group transfer between phenolate and ion nucleophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, pp. 6362-6368.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, pp. 5648-5651.

BEDNAREK, M. A.; FEIGHNER, S. D.; PONG, S. -S. *et al.* Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, pp. 4370-4376.

BELL, I. M.; ERB, J. M.; FREIDINGER, R. M.; *et al.* Development of orally active oxytocin antagonists: studies on 1-(1-{4-[1-(2-methyl-1-oxidopyridin-3-ylmethyl)piperidin-4-yloxy]-2-methoxybenzoyl}piperidin-4-yl)-1,4-dihydroenz[d][1,3]oxazin-2-one (L-372,662) and related pyridines. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, pp. 2146-2153.

BESSMAN, S. P. and LIPMANN, F. The enzymatic transacetylation between aromatic amines. *Arch. Biochem. Biophys.* **1953**, 46, pp. 252-254.

BLOCH, R. Additions of organometallic reagents to C=N bonds: reactivity and selectivity. *Chem. Rev.* **1998**, 98, pp. 1407-1438.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **1958**, 181, pp. 1199-1200.

BOOT, J. R.; BOULET, S. L.; CLARK, B. P. *et al.* N-Alkyl-N-arylmethylpiperidin-4-amines: Novel dual inhibitors of serotonin and norepinephrine reuptake. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, pp. 2714-2718.

BOUZA, E. and MUÑOZ, P. Papel de la caspofungina. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.* **2002**, 1, pp. 38-42.

BOYD, B. Ongoing progress in the Alzheimer's disease arena. *Drug News Perspect* **2000**, 13, pp. 425-438.

BOYER, R. *Conceptos de Bioquímica*. Inter. Thomson Editores, México, **2000**, pp. 424-425.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E. and BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **1995**, 28, pp. 25-30.

BRIEGER, G. and NESTRICK, T. Catalytic transfer hydrogenation. *Chem. Rev.* **1974**, 74, pp. 567-580.

BRINE, G. A.; STARA, P. A.; YOUNG, L.; CARROLL, F. Y.; SINGH, P.; XU, H. and ROTHMAN, R. B. Enantiomers of diastereomeric *cis*-N-[1-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-3-methyl-4-piperidyl]-N-phenylpropanamides: synthesis, X-ray analysis, and biological activities. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, pp. 1547-1557.

BRINNER, K. M.; POWLES, M. A.; SCHMATZ, D. M. and ELLMAN, J. A. Potent 4-aminopiperidine based antimalarial agents. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, pp. 345-348.

BROWN, D. W.; MAHON, M. F.; NINAN, A. and SAINSBURRY, M. The synthesis of antioxidants showing selective affinity for low density lipoproteins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1997**, pp. 2329-2336.

BRUCKNER, R. *Advanced Organic Chemistry*. Harcourt/Academic Press, Massachusetts, **2002**, pp. 578-579.

BRUCKNER, R. *Advanced Organic Chemistry. Reaction Mechanisms*. Harcourt/Academic Press, San Diego, Estados Unidos, **2002**, pp. 309-312.

BUENGER J.; *et al.* An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials 1. *Internat. J. Cosmetic Sci.* **2006**, 28, pp. 135-146.

BULL, S. D.; DAVIES, S. G.; FENTON. *et al.* Chemoselective debenzoylation of N-benzyl tertiary amines with ceric ammonium nitrate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, pp. 3765-3774.

CACABELOS, R. *et. al.* Pharmacological treatment of Alzheimer disease: From psychotropic drugs and cholinesterase inhibitors to pharmacogenomics. *Drugs Today* **2000**, 36, pp. 415-499.

CALABRESE, V.; SCAPAGNINI, G.; COLOMBRITA, C. *et al.* Redox regulation of heat shock protein expression in aging and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress: a nutritional approach. *Amino Acids* **2003**, 25, pp. 437-444.

CAREY, F. A. Química Orgánica, tercera edición, McGraw Hill, Madrid-España, **1999**, pp. 974.

CARROLL, F. A. *Perspectives on structure and mechanism in organic chemistry*. Brooks/Cole Publishing Company, Pacific Grove, California, Estados Unidos, **1998**, pp. 323-325.

CHAN, T. H. and LU, W. Organometallic reactions in aqueous media. Indium-mediated allylation of sulfonimines. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, pp. 8605-8608.

CHANDRASEKAR, P. H. and MANAVATHU, E. K. Caspofungin. *Drugs Today* **2002**, 38, pp. 829-846.

CHEN, W.-Y. and LU, J. Silica sulfuric acid catalyzed one-pot synthesis of α -aminonitriles. *Synlett* **2005**, 15, pp. 2293-2296.

CHENG, K.-J. CHEN, J. and LIANG, G.-L. Taxiphyllin: a cyanogenic glucoside with tyrosinase inhibitory activity from the shoots of *Pleioblastus amarus*. *Natural product research and development* **2005**, 17, pp. 733-735.

CHOU, T. C. and LIPMANN, F. Separation of acetyl transfer enzymes in pigeon liver extract. *J. Biol. Chem.* **1952**, 196, pp. 89-103.

CHOU, T. C. and SOODAK, M. The acetylation of d-glucosamine by pigeon liver extracts. *J. Biol. Chem.* **1952**, 196, pp. 105-109.

CHOU, T.; KURAMOTO, M.; OTANI, Y. *et al.* Pinnaic acid and taupinnaic acid: Two novel fatty acids composing a 6-azaspiro[4.5]decane unit from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, pp. 3871-3874.

CHRYSTIUK, E. and WILLIAMS, A. A single transition state in the transfer of the methoxycarbonyl group between isoquinoline and substituted pyridines in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, pp. 3040-3046.

CHUNG, S-K.; RYOO, C. H. and YANG, H. W. *et al.* Synthesis and bioactivities of steroid derivatives as antifungal agents. *Tetrahedron* **1998**, 54, pp. 15899-15914.

COATES, G. E.; GREEN, M. L. H.; POWELL, P. and WADE, K. *Principios de Química Organometálica*, Ed. Reverté, Barcelona, **1975**, pp. 63.

CONLEY, R. T. and KNOPKA, W. N. The cyclization of N-phenylcinnamamides to 3,4-dihydro-4-phenylcarbostyrils with polyphosphoric acid. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, pp. 496-497.

CONTI-TRONCONI, B. M.; HUNKAPILLER, M. W.; LINDSTROM, J. M.; and RAFTERY, M. A. Subunit structure of the acetylcholine receptor from *Electrophorus electricus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1982**, 79, pp. 6489-6493.

CORNELY, O. A.; SCHMITZ, K. and AISENBREY, S. The first echinocandin: caspofungin. *Mycoses* **2002**, 3, pp. 56-60.

COSSY, J.; POITEVIN, C.; GOMEZ PARDO, D.; PEGLION, J.-L. and DESSINGES, A. Synthesis of spiro[benzazepine-2,4'-piperidine]. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, pp. 4554-4557.

COSSY, J.; POITEVIN, C.; GOMEZ PARDO, D.; PEGLION, J.-L. and DESSINGES, A. Synthesis of spiro[quinoline-2,4'-piperidines]. Heck versus radical reaction. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, pp. 2965-2968.

CUMMINGS, J. L. and ASKIN-EDGAR, S. Evidence for psychotropic effects of acetylcholinesterase inhibitors. *CNS Drugs* **2000**, 13, pp. 385-395.

DAKE, G. Recent approaches to the construction of 1-azaspiro[4.5]decanes and related 1-azaspirocycles. *Tetrahedron* **2006**, 62, pp. 3467-3492.

DALPOZZO, R.; DE NINO, A.; NARDI, M.; RUSSO, B. and PROCOPIO, A. Erbium(III) triflate: a valuable catalyst for the synthesis of aldimines, ketimines, and enamionones. *Synthesis* **2006**, pp. 1127-1132.

DALY, J. W.; GARRAFO, H. M. and SPANDE, T. F. *Alkaloids: Chemical and Biological perspectives*. Pelletier S. W. Ed. Pergamon-Elsevier, **1999**, 13, pp. 2-147.

DAS, B.; RAMU, R.; RAVIKANTH, B. and REDDY, K. R. (Bromodimethyl) sulfoniumbromide catalyzed one-pot synthesis of α -aminonitriles. *Synthesis* **2006**, pp. 1419-1422.

De ANGELIS, J.; GASTEL, J.; KLEIN, D. C. and COLE, P. A. Kinetic analysis of the catalytic mechanism of serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, pp. 3045-3050.

De ZWART, L. L.; MEERMAN, J. H. N.; COMMANDEUR, J. N. M. and VERMEULEN, N. P. E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad. Bio. Med.* **1999**, 26, pp. 202-226.

DE, S. K. Nickel (II) chloride catalyzed one-pot synthesis of α -aminonitriles. *J. Mol. Catalysis A: Chemical* **2005**, 225, pp. 169-171.

DE, S. K. and GIBAS, R. A. Bismuth trichloride catalyzed synthesis of α -aminonitriles. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, pp. 7407-7408.

DECKER, M.; KRAUS, B. and HEILMANN J. Design, synthesis and pharmacological evaluation of hybrid molecules out of quinazolinimines and lipoic acid lead to highly potent and selective butyrylcholinesterase inhibitors with antioxidant properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, pp. 4252-4261.

DENNING, D. Antifungals-Where are we headed? *Drug Plus Intern.* **2004**, 3, pp. 11-13.

DENONNE, F.; BIDET, S.; BURTON, M. *et al.* Discovery of new C3aR ligands. Part 2: Amino-piperidine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, p.3262-3265.

DERESINSKI, S. C. and STEVENS, D. A. Caspofungin. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, 36, pp. 1445-1457.

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. N.Y. Ed. Wiley-Interscience, **1997**, pp. 270-371.

DI DOMENICO, B. Novel antifungal drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, 2, pp. 509-515.

DING, H. and FRIESTAD, G. K. Asymmetric addition of allylic nucleophiles to imino compounds. *Synthesis* **2005**, pp. 2815-2829.

DOREY, G.; LOCKHART, B.; LESTAGE, P. and CASARA, P. New quinolinic derivatives as centrally active antioxidants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, pp. 935-939.

DRAKER, K.-ANN.; NORTHROP, D. B.; and WRIGHT, G. D. Kinetic mechanism of the GCN5-related chromosomal aminoglycoside acetyltransferase AAC(6')-II from *Enterococcus faecium*: evidence of dimer subunit cooperativity. *Biochemistry*, **2003**, 42, pp. 6565-6574.

DRAKER, K.-ANN. and WRIGHT, G. D. Molecular mechanism of the enterococcal aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase: role of GNAT-conserved residues in the chemistry of antibiotic inactivation. *Biochemistry* **2004**, 43, pp. 446-454.

DUFFIELD, A. M.; BUDZIKIEWICZ, H.; WILLIAMS, D. H. and DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. LXIV.1 A study of the fragmentation processes of some cyclic amines. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, pp. 810-816.

ELATI, C. R.; KOLLA, N.; CHALAMALA, S. R. *et al.* New synthesis of donepezil through palladium-catalyzed hydrogenation approach. *Synth. Commun.* **2006**, 36, pp. 169-174.

ELIEL, E. L. and WILEN, S. H. Stereochemistry of Organic Compounds. John Wiley & Sons. New York, **1994**, pp. 734-740.

ELLIOT, M. C. and WORDINGHAM, S. V. Reversibility in Lewis-acid promoted reactions of N-arylcinnamamides. *Synlett* **2004**, 5, pp. 898-900.

ELLMAN G. L.; COURTNEY, D.; ANDRES V. JR. and FEATHERSTONE R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **1961**, 7, pp. 88-95.

ENDERS, D. and REINHOLD, U. Asymmetric synthesis of amines by nucleophilic 1,2-addition of organometallic reagents to the CN-double bond. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, pp. 1895-1946.

ENDERS, D. and SHILVOCK, J. P. Some recent applications of α -aminonitrile chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, pp. 359-373.

EVERS, A.; HESSLER, G.; MATTER, H. and KLABUNDE, T. Virtual screening of biogenic amine-binding G-protein coupled receptors: comparative evaluation of protein- and ligand-based virtual screening protocols. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, pp. 5448-5465.

FANG, L.; KRAUS, B.; LEHMANN, J. *et al.* Design and synthesis of tacrine-ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, pp. 2905-2909.

FELDMAN; P. L. and BRACKEEN, M. F. A novel route to the 4-anilido-4-(methoxycarbonyl) piperidine class of analgetics. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, pp. 4207-4209.

FERREIRA, A.; PROENÇA, C.; SERRALHEIRO, M. L. M. and ARAÚJO, M. E. M. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* **2006**, 108, pp. 31-37.

FLETCHER, S. R.; BURKAMP, F.; BLURTON, P. *et al.* 4-(Phenylsulfonyl)piperidines: novel, selective, and bioavailable 5-HT_{2A} receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, pp. 492-503.

FOSTEL, J. M. and LARTEY, P. A. Emerging novel antifungal agents. *Drug Discovery Today* **2000**, 5, pp. 25-32.

FREIFELDER, M. and STONE, G. R. Reductions with ruthenium. II. Its use in the hydrogenation of pyridines. *J. Org. Chem.* **1961**, 26, pp. 3805-3808.

FRISCH, M. J.; *et al.* Gaussian 03, Revision D.1: Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **1995**.

GARBARINO, J. A. En: Introducción a la estereoquímica. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, **1975**, pp. 63-66.

GARCÍA, G. A. "Alzheimer: una pléyade de ideas terapéuticas". En: *Actualidad en Farmacología y Terapéutica*, **2003**, 1, pp. 65-66.

GARST, J. F. and SWIFT, B. Mechanism of Grignard reagent formation. Comparison of D-model calculations with experiment product yields. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, pp. 241-250.

GASTEIGER, J. and MARSILI, M. A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 34, pp. 3181-3184.

GASTEIGER, J. and MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity-A rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **1980**, 36, pp. 3219-3288.

GATES, M. and TSCHUDI, G. The synthesis of morphine. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, pp. 1109-1110.

GATES, M. and TSCHUDI, G. The synthesis of morphine. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, pp. 1380-1393.

GEDIG, T.; DETTNER, K. and SEIFERT, K. Short synthesis of stenusine and norstenusine, two spreading alkaloids from *Stenus* beetles (Coleoptera: Staphylinidae). *Tetrahedron* **2007**, 63, pp. 2670-2674.

GHOSH, S.; ELDER, A.; GUO, J. *et al.* Design, synthesis, and progress toward optimization of potent small molecule antagonists of CC chemokine receptor 8 (CCR8). *J. Med. Chem.* **2006**, 49, pp. 2669-2672.

GIBSON, G. E. and HUANG, H. -M. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **2005**, 26, pp. 575-578.

GÓMEZ, B. A.; MONTERO P. D.; NOGAL, R. J. J. *et al.* Antiparasitic properties of homoallylamines and related compounds. *Acta Parasitologica* **2006**, 51, pp. 73-78.

GÓMEZ, B. A.; MONTERO, P. D.; NOGAL, R. J. J. *et al.* Antiparasitic properties of homoallylamines and related compounds. *Acta Parasitologica* **2006**, 51, pp. 73-78.

GORDON, M. H. Chapter 2. The development of oxidative rancidity in foods. Antioxidants in Food. Practical Applications. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, Cambridge (Eng.) and Boca Ratón (USA), **2001**, pp.7-21.

GOTO, Y.; ARAI-OTSUKI, S.; TACHIBANA, Y. *et al.* Identification of a novel spiropiperidine opioid receptor-like 1 antagonist class by a focused library approach featuring 3D-pharmacophore similarity. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, pp. 847-849.

GREENE, T. W. and WUTS, P. G. M. Protecting Groups in Organic Synthesis, 3rd ed. Wiley, New York, **1999**.

GRIGNARD, V. *Compt. Rend.* **1900**, 130, pp. 1322.

GRINGAUZ, A. Introduction to medicinal chemistry. How drugs act and why. WILEY-VCH, New York, **1997**, pp. 309.

GROLL, A.; DE LUCCA, A. and WALSH, T. Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends in Microbiology* **1998**, 3, pp. 117-124.

HAASS, C. and SELKOE, D.J. Alzheimer's disease A technical KO of amyloid-? peptide. *Nature* **1998**, 391, pp. 339-340.

HAGER, K.; MARAHRENS, A.; KENKLIES, M. *et al.* Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer type dementia. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **2001**, 32, pp. 275-282.

HAMILTON, R. J.; KALU, C.; PRISK, E. *et al.* Chemistry of free radicals in lipids. *Food chem.* **1997**, 60, pp. 193-199.

HAMILTON, T. S. and ADAMS, R. Reduction of pyridine hydrochloride and pyridonium salts by means of hydrogen and platinum-oxide platinum black. XVIII. *J. Am. Chem. Soc.* **1928**, 50, pp. 2260-2263.

HANNA, P. E. Metabolic activation and detoxification of arylamines. *Curr. Med. Chem.* **1996**, 3, pp. 195-210.

HANNA, P. E. N-Acetyltransferases, O-acetyltransferases and N,O-acetyltransferases: enzymology and biactivation. *Adv. Pharmacol.* **1994**, 27, pp. 401-430.

HARBORNE, J. B. Introduction to ecological biochemistry. Academic Press, Fourth Edition, Amsterdam, **2002**, pp. 71-103.

HARUSAWA, S.; HAMADA, Y. and SHIOIRI, T. Diethyl phosphorocyanidate (DEPC), a novel reagent for the classical Strecker's α -aminonitriles synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, pp. 4663-4666.

HAY, P. J. and WADT, W. R. *Ab initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, pp. 299-310.

HEGDE, S. S.; CHANDLER, J.; VETTING, M. W.; YU, M. and BLANCHARD, J. S. Mechanistic and structural analysis of human spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase. *Biochemistry* **2007**, 46, pp. 7187-7195.

HEGDE, S. S.; DAM, T. K.; BREWER, C. F. and BLANCHARD, J. S. Thermodynamics of aminoglycoside and acyl-coenzyme A binding to the *Salmonella enterica* AAC(6')-Iy aminoglycoside N-acetyltransferase. *Biochemistry*, **2002**, 41, pp. 7519-7527.

HENGGE, A. C. and HESS, R. A. Concerted or stepwise mechanisms for acetyl group transfer reactions of p-nitrophenyl acetate? Transition state structures from isotope effects. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, pp. 11256-11263.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y. and HOWES, M-J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *En: Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, pp. 181-199.

HUTCHINS, R. O. and HUTCHINS, M. K. Comprehensive Organic Synthesis, Pergamon Press: Oxford, **1991**, 8 pp. 25-78.

HUTCHISON, A. J.; WILLIAMS, M.; ANGST, C. *et al.* 4-(Phosphonoalkyl)- and 4-(phosphonoalkenyl)-2-piperidinecarboxylic acids: synthesis, activity at N-methyl-D-aspartic acid receptors and anticonvulsant activity. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, pp. 2171-2178.

HWANG, Y.; GANGULY, S.; HO, A. K.; KLEIN, D. C. and COLE, P. A. Enzymatic and cellular study of a serotonin N-acetyltransferase phosphopantetheine-based products. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, pp. 2147-2155.

JACKMAN, L. M. Dynamic nuclear magnetic resonance spectroscopy. Academic Press, New York, **1975**, cap. 7.

JEAN-FRANÇOIS, E. D. and CHENAULT, J. Reactivity of arylcinnamates in polyphosphoric acid (PPA): cyclisation and rearrangement reactions. *Heterocycles* **1983**, 20, pp. 2401-2404.

JIA, C.; PIAO, D.; KITAMURA, T. and FUJIWARA, Y. New method for preparation of coumarins and quinolinones via Pd-catalyzed intramolecular hydroarylation of C-C triple bonds. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, pp. 7516-7522.

JIANG, X.-H.; SONG, Y.-L. and LONG, Y.-Q. Facile synthesis of 4-substituted-4-aminopiperidine derivatives, the key building block of piperazine-based CCR5 antagonists. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, pp. 3675-3678

JOHNSON, R. A. Conformations of alkylpiperidine amides. *J. Org. Chem.* **1968**, 33, pp. 3627-3632.

JOULE, J. A.; MILLS, K. and SMITH, G. F. Heterocyclic Chemistry. Chapman & Hall, London, Third edition, **1995**, pp. 72-119.

KÄLLSTRÖM, S. and LEINO, R. Synthesis of pharmaceutically active compounds containing a disubstituted piperidine framework. *Biorg. Med. Chem.* **2008**, 16, pp. 601-635.

KÄLLSTRÖM, S.; SALORANTA, T.; MINNAARD, A. J. and LEINO, R. Indium- and zinc-mediated Barbier-type allylations of an N,N-(dimethylsulfamoyl)-protected aldimine and subsequent deprotection. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, pp. 6958-6961.

KASRAEE, B. Depigmentation of brown Guinea Pig skin by topical application of methimazole. *Journal of investigative dermatology* **2002**, 118, pp. 205-207.

KATRITZKY, A. R.; RACHWAL, S. and RACHWAL, B. Recent progress in the synthesis of 1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Tetrahedron* **1996**, 52, pp. 15031-15070.

KATZUNG, B.G. *Farmacología Básica y Clínica*. El manual moderno, México, 4th edición, **1993**, pp. 259-390.

KEATING, G. M. and JARVIS, B. *Caspofungin*. *Drugs* **2001**, 61, pp. 1121-1129.

KELLY, S.; LAMB, D.; CORRAN, A.; BALDWIN, B. and KELLY, D. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14- α -methylergosta-8,24-(28)-dien-3- β -6- α -diol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 207, pp. 910-915.

KHALIL, E. M. and COLE, P. A. A potent inhibitor of the melatonin rhythm enzyme. *J. Am. Soc. Chem.* **1998**, 120, pp. 6195-6196.

KHAN, N. H.; AGRAWAL, S.; KURESHY, R. I. *et al.* Fe(Cp)₂PF₆ catalyzed efficient Strecker reactions of ketones and aldehydes under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, pp. 640-644.

KHARASCH, M. S. and REINMUTH, O. Grignard reactions of nonmetallic substances. Prentice-Hall, New York, **1954**.

KIM, D. and GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, 45, pp. 27-49.

KLEEMANN, A. and ENGEL, J. Pharmaceutical Substances. Thieme, New York, **1999**.

KLEIN, D. C. and WELLER, J. L. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* **1970**, 169, pp. 1093-1095.

KLEINMAN, E. F. and VOLKMANN, R. A. Reactions of allyl and propargyl/allenic organometallics with imines and iminium ions. *Comprehensive organic synthesis*, additions to C-X π bonds, Parte 2; Heathcock C. H. Pergamon Press, Oxford, **1991**, 2, Cap. 4.3, pp. 975-1006.

KOBAYASHI, S. and ISHITANI, H. Catalytic enantioselective addition to imines. *Chem. Rev.* **1999**, 99, pp. 1069-1094.

KOHEN, R. and NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* **2002**, 30, pp. 620-650.

KONTUSH, A. and SCHEKATOLINA S. Vitamin E in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, 1031, pp. 294-262.

KOŞAR, M.; GÖGER, F. and BAŞER, H. C. In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* jacq. from Turkey. *J. Agric. Food. Chem.* **2008**, 56, pp. 2369-2374.

KOUZNETSOV V., PALMA A., EWERT C. and VARLAMOV A. Some aspects of the reduced quinoline chemistry. *J. Heterocyclic Chem.* **1998**, 35, pp. 761-785.

KOUZNETSOV, V. Síntesis de nuevas espiro[tetrahydroquinolina-2,4'-piperidinas]. *Rev. Latinoam. Quím.* **1997**, 25, pp. 132-137.

KOUZNETSOV, V. V.; RIVERO, C. J. *et al.* Synthesis and antiparasitic properties of new 4-N-benzylamino-4-heteroarylbut-1-enes. 5. *Archiv der Pharmazie* **2005**, 338, pp. 32-37.

KOUZNETSOV, V. V.; SAAVEDRA A. L.; VARGAS M. L. Y. and CAZAR R. M. E. Synthesis of some secondary amine derivatives bearing a heteroaryl fragment. *J. Chil. Chem. Soc.* **2004**, 49, pp. 107-203.

KOUZNETSOV, V. V.; VARGAS M. L. Y. SORTINO, M. *et al.* Antifungal and cytotoxic activities of some *N*-substituted aniline derivatives bearing a heteroaryl fragment. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, pp. 794-809.

KOUZNETSOV, V. V. and VARGAS, M. L. Y. Recent developments in three component Grignard-Barbier-type reactions. *Synthesis* **2008**, pp. 491-506.

KOUZNETSOV, V. V.; VARGAS, M. L. Y. *et al.* 4-Aryl(benzyl)amino-4-heteroarylbut-1-enes as building blocks in heterocyclic synthesis. 4. Synthesis of 4,6-dimethyl-5-nitro(amino)-2-pyridylquinolines and their antiparasitic activities. *Archiv der Pharmazie* **2004**, 337, pp. 127-132.

KOUZNETSOV, V.; *et al.* An improved and stereoselective route to all-cis-2,6-disubstituted 4-hydroxypiperidines from accessible 4-substituted 4-N-benzylaminobut-1-enes. *Synthesis* **2002**, pp. 771-783.

KOUZNETSOV, V.; URBINA, J.; PALMA, A. *et al.* Synthesis and in vitro Antifungal Properties of 4-Aryl-4-N-arylamino-1-butenes and Related Compounds. *Molecules* **2000**, 5, pp. 428-430.

KUMAR, I. and PRATT, R. F. Transpeptidation reactions of a specific substrate catalyzed by the *Streptomyces* R61 DD-peptidase: the structural basis of acyl acceptor specificity. *Biochemistry* **2005**, pp. 9961-9970.

KUMAR, S. H. M.; ANJANEYULU, S.; REDDY, E. J. and YADAV, J. S. Indium mediated allylation of C=N compounds in aqueous media. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, pp. 9311-9314.

KURTZMAN, C. and FELL, J. The yeasts, a taxonomic study. Elsevier Sci. Amsterdam, **1998**, pp. 9-12.

KUZNETSOV, V. V. γ -Substituted piperidines as pharmaceuticals. *Khim.-Farm. Zh.* **1991**, 25, pp. 61-75. *Chem. Abstr.* **1991**, 115, 158846h.

KUZNETSOV, V. V.; ALIEV, A. E.; PALMA, A. et al. Synthesis, chemical transformation and structure of 1,2,3,4-tetrahydrospiro[quinoline-2-cycloalcanes]. *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1991**, pp. 947-952.

KUZNETSOV, V. V.; ALIEV, A. E. and PROSTAKOV, N. S. Method of preparation for the 4-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-2-(pyridyl)quinolines. Pat. URSS, No. 169429, 1991. Chem. Abstr. **1992**, 117, 48356.

KUZNETSOV, V. V.; ALIEV, A. E. and PROSTAKOV, N. S. Synthesis of 2-alkyl(aryl, hetearyl)-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Khim. Geterotsikl. Soed.* **1994**, pp. 73-78.

KUZNETSOV, V. V.; ANDREEVA, E. I. and PROSTAKOV, N. S. Synthesis and pesticide activity of new derivatives of 2,4-disubstituted 1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Khim. Farm. Zh.* **1995**, 29, pp. 61-62. Chem. Abst. **1996**, 124, 48.290a.

KUZNETSOV, V. V. and PROSTAKOV, N. S. γ -Piperidone imines and enamines in organic synthesis. *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1994**, pp. 3-17. Chem. Abstr. 1994, 121, 255518j.

KYM, P. R.; SOUERS, A. J. CAMPBELL, T. J. et al. Screening for cardiovascular safety: a structure-activity approach for guiding lead selection of melanin concentrating hormone receptor 1 antagonists. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, pp. 2339-2352.

LA PLANCHE, L. A. and ROGERS, M. T. Configurations in unsymmetrically N,N-disubstituted amides. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, pp. 3728-3730.

LAMBERT, J. B.; KESKE, R. G.; CARHART R. E. et al. The conformational rivalry between the nonbonding electron pair and the proton on nitrogen. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, pp. 3761-3767.

LANIGAN R. S. and YAMARIK T. A. Final report on the safety assessment of BHT. *Int. J. Toxicol.* **2002**, 21, pp. 19-94.

LAROCK, R. C. *Comprehensive Organic Transformations. A Guide to Functional Group Preparations*. Wiley-VCH, New York, 2^d edition, **1999**, 2583p.

LAU, E. Y.; FELTON, J. S. and LIGHTSTONE, F. C. Insights into the O-acetylation reaction of hydroxylated heterocyclic amines by human arylamine N-acetyltransferases: a computational study. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, 19, pp. 1182-1190.

- LAYER, R. W. The Chemistry of imines. *Chem. Rev.* **1963**, *63*, pp. 489-510.
- LEANDER, J. D. Comparing the effects of anileridine, alphaprodine and fentanyl on schedule-controlled responding by pigeons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1978**, *206*, pp. 624-635.
- LEDNICER, D. and MITSCHER, L. A. The organic chemistry of drug synthesis. John Wiley & Sons, New York, **1984**, *3*, pp. 186.
- LEE, C.; YANG, W. and PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density *k*. *Phys. Rev. B.* **1988**, *37*, pp. 785-789.
- LEE, K. C. -L.; LING, H. Y. and LOH, T. -P. Asymmetric synthesis of C-aliphatic homoallylic amines and biologically important cyclohexenylamine analogues. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, pp. 7787-7789.
- LEE, Y. S.; PETROV, R.; PARK, C. K.; *et al.* Development of novel enkephalin analogues that have enhanced opioid activities at both μ and δ opioid receptors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, pp. 5528-5532.
- LEGROS, J.; MEYER F.; COLIBOEUF, M. *et al.* Stereoselective Barbier-type allylation reaction of trifluoromethyl aldimines. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, pp. 6444-6446.
- LETSCHER-BRU, V. and HERBRECHT, R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, pp. 513-521.
- LEVY, G. C. and NELSON, G. L. Carbon-13 NMR study of aliphatic amides and oximes. Spin-lattice relaxation times and fast internal motions. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, pp. 4897-4901.
- LI, D. and CALDERONE, R. Antifungal drugs, targets and target discovery. Pathogenic fungi, host interaction and emerging strategies for control, Caister Academic Press (Norkfolk), **2004**, pp. 335-355.
- LI, K.; FORESEE, L. N. and TUNGE, J. A. Trifluoroacetic acid-mediated hydroarylation: synthesis of dihydrocoumarins and dihydroquinolones. *Organometallics* **2005**, *24*, pp. 2881-2883.
- LING, S.-K.; TANAKA, T. and KOUNO, I. New cyanogenic and alkyl glycoside constituents from *Phyllagathis rotundifolia*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, p.131-135.
- LIST, B. and YANG, J. W. The organic approach to asymmetric catalysis. *Science* **2006**, *313*, pp. 1584-1586.

LIU, L.; VON VETT, A.; ZHANG, N. *et al.* Arylamine *N*-acetyltransferases: characterization of the substrate specificities and molecular interactions of environmental arylamines with human NAT1 and NAT2. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, 20, pp. 1300-1308.

LIU, X.; ZHU, S. and WANG, S. Zinc-mediated radical reactions of per-(or poly)fluorophenyl aromatic aldimines in aqueous media. *Synthesis*, **2004**, pp. 683-691.

LOZANO, T. J. A.; GALINDO, C. J. D.; GARCÍA-BORRÓN, M. J. C. *et al.* *Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud*. McGraw-Hill, Madrid, **2000**, pp. 147-148.

LU, W. and CHAN, T. H. Indium-mediated organometallic reactions in aqueous media. Stereoselectivity in the crotylation of sulfonimines bearing a proximal chelating group. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, pp. 3467-3473.

LU, W. and CHAN, T. H. Organometallic reactions in aqueous media. Indium- and zinc-mediated allylation of sulfonimines. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, p.8589-8594.

LUNN, G. and SANSONE, E. B. Facile reduction of pyridines with nickel-aluminium alloy. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, pp. 513-517.

LYNCH, D. M.; COLE, W. Pyridylmethylnaphthalene and pyridylmethylindan derivatives. *J. Org. Chem.* **1966**, 31, pp. 3337-3341.

MAGALHAES, A.; TOZZI, A.; MAGALHAES, E. *et al.* Prenylated flavonoids from *Deguelia hatschbachii* and their systematic significance in *Deguelia*. *Phytochemistry* **2001**, 57, pp. 77-89.

MAGALHAES, M. L. B. and BLANCHARD, J. S. Kinetic mechanism of AAC(3)-IY aminoglycoside acetyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **2005**, 44, pp. 16275-16283.

MAGALHÃES, M. L. B.; VETTING, M. W.; GAO, F. *et al.* Kinetic and structural analysis of bisubstrate inhibition of the *Salmonella enterica* aminoglycoside 6'-*N*-acetyltransferase. *Biochemistry* **2008**, 47, pp. 579-584.

MAIER, C. A. and WÜNSCH, B. Novel spiropiperidines as highly potent and subtype selective σ -receptor ligands. Part I. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, pp. 438-448.

MAJINDA, R.; ABEGAZ, GB.; BEZABIH, M. *et al.* Recent results from natural products research at the University of Botswana. *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, pp. 1197-1208.

MARDER, S. R.; CHOULNARD, G. and DAVIS, J. M. The clinical actions of risperidone. *Biological Psychiatry* **1997**, 42, Suplemento 1, pp. 177S.

MARMORSTEIN, R. Structure of histone acetyltransferases. *J. Mol. Biol.* **2001**, 311, pp. 433-444.

MARTÍNEZ, R.; RAMÓN, D. J. and YUS, M. Catalyst-free multicomponent Strecker reaction in acetonitrile. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, pp. 8471-8474.

MASSOULIE, J.; BACOU, F.; BARNARD, E. et al. Cholinesterases. Structure, function, mechanism, genetics and cell biology. *ACS Conference proceedings series*, Washington, **1991**, pp. 2-398.

MASSOULIÉ, J. and BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* **1982**, 5, pp. 57-106.

MEHROTRA, M. M.; HEATH, J. A.; SMYTH, M. S. et al. Discovery of novel 2,8-diazaspiro[4.5]decanes as orally active glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, pp. 2037-2061.

MERTES, M. P. and FIN, A. J. Cofactor inhibitors of thymidylate synthetase. Piperidine and tetrahydroquinoline analogs of tetrahydrofolic acid. *J. Org. Chem.* **1970**, 13, p.276-279.

MIKAYA, A. I.; LANTSETOV, S. V.; KUZNETSOV, V. V. et al. Electron impact mass spectrometry of substituted benzyl(1-allylcycloalkyl)amines and their cyclization products. *Org. Mass Spectrom.* **1991**, 26 (9), pp. 763-764. *Chem. Abstr.* **1991**, 115, 231556.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIES, M. J. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, 84, pp. 407-412.

MIYAZAWA, M.; WATANABE, H.; UMEMOTO, K.; et al. Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, pp. 3431-3434.

MIYAZAWA, M. and YAMAFUJI, C. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, pp. 1765-1768.

MOERTEL, C. G.; FLEMING, T. R.; RUBIN, J. et al. A clinical trial of amygdalin (Laetrile) in the treatment of human cancer. *Engl. J. Med.* **1982**, 306, pp. 201-206.

MOLTZEN, E. K.; PERREGAARD, J. and MAIER, E. σ Ligands with subnanomolar affinity and preference for σ_2 binding site. 2. Spiro-joined benzofuran, isobenzofuran, and benzopyran piperidines. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, pp. 2009-2017.

MOREIRA, P. I.; SIEDLAK, S. L.; ALIEV, G. *et al.* Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer disease. *J. Neural Transm.* **2005**, 112, pp. 921-932.

MUKAI, K.; YOKOYAMA, S.; FUKUDA, K. and UEMOTO, Y. Kinetic studies of antioxidant activity of new tocopherol model compounds in solution. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, pp. 2163-2167.

NAKAMURA, S.; SATO, N.; SUGIMOTO, M. and TORU, T. A new approach to enantioselective cyanation of imines with Et_2AlCN . *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, pp. 1513-1516.

NEEDLEMAN, S. B. and CHANG KUO, M. C. Diels-Alder syntheses with heteroatomic compounds. *Chem. Rev.* **1962**, 62, pp. 405-431.

NGUYEN M. T.; KRYACHKO, E. S. and VANQUICKENBORNE L. Q. Chemistry of phenols, John Wiley & Sons, Chichester, **2003**, pp. 140.

NIKI, E. and NOGUCHI, N. Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method? *IUBMB Life* **2000**, 50, pp. 323-329.

OEHLSCHLAGER, A. and CZYZEWSKA, E. Rationally designed inhibitors of sterol biosynthesis. Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy" Chapman and Hall, Nueva York, **1992**, pp. 437-475.

OGATA, Y.; TAKAGI, K. and ISHINO, I. Photocyclization of acrylanilides. *J. Org. Chem.* **1971**, 36, pp. 3975-3979.

OKI, M. *Applications of dynamic NMR spectroscopy to organic chemistry*. VCH Publishers, Inc, Deerfield Beach, Florida, **1985**, 423p.

ONISHI, J.; MEINZ, M. and CUROTTO, J. *et al.* Discovery of novel antifungal (1,3) β -D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, pp. 368-377.

ORABI, K.; MOSSA, J. and EL-FERALY F. Isolation and characterization of two antimicrobial agents from mace (*Myristica fragrans*). *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, pp. 856-859.

OSKOOIE, H. A.; HERAVI, M. M.; SADNIA, A. *et al.* Ferric perchlorate-catalyzed one-pot synthesis of α -aminonitriles using trimethylsilylcyanide. *Synth. Commun.* **2007**, 37, pp. 2543-2548.

OZGEN, M.; REESE, N.; TULLIO JR. A. Z. *et al.* Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Agric. Food Chem.* **2006**, 54, pp. 1151-1157.

PASHA, M. A.; NANJUNDASWAMY, H. M. and JAYASHKARA, V. P. Cerium(III)chloride: A highly efficient reagent for the synthesis of α -aminonitriles. *Synth. Commun.* **2007**, 37, pp. 4371-4380.

PATAI, S. *The Chemistry of the Carbon-Nitrogen Double Bond*. Ed. Wiley Interscience, New York, **1970**.

PAULSEN, H. and TODT, K. Magnetic anisotropy of the amide group. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1966**, 5, pp. 899-900.

PERALEZ, E.; NEGREL, J-C. and CHANON, M. New perspectives in the formation of the Grignard reagent. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, pp. 5857-5860.

PÉREZ, P. and RIBAS, J. C. Cell wall analysis. *Methods* **2004**, 33, pp. 245-251.

PERRY, N. S. L.; HOUGHTON, P. J.; JENNER, P. *et al.* *Salvia lavandulaefolia* essential oil inhibits cholinesterase in vivo. *Phytomedicine* **2002**, 9, pp. 48-51.

PETERSEN, R. C.; THOMAS, R. G.; GRUNDMANN, M. *et al.* Vitamin E and Donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *New Eng. J. Med.* **2005**, 352, pp. 2379-2388.

PETRA, web site:<http://www2.chemie.uni-erlangen.de/services/petra/smiles.phtml>.

PETRAITIENE, R.; PETRAITIS, V. ; GROLL, A.H. *et al.* Antifungal efficacy of caspofungin (MK-0991) in experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits: pharmacokinetics, drug disposition, and relationship to galactomannan antigenemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, pp. 12-23.

PONGUTÁ, B. D. Preparación de N-fenilaminociclanos y su uso en las reacciones intramoleculares de Friedel-Crafts y de Heck”, **2000**, Tesis de pregrado, 86p.

PORTER, Q. N. *Mass Spectrometric of Heterocyclic Compounds*. John Wiley & Sons, 2nd ed. **1985**.

POVEDA, J. C.; VARGAS, L. Y. and KOUZNETSOV, V. V. X-ray powder diffraction data of 4-N-(4-methylphenyl)amino-4-(3'-pyridyl)-1-butene. *Powder Diffraction* **2003**, 18, pp. 244-247.

PRAKASH, G. K. S.; PANJA, C.; DO C. *et al.* Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate as a metal-free, homogeneous and strong Lewis acid catalyst for efficient one-pot synthesis of α -aminonitriles and their fluorinated analogues. *Synlett* **2007**, 15, pp. 2395-2399.

PRIOR, R. L. and CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad. Bio. Med.* **1999**, 27, p.1173-1181.

PROSTAKOV, N. S.; KUZNETSOV, V. V. and STASHENKO, E. Synthesis of 4-allyl-4-arylamino piperidines and their transformations into spiro[tetrahydroquinoline-2,4'-piperidines]. *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1989**, pp. 1514-1519; Chem. Abst. 1990, 113, 40424z.

PRYOR, W. A.; STRICKLAND, D. F. and CHURCH, D. F. Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous SDS [sodium dodecyl sulfate] micelle solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, pp. 2224-2229.

PUERTAS, M. M.; HILLEBRAND S.; STASHENKO E. and WINTERHALTER, P. In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour Fragr. J.* **2002**, 17, pp. 380-384.

RAFIEE, E. and AZAD, A. $K_5CoW_{12}O_{40} \cdot 3H_2O$: Heterogeneous catalyst for the Strecker-type aminative cyanation of aldehydes and ketones. *Synth. Commun.* **2007**, 37, pp. 1127-1132.

RAHALISON, L.; HAMBURGER, M. and HOSTETTMAN, K. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compound from higher plants. *Phytochem. Anal.* **1991**, 2, pp. 199-203.

RAM, S. and EHRENKAUFER, R. E. Ammonium formate in organic synthesis: a versatile agent in catalytic hydrogen transfer reductions. *Synthesis* **1988**, pp. 91-95.

RANU, B. C.; DEY, S. S. and HAJRA, A. Indium trichloride catalyzed one-step synthesis of α -amino nitriles by the three-component condensation of carbonyl compounds, amines, and potassium cyanide. *Tetrahedron* **2002**, 58, pp. 2529-2532.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, 26, pp. 1231-1237.

RICHARDSON, K. The Discovery of Fluconazole. *Contemporary Organic Synthesis* **1994**, pp. 125-132.

RIDDLE, B. and JENCKS, W. P. Acetyl-coenzyme A: arylamine N-acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, pp. 3250-3258.

ROVER, S. ; ADAM, G. ; CESURA, A. M. *et al.* High-affinity, non-peptide agonists for the ORL1 (orphanin FQ/nociceptin) receptor. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, pp. 1329-1338.

ROYER, L.; DE, S. K. and GIBAS, R. A. Iodine as a novel and efficient reagent for the synthesis of α -aminonitriles by the three-component condensation of carbonyl compounds, amines, and trimethylsilyl cyanide. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, pp. 4595-4597.

RUBIRALTA, M.; DIEZ, A.; BOSCH, J. and SOLANS, X. Studies on the synthesis of the indolo[2,3-a]quinolizidine system. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, pp. 5591-5597.

RUBIRALTA, M.; GIRALT, E. and DIEZ, A. *Piperidine. Structure, preparation, reactivity, and synthetic application of piperidine and its derivatives.* Elsevier, Amsterdam, **1991**, pp. 198-206.

RYLANDER, P. *Catalytic Hydrogenation in Organic Syntheses.* Academic Press, New York, **1979**, pp. 214.

SAKAMOTO, S.; IMAMOTO, T. and YAMAGUCHI, K. Constitution of Grignard reagent RMgCl in tetrahydrofuran. *Org. Lett.* **2001**, 3, pp. 1973-1975.

SAN BLAS, G. Antibióticos antifúngicos: hacia la búsqueda de antibióticos selectivos. *Revista Iberoamer. Micol.* **1991**, 8, pp. 28-34.

SAN BLAS, G. and NIÑO, V. G. Morphogenesis in *Candida albicans* and in other agents of systemic micoses. Pathogenic fungi. Host interactions and emergin strategies for control. Caister Academic Press (England), **2004**, pp. 167-220.

SARAL, R. *Candida* and *Aspergillus* infections in immunocompromised patients: An overview. *Rev. Infect Dis.* **1991**, 13, p.487-492.

SCHIFF, H. *Annals* **1864**, 131, pp. 118.

SCHNUR, D. M.; YUH, Y. H. and DALTON, D. R. A molecular mechanics study of

amide conformations. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, pp. 3779-3785.

SELITRENNIKOFF, C. Antifungal drugs: (1,3) β -glucan-synthase inhibitors; Springer-Verlag (Heidelberg), **1995**, pp. 1-12.

SMITH, M. B. and MARCH, J. Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure 5th edición. John Wiley and Sons, New York, **2001**, pp. 736.

SPINO, C. Recent developments in the catalytic asymmetric cyanation of ketimines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, pp. 1764-1766.

SPRUNG, M. A. A Summary of the reactions of aldehydes with amines. *Chem. Rev.* **1940**, 26, pp. 297-338.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. and JARAMILLO, B. E. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J. Chromatog.* **2004**, 125, pp. 93-103.

STASHENKO, E. RUIZ, C.; MUÑOZ, A. *et al.* Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia. *Nat. Prod. Comm.* **2008**, 3, pp. 563-566.

STEWART, W. E. and SIDDALL, T. H. Nuclear magnetic resonance studies of amides. *Chem. Rev.* **1970**, 70, pp. 517-551.

STUCHBURY, G. and MUNCH, G. Alzheimer's associated inflammation, potential drug targets and future therapies. *Journal of Neural Transmission* **2005**, 112, pp. 429-453.

SUN, X.-W.; XU, M.-H. and LIN, G.-Q. Room-temperature highly diastereoselective Zn-mediated allylation of chiral *N-tert*-butanesulfinyl imines: remarkable reaction condition controlled stereoselectivity reversal. *Org. Lett.* **2006**, 8, pp. 4979-4982.

SUNG, S.; YAO, Y.; URYU, K. *et al.* Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces A β levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* **2004**, 18, pp. 323-325.

SUVIRE, D.F.; SORTINO, M.; KOUZNETSOV, V. V. *et al.* Structure-activity relationship study of homoallylamines and related derivatives acting as antifungal agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, pp. 1851-1862.

SYKES, P. *Investigación de mecanismos de reacción en química orgánica*. Ed. Reverté, Barcelona, **1975**, pp. 58-62.

SZEWCZUK, L. M.; SALDANHA, A.; GANGULY, S. et al. De novo discovery of serotonin N-acetyltransferase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, pp. 5330-5338.

TABOR, H.; MEHLER, A. H. and STADTAMAN, E. R. The enzymatic acetylation of amines. *J. Biol. Chem.* **1953**, 204, pp. 127-138.

TALAGA, P. Beta-amyloid aggregation inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: dream or reality? *Mini Rev. Med. Chem.* **2001**, 1, pp. 175-186.

TAN, K. L. and JACOBSEN, E. N. Iridium-Mediated asymmetric allylation of acylhydrazones using a chiral urea catalyst. *Angew. Chem.* **2007**, 119, pp. 1315-1317.

TEODORI, E.; BALDI, E.; DEI, S. et al. Design, synthesis, and preliminary pharmacological evaluation of 4-aminopiperidine derivatives as N-type calcium channel blockers active on pain and neuropathic pain. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, pp. 6070-6081.

TOWERS, G. H. N.; MCINNES, A. G. and NEISH, A. C. The absolute configurations of the phenolic cyanogenetic glucosides taxiphyllin and dhurrin. *Tetrahedron* **1964**, 20, pp. 71-77.

URBINA, J.M.G.; CORTÉS, J.C.; PALMA, A. et al. Inhibitors of the fungal cell wall. Synthesis of 4-aryl-4-N-arylamine-1-butenes and related compounds with inhibitory activities on $\beta(1-3)$ glucan and chitin synthases. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, pp. 691-698.

VACHAL, P. and JACOBSEN, E. N. Structure-based analysis and optimization of a highly enantioselective catalyst for the Strecker reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, pp. 10012-10014.

VAN der SLUIS, M.; DALMOLEN, J.; DE LANGE, B. et al. Diastereoselective addition of allylzinc bromide to imines derived from (R)-phenylglycine amide. *Org. Lett.* **2001**, 3, pp. 3943-3946.

VANDEN BERGHE, D. and VLIETINK, A. Screening for antibacterial and antiviral agents. *Methods in Plant Biochemistry*. Volumen 6: Assays for Bioactivity; Dey, P.; Harborne, J. (eds.), Academic Press, London, **1991**, 3, pp. 52-53.

VANIER, G. S. Simple and efficient microwave-assisted hydrogenation reactions at moderate temperature and pressure. *Synlett* **2007**, pp. 131-135.

VARGAS, M. L. Y. Síntesis de 2-piridil-4-metilquinolinas funcionalizadas y sus intermediarios, como promisorios agentes antiparasitarios y fungicidas. Tesis de Maestría en Química. Universidad Industrial de Santander, **2001**, 224p.

VARGAS, M. L. Y.; CASTELLI, M. V.; KOUZNETSOV, V. V. et al. In vitro antifungal activity of new series of homoallylamines and related compounds with inhibitory properties of the synthesis of fungal cell wall polymers. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, pp. 1531-1550.

VARGAS, M. L. Y. and KOUZNETSOV, V. 4-N-Aryl(benzyl)amino-4-hetaryl-1-butenes as building blocks in heterocyclic synthesis. 3. A simple synthesis of fluorinated 4-methyl-2-(3-pyridyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinolines and their respective quinolines. *Heterocyclic Commun.* **2002**, 8, pp. 583-586.

VARGAS, M. L. Y. and KOUZNETSOV, V. V. An efficient synthesis of new 1-H-4'-methyl-3',4'-dihydrospiro [piperidine-4,2'(1'H)quinoline] scaffolds. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, pp. 2509-2512.

VARGAS, M. L. Y.; KOUZNETSOV, V.; STASHENKO, E. et al. 4-N-Aryl(benzyl)amino-4-hetaryl-1-butenes as building blocks in heterocyclic synthesis. 1. New route to 4,6-dimethyl-2-pyridylquinolines from the 4-N-p-methylphenylamino-4-pyridyl-1-butenes. *Heterocyclic Commun.* **2001**, 7, pp. 323-326.

VARLAMOV, A. V.; NIKITINA, E. V.; ZUBKOV, F. I. et al. Synthesis of 3-spiroannulated hexahydro-6,8a-epoxiisoquinolines. *Mendeleev Commun.* **2002**, 12, pp. 32-33.

VARTANYAN, R. S. 4-N-Substituted piperidines. *Khim.-Farm. Zh.* **1983**, 17, p.540-550. *Chem. Abstr.* **1993**, 99, 53629n.

VASUDEVAN, A.; LA MARCHE, M.; BLACKBURN, C. et al. Identification of ortho-amino benzamides and nicotinamides as MCHR1 antagonists. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, pp. 4174-4179.

VASUDEVAN, A.; VERZAL, M. K.; VODKA, D. et al. Identification of aminopiperidine benzamides as MCHR1 antagonists. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, pp. 3412-3416.

VETTING, M. W.; DE CARVALHO, S. L. P.; Yu, M. et al. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, 433, pp. 212-226.

VILAIVAN, T.; WINOTAPAN, C.; BANPHAVICHIT, V. *et al.* Indium-mediated asymmetric Barbier-type allylation of aldimines in alcoholic solvents: Synthesis of optically active homoallylic amines. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, pp. 3464-3471.

VILAIVAN, T.; WINOTAPAN, C.; SHINADA, T. and OHFUNE, Y. Indium mediated Barbier-type allylation of aldimines in alcoholic solvents. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, pp. 9073-9076.

VILLAGRA, S. E.; BERNINI, M. C. and RODRÍGUEZ, A. M. Conformational and electronic study of homoallylamines with inhibitory properties against polymers of fungal cell wall. *J. Mol. Structure (Theochem)* **2003**, 666-667, pp. 587-598.

VINA, J.; LLORET, A.; ORTI, R. and ALONSO, D. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine*, **2004**, 25, pp. 117-123.

VOLKMANN, R. A. Nucleophilic addition to imines and imine derivatives. *Comprehensive Organic Synthesis*, Additions to C-X π Bonds, Parte 1; Schreiber S. L., Pergamon Press, Oxford, **1991**, 1, Cap. 1.12, pp. 355-396.

WANG, H.; LIU, L.; HANNA, P. E. and WAGNER, C. R. Catalytic mechanism of hamster arylamine *N*-acetyltransferase 2. *Biochemistry* **2005**, 44, pp. 11295-11306.

WANG, H.; VATH, G. M.; GLEASON, K. J. and HANNA, P. E. Probing the mechanism of hamster arylamine *N*-acetyltransferase 2 acetylation by active site modification, site-directed mutagenesis, and pre-steady state and steady state kinetic studies. *Biochemistry* **2004**, 43, pp. 8234-8246.

WAGNER, E. C. A rationalization of acid-induced reactions of methylene-bis-amines, methylene-amines, and of formaldehyde and amines. *J. Org. Chem.* **1954**, 19, pp. 1862-1881.

WANG, Z.; YUN, S. and LI, C. -J. Gallium-mediated allylation of carbonyl compounds in water. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, pp. 5097-5099.

WATSON, P. S.; JIANG, B. and SCOTT, B. A diastereoselective synthesis of 2,4-disubstituted piperidines: scaffolds for drug discovery. *Org. Lett.* **2000**, 2, pp. 3679-3681.

WEINTRAUB, P. M.; JEFFREY, S. S.; KANE, J. M. and BORCHERDING, D. R. Recent advances in the synthesis of piperidones and piperidines. *Tetrahedron* **2003**, 59, pp. 2953-2989.

- WEITZMANN, I. and SUMMERBELL, R. The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* **1995**, 8, pp. 240-259.
- WHELAND, G. W. Resonance in Organic Chemistry. John Wiley & Sons, New York, **1955**, pp. 86-114. Ref. citada en: JOHNSON, R. A. Conformations of alkylpiperidine amides. *J. Org. Chem.* **1968**, 33, pp. 3627-3632.
- WIDMALM, G.; JANSSON, K.; PELLIJEFF, G. and SANDSTROM, D. Probing segmental mobility in the cyanogenic glycoside amygdalin by ¹³C solid-state NMR. *J. Phys. Chem. B.* **2003**, 107, pp. 11794-11798.
- WILLCOX, J. K.; ASH, S.L. and CATIGNANI, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, 44, pp. 275-295.
- WILLIAMS, A. *Concerted Organic and Bio-organic Mechanisms*. CRC Press, Boca Raton, **2000**, 286 p.
- WILLIAMS, A. and DOUGLAS, K. T. Elimination-addition mechanisms of acyl transfer reactions. *Chem. Rev.* **1975**, 75, pp. 627-649.
- WIRTH, T. New strategies to α -alkylated α -aminoacids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, pp. 225-227.
- XIE, J.-S.; HUANG, C. Q.; FANG, Y.-Y. and ZHU, Y.-F. A convenient synthesis of 1'-H-spiro-[indoline-3,4'-piperidine] and its derivatives. *Tetrahedron* **2004**, 60, pp. 4875-4878.
- YADAV, J. S.; REDDY, B. V. S.; EESHWARAI AH, B. and SRINIVAS, M. Montmorillonite KSF clay catalyzed synthesis of α -aminonitriles. *Tetrahedron* **2004**, 60, pp. 1767-1771.
- YADAV, J. S.; REDDY, B. V. S.; EESHWARAI AH, B.; SRINIVAS, M.; and VISHNUMURTHY, P. Three-component coupling reactions in ionic liquids: a facile synthesis of α -aminonitriles. *New J. Chem.* **2003**, 27, pp. 462-469.
- YAMAMOTO, Y. and ASAO, N. Selective reactions using allylic metals. *Chem. Rev.* **1993**, 93, pp. 2207-2293.
- YET, L. Recent developments in catalytic asymmetric Strecker-type reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, pp. 875-877.
- YEVICH, J. P. and YOCCA, F. D. Second generation antimigraine 5-HT_{1B/D} agonists: structure activity relationship and preclinical pharmacological distinctions. *Curr. Med. Chem.* **1997**, 4, pp. 295-312.

YU, F.; XU, D.; LEI, R.; LI, N. and LI, K'A. Free-radical scavenging capacity using the Fenton reaction with rhodamine B as the spectrophotometric indicator. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, pp. 730-735.

YURASHEVSKY, N. K. and STEPANOVA, N. L. Investigation of alkaloids of *Girgensohnia oppositiflora*. *J. Gen. Chem.* **1946**, 16, pp. 141-144. Chem. Abstr. **1946**, 40, 6754.

ZACHARIE, B.; MOREAU, N. and DOCKENDORFF, C. A mild procedure for the reduction of pyridine N-oxides to piperidines using ammonium formate. *En: J. Org. Chem.* **2001**, 66, pp. 5264-5265.

ZANDI, P. P.; ANTHONY, J. C.; KHACHATURIAN, A. S. *et al.* Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements. *Arch. Neurol.* **2004**, 61, pp. 82-88.

ZHANG, L.; XING, G. Q.; BARKER. *et al.* Alpha-lipoic acid protects rat cortical neurons against cell death induced by amyloid and hydrogen peroxide through the Akt signalling pathway. *Neurosci. Lett.* **2001**, 312, pp. 125-128.

ZUBKOV, F. I.; NIKITINA, E. V.; TURCHIN, K. F. *et al.* Intramolecular Diels-Alder reaction of 4-(N-furfuryl)aminobut-1-enes. New approach to the synthesis of 6,8a-epoxioctahydroisoquinoline(3-aza-11-oxatricyclo[6.2.1.0^{1,6}]undec-9-ene)derivatives *Russian Chemical Bulletin, International Edition* **2004**, 53, pp. 860-872.